



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

(11) PI 0615905-2 B1

(22) Data do Depósito: 05/09/2006

(45) Data de Concessão: 15/05/2018



(54) Título: SUBSTRATO PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DO REFERIDO SUBSTRATO

(51) Int.Cl.: A61L 27/00

(30) Prioridade Unionista: 09/09/2005 JP 2005-261840

(73) Titular(es): GUNZE LIMITED

(72) Inventor(es): YOSHITO IKADA; SHIGEHIKO SUZUKI; YOSHITAKE TAKAHASHI; KENJI TOMIHATA; TSUGUYOSHI TAIRA

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**SUBSTRATO PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DO REFERIDO SUBSTRATO**".

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção refere-se a um substrato para a regeneração de tecido. Especificamente, a presente invenção refere-se a um substrato de derme artificial, etc., para uso na regeneração de tecidos da pele em escaldaduras/queimaduras, lesões e imperfeições (defeitos) agudas da pele do mesmo tipo; e úlceras de decúbito e imperfeições (defeitos) crônicas da
10 pele do mesmo tipo.

Antecedentes da Técnica

Se o defeito da pele cobre uma área larga, o defeito deve ser tratado no estágio inicial. Um método para a regeneração da pele para a cicatrização de um defeito envolve tecidos artificiais de derme sendo regenerados *in vivo* através do implante de uma esponja de colágeno, que funciona
15 como um andaime, no corpo sem a semeadura de células (isso é referido como um método de produção de uma derme artificial). O método de produção de uma derme artificial requer enxertos de pele de espessura fina dividida ou o transplante de uma epiderme cultivada depois da regeneração de tecidos do tipo da derme. Em ambos os casos, a regeneração dos componentes da derme deve ser executada tão cedo quanto possível.
20

Um método de produção padrão de derme artificial envolve a obtenção de uma esponja de colágeno através de secagem por congelamento, e com a finalidade de controlar as taxas de degradação e de absorção *in vivo*, um tratamento de reticulação é usualmente realizado.
25

Um método para a promoção de regeneração de tecido da pele envolve a aplicação de um fator de crescimento, tal como um fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), à superfície da pele. Este método é um tanto quanto efetivo devido ao fator de crescimento aplicado que pode
30 ser absorvido através da pele. No entanto, a aplicação tem que ser realizada em todos os dias com a finalidade de manter o efeito. Por esse motivo, diversas tentativas têm sido feitas para encontrar um método de manter o efeito com somente a administração em uma vez pela liberação continuada dos

fatores de crescimento.

Por exemplo, Kawai et al., descreve que através da infusão de uma microesfera de gelatina impregnada com bFGF em uma pele artificial, a liberação continuada de bFGF e a construção dos tecidos da pele *in vivo* pode ser promovida (Documento Não Patente 1). Além disso, quando uma
5 célula de uma pele cultivada do tipo semeada é preparada, a constituição dos tecidos é promovida através da adição de uma microesfera de gelatina impregnada com bFGF (Documento Não Patente 2).

No entanto, esses métodos requerem a impregnação de bFGF
10 em uma microesfera, e ainda a infusão da microesfera assim preparada no interior de uma derme artificial em um local clínico, em uma operação complicada.

Se for possível conferir à própria pele artificial com a capacidade de liberar um fator de crescimento em uma maneira contínua, o único procedimento necessário em um local clínico é o da aplicação do fator de crescimento à derme artificial, simplificando grandemente o processo.
15

O fator de crescimento de célula usado de forma mais ampla nos campos clínicos atuais é o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF). O bFGF tem um ponto isoelétrico de 9,6 e pode aderir a uma gelatina que tenha um ponto isoelétrico de, por exemplo, 5,0 através de interação elétrica. Pela utilização de tais características, é possível a liberação do bFGF *in vivo* de uma maneira continuada com o tempo utilizando uma microesfera com bFGF absorvido, que pode ser preparada através da impregnação de uma microesfera feita de gelatina acida (que tenha um ponto isoe-
20 létrico de 5,0) com b GFG (Documento de Patente 1, e Documento não Patente 3).

No entanto, esse método requer manipulação, por exemplo, fazendo o bFGF ser absorvido em uma microesfera particulada, e em seguida fazendo a infusão da microesfera com o b FGF obtida dessa forma em um substrato. Isso torna o método complicado e difícil de ser usado em um local
30 clínico.

Se for preparado um material de derme artificial através de fazer

com que o bFGF seja absorvido em uma gelatina ácida, na qual o bFGF é absorvido com facilidade, um substrato que tenha uma capacidade de liberação continuada pode ser obtido. No entanto, a gelatina é inferior ao colágeno *in vivo* em termos de facilidade de infiltração de célula, etc., e por essa
 5 razão ela não é adequada para a regeneração de tecidos. Por consequência, é procurado um substrato que possa adsorver uma quantidade adequada de bFGF no qual as células em torno possam entrar com facilidade.

O Documento de Patente 2 descreve um dispositivo médico que contém gelatina e colágeno como os componentes essenciais, e que é irradiado com ultravioleta para ser reticulado. O substrato médico é usado de
 10 forma adequada como um veículo de cultura de células, para o cultivo de pele, etc.

Documento de Patente 1: Publicação de Patente Japonês Não Examinada Nº 2003-325652.

15 Documento de Patente 2: Publicação de Patente Japonês Não Examinada Nº 1999-47258.

Documento Não Patente 1: K; Kawai et al., Biomaterials, Vol. 21, págs. 489 a 199 (2000).

Documento Não Patente 2: Saso et al., Japanese Journal of
 20 Burn Injuries, Vol. 29, págs. 24 a 30.

Documento Não Patente 3: Y. Tabala et al., J. Controlled release, Vol. 312, págs. 189 a 1099 (1994)

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

PROBLEMA A SER SOLUCIONADO PELA INVENÇÃO

25 Um objetivo da presente invenção é o de prover um substrato para a regeneração de tecido que tenha a capacidade de liberar um fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e células de fatores de crescimento do mesmo tipo de uma maneira contínua, dentro dos quais as células possam entrar com facilidade e que sejam adequados para serem usados na
 30 regeneração de tecidos.

MEIOS PARA A SOLUÇÃO DO PROBLEMA

Os presentes inventores realizaram uma pesquisa extensa para

a solução dos problemas acima e descobriram que um substrato, que é obtido pela fabricação de um substrato poroso bioabsorvível que contenha colágeno e gelatina para adsorver o bFGF, é usado de forma adequada como um substrato para a regeneração de tecidos para a regeneração de tecidos da pele, devido ao substrato exibir uma excelente capacidade de liberar bFGF de uma maneira continuada, e o substrato permitir que células entrem com facilidade no interior do mesmo. A presente invenção foi conseguida com base nessa descoberta em estudos adicionais.

Especificamente a presente invenção proporciona os substratos de regeneração de tecidos e os processos de produção como abaixo:

Item 1. Um substrato para a regeneração de tecido compreendendo um substrato poroso bioabsorvível que contém colágeno e gelatina, o substrato poroso bioabsorvível tendo um fator de crescimento de célula dentro do mesmo.

Item 2. Um substrato para a regeneração de tecido de acordo com o Item 1, no qual o conteúdo de gelatina no substrato poroso bioabsorvível é de 1 até 70% em peso.

Item 3. Um substrato para a regeneração de tecido de acordo com os Itens 1 ou 2, no qual o fator de crescimento de célula é um fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF).

Item. 4. Um substrato para a regeneração de tecido de acordo com qualquer um dos Itens de 1 a 3, no qual a quantidade do fator de crescimento de célula liberada para o tampão de solução salina com fosfato (PBS) depois de ser imerso no PBS a 37°C durante três dias não é maior do que 7% em peso da quantidade total de fator de crescimento de célula inicialmente contido no substrato de regeneração de tecido.

Item 5. Um substrato para a regeneração de tecido de acordo com qualquer um dos Itens de 1 a 4, no qual a quantidade do fator de crescimento de célula liberada para o tampão de solução salina com fosfato (PBS) depois de ser imerso no PBS a 37°C durante três dias não é maior do que 15% em peso da quantidade total de fator de crescimento de célula inicialmente contido no substrato de regeneração de tecido.

Item 6. Um substrato para a regeneração de tecido de acordo com qualquer um dos Itens de 1 a 5, que tem poros com uma estrutura interconectada tendo um diâmetro médio de poros de 10 até 500 μm .

Item 7. Um substrato para a regeneração de tecido de acordo com qualquer um dos Itens de 1 a 6, que é degradado e absorvido *in vivo* dentro de três semanas.

Item 8. Um método para a produção de um substrato para a regeneração de tecido que compreende as etapas de:

secagem por congelamento de uma mistura aquosa que contém colágeno e gelatina;

submissão a substância secada por congelamento obtida dessa forma à reticulação; e

preparação da substância reticulada para conter um fator de crescimento de célula.

A presente invenção é explicada em detalhe abaixo.

I. Substrato de Regeneração de Tecido.

O substrato de regeneração de tecido da presente invenção compreende um fator de crescimento de célula em um substrato poroso bioabsorvível contendo colágeno e gelatina. O substrato de regeneração de tecido da presente invenção é um substrato amplamente usado na engenharia de tecidos, por exemplo, um substrato para ser usado na regeneração de pele, osso, cartilagem, miocárdio e/ou gordura. Especificamente ele é usado de forma adequada como um substrato para a regeneração de tecido para a pele (derme), isto é, um substrato de derme artificial.

O substrato poroso bioabsorvível usado como o substrato para a regeneração de tecido da presente invenção contém colágeno e gelatina como os componentes essenciais.

Não existe limitação com relação à gelatina, e os exemplos que podem ser usados incluem aqueles derivados a partir de osso, tendão, pele etc., de gado, porcos, frangos, salmão e similares. É de preferência que a gelatina tenha sido submetida a um tratamento ácido ou a um tratamento alcalino. A gelatina com tratamento ácido tem uma carga positiva, enquanto

que a gelatina com tratamento alcalino tem uma carga negativa. Com a utilização dessas cargas elétricas, diversos tipos de fatores de crescimento de célula podem ser imobilizados eletricamente, sem desnaturação, em um substrato poroso bioabsorvível que contenha gelatina com uma carga elétrica positiva ou negativa. Isso consegue uma liberação continuada dos fatores de crescimento de célula (por exemplo, o bFGF).

Não existe limitação com relação ao colágeno, e os exemplos que podem ser usados incluem aqueles derivados a partir de pele, tendão, etc., de bovinos, porcos, etc. Com a finalidade de eliminar a capacidade de formação de antígenos e aumentar a segurança, o atelocolágeno, que é obtido através do tratamento do colágeno com prótese, pepsina e enzimas similares para a eliminação dos telopeptídios o tanto quanto possível, é o de preferência. O atelocolágeno pode ser categorizado nos tipos de I a IV, e pode ser selecionado dependendo do uso do substrato. Quando o substrato é usado para pele cultivada ou curativo de lesão, o tipo I ou II é preferível, na medida em que eles têm componentes constituintes similares àqueles da derme. Por fazer um substrato poroso bioabsorvível que contém o colágeno, as células podem entrar com facilidade no substrato.

O conteúdo de gelatina no substrato poroso bioabsorvível é em geral de cerca de 1% em peso até cerca de 70% em peso, de preferência de cerca de 20% em peso até cerca de 60% em peso, e de mais preferência de cerca de 30% em peso até 50% em peso. Se o conteúdo de gelatina é indevidamente grande, é difícil para os tecidos circundantes entrar no substrato poroso bioabsorvível. Em contraste, se o conteúdo de gelatina é indevidamente pequeno, não pode ser obtida uma capacidade de liberação continuada suficiente uma vez que a adesão entre a gelatina e os fatores de crescimento de célula através da interação eletrostática se torna fraca. Se o conteúdo de gelatina cai dentro das faixas acima, as capacidades da gelatina e do colágeno podem ser totalmente exploradas, e pode ser obtido um grande efeito terapêutico.

Devido ao substrato poroso bioabsorvível funcionar como um substrato para a regeneração de tecidos tridimensionais, é de preferência

que o substrato poroso bioabsorvível tenha uma estrutura porosa, e que tenha muitos poros interconectados (poros pequenos contínuos) é de preferência específica. Através do emprego de tal estrutura, quando as células são semeadas no substrato de regeneração de tecido da presente invenção, as células podem entrar e aderir aos poros pequenos e se prolongarem de forma tridimensional; e quando o substrato é implantado sem a semeadura de células no mesmo, as células circundantes podem entrar com facilidade no substrato. Além do mais, esta estrutura torna possível suprir uma nutrição suficiente para as células aderentes e proliferar e diferenciar as células normalmente.

O diâmetro médio dos poros pequenos no substrato poroso bioabsorvível pode ser selecionado de forma adequada dependendo do tecido ou do órgão a ser regenerado, porém é de preferência de cerca de 10 μm até cerca de 500 μm , e de mais preferência de cerca de 50 μm até cerca de 300 μm . Se o diâmetro médio de poros é menos do que 10 μm , a capacidade de adesão celular pode ser marcadamente reduzida, uma vez que as células não podem entrar no substrato poroso bioabsorvível, ou as células aderentes podem não ser capazes de se prolongar de forma tridimensional. Se o diâmetro médio de poros exceder a 500 μm , a densidade das células se torna muito baixa, e os tecidos ou órgão podem não ser capazes de se regenerar.

A estrutura porosa do substrato poroso bioabsorvível acima mencionada é diretamente herdada para o substrato para a regeneração de tecido da presente invenção.

O substrato para a regeneração de tecido da presente invenção compreende fatores de crescimento de célula em um substrato poroso bioabsorvível que contém colágeno e gelatina. Não existe limitação com relação aos fatores de crescimento de células, contanto que eles promovam a vascularização e aumentem a atividade das células. Os exemplos dos mesmos incluem os fatores de crescimento de células que tenham uma ação de vascularização, tais como o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), um fator de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF), um fator de crescimen-

to de vascularização de célula endotelial (VEGF), um fator de crescimento de hepatócito (HGF), um fator de crescimento derivado do plasma (PDGF), angiopoietina, e um fator de crescimento de transformação. A modalidade preferível da presente invenção é o bFGF.

5 Não existe limitação com relação ao conteúdo do fator de crescimento de células no substrato de regeneração de tecido da presente invenção e pode ser selecionado de forma adequada dependendo dos tecidos e similares a serem regenerados. De preferência ele cai dentro da faixa a partir de cerca de 0,1 μg até cerca de 100 μg , e de mais preferência a partir
10 de cerca de 1 μg até cerca de 50 μg por 1 m^2 do substrato.

O substrato de regeneração de tecido da presente invenção tem uma excelente capacidade de liberar de forma estável os fatores de crescimento de célula de uma maneira continuada durante um longo período de tempo. Por exemplo, o bFGF promove a vascularização e aumenta a atividade das células, porém ele é instável *in vivo* e não pode alcançar os efeitos
15 biológicos esperados, quando usado em uma solução aquosa. No entanto, quando o substrato poroso bioabsorvível acima mencionado contém uma quantidade predeterminada de bFGF, a ação do bFGF pode ser mantida de forma estável através da liberação de uma maneira continuada.

20 O substrato de regeneração de tecido da presente invenção tem uma característica distinta, por exemplo, a quantidade de fator de crescimento de célula liberada para o tampão salino de fosfato (PBS) depois da imersão em PBS a 37°C durante três dias não é maior do que 7% em peso da quantidade total do fator de crescimento de célula inicialmente contido no
25 substrato de regeneração de tecido (de preferência não maior do que 6% em peso). A quantidade do fator de crescimento de célula liberada para o PBS depois de ser imerso no PBS a 37°C durante sete dias não é maior do que 15% em peso da quantidade total do fator de crescimento de célula inicialmente contido no substrato de regeneração de tecido (de preferência não
30 maior do que 13% em peso). De forma específica, quando o fator de crescimento de célula é o bFGF, a capacidade de liberação continuada acima mencionada pode ser atingida com uma capacidade de reprodução suficien-

te.

Além do mais, devido ao substrato de regeneração de tecido da presente invenção compreender um substrato bioabsorvível que contém colágeno e gelatina, ele pode ser degradado e absorvido *in vivo* dentro de três
5 semanas.

O limite mais baixo do teor de água no substrato de regeneração de tecido é de preferência de 90%, e o limite mais alto do mesmo é de preferência de 99,8%. O teor de água do substrato poroso bioabsorvível depende do grau de reticulação do substrato poroso bioabsorvível. Quando mais alto
10 o grau de reticulação, mais baixo é o teor de água. Se o teor de água for de menos do que 90%, o substrato de regeneração de tecido não pode ter flexibilidade suficiente para ser usado em implantes. No entanto, se o teor de água exceder a 99,8%, o substrato de regeneração de tecido obtido pode não ser capaz de manter uma resistência suficiente em uma solução de cul-
15 tura ou de tampão. De mais preferência, o limite mais baixo do teor de água é 95%, e o limite mais alto do mesmo é de 98%. O teor de água pode ser obtido na fórmula abaixo.

$$\text{Teor de água (\%)} = [(W_s - W_d)/W_s \times 100 (\%)]$$

Em que, W_s indica o peso (em uma base molhada) do substrato de regeneração de tecido imerso em um a solução salina tamponada com fosfato a
20 25°C durante uma hora, e W_d indica o peso (em uma base seca) do substrato depois de ser completamente secado com a utilização de um secador a vácuo.

II. Método para a produção de substrato para a regeneração de tecido.

25 O substrato para a regeneração de tecido da presente invenção é produzido através do procedimento que compreende as etapas de secar por congelamento uma mistura aquosa que contenha colágeno e gelatina;

reticulando a substância seca obtida dessa forma; e colocando um fator de crescimento de célula dentro da substância reticulada.

30 Primeiro a gelatina e o colágeno, acima mencionados são misturados para ser obtida uma solução aquosa. A solução aquosa é moldada em fluxo em um molde apropriado, e em seguida congelada a -40°C até -80°C

durante cerca de 30 minutos até cerca de 2 horas. Essa substância congelada é em seguida submetida à secagem por congelamento, depois do que é obtido um substrato poroso bioabsorvível esponjoso.

Segundo, a substância secada por pulverização obtida dessa forma é submetida a um tratamento de reticulação para ser obtido um substrato poroso bioabsorvível. Não existe limitação com relação ao método para a reticulação da substância secada por pulverização, e os exemplos dos mesmos incluem o método de reticulação por calor, método de irradiação de raios gama, método de irradiação ultravioleta, método de irradiação com feixe de elétrons, método de irradiação com raios-X, método de reticulação química com a utilização de um agente de reticulação, etc. Entre esses, o método de reticulação química com a utilização de um agente de reticulação é o de preferência específica, com a finalidade de ser alcançado um grau uniforme de reticulação através de todo o substrato.

O método de reticulação química pode ser especificamente executado através de, por exemplo, imersão da substância secada por congelamento em uma solução que contenha glutaraldeído ou um agente de reticulação similar. O excesso de glutaraldeído é removido por lavagem com água, e realizando outra secagem por pulverização, se necessária, sendo obtido por meio disso um substrato poroso bioabsorvível.

Em seguida, é adicionado um fator de crescimento de célula ao substrato reticulado obtido. Não existe limitação com relação ao método da mesma, por exemplo, uma solução aquosa que contenha o fator de crescimento de célula pode ser adicionada gota a gota ao substrato reticulado; o substrato reticulado pode ser impregnado com uma solução aquosa que contenha um fator de crescimento de célula; etc. Em seguida, uma etapa adicional de secagem pode ser executada, se necessária.

EFEITO DA INVENÇÃO

O substrato de regeneração de tecido da presente invenção (especificamente substrato de derme artificial) pode liberar um fator de crescimento de célula de forma estável de uma maneira continuada. Além do mais, uma vez que as células podem ser infiltradas com facilidade, a cicatri-

zação de lesões pode ser acelerada e o tempo de tratamento pode ser marcadamente encurtado.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

5 A Figura 1 é um gráfico que exhibe os resultados do Exemplo de Teste 1, em que a liberação continuada do bFGF *in vitro* foi examinada.

A Figura 2 exhibe uma imagem de um pedaço de tecido quando o conteúdo de gelatina da esponja do Exemplo de Teste 1 é de 0% em peso.

A Figura 3 exhibe uma imagem de um pedaço de tecido quando o conteúdo de gelatina da esponja do Exemplo de Teste 1 é de 10% em peso.

10 A Figura 4 exhibe uma imagem de um pedaço de tecido quando o conteúdo de gelatina da esponja do Exemplo de Teste 1 é de 30% em peso.

A Figura 5 exhibe uma imagem de um pedaço de tecido quando o conteúdo de gelatina da esponja do Exemplo de Teste 1 é de 50% em peso.

15 A Figura 6 exhibe uma imagem de um pedaço de tecido quando o conteúdo de gelatina da esponja do Exemplo de Teste 1 é de 100% em peso.

MELHOR MANEIRA PARA REALIZAR A INVENÇÃO

A presente invenção é explicada em detalhe abaixo com referência aos Exemplos, porém o âmbito da presente invenção não está limitado a esses exemplos.

Exemplo de Teste 1

(1) Produção da esponja mista de colágeno e de gelatina

25 Colágeno do tipo I derivado de tendão de porco e gelatina derivada de pele de porco foram misturados em uma solução aquosa. A solução aquosa foi colocada em um molde e congelada à -40°C durante uma hora e em seguida secada por congelamento, obtendo uma esponja.

30 A reticulação com calor foi realizada através do processamento dessa esponja a 110°C sob um vácuo. Depois da reticulação com calor, a esponja foi imersa em uma solução aquosa de 0,2% de glutaraldeído e 0,05 N de ácido acético para realizar a reticulação química. O excesso de glutaraldeído foi removido pela lavagem com água, e executando uma secagem por pulverização adicional, sendo obtida uma esponja de colágeno e gelatina

reticulada. A esponja reticulada obtida dessa forma foi usada em um experimento de liberação continuada *in vitro* realizado na etapa que se segue.

(2) Experimento de liberação continuada *in vitro*

As esponjas usadas no experimento tinham um conteúdo de gelatina de 0, 10, 30 ou 50% em peso. Cada uma dessas esponjas foi formada em um formato tendo um diâmetro de 12 mm e uma espessura de 3 mm. Uma solução aquosa de bFGF (100 μ l) foi adicionada às esponjas gota a gota de tal modo que 40 μ g de bFGF foi impregnado nas mesmas.

O experimento de liberação continuada foi executado de uma maneira tal que cada uma das esponjas foi imersa no PBS a 37°C e a quantidade de bFGF liberada no PBS foi avaliada através de ELISA, 1, 3, 5, 7 e 9 dias depois da iniciação da impregnação.

A Tabela 1 e a Figura 1 mostram a mudança na taxa de liberação do bFGF com a passagem do tempo quando o peso do bFGF contido em cada esponja imediatamente depois da imersão foi determinado como 100, isto é, taxa de eluição do bFGF (%).

Tabela 1

Dias	Conteúdo de gelatina (% em peso)			
	0	10	30	50
1	7,2	3,0	2,9	3,2
3	11,9	5,5	5,7	4,2
5	16,2	9,2	8,7	6,0
7	20,3	12,0	12,1	6,8
9	22,6	13,9	14,2	7,3

(3) Teste de implantação

As esponjas usadas no experimento tinham um conteúdo de gelatina de 0, 10, 30, 50 ou 100% em peso. Cada uma dessas esponjas foi formada em um formato tendo um diâmetro de 12 mm e uma espessura de 3 mm. Uma solução aquosa de bFGF (100 μ l) foi adicionada às esponjas gota a gota de tal modo que 40 μ g de bFGF foi impregnado nas mesmas. Essa esponja foi implantada em uma imperfeição de espessura total da pele no dorso de uma cobaia (porquinho da Índia).

As Figuras de 2 a 6 exibem imagens de pedaços de tecido depois da implantação.

Na esponja que tinha um conteúdo de gelatina de 100% em peso foi observada pouca infiltração dos tecidos circundantes dentro das células, e uma imagem de "crescimento para baixo", isto é, as células entrando por baixo da esponja, também foi observado. Quanto mais alto o conteúdo de colágeno, maior a infiltração das células e excelente regeneração do tecido pode ser observada. No entanto, quando o conteúdo de colágeno foi de 100% em peso, a capacidade de liberação continuada dos fatores de crescimento de célula foi reduzida. Com a finalidade de exibir uma capacidade de liberação continuada do fator de crescimento de célula suficiente, sem impedir a infiltração dos tecidos circundantes, é essencial ter um teor de gelatina apropriado.

REIVINDICAÇÕES

1. Substrato para regeneração de tecido, caracterizado pelo fato de que compreende um substrato poroso bioabsorvível que contém colágeno e gelatina, o substrato poroso bioabsorvível tendo dentro dele um fator de crescimento de célula, o substrato poroso bioabsorvível tendo poros com estrutura interconectada tendo um diâmetro médio de poros de 10 até 500 µm, e o substrato poroso bioabsorvível sendo obtido por secagem por congelamento de uma solução misturada aquosa que contém colágeno e gelatina.
2. Substrato para regeneração de tecido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o teor de gelatina no substrato poroso bioabsorvível é de 1 até 70% em peso.
3. Substrato para regeneração de tecido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o fator de crescimento de célula é um fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF).
4. Substrato para regeneração de tecido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a quantidade do fator de crescimento de célula liberada para o tampão de solução salina com fosfato (PBS) depois de ser imerso no PBS a 37°C durante três dias não é maior do que 7% em peso da quantidade total de fator de crescimento de célula inicialmente contido no substrato para regeneração de tecido.
5. Substrato para regeneração de tecido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a quantidade do fator de crescimento de célula liberada para o tampão de solução salina com fosfato (PBS) depois de ser imerso no PBS a 37°C durante sete dias não é maior do que 15% em peso da quantidade total de fator de crescimento de célula inicialmente contido no substrato para regeneração de tecido.
6. Substrato para regeneração de tecido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato poroso bioabsorvível é quimicamente reticulado.
7. Substrato para regeneração de tecido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é degra-

dado e absorvido *in vivo* dentro de três semanas.

8. Substrato para regeneração de tecido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato para regeneração de tecido é produzido pelo processo compreendendo as etapas de secagem por
5 congelamento de uma mistura aquosa que contém colágeno e gelatina, reticulação da substância seca assim obtida, e colocação do fator de crescimento de célula dentro da substância reticulada.

9. Método para a produção de um substrato para regeneração de tecido, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:
10 secagem por congelamento de uma mistura aquosa que contém colágeno e gelatina;
 submetendo a substância secada por congelamento assim obtida à reticulação; e
 colocando o fator de crescimento de célula dentro da substância
15 reticulada.

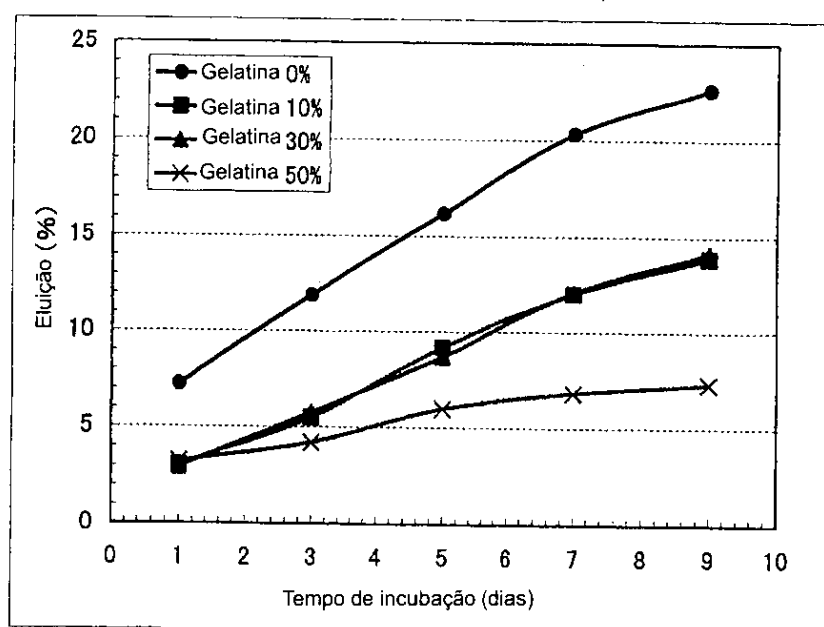
Fig.1

Fig.2

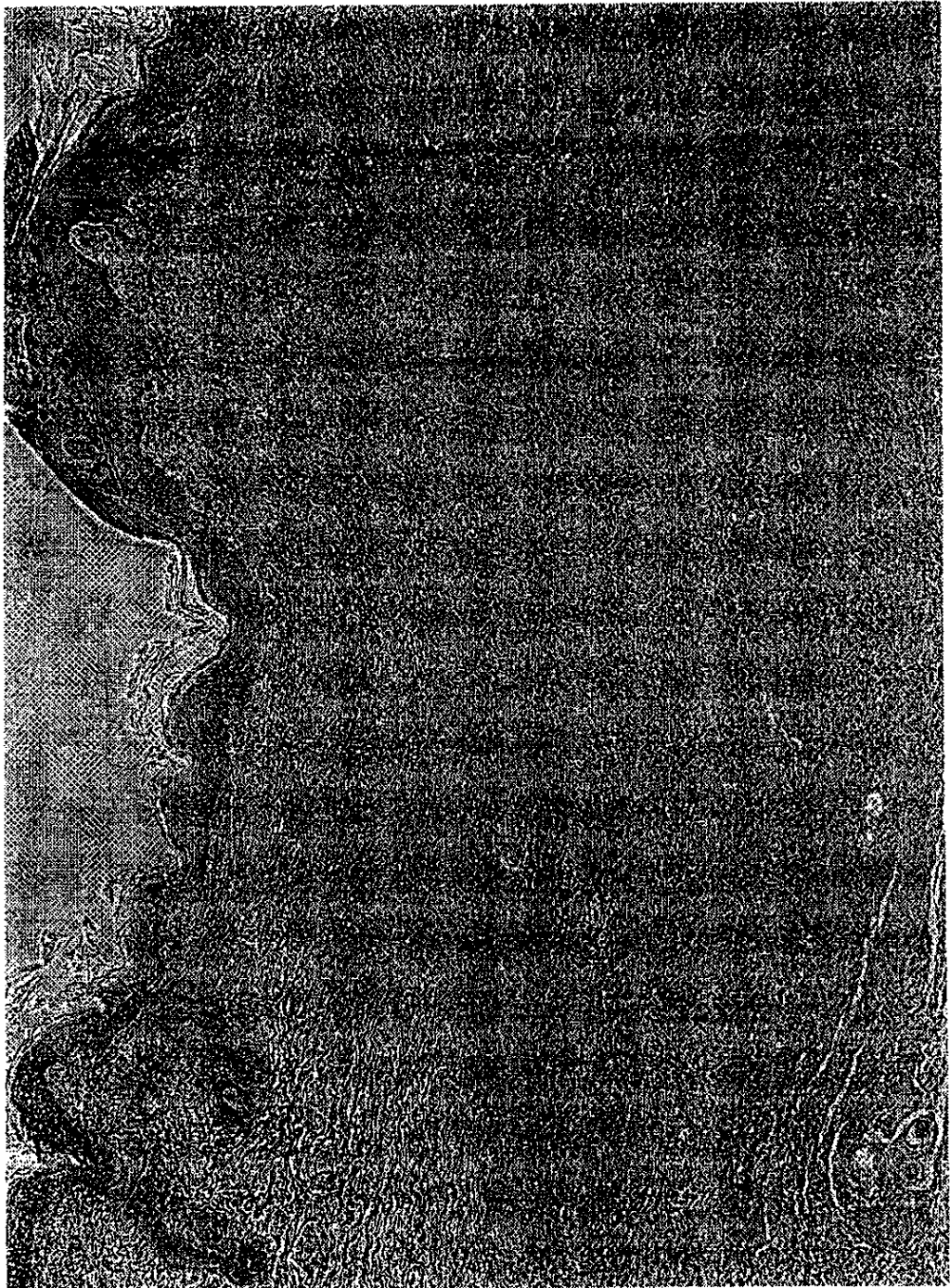
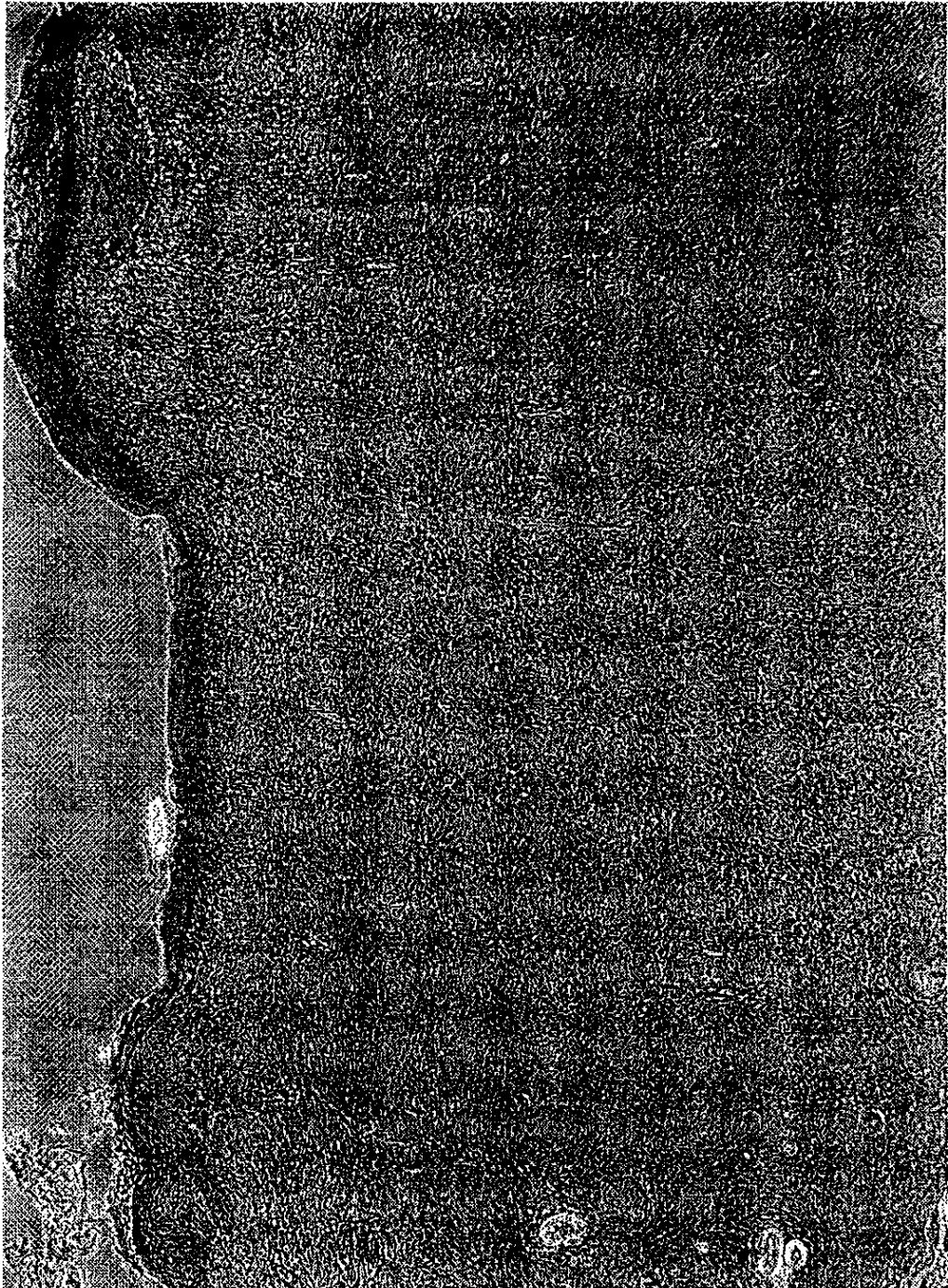


Fig.3



4/6

Fig.4

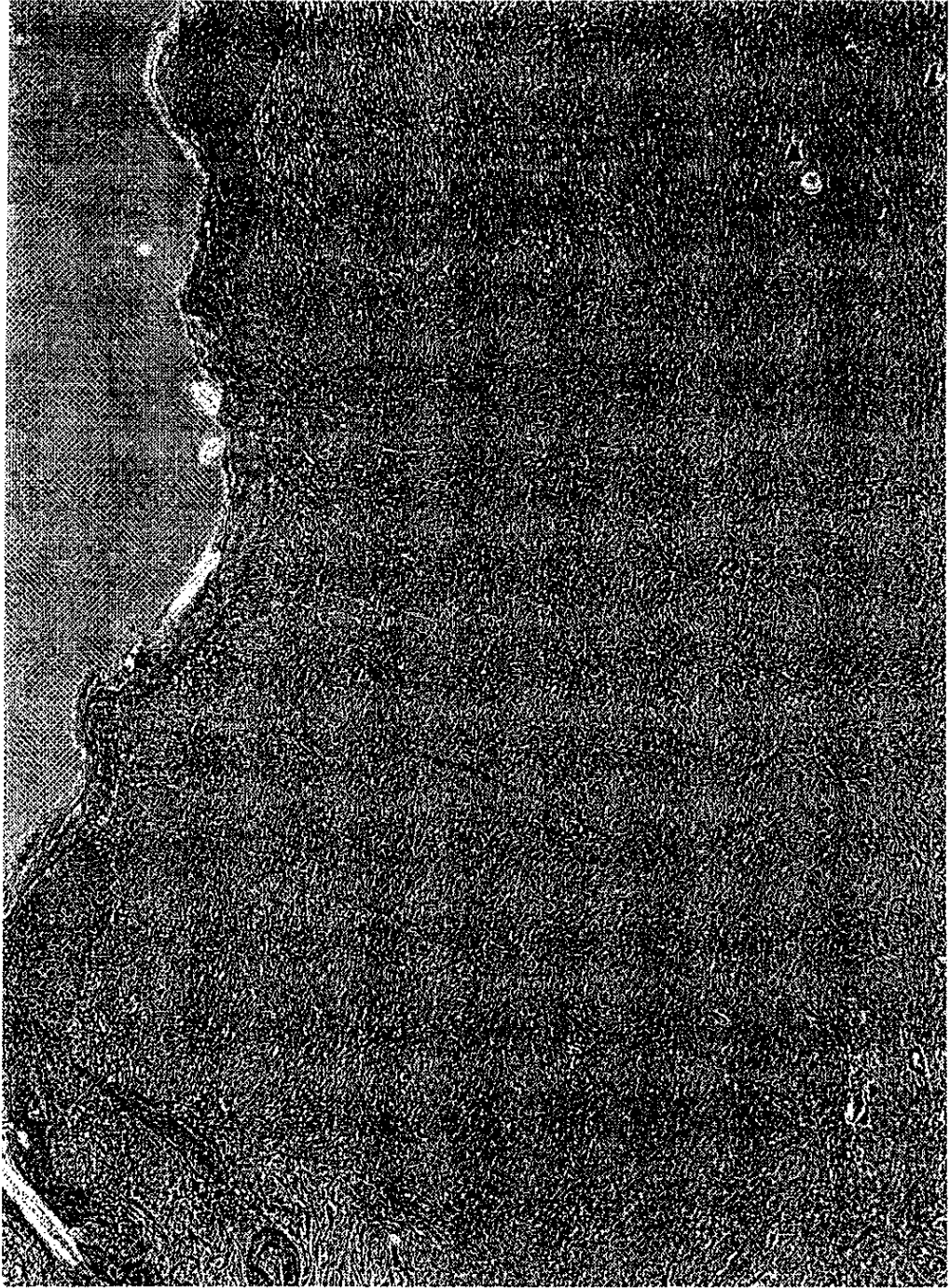


Fig.5



Fig.6

