



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102018003726-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102018003726-9

(22) Data do Depósito: 26/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 10/09/2019

(51) Classificação Internacional: A61L 27/36; A61L 27/52; A61L 33/18.

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM BIOMATERIAL ÓSSEO, BIOMATERIAL ÓSSEO E USO DO MESMO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES. CGC/CPF: 32479123000143. Endereço: RUA FERNANDO FERRARI,514, ES, BRASIL(BR), 29075-910

(72) Inventor: RODOLPHO JOSÉ DA SILVA BARROS; BRENO VALENTIM NOGUEIRA; ALEX BALDUINO DE SOUZA; CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA; DANIELLE LUCIANA AURORO SOARES DO AMARAL; JAIRO PINTO DE OLIVEIRA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 26/02/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 11/04/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: “**MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM BIOMATERIAL ÓSSEO, BIOMATERIAL ÓSSEO E USO DO MESMO**”

[001] Refere-se a presente patente de invenção a um biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea, mais especificamente a um biomaterial natural, desenvolvido exclusivamente a partir de ossos descelularizado, liofilizado, poroso e rígido, manipulável, seguro e não imunogênico, revestido e enriquecido com substâncias estimulantes próprias do tecido ósseo, apresentado/utilizado na forma particulada ou em bloco. Assim, possui a capacidade de promover o desenvolvimento de linhagens celulares maduras ou progenitoras *in vitro* quando utilizado como biorreator, e demonstra ter alta capacidade de integração e maior velocidade de cicatrização de fraturas e de preenchimento de defeitos ósseos quando utilizado como enxerto ósseo *in vivo*.

[002] Até o momento, para a regeneração do tecido ósseo, as alternativas mais usadas e que apresentam os melhores resultados nos tratamentos e correções de falhas ósseas ainda são o enxerto ósseo autógeno (autoenxerto), seguido pelo uso de osso humano cadavérico (aloenxerto) ou de ossos animais (xenoenxerto) transplantados. A busca por novos métodos que superem a eficácia clínica de aloenxertos e xenoenxertos ainda é um desafio para Bioengenharia de Tecidos (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014).

[003] Para se produzir um arcabouço de tecido ósseo ideal, um dos critérios mais importantes é que o produto seja constituído por uma rede porosa altamente interconectada com tamanhos suficientemente grandes para migração celular, troca de fluidos e, eventualmente, crescimento e vascularização do tecido. No entanto, apenas favorecer o desenvolvimento celular não é o bastante, pois o papel fisiológico do tecido ósseo exige que os biomateriais implantados em locais defeituosos também sejam capazes de suportar cargas mecânicas associadas ao estímulo compressivo funcional do osso, além de não gerarem resposta imune (GRUSKIN *et al.*, 2012).

[004] Biomateriais desproteinizados e/ou liofilizados foram fabricados a partir de ossos e corais naturais e tem sido utilizado em larga escala. Eles apresentam a vantagem de herdar as propriedades dos materiais originais como a estrutura dos poros, no entanto, como todo o material orgânico é removido por recozimento gradual (até 300 °C), e posteriormente liofilizado, perde-se uma série de substâncias importantes e

fatores estimulantes para a regeneração tecidual. Esse tipo de material poroso inorgânico ganhou ampla aceitação para várias aplicações odontológicas e ortopédicas, que apesar de ser um arcabouço puramente mineral e osteocondutor, não é capaz de melhorar a regeneração óssea, pois não apresenta propriedade osteoindutora relevante. Nesse contexto, materiais de reparação óssea desmineralizados, como Bio-oss®, exibem um efeito clínico relativamente fraco, por um processo celular de "substituição rastejante", que limita a sua aplicação a grandes defeitos ósseos (LEI *et al.*, 2015). Mesmo assim, somente nos EUA, mais de US \$ 1 bilhão por ano são movimentados no mercado que concentra o uso desses produtos de enxerto ósseo convencionais (GRUSKIN *et al.*, 2012).

[005] Atualmente, diversos biomateriais têm sido desenvolvidos para serem utilizados como substitutos ósseos, e de modo mais abrangente são classificados entre materiais inorgânicos e orgânicos, que incluem constituintes naturalmente derivados ou sintéticos. Materiais inorgânicos como o beta-fosfato tricálcico (β -TCP), a hidroxiapatita (HA) e cerâmicas de vidro bioativo (Bioglass®, BonAlive®) têm sido utilizados para fins de engenharia de tecido ósseo por causa de suas semelhanças na estrutura e composição com os elementos inorgânicos do próprio osso. Estes biomateriais inorgânicos até apresentam benefícios como potencial de osteocondutividade e capacidade de compressão, que é muitas vezes igual ou maior que o tecido ósseo. Entretanto, por possuírem estrutura naturalmente frágil, sempre geram uma grande preocupação para aplicações biológicas que obrigatoriamente precisam suportar carga elevada (FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2015).

[006] Uma alternativa aos materiais inorgânicos são os polímeros orgânicos naturais ou sintetizados quimicamente. Esses materiais alternativos possuem características que incentivam suas aplicações na engenharia de tecidos. Biomateriais derivados de fontes naturais, como colágeno, ácido hialurônico, celulose, seda, alginato e quitosana, geralmente são caracterizados por biocompatibilidade, permitindo a adesão e migração de células dentro de suas estruturas. As esponjas de colágeno, em especial, têm sido usadas para fornecer fatores de crescimento e promover a regeneração óssea. Apesar de grande diversidade, as principais limitações de polímeros naturais incluem dificuldades no processamento e purificação, e preocupações quanto à imunogenicidade. Além disso, a possibilidade de variabilidade de produtos e lotes dos

materiais diminui a previsibilidade de resultados na clínica. Por fim, nenhum biomaterial orgânico naturalmente derivado é capaz de combinar as propriedades mecânicas do tecido ósseo, que contém componentes orgânicos e inorgânicos (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014).

[007] O campo da síntese de polímeros orgânicos destinados à engenharia de tecidos cresceu consideravelmente, principalmente, em relação às técnicas de polimerização de arcabouços para minimizar a variabilidade de lotes. Estão sendo desenvolvidos biomateriais sintéticos com características de micro e macroescala específicos. Os recursos de microescala incluem composição, arquitetura e grupos de ligação, enquanto que as características de macroescala incluem porosidade, rigidez e elasticidade. Quanto à composição, os polímeros frequentemente sintetizados para biomateriais de regeneração do tecido ósseo incluem ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), PLGA, policaprolactona (PCL), polietileno (PE), polietilenoglicol (PEG) e polimetacrilato de metilo (PMMA), entre outros. Apesar de biologicamente inspirados e da grande versatilidade, os polímeros sintéticos também apresentam falhas como modelos para engenharia de tecidos. A falta de bioatividade restringe as interações positivas entre biomateriais e hospedeiros, de modo inverso ao observado em polímeros naturalmente derivados que possuem naturalmente domínios de ligação para a matriz extracelular tecidual (ECM). Além disso, os produtos de degradação de polímeros sintéticos geralmente incluem subprodutos ácidos como PLA ou PGA que podem dificultar processos regenerativos (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014).

[008] De modo mais recente, o sucesso clínico de algumas pesquisas baseadas no desenvolvimento de arcabouços para a regeneração óssea parece estar associado à superação das limitações apresentadas pelos biomateriais monofásicos através do desenvolvimento de combinações sinérgicas de biomateriais inorgânicos e orgânicos. Neste sentido, progressos interessantes já foram alcançados na busca por produtos híbridos. A produção de arcabouços biológicos (*scaffolds*) promissores foi conseguida combinando materiais orgânicos e inorgânicos, possibilitando a criação de modelos biocompatíveis, que conferem alguma capacidade osteoindutiva aos materiais até então apenas osteocondutores e com resistência necessária à compressão requerida em áreas de defeitos ósseos. A combinação de nanofibras de colágeno e microfibras de

policaprolactona (PCL), por exemplo, foi alcançada sem comprometer as propriedades adesivas de colágeno ou a resistência mecânica de PCL. A mistura de quitosana e hidroxiapatita em biomoldes resultou em materiais com propriedades mecânicas, porosidade e bioatividade para sustentar o crescimento das células e a nova formação óssea, como verificado nos produtos InFuse®, uma combinação bem sucedida de biomaterial e fator de crescimento. Já existem materiais minerais enriquecidos com fontes de colágeno, fatores de crescimento ou proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), especialmente BMP-2 que promove a diferenciação osteogênica. No entanto, apesar da eficácia comprovada da BMP, sua aplicação clínica ainda é complicada devido a sua baixa meia-vida biológica, efeitos colaterais sistêmicos e remoção rápida no local da lesão. De modo mais recente, pesquisas têm focado em sistemas de entrega que minimizam a difusão de BMPs longe de seu alvo terapêutico, não só para melhorar a formação óssea, mas também para limitar reações indesejadas. Outros exemplos de biomateriais com produtos combinados incluem colágeno e HA, PGA e β TCP, bem como uma associação particularmente interessante de PEG, PCL, colágeno e nanomateriais (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014).

[009] Um dos principais propósitos da produção de biomateriais para a regeneração tecidual é apoiar e facilitar as funções fisiológicas necessárias no local da lesão. Em geral, isso inclui o fornecimento de estrutura ideal para a migração e especialização da população de células regenerativas, bem como o sequestro de componentes de matriz extracelular (ECM) e fatores de crescimento locais. Este suporte multidimensional age favorecendo a capacidade de fixação, de ancoragem, de diferenciação, de proliferação e a funcionalidade das células. É sabido que a matriz extracelular de tecidos de mamíferos pode ser isolada, descelularizada e utilizada como *scaffolds*, que já demonstraram facilitar a restauração funcional de diferentes tecidos. Os mecanismos de remodelamento construtivo a partir de ECM incluem o recrutamento de células progenitoras, promoção da migração celular e proliferação, angiogênese regional e promoção de um fenótipo de macrófagos M2 favorável na interface do tecido hospedeiro e do arcabouço biológico. Embora ECM tenha sido usada com sucesso em locais não homólogos, estudos recentes demonstraram especificidade, ou seja, ocorrência de funções adicionais e formação complexa de tecidos quando matrizes biológicas foram derivadas de tecidos específicos (SAWKINS *et al.*, 2013). Também é

bem descrito que além de diferenças nos métodos de preparo, processamento, e local de obtenção, de modo semelhante a outros tecidos, a idade do doador também tem impacto importante nas propriedades da ECM e no seu desempenho clínico (BENDERS *et al.*, 2013; SAWKINS *et al.*, 2013; WILLIAMS *et al.*, 2014).

[010] Nesse contexto, a matriz óssea desmineralizada (DBM) foi desenvolvida como substituto ósseo para superar as limitações dos enxertos convencionais e oferecer maior especificidade tecidual no local de implante. A DBM ósteo condutora é produzida pela extração ácida do conteúdo mineral do osso alogênico ou xenogênico e contém fatores de crescimento, proteínas não colágenas e colágeno tipo I (SAWKINS *et al.*, 2013). Embora com variabilidade, o efeito osteoindutivo da DBM foi bem descrito em estudos com animais, mas há uma escassez de informações semelhantes para estudos clínicos em humanos. O produto final do processo de desmineralização é um pó de DBM geralmente associado a um veículo viscoso, que tem a finalidade de facilitar o manuseio, a formulação e utilização clínica mínima, pois não é efetivo para oferecer continuidade e suporte físico necessário na correção de defeitos críticos. Os veículos viscosos, geralmente, são polímeros solúveis em água, tais como hialuronato de sódio ou carboximetilcelulose, ou solventes miscíveis com água anidra, tais como glicerol, que pode ter efeitos nefrotóxicos. Estudos desenvolvidos para testar a utilização de veículos sobre a eficácia de DBM são limitados. O que se sabe até o momento é que parece haver diferenças na atividade osteogênica que podem estar relacionadas à utilização de diferentes veículos, bem como a quantidade de DBM em suspensão, e a capacidade do veículo de disponibilizar as partículas de DBM no local do defeito ósseo por um período suficiente de tempo para promover a regeneração óssea. Um estudo recente caracterizou uma resposta inflamatória a quatro substitutos de enxerto ósseo comercial e descobriu que os três materiais de DBM produziram mais inflamação do que um composto de hidroxiapatita sintética. No entanto, não foi determinado se o material DBM ou o veículo provocaram a resposta inflamatória (GRUSKIN *et al.*, 2012; CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014).

[011] Assim como o desenvolvimento de *scaffolds* cada vez mais específicos parece ser fundamental para o sucesso terapêutico da engenharia de tecidos, também parece claro que a disponibilidade de múltiplos fatores de crescimento com parâmetros temporais, espaciais, e de dosagem biologicamente estimulante, são cruciais para o

desenvolvimento de terapias regenerativas bem sucedidas. O aperfeiçoamento de biomateriais cada vez mais enriquecidos, que possibilitem a administração de fármacos, e a entrega sequencial de fatores de crescimento em doses apropriadas, pode ser a chave para se recriar os processos regenerativos ósseos que ocorrem naturalmente durante a embriogênese e a cicatrização de uma fratura (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014).

[012] Até o momento, a bioengenharia de tecidos ainda não conseguiu produzir uma terapia convincente para a regeneração do tecido ósseo e ainda não existem produtos que integrem a utilização de células aos biomateriais (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014). A busca clínica por novas alternativas eficazes para a regeneração óssea deu origem a várias possibilidades que podem ser clinicamente impactantes, mesmo que ainda, nenhuma delas tenha priorizado a utilização de matrizes extracelulares ósseas descelularizadas finamente preservadas e/ou o enriquecimento com células como possibilidades terapêuticas e potenciais subprodutos da engenharia de tecidos (LI *et al.*, 2015). A próxima geração de biomateriais para regeneração óssea deverá não apenas sustentar fisicamente os defeitos ósseos, bem como sustentar quimicamente e biologicamente os fatores de crescimento e células presentes (PAUL *et al.*, 2016).

[013] O desenvolvimento de tecnologias como os biorreatores, que agregam a tríade: células-tronco, fatores de crescimento e *scaffold*, manipulados em ambientes controlados, têm contribuído para que a criação de tecidos *ex vivo* seja uma possibilidade real. Os estímulos fornecidos em culturas 3D podem ser capazes de direcionar a diferenciação e o comportamento celular, produzindo tecidos especializados para implantação *in vivo*. Apesar de ainda enfrentar desafios quanto à padronização de técnicas e qualidade dos produtos, há expectativa para que ocorra avanço do uso clínico de biorreatores, uma vez que os benefícios proporcionados por esta tecnologia, sobretudo sobre o conhecimento da vascularização de enxertos, podem ser a chave para a criação de produtos e terapias mais promissores (BARTNIKOWSKI *et al.*, 2014).

[014] Olhando para além da tecnologia do biorreator, a próxima geração de produção de tecidos *ex vivo* poderá ser através de avanços na tecnologia para fabricação de tecidos gerados por computador, que poderão combinar polímeros naturais e sintéticos, bem como materiais inorgânicos para produzir biomateriais, incluindo

termoplásticos, hidrogéis e arcabouços compostos mais complexos, que permitiriam o controle preciso de sua arquitetura e composição, limitados apenas pela resolução da tecnologia de distribuição. Isso poderia abrir portas para a produção de *scaffolds* e tecidos com parâmetros geométricos específicos de cada paciente, uma façanha inacessível com os métodos atuais. Para tamanho feito, e fusão funcional dos elementos da tríade de engenharia de tecidos, é imprescindível que pesquisas de base estejam em constante avanço (FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2015).

[015] Por fim, na busca insistente pelo desenvolvimento de biomateriais que promovam o crescimento ósseo, apesar da demanda e mesmo existindo produtos notáveis que apresentam algum sucesso clínico em pesquisas, até a presente data, nenhum deles foi capaz de superar a eficácia dos enxertos autólogo, homólogo ou xenólogo em suas habilidades para tratar defeitos de tamanho crítico. Diversos biomateriais desenvolvidos até apresentam alguma biocompatibilidade, por serem projetados para imitar o mais próximo possível a rede porosa da matriz extracelular óssea nativa, no entanto, ainda não se comparam ao osso natural em termos de estrutura e função (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014).

[016] Visto acima as tecnologias utilizadas atualmente, foi possível identificar as principais limitações e inconvenientes das mesmas, tais como:

- A disponibilidade limitada e alta morbidade ao doador para autoenxertos;
- A baixa disponibilidade e qualidade de material em banco de ossos;
- A chance de rejeição imunogênica e risco potencial de transmissão de doenças por aloenxertos e xenoenxertos congelados/liofilizados;
- A possibilidade de resultados clínicos insatisfatórios e adversos em terapias convencionais;
- O efeito clínico relativamente fraco e baixa capacidade osteoindutiva de biomateriais inorgânicos;
- A baixa capacidade de suporte à compressão mecânica e fragilidade de alguns materiais;
- A falta de padronização de técnicas de preparo e de qualidade de lotes dos produtos;
- A falta de produtos que garantam qualidade e disponibilidade adequada de fatores de crescimento;

- A falta de produtos integrados com tecnologias que possibilitem a inclusão de células;
- A falta de produtos compostos com múltiplos fatores de crescimento;
- A falta de produtos seguros de origem específica do tecido ósseo;
- A falta de produtos seguros produzidos a partir de regiões específicas do tecido ósseo;
- A falta de produtos seguros produzidos a partir de tecido ósseo com idade específica;
- A falta de produtos seguros de matriz óssea descelularizada;
- A falta de produtos personalizados para cada tipo de paciente, lesão ou finalidade biológica;
- A baixa eficácia dos modelos de biorreatores existentes testados;
- A falta de produtos destinados para investigação *in vitro*;
- O custo elevado de produtos híbridos, principalmente se associados com fator de crescimento.

[017] Neste sentido, e com o intuito de solucionar ou até mesmo superar os inconvenientes identificados, foi desenvolvido o biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea. Este representa um biomaterial desenvolvido a partir de tecido ósseo animal descelularizado e revestido com matriz extracelular óssea na forma de gel, que é capaz de conferir eficiente suporte mecânico e biológico, e que permite ainda ser enriquecido com linhagem de células, nanocompostos ou fármacos, quando utilizado como enxerto ósseo, biorreator, ou veículo em tratamentos, pesquisas e desenvolvimento de outros biomateriais. O produto desta invenção, diferentemente de outras tecnologias, foi desenvolvido desde sua concepção para favorecer o desenvolvimento celular, a partir da manutenção da integridade da matriz extracelular orgânica do tecido ósseo, sendo capaz de melhorar o tempo de cicatrização, diminuir custos e contribuir cientificamente para pesquisas de base demonstrando a importância biotecnológica, a necessidade investigativa e aplicabilidade de matrizes orgânicas descelularizadas em biomateriais.

[018] O biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea poderá ser melhor compreendido através da descrição detalhada em consonância com as seguintes figuras em anexo, onde:

FIGURA 01 apresenta imagens fotográficas de fragmentos de tecido ósseo antes (esquerda) e após imersão em solução (direita), durante o processo de

descelularização do biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea.

FIGURA 02 apresenta imagens fotográficas de partículas liofilizados (esquerda) e hidrogel (direita) de matriz óssea descelularizada do biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea.

FIGURA 03 apresenta imagens de esteromicroscopia do biomaterial de osso descelularizado nos aumentos de 8x (a), 12,5x (b) e 20x (c) do biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea.

FIGURA 04 apresenta imagens de microscopia de varredura do biomaterial de osso descelularizado nos aumentos de 50x (A), 100x (b), 200x (c) e 350x (d) do biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea.

[019] Em conformidade com as figuras acima pode-se observar que o biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea descelularizada corresponde a um biomaterial natural, desenvolvido exclusivamente a partir de osso descelularizado, liofilizado, poroso e rígido, manipulável, seguro e não imunogênico, revestido e enriquecido com substâncias estimulantes próprias do tecido ósseo, apresentado/utilizado na forma particulada ou em bloco, com potencial para ser explorado pela produção industrial e pela ciência de base em Ciências da Saúde (Medicina, Medicina Veterinária e Odontologia) e de Biotecnologia. Tem a capacidade de promover o desenvolvimento de linhagens celulares maduras ou progenitoras *in vitro* quando utilizado como biorreator, e demonstra ter alta capacidade de integração e maior velocidade de cicatrização de fraturas e de preenchimento de defeitos ósseos quando utilizado como enxerto *in vivo*.

[020] Para isso, os ossos animais coletados são de procedência regulamentada/certificada (Serviço de Inspeção Federal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - SIF/MAPA/Brasil), coletados de abatedouro frigorífico e encaminhados ao laboratório. Após a limpeza e dissecação dos ossos coletados, áreas específicas do tecido ósseo são selecionadas e tratadas de modo a preservar ao máximo as características físicas, biológicas e morfofuncionais do tecido e da matriz extracelular orgânica presente. O tecido selecionado é tratado por imersão em solução detergente (Triton 1-3%, Dodecil Sulfato de Sódio– SDS 0,1-2,5%, ou outra), sob agitação de 200-500 rpm, durante 24 a 96 horas, até que o material

apresente quantidade de DNA amostral inferior a 50ng. Após descclularização, a matriz sólida resultante é lavada insistentemente com solução tampão (PBS pH 7,4-7,8 ou outra), seca em estufa com temperatura controlada entre 25-50 °C por pelo menos 12 a 48 horas, em seguida, é liofilizada, esterilizada em óxido de etileno e preservada para recobrimento com gel.

[021] O gel de matriz extracelular óssea descclularizada é produzido a partir do mesmo material coletado. Após seleção do tecido ósseo, o material congelado em nitrogênio líquido é triturado em pequenos fragmentos ou até se tornar pó. Em seguida é realizada a desmineralização em solução ácida (HCl 0,1-2,5 N ou outra) sob agitação de 200-500rpm, em temperatura ambiente, durante 24 a 96 horas e lavado exaustivamente com água destilada. Após secagem o material é desengordurado em solução clorofórmio/metanol, sob agitação de 200-500rpm, em temperatura ambiente, durante 1 a 3 horas, e lavado com água destilada insistentemente. Após secagem, o material é descclularizado por imersão em solução enzimática (Tripsina 0,01%-0,5% e EDTA 0,01-0,2% ou outra), sob agitação de 200-500rpm, a 37 °C, durante 12 a 48 horas, até que o material apresente quantidade de DNA amostral inferior a 50ng. Após esse tempo, é adicionada solução antibiótica e antifúngica 1% (Estreptomicina/Penicilina, Gentamicina ou outra), sob agitação de 200-500rpm, a 4°C, durante 12 a 48 horas.

[022] Após este período, o conteúdo é testado em cultura contra contaminação, liofilizado e conservado em freezer -80 °C. A partir do conteúdo liofilizado estéril, faz-se a digestão enzimática com solução ácida (HCl 0,01-0,1N) de Pepsina 0,5-2,5mg/ml, sob agitação com barra magnética, à temperatura ambiente, durante 48 a 120 horas. A partir de então, se conserva o material denominado matriz digerida em freezer -80 °C. A partir da matriz digerida, faz-se a neutralização por solução de NaOH 0,05-0,5N e solução tampão (PBS pH 7,4-7,8 ou outra) a 4 °C. Para formação do hidrogel coloca-se o material a 37°C por pelo menos 1 a 6 horas.

[023] Produzidos os materiais descclularizados, matriz sólida e gel, o biomaterial é produzido por imersão da matriz sólida no gel resultante da própria matriz descclularizada, de modo que o hidrogel preencha as porosidades ali presentes e seja capaz de revestir todo o material. Em seguida pode ser realizada ou não a

liofilização e conservação do biomaterial em freezer -80 °C até o momento de utilização.

[024] Visto a descrição da tecnologia acima, e dadas as incorporações preferenciais e possíveis implementações posteriores ao depósito da mesma, sigam de forma que não tendam a limitá-la, podendo haver variações construtivas que sejam equivalentes sem, no entanto, fugir do escopo de proteção da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1- Método de produção de um biomaterial ósseo compreendendo uma matriz óssea sólida descelularizada e um hidrogel de matriz extracelular óssea descelularizada, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

a) produção de uma matriz óssea sólida descelularizada, compreendendo:

- limpeza e seleção do tecido ósseo;
- descelularização do tecido ósseo selecionado, compreendendo tratamento por imersão em uma solução detergente, sob agitação, até que o material apresente quantidade de DNA amostral inferior a 50ng, preferencialmente em que o tratamento por imersão compreende uma solução detergente selecionada de Triton 1 a 3% e Dodecil Sulfato de sódio - SDS 0,1 a 2,5%, sob agitação de 200 a 500 rpm, por 24 a 96 horas;

- lavagem da matriz óssea sólida resultante do processo de descelularização com solução tampão, preferencialmente solução de PBS pH 7,4 - 7,8;

e

- secagem, preferencialmente em estufa e com temperatura variando de 25 a 50°C, por 12 a 48 horas;

- liofilização e esterilização, preferencialmente por óxido de etileno, da matriz óssea sólida descelularizada;

b) produção de um hidrogel de matriz extracelular óssea descelularizada, compreendendo:

- limpeza e seleção do tecido ósseo;
- congelamento do tecido ósseo selecionado em nitrogênio líquido;
- trituração do tecido ósseo congelado;
- desmineralização da matriz óssea triturada em solução ácida, sob agitação, preferencialmente em que a desmineralização compreende uma solução ácida de HCl 0,1 a 2,5 N, sob agitação de 200 a 500rpm, por 24 a 96 horas;
- desengorduramento da matriz desmineralizada em uma solução, preferencialmente de clorofórmio/metanol, sob agitação, preferencialmente de 200 a 500rpm e por 1 a 3 horas;
- descelularização da matriz desmineralizada e desengordurada, compreendendo tratamento por imersão em uma solução enzimática, sob agitação, até que o material apresente quantidade de DNA amostral inferior a 50ng, preferencialmente em que o tratamento por imersão compreende uma solução enzimática tendo Tripsina 0,01% a 0,5% e EDTA 0,01% a 0,2%, sob agitação de 200 a 500rpm, por 12 a 48 horas e a 37°C;
- esterilização e liofilização da matriz descelularizada, preferencialmente em que a esterilização compreende tratar a matriz em solução antibiótica e

antifúngica 1%, sob agitação de 200 a 500rpm, por 12 a 48 horas e a 4°C

- digestão enzimática da matriz descelularizada liofilizada estéril, preferencialmente em que a digestão enzimática compreende tratar a matriz em solução ácida (HCl 0,01 a 0,1 N) de Pepsina 0,5 a 2,5 mg/mL, sob agitação, durante 48 a 120 horas; e

- neutralização da matriz digerida para formação do hidrogel de matriz extracelular óssea, preferencialmente em que a etapa de neutralização compreende tratar a matriz com solução de NaOH 0,05 a 0,5 N e solução tampão PBS pH 7,4 - 7,8, a 4°C e colocar o material obtido a 37°C por 1 a 6 horas para formação do hidrogel; e

c) produção do biomaterial a partir da matriz óssea sólida descelularizada e do hidrogel da matriz extracelular óssea descelularizada produzidos nas etapas a) e b).

2- Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de produção do biomaterial compreende a imersão da matriz óssea sólida descelularizada produzida na etapa a) no hidrogel de matriz extracelular óssea descelularizada produzido na etapa b), em que a matriz óssea sólida descelularizada é revestida e enriquecida com o hidrogel de matriz extracelular óssea descelularizada para formação do biomaterial, opcionalmente

em que o biomaterial formado é adicionalmente liofilizado e congelado.

3- Biomaterial ósseo desenvolvido a partir de tecido ósseo descelularizado **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- uma matriz óssea sólida descelularizada tal como obtida pelo método da reivindicação 1; e

- um hidrogel de matriz extracelular óssea descelularizada tal como obtido pelo método da reivindicação 1,

em que a matriz óssea sólida descelularizada é revestida e enriquecida com o hidrogel da matriz extracelular óssea descelularizada.

4- Biomaterial, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que é adicionalmente enriquecido com pelo menos um composto selecionado a partir de: linhagem de células, nanocompostos, fármacos ou outros excipientes aceitáveis.

5- Uso do biomaterial ósseo tal como tal como obtido pelo método das reivindicações 1 ou 2 ou do biomaterial ósseo tal como descrito em qualquer uma das reivindicações 3 ou 4, **caracterizado** pelo fato de que é na produção de um produto para ser usado como enxerto ósseo, procedimentos ortopédicos, procedimentos odontológicos; como biorreator ou arcabouço para aplicações de engenharia de tecidos; no

desenvolvimento/estabelecimento de cultivo ou linhagem de células mesenquimais, progenitoras ou maduras; ou como matéria-prima para impressão em 3D.

FIGURA 01



FIGURA 02

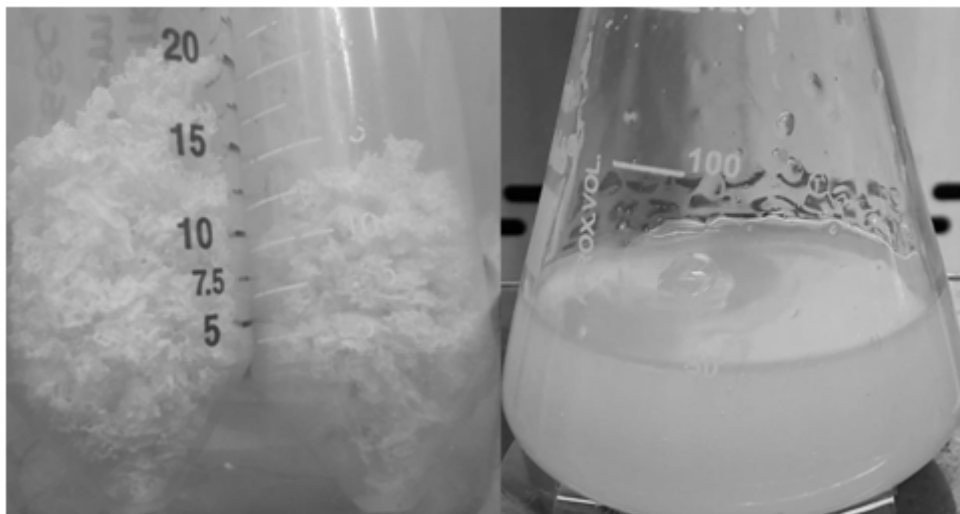


FIGURA 03

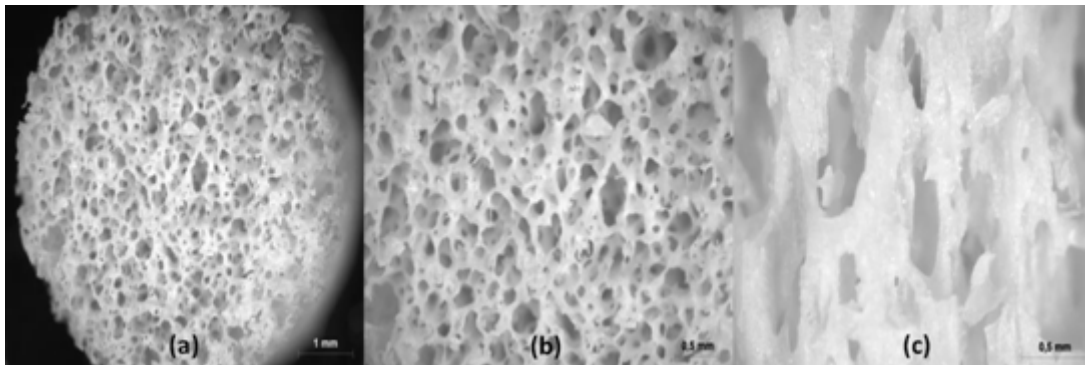


FIGURA 04

