



**INPI**  
INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

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

## CARTA PATENTE Nº PI 0515973-3

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:** PI 0515973-3

**(22) Data do Depósito:** 12/10/2005

**(43) Data da Publicação do Pedido:** 27/04/2006

**(51) Classificação Internacional:** A61K 31/729.

**(30) Prioridade Unionista:** US 60/617,852 de 12/10/2004.

**(54) Título:** KIT PARA PRODUZIR UM GEL DE ALGINATO, COMPOSIÇÃO PARA PREPARAR UM GEL E USO

**(73) Titular:** FMC BIOPOLYMER AS, Companhia Norueguesa. Endereço: TOMTEGT. 36, N-3013 DRAMMEN,, NORUEGA(NO), Norueguesa

**(72) Inventor:** JAN-EGIL MELVIK; MICHAEL DORNISH; EDVAR ONSOYEN; ASTRID B. BERGE; TERJE SVENDSEN.

**Prazo de Validade:** 10 (dez) anos contados a partir de 21/11/2018, observadas as condições legais

**Expedida em:** 21/11/2018

Assinado digitalmente por:

**Alexandre Gomes Ciancio**

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

“KIT PARA PRODUZIR UM GEL DE ALGINATO, COMPOSIÇÃO PARA PREPARAR UM GEL E USO”

### CAMPO DA INVENÇÃO

**[0001]** A presente invenção diz respeito aos sistemas de alginato que têm um processo de geleificação retardado e às composições, dispositivos, kits e métodos de fabricar e usar tais sistemas.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

**[0002]** Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório US Serial N° 60/617.852 intitulado Self-Gelling Alginate Systems and Uses Thereof, depositado em 12 de Outubro de 2004, que é incorporado aqui por referência.

**[0003]** Os alginatos são biopolímeros marinhos hidrofílicos com a única capacidade para formar géis termoestáveis que podem desenvolver-se e ajustar-se em temperaturas fisiologicamente relevantes. Os alginatos são uma família de copolímeros binários não ramificados de 1 a 4 resíduos de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) e ácido  $\alpha$ -L-glicurônico (G) glicosidicamente ligados. A quantidade relativa dos dois monômeros de ácido urônico e seu arranjo seqüencial ao longo da cadeia polimérica variam amplamente, dependendo da origem do alginato. O alginato é o polímero estrutural em algas pardas marinhas tais como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia nigrescens* e *Ascophyllwn nodosum*. O alginato também é produzido por certas bactérias tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas fluorescens* (WO04011628 A1).

**[0004]** Os géis de alginato são produzidos quando um cátion bivalente forma ligações iônicas com o grupo negativamente carregado de um resíduo G de cada um de dois polímeros de alginato diferentes, reticulando deste modo os dois polímeros. A formação de ligações cruzadas múltiplas entre numerosos polímeros de alginato resulta na matriz que é a estrutura de gel de alginato.

**[0005]** Os géis de alginato podem ser hidrogéis, isto é, polímeros de alginato de ligação cruzada que contêm quantidades grandes de água sem dissolução. Os géis de biopolímero, tais como hidrogéis de alginato são candidatos atrativos para a engenharia tecidual e outras aplicações biomédicas. Por causa disto e da

capacidade para formar géis sob condições fisiológicas, os alginatos são amplamente usados e estudado para propósitos de encapsulação e como um material de bioestrutura. O encapsulamento de células em pérolas de alginato é uma técnica comumente usada. Também os alginatos mostraram ser o material útil para outros tipos de bioestruturas, incluindo aplicações de engenharia tecidual e como andaimes para regenerações de nervo.

**[0006]** Métodos diferentes para fabricar hidrogéis de alginato existem. O método mais comum é o método de diálise/difusão onde a solução de alginato é geleificada por difusão de íons geleificantes de um reservatório externo. Este método é principalmente usado quando da fabricação de pérolas de gel de alginato e em aplicações alimentícias. A fabricação de micropérolas de alginato é um processo rápido limitado pela difusão de íons geleificantes na rede de gel. Embora este processo seja bem adequado para o encapsulamento de células em micropérolas, ele é menos útil para a produção de outras formas ou estruturas. Para a fabricação de estruturas em gel de tamanho maior sistemas de geleificação de difusão podem ter possibilidade limitada. Isto é porque o processo de geleificação rápido limita o tempo para permitir a formação da estrutura em gel.

**[0007]** Um retardo no processo de geleificação pode ser usado para levar em consideração a injeção de soluções no corpo e/ou para misturar células ou outro biomaterial na matriz de gel antes da formação de gel. Portanto, métodos alternativos foram desenvolvidos para a fabricação de outros tipos de estruturas em gel de alginato biocompatíveis. A velocidade de geleificação pode ser reduzida usando-se sistema de geleificação interna do qual os íons geleificantes são liberados mais lentamente dentro do gel em formação. Isto é descrito como ajuste interno do gel. Comumente, em um sistema de geleificação interna, um sal de cálcio com solubilidade limitada, ou íons de  $\text{Ca}^{2+}$  complexos, são misturados com uma solução de alginato em que os íons cálcio são lentamente liberados. O sulfato de cálcio foi usado em veículos de liberação de célula com base em alginato para engenharia tecidual. A liberação de cálcio e cinética de geleificação também podem ser controladas usando-se sais de cálcio com solubilidade dependente do pH e da

adição de um ácido que age lentamente tal como D-glucono- $\delta$ -lactona (GDL). Como as mudanças de pH, íons cálcio são liberados. Também lipossomos contendo cálcio foram usados como um sistema de geleificação de alginato controlável. Os sistemas de gel de alginato com base em geleificação interna podem ter um fornecimento mais definido e limitado de íons geleificantes como oposto aos sistemas de difusão onde íons cálcio são deixados difundir na solução de alginato para fornecer um gel saturado de cálcio.

**[0008]** Métodos correntes para a fabricação de estruturas em gel de alginato têm limitações. Algumas técnicas apenas são úteis para fabricar géis de tamanhos e formas limitados. Dependendo das aplicações pode haver problemas associados com o controle da cinética de geleificação. Em alguns casos, os materiais indesejáveis estão presentes em géis porque tais materiais são resíduos e subprodutos de mecanismos de geleificação quimicamente controlados. Em alguns casos, os valores de pH não fisiológico são necessários para a geleificação e tais condições podem apresentar limitações ao uso de tais métodos. Portanto existe uma necessidade para outros sistemas e formulações de geleificação.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

**[0009]** A presente invenção diz respeito aos kits para produzir um gel de alginato. Os kits compreendem um primeiro recipiente compreendendo alginato solúvel, e um segundo recipiente compreendendo partículas de alginato insolúvel/íon geleificante.

**[0010]** A presente invenção diz respeito ainda às composições para preparar géis de alginato. As composições compreendem alginato imediatamente solúvel e partículas de alginato insolúvel/íon geleificante.

**[0011]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos para distribuir dispersão de alginato auto-geleificante. Os métodos compreendem formar uma dispersão de partículas de alginato insolúvel/íon geleificante em uma solução de alginato solúvel, e distribuir a dispersão por meio da qual a dispersão forma uma matriz de gel de alginato.

**[0012]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos para distribuir a dispersão de alginato auto-geleificante em um indivíduo. Os métodos compreendem

formar uma dispersão de partículas de alginato insolúvel/íon geleificante em uma solução de alginato solúvel, e distribuir a dispersão em um indivíduo por meio da qual a dispersão forma uma matriz de gel de alginato no indivíduo.

**[0013]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos para distribuir a dispersão de alginato auto-geleificante em um indivíduo para o uso como material de aumento de volume de tecido, para o uso em um procedimento de embolização vascular, para o uso para prevenir formação de adesão pós cirúrgica, para o uso em procedimentos de tratamento da ferida, para o uso em tratamentos da diabete e para o uso no tratamento de artrite.

**[0014]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos de usar um gel de alginato implantável. Os métodos compreendem formar o alginato auto-geleificante distribuindo-se a dispersão de alginato auto-geleificante e, seguindo a formação de gel, implantar o gel de alginato implantável em um indivíduo.

**[0015]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos de produzir dispositivos implantáveis.

**[0016]** A presente invenção diz respeito ainda aos géis de alginato tendo uma espessura de mais do que 5 mm e uma rede de matriz de alginato homogênea.

**[0017]** A presente invenção diz respeito ainda aos géis de alginato tendo uma espessura de mais do que 5 mm e isentos de um ou mais de: sulfatos citratos, fosfatos, lactatos, EDTA ou lipídeos.

**[0018]** A presente invenção diz respeito ainda aos dispositivos implantáveis compreendendo um revestimento de gel de alginato homogêneo.

**[0019]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos de enchimento ou reparo de defeitos osteocondrais que resultam de osteoartrite distribuindo-se uma dispersão de alginato auto-geleificante que inclui condrócitos em um corpo de indivíduo ou implantando-se uma matriz biocompatível que inclui condrócitos em um corpo de indivíduo.

**[0020]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos de tratar diabete distribuindo-se uma dispersão de alginato auto-geleificante que inclui células que produzem insulina ou agregados multicelulares em um corpo de indivíduo ou

implantando-se uma matriz biocompatível que inclui células que produzem insulina ou agregados multicelulares em um corpo de indivíduo.

**[0021]** A presente invenção diz respeito ainda aos métodos de melhorar a viabilidade de ilhotas pancreáticas, ou outros agregados celulares ou tecido, a seguir do isolamento e durante o armazenamento e transporte incorporando-se as ilhotas, ou agregados celulares ou tecido em uma dispersão de alginato auto-geleificante.

**[0022]** A presente invenção diz respeito ainda às partículas de alginato insolúvel/íon geleificante ultrapuras e métodos de produzir as mesmas.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

**[0023]** A Figura 1 contém dados de medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis com as concentrações de alginato de cálcio diferentes (Protaweld TX 120) seguintes é mostrado (concentrações na mistura/gel): 1,0% de alginato de cálcio misturado com 1,0% de alginato de sódio, e 1,5% de alginato de cálcio misturado com 1,0% de alginato de sódio, e 2,0% de alginato de cálcio misturado com 1,0% de alginato de sódio. O alginato de sódio usado foi Protanal SF 120.

**[0024]** A Figura 2 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis fabricados misturando-se quantidades iguais de alginato de sódio (Protanal SF 120) e alginato de cálcio (Protaweld TX 120) nas concentrações seguintes no gel: 0,75%, 1%, 1,25% ou 1,5% de alginato de sódio e alginato de cálcio

**[0025]** A Figura 3 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento foi medido como uma função do tempo para géis contendo pesos moleculares diferentes de alginatos de cálcio (painel A) e alginatos de sódio (painel B) é mostrado como segue. Os géis no painel A contêm 1% de alginato de sódio e 1,5% de alginato de cálcio e os géis no painel B contêm 1% de alginato de cálcio e 1% de alginato de sódio. Os alginatos usados no painel A foram: Alginato de cálcio:

Protaweld TX 120 e Protaweld TX 120 degradado durante 33 dias a 60°. A viscosidade (1% de solução a 20° C) dos dois alginatos de Ca, medida como o alginato de sódio, foi de 270 mPas e 44 mPas, respectivamente. Alginato de sódio: Protanal SF 120. Os alginatos usados no painel B foram: Alginato de cálcio: Protaweld TX 120. Alginato de sódio: Protanal SF 120 e Protanal SF/LF. A viscosidade (1% de solução a 20° C) dos alginatos de sódio foi de 95 mPas e 355 mPas, respectivamente.

**[0026]** A Figura 4 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis fabricados com estrôncio ou cálcio como íons geleificantes. A quantidade de alginato de sódio (Protanal SF 120) e alginato de estrôncio/cálcio foi toda ajustada para ser 0,75% no gel. O alginato de cálcio usado foi fabricado amassando-se ácido algínico (produto do processo FMC) (65,2 g) com carbonato de cálcio (35,32 g) em um amassador de laboratório durante 1 hora, depois secando-se e moendo-se. O alginato de estrôncio usado foi fabricado amassando-se ácido algínico (produto do processo FMC) (65,2 g) com carbonato de estrôncio (52,10 g) em um amassador de laboratório durante 1,5 hora, depois secando-se e moendo-se.

**[0027]** A Figura 5 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis contendo alginato de sódio com teor alto e baixo de ácido glicurônico. Na Figura 5, painel A, alginato de cálcio (Protaweld TX 120) e alginato de sódio usados foram todos ajustados para ser 1,0% do gel. Os alginatos de sódio usados foram Protanal SF 120 (69% G) e Protanal HF 60D (32% de G, MW: 119 000). Na Figura 5, painel B, 5,5% de alginato de estrôncio (Exemplo 14) foram misturados com 1,25% de alginato de sódio em uma razão de 1:4 (concentração de alginato final foi de 2,1%). Os alginatos de sódio usados foram PRONOVA UP 100G (69% de G, MW: 122 000) e PRONOVA UP 100M (46% de G, MW: 119 000). O MW (e viscosidade) dos dois lotes de alginato de sódio foi selecionado para ser similar (tão próximo quanto possível). Cada curva na Figura 5,

painel B, é a média de três medições independentes (curvas) com erro padrão da média mostrado para cada ponto.

**[0028]** A Figura 6 mostra estabilidade e biodegradabilidade para géis de alginato fabricados com teor diferente de íons cálcio e armazenados durante 6 meses sob condições fisiológicas. Os discos de géis foram fabricados misturando-se uma dispersão de alginato de cálcio submetida à autoclave (Protaweld TX 120) e alginato de sódio filtrado estéril (PRONOVA UP LVG) a uma concentração final de 1,0% de alginato cada e a dispersão foi geleificada nas duas placas de Petri. Os discos de gel em uma placa (marcada V) foram lavados com 50 mM de cloreto de cálcio durante 10 minutos depois da geleificação e ambas as placas foram depois disso adicionadas com meio de cultura celular (DMEM suplementado com 10% de FBS). As placas foram armazenadas sob condições estéreis em uma incubadora de CO<sub>2</sub> e o meio foi mudado regularmente três vezes por semana. O tamanho do disco de gel menor em cada placa foi inicialmente do mesmo tamanho. A imagem mostrada foi tomada depois de seis meses.

**[0029]** A Figura 7 mostra dados dos experimentos usando células capturadas em alginato auto-geleificante de alginato. A Figura 7, painel A, mostra células de mioblasto de camundongo C2C12 45 dias depois do encapsulamento em gel de alginato auto-geleificante. O gel foi fabricado e armazenado similar como na Figura 6 mas incluiu as células. A imagem foi tomada usando um microscópio de fluorescência depois de tingir as células com calceína (Molecular Probes, L-3224) como um marcador da viabilidade celular. As áreas e manchas ilustradas mostram a presença de células viáveis. As células viáveis estão localizadas dentro e na superfície da construção de gel. A Figura 7, painel B, mostra condrócitos humanos capturados em auto-gel de alginato. O gel foi fabricado de auto-gel misturado de 5 ml de PRONOVA SLG 20 e alginato de cálcio (Exemplo 14) contendo condrócitos humanos. Três dias depois da geleificação os géis foram seccionados em fatias de 600 µm usando um vibratome. As fatias de gel foram armazenadas em meio de crescimento celular em uma incubadora de CO<sub>2</sub> e a imagem foi tomada depois de seis meses. A imagem foi tomada usando um microscópio de fluorescência depois

de tingir as células com calceína (Molecular Probes, L-3224) para viabilidade e claramente mostra a presença de um número alto de células viáveis (manchas ilustradas).

**[0030]** A Figura 8 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis contendo 1,25% de alginato de sódio (PRONOVA UP 100 G) misturado com 5,5% de alginato de estrôncio (Exemplo 14) em uma razão de 4:1 (concentração de alginato final foi de 2,1%) na presença ou ausência de cloreto de sódio ou hexametáfosfato de sódio. Cada curva é a média de três medições independentes (curvas) com erro padrão da média mostrada para cada ponto.

**[0031]** A Figura 9 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis contendo 1,25% de alginato de sódio (PRONOVA UP 100 G) misturado com 5,5% de alginato de cálcio (Exemplo 14) fabricado em tamanhos de partícula diferentes em uma razão de 4:1 (concentração de alginato total final foi de 2,1%). Os tamanhos de partículas diferentes foram fabricado moendo-se alginato de cálcio seco por congelamento e separando nos tamanhos indicados. Cada curva é a média de três medições independentes com erro padrão da média mostrado para cada ponto.

**[0032]** A Figura 10 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis contendo 1,25% de alginato de sódio (PRONOVA UP LVG) misturado com 10% de alginato de cálcio (Exemplo 14) em temperaturas diferentes em uma razão de 9:1 (concentração de alginato final foi de 2%).

**[0033]** A Figura 11 contém dados das medições reométricas. As medições de oscilação foram realizadas usando um reômetro Physica MCR300. O módulo de armazenamento foi medido como uma função do tempo para géis contendo pesos moleculares diferentes de alginato de sódio. Os géis contêm 1,25% de alginato de

sódio (PRONOVA UP100G) não degradado (controle) ou o mesmo lote de alginato degradado. Um gel também foi fabricado do alginato de sódio degradado em uma concentração de 2,5% (curva superior). Em todos os casos os alginatos de sódio foram misturados com 5,5% de alginato de estrôncio (Exemplo 14) em uma razão de 4:1. Cada curva é a média de três medições independentes (curvas) com erro padrão da média mostrado para cada ponto.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

**[0034]** Um sistema de geleificação de alginato alternativo é fornecido. Este sistema é usado em numerosas aplicações biomédicas assim como outras aplicações. O sistema pode incluir alginato e íons geleificantes que têm um grau alto de biocompatibilidade. O sistema inclui variações no tempo de geleificação e resistência do gel dependendo das necessidades de uma aplicação específica. O sistema fornece geleificação sem as mudanças de pH associadas com outros sistemas e requer um número mínimo de componentes.

**[0035]** O sistema compreende dois componentes: um é alginato solúvel; o outro são partículas de alginato insolúvel/íon geleificante. Quando os componentes são combinados na presença de um solvente para formar uma dispersão, um gel de alginato começa a formar-se conforme o íon geleificante das partículas começa a reticular os polímeros de alginato das partículas e os polímeros de alginato solúveis em solução. Os dois componentes podem ser misturados agitando-se ou usando-se um dispositivo de mistura adequado. A cinética de geleificação da formulação é dependente de vários fatores incluindo: a concentração do alginato solúvel em solução, a concentração das partículas de alginato insolúvel na dispersão, o teor relativo de íon geleificante para alginato, a presença de íons não geleificantes ou outros carboidratos, temperatura, o tamanho das partículas de alginato insolúvel/íon geleificante, o teor de células, agregados multicelulares, tecidos ou outros biomateriais a serem capturados no gel ou presentes durante a geleificação, (a presença de impurezas) e os tipos de alginatos usados, assim como o processo de fabricação para as partículas de alginato insolúvel e o tratamento pós fabricação de materiais de partida de alginato. Este sistema de alginato portanto pode ser

amplamente adaptado a cada aplicação particular. Para o encapsulamento de células, agregados multicelulares, tecidos ou outro biomateriais dentro do gel em formação, o solvente, a solução ou dispersão de alginato podem ser pré misturados com o material a ser capturado.

**[0036]** A dispersão pode ser distribuída dentro de um indivíduo como um líquido/pasta fluida a um sítio onde uma matriz de gel de alginato é desejável. A formação de gel de alginato, iniciada quando o alginato solúvel e partículas de alginato insolúvel/íon geleificante são misturados na presença de um solvente, continua e o gel de alginato ajusta-se in situ. Como aqui usado, o termo “auto-geleificante” é significado a referir-se ao processo de geleificação que ocorre quando o alginato solúvel e partículas de alginato insolúvel/íon geleificante são misturados na presença de um solvente. Um “alginato auto-geleificante” é uma dispersão ou gel de alginato que inclui ou é formado por alginato solúvel e partículas de alginato insolúvel/íon geleificante em um solvente.

**[0037]** Os componentes usados no sistema podem ser mantidos antes do uso em qualquer uma de várias formas. Por exemplo, o alginato solúvel pode ser mantido em solução ou como um pó. Em algumas formas de realização, o alginato solúvel pode ser mantido como um pó que é imediatamente solúvel tal como quando ele é seco por congelamento. Similarmente, as partículas de alginato insolúvel/íon geleificante podem ser mantidas como uma dispersão ou como um pó.

**[0038]** Os polímeros de alginato ou combinações destes usados no alginato solúvel podem ser os mesmos ou diferentes daqueles nas partículas de alginato insolúvel/íon geleificante.

**[0039]** A concentração de alginato, tanto alginato solúvel quanto o alginato na forma de partículas de alginato insolúvel/íon geleificante em uma dispersão em relação à quantidade de solvente afeta o tempo de geleificação, porosidade, estabilidade e biodegradabilidade, resistência do gel e elasticidade dos géis e géis tendo propriedades específicas podem ser preparados usando-se razões específicas de alginato solúvel e partículas de alginato insolúvel/íon geleificante para solvente. No geral, quanto mais baixa a concentração de alginato (para um razão dada de

alginate solúvel para alginate insolúvel), mais biodegradável um gel será. Em algumas formas de realização, aproximadamente 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% ou mais de alginate (alginate solúvel e alginate na forma de partículas de alginate insolúvel/íon geleificante) podem ser usados.

**[0040]** A concentração relativa do alginate solúvel para o alginate na forma de partículas de alginate insolúvel/íon geleificante na dispersão afeta o tempo de geleificação, tamanho do poro, resistência do gel e elasticidade de géis assim como estabilidade e biodegradabilidade e géis tendo propriedades específicas podem ser preparados usando-se razões específicas de alginate solúvel para partículas de alginate insolúvel/íon geleificante. Em algumas formas de realização, a concentração de alginate solúvel é aproximadamente igual à concentração de alginate na forma de partículas de alginate insolúvel/íon geleificante (1:1). Em algumas formas de realização, a concentração de alginate na forma de partículas de alginate insolúvel/íon geleificante é duas vezes aquela de alginate solúvel (2:1). Em algumas formas de realização, a concentração de alginate na forma de partículas de alginate insolúvel/íon geleificante é metade daquela de alginate solúvel (1:2). Em algumas formas de realização, a concentração de alginate na forma de partículas de alginate insolúvel/íon geleificante para alginate solúvel é de 1 para 7 (1:7). No geral, quanto menos íon geleificante presente, mais biodegradável um gel será. A redução da concentração de alginate insolúvel/íon geleificante no sistema pode ser usada para criar géis com estabilidade mais baixa e biodegradabilidade mais alta visto que a rede de gel é menos saturada com íons reticulantes. A auto-geleificação leva em consideração a preparação de géis com concentrações mais baixas de íon geleificante para produzir géis particularmente bem adequados para usos biodegradáveis. Em algumas formas de realização preferidas, as razões de alginate de partículas de alginate insolúvel/íon geleificante para alginate solúvel são: 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ou 1:5.

**[0041]** O teor relativo de monômeros G e M nos polímeros de alginate afeta o tamanho do poro, estabilidade e biodegradabilidade, resistência do gel e elasticidade

de géis. Os polímeros de alginato contém variações grandes no teor total de M e G, e o teor relativo de estruturas de seqüência também varia grandemente (blocos G, blocos M e seqüências alternadas de MG) assim como o comprimento das seqüências ao longo da cadeia polimérica. No geral, quanto mais baixo o teor de G em relação ao teor de M nos polímeros de alginato usado mais biodegradável um gel será. Os géis com alginato com alto teor de G no geral têm tamanhos de poro maiores e resistência do gel mais potente em relação aos géis com alginato com alto teor de M, que têm tamanhos de poro menores e resistência do gel mais baixa. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém mais do que 50% de ácido  $\alpha$ -L-glicurônico. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém mais do que 60% de ácido  $\alpha$ -L-glicurônico. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém 60% a 80% de ácido  $\alpha$ -L-glicurônico. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém 65% a 75% de ácido  $\alpha$ -L-glicurônico. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém mais do que 70% de ácido  $\alpha$ -L-glicurônico. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém mais do que 50% de ácido  $\beta$ -D-manurônico de epímero C-5. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém mais do que 60% de ácido  $\beta$ -D-manurônico de epímero C-5. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém 60% a 80% de ácido  $\beta$ -D-manurônico de epímero C-5. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém 65% a 75% de ácido  $\beta$ -D-manurônico de epímero C-5. Em algumas formas de realização, um ou mais dos polímeros de alginato da matriz de alginato contém mais do que 70% de ácido  $\beta$ -D-manurônico de epímero C-5. Os procedimentos para produzir blocos urônicos de são divulgados na US 6.121.441. Os polímeros de alginato de bloco G e seus usos como moduladores de propriedades de gel de alginato são apresentados na Patente US N° 6.407.226. Algumas formas de realização preferidas, 30% de G,

35% de G, 40% de G, 45% de G, 50% de G, 55% de G, 60% de G, 65% de G, 70% de G, 75%, 80% de G ou 85% de G.

**[0042]** O peso molecular médio de polímeros de alginato afeta o tempo de geleificação, tamanho do poro, resistência do gel e elasticidade de géis. Os polímeros de alginato podem ter pesos moleculares médios variando de 2 a 1000 kD. O peso molecular dos alginatos pode afetar a formação de gel e as propriedades finais do gel. No geral, quanto mais baixo o peso molecular do alginato usado mais biodegradável um gel será. Os polímeros de alginato ou combinações destes usados nos componentes de alginato solúvel podem ser os mesmos ou diferentes dos polímeros ou combinações destes usados nas partículas de alginato insolúvel/íon geleificante. Em algumas formas de realização, os polímeros de alginato da matriz de alginato têm um peso molecular médio de 5 a 350 kD. Em algumas formas de realização, os polímeros de alginato da matriz de alginato têm um peso molecular médio de 2 a 100 kD. Em algumas formas de realização, os polímeros de alginato da matriz de alginato têm um peso molecular médio de 50 a 500 kD. Em algumas formas de realização, os polímeros de alginato da matriz de alginato têm um peso molecular médio de 100 a 1000 kD. Em algumas formas de realização, os géis são designados a ter um grau alto de biodegradabilidade. Conseqüentemente, os géis tendo menos alginato, menos íon geleificante diminuem o teor de G e alginatos de peso molecular mais baixo podem ser produzidos usando os limites mais baixos de um ou mais destes parâmetros como apresentado aqui para produzir géis com um grau alto de biodegradabilidade.

**[0043]** O alginato pode possuir uma viscosidade em uma solução a 1% medida a 20 graus centígrados de 25 a 1000 mPas e em algumas formas de realização, preferencialmente 50 a 1000 mPas (solução a 1%, 20 C).

**[0044]** Em algumas formas de realização, é preferido que os métodos de fabricação de partículas de alginato insolúvel/íon geleificante forneçam produtos com quantidade estequiométrica (100% de saturação) de íon geleificante. O uso de tais sais estequiométricos comunica maior reprodutibilidade nos sistemas de alginato auto-geleificante. Em algumas formas de realização, é preferido que o método de

fabricação de partículas de alginato insolúvel/íon geleificante forneça produtos com - quantidade subestequiométrica (< 100% de saturação) do dito íon geleificante. O uso de tais sais subestequiométricos comunica biodegradabilidade aos sistemas de alginato auto-geleificante.

**[0045]** Em algumas formas de realização, o alginato é alginato ultrapuro. O alginato ultrapuro está comercialmente disponível tal como de fontes diferentes de alga marinha como *Laminaria hyperborea*. Os sais de cálcio comerciais de ácido algínico são no geral fabricado em processos por meio dos quais o cálcio é adicionado ao ácido algínico na fase sólida por mistura simples e amassadura dos componentes juntos. Os exemplos de sais de cálcio comercialmente disponíveis de ácido algínico são Protaweld (da FMC BioPolymer) e Kelset da ISP Corporation. As partículas de alginato insolúvel/íon geleificante podem ser produzidas usando alginato ultrapuro fabricando-se um gel de alginato usando o alginato ultrapuro e um íon geleificante, separando por lavagem o sódio ou outros íons que estavam presentes no alginato ultrapuro, secando o gel para remover a água, e fabricando as partículas a partir do gel seco. Em algumas formas de realização, as partículas de alginato insolúvel/íon geleificante são sais estequiométricos. As partículas de alginato insolúvel/íon geleificante preferivelmente têm uma pureza alta e um teor de íon geleificante específico, consistente e no geral uniforme tal como, por exemplo, cálcio ou estrôncio bário, zinco, ferro, manganês, cobre, chumbo, cobalto, níquel, ou combinações destes, tal que a velocidade de formação de gel e resistência do gel podem ser fornecidas com previsibilidade mais precisa. Os sais alcalinos terrosos insolúveis de ácido algínico tais como por exemplo alginato de cálcio ou alginato de estrôncio (dependendo do íon geleificante usado) ou sais de metal de transição insolúveis de ácido algínico (tais como aqueles usando íons geleificantes de cobre, níquel, zinco, chumbo, ferro, manganês ou cobalto) podem ser fabricados com um teor conhecido e predeterminado de íons metal alcalino por precipitação das soluções. Em algumas formas de realização, o alginato de sódio comercialmente disponível é primeiro usado para preparar uma solução de alginato de sódio. Opcionalmente, o sal de sódio tal como carbonato de sódio pode ser incluído na

solução de alginato de sódio. Um sal contendo o íon geleificante desejado para a partícula de alginato insolúvel/íon geleificante, tal como por exemplo, sal de cálcio ou sal de estrôncio tal como cloreto de cálcio ou cloreto de estrôncio, é usado para fabricar uma solução. A solução de alginato de sódio é combinada, preferivelmente lentamente, com a solução de íon geleificante. Preferivelmente, as soluções combinadas são continuamente agitadas durante o processo de mistura. O alginato insolúvel tal como por exemplo alginato de cálcio ou alginato de estrôncio (dependendo do íon geleificante usado) precipita das soluções combinadas. O alginato insolúvel precipitado depois deve ser removido da solução e lavado repetidamente, tal como 2 a 10 vezes, com água purificada por exemplo para remover todos os íons solúveis. A remoção dos íons solúveis é confirmada por exemplo testando-se a condutividade de alginato insolúvel em água purificada comparada à condutividade de água purificada. Depois da lavagem, o alginato insolúvel pode ser seco, tal como com um vácuo. O alginato seco podem ser moído e, em algumas formas de realização, selecionado quanto aos tamanhos de partícula.

**[0046]** Em algumas formas de realização, o alginato é estéril. Em algumas formas de realização preferidas, o alginato é alginato ultrapuro estéril. As condições freqüentemente usadas para esterilizar o material podem mudar o alginato, tal como diminuir o peso molecular. Em algumas formas de realização, o alginato estéril é produzido usando filtros de esterilidade. Em algumas formas de realização, o alginato tem um nível de endotoxina de < 25 EU/grama.

**[0047]** Em algumas formas de realização, a matriz de alginato pode ser revestida com um polímero policatiônico como um poli aminoácido ou quitosano depois que a matriz de gel forma-se. Em algumas formas de realização, a poli-lisina é o polímero policatiônico. Em algumas formas de realização, a poli-lisina é ligada a uma outra porção e a poli-lisina é assim usada para facilitar a associação da porção ao gel. Os exemplos de porções ligadas ao gel usando polímeros policatiônicos incluem, por exemplo, drogas, peptídeos, reagentes de contraste, ligandos de ligação do receptor ou outros rótulos detectáveis. Alguns exemplos específicos incluem fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF),

fator de crescimento transformante (TGF), e proteína morfogênica óssea (BMP). As drogas podem incluir agentes quimioterapêuticos contra o câncer tais como Taxol, cis-platina e/ou outros derivados contendo platina. Os polímeros de carboidrato podem incluir hialuronan, quitosano, heparina, laminarina, fucoidan, sulfato de condroitina. Em algumas formas de realização, os alginatos usados são polímeros de alginato modificados tais como alginato quimicamente modificado em que um ou mais polímeros são ligados a um polímero de alginato diferente. Os exemplos de tais polímeros de alginato modificados podem ser encontrados na Patente US N° 6.642.363, que é incorporada aqui por referência.

**[0048]** Em algumas formas de realização, o polímero de alginato pode incluir uma porção que não alginato tal como, por exemplo, uma droga, um peptídeo, um reagente de contraste, um ligando de ligação do receptor ou outro rótulo detectável. Em uma forma de realização, o polímero de alginato inclui um peptídeo de RDG (Arg-Asp-Gly), uma porção radioativa (por exemplo, <sup>131</sup>I) ou um substância radio opaca. Outros exemplos de porções ligadas aos polímeros de alginato incluem, por exemplo, drogas, peptídeos, reagentes de contraste, ligandos de ligação do receptor ou outros rótulos detectáveis. Algumas exemplos específicos incluem fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante (TGF), e proteína morfogênica óssea (BMP). As drogas podem incluir agentes quimioterapêuticos contra o câncer tais como Taxol, cis-platina e/ou outros derivados contendo platina. Os polímeros de carboidrato podem incluir hialuronan, quitosano, heparina, laminarina, fucoidan, sulfato de condroitina.

**[0049]** O alginato solúvel pode ser um sal tal como, por exemplo, alginato de Na<sup>+</sup>, alginato de K<sup>+</sup>, alginato de PEG (alginato de polietileno glicol), alginato de NH<sub>4</sub> ou combinações destes.

**[0050]** Em algumas formas de realização, o alginato solúvel é seco por congelamento ou de outro modo dessecado. O alginato solúvel seco por congelamento é “imediatamente solúvel”. O alginato “imediatamente solúvel” é solúvel em água em menos do que um minuto, preferivelmente menos do que 30

segundos, mais preferivelmente menos do que 15 segundos. O alginato “facilmente solúvel” toma mais do que um minuto e usualmente vários minutos para entrar em solução.

**[0051]** Os íons geleificantes usados nas partículas de alginato insolúvel/íon geleificante afetam a cinética de geleificação, resistência do gel, e elasticidade. Os íons geleificantes também tem efeitos no crescimento celular. Os íons geleificantes usados nas partículas de alginato insolúvel/íon geleificante podem ser  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Co}$ ,  $\text{Ni}$ , ou combinações destes.

**[0052]** O complexos de íon de geleificação de alginato insolúvel são partículas. As partículas no geral são não fibrosas com base em uma razão de L/D onde a forma da partícula é caracterizada por uma dimensão maior (L) e dimensão menor (D). A L/D não fibrosa é menos do que 10, preferivelmente menos do que 5, preferivelmente menos do que 2. Uma L/D de 10 ou mais é uma fibra cortada. O íon de geleificação de alginato insolúvel pode ser mantido como uma dispersão ou na forma seca. Se o formador, a dispersão pode ser misturada com uma solução contendo alginato solúvel ou com alginato imediatamente solúvel para formar uma dispersão de partículas de alginato insolúvel/íon geleificante em uma solução contendo alginato solúvel. Se as partículas de íon de geleificação de alginato insolúvel estão na forma seca, elas podem ser misturadas com alginato imediatamente solúvel seco e subseqüentemente com uma solução para formar uma dispersão de partículas de alginato insolúvel/íon geleificante em uma solução contendo alginato solúvel ou as partículas de íon de geleificação de alginato insolúvel secas podem ser combinadas com uma solução contendo alginato solúvel para formar uma dispersão de partículas de íon de geleificação de alginato insolúvel em uma solução contendo alginato solúvel.

**[0053]** A agitação que ocorre na mistura dos componentes para formar a dispersão resulta na distribuição das partículas sólidas dentro da solução. A dispersão assim produzida pode estar na forma de uma pasta fluida que pode ser vertida, injetada e de outro modo auto geleificada dentro de um molde ou cavidade para formar a forma de tal molde ou cavidade.

**[0054]** A dispersão das partículas de íon de geleificação de alginato insolúvel em uma solução contendo alginato solúvel é formada, ela é distribuída ao sítio onde a auto-geleificação ocorre para formar um gel de alginato. Em algumas formas de realização, a dispersão é distribuída a um sítio in vivo. Em algumas formas de realização, a dispersão é distribuída a um sítio em um corpo de indivíduo. Em algumas formas de realização, a dispersão é distribuída em um molde ou outro recipiente ou superfície.

**[0055]** A concentração de íons geleificantes usados nas partículas de alginato insolúvel/íon geleificante afeta a cinética de geleificação, resistência do gel, e elasticidade. Quanto mais alta a concentração de íons geleificantes, mais alta a resistência do gel. A resistência do gel é mais alta quando o gel é saturado com íon geleificante. Reciprocamente, quanto mais baixa a concentração do íon geleificante, mais baixa a resistência do gel e mais alto o grau de biodegradabilidade.

**[0056]** O tamanho de partícula das partículas de alginato insolúvel/íon geleificante pode afetar a cinética de geleificação e as propriedades finais do gel. Quanto menor o tamanho de partícula mais rápida a conclusão da formação de gel. Tamanhos de partícula maiores produzem géis mais fortes. Os tamanhos de partícula podem ser controlados, por exemplo, separando-se as partículas de alginato insolúvel/íon geleificante através de vários filtros de tamanho diferente tal que as partículas podem estar todas no geral dentro de uma faixa de tamanho predeterminado. Em algumas formas de realização, as partículas são <25 µm, 25 a 45 µm, 45 a 75 µm, 75 a 125 µm ou >125 µm.

**[0057]** O solvente usado pode ser, por exemplo, água, solução salina, solução de açúcar, solução de cultura celular, uma solução tal como uma solução medicamentosa, proteína, ou solução de ácido nucléico, uma suspensão tal como uma suspensão celular, lipossomos, ou uma suspensão de reagente de contraste.

**[0058]** O hidrogel de alginato formado pode compreender, por exemplo, moléculas de ácido nucléico medicamentosas, células, agregados multicelulares, tecido, proteínas, enzimas, lipossomos, um reagente de contraste ou um material biologicamente ativo. Os exemplos de um material biologicamente ativo são

hialuronato e quitosano. Os reagentes de contraste incluem tântalo e gadolínio. Alguns exemplos específicos de proteínas incluem fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante (TGF), e proteína morfogênica óssea (BMP). As drogas podem incluir agentes quimioterapêuticos contra o câncer tais como Taxol, cis-platina e/ou outros derivados contendo platina. Os polímeros de carboidrato podem incluir hialuronan, quitosano, heparina, laminarina, fucoidan, sulfato de condroitina.

**[0059]** As células que podem ser usadas nos géis incluem células não recombinantes e recombinantes. Em algumas formas de realização em que as células são encapsuladas dentro de uma matriz de alginato, as células encapsuladas são células mamíferas, preferivelmente células humanas. Em algumas formas de realização em que as células encapsuladas são células não proliferantes, as células não proliferantes podem ser selecionadas dentre o grupo consistindo de: ilhotas pancreáticas, células hepáticas, células neurais, células do córtex renal, células endoteliais vasculares, células da tireóide e paratireóide, células adrenais, células tímicas, células ovarianas e condrócitos. Em algumas formas de realização em que as células encapsuladas são células proliferantes, as células proliferantes podem ser células tronco, células progenitoras, células proliferantes de órgãos específicos, fibroblastos e queratinócitos ou células derivadas de linhagens celulares estabelecidas, tais como por exemplo, linhagens celulares 293, MDCK e C2C12. Em algumas formas de realização, as células encapsuladas compreendem um vetor de expressão que codifica uma ou mais proteínas que são expressadas quando as células são mantidas. Em algumas formas de realização, a proteína é uma citocina, um fator de crescimento, insulina ou um inibidor da angiogênese tal como angiostatina ou endostatina, outras proteínas terapêuticas ou outras moléculas terapêuticas tais como drogas. As proteínas com um MW mais baixo, menos do que cerca de 60 a 70 kD, são particularmente bons candidatos por causa da porosidade da rede de gel. Em algumas formas de realização, as células estão presentes como agregados multicelulares ou tecido.

**[0060]** Os alginatos auto-geleificantes podem ser usados para produzir géis de

alginate maiores do que 5 mm com uma rede de alginato homogênea. Em algumas formas de realização, o gel de alginato homogêneo é maior do que 10 mm. O gel formado pelos métodos de difusão no geral são géis de alginato não homogêneos maiores do que 1 mm. Em formas de realização preferidas, o gel de alginato homogêneo formado pela formação de gel de alginato auto-geleificante é isento de sulfatos, citratos, fosfatos (TSPP: Tetra sódioPiroFosfato e Polifosfato são usados em aplicações alimentícias com pudins de alginato etc.), lactatos, EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) e lipídeos como com os lipossomos usados para encapsular o íon geleificante.

**[0061]** Existem numerosas aplicações para o alginato auto-geleificante. Em algumas formas de realização, o alginato auto-geleificante é usado em produtos alimentícios. Os alginatos auto-geleificantes que são particularmente úteis naqueles produtos alimentícios que são preparados como uma mistura de líquido/pasta fluida com outros ingredientes alimentícios são distribuídos em um vaso. O vaso é preferivelmente um molde onde o produto de gel/alimento ajusta-se para formar um sólido ou semi-sólido com uma forma moldada. Confeitos, decorações comestíveis, pudins e outros produtos alimentícios de forma moldada podem ser preparados.

**[0062]** Em algumas formas de realização, os alginatos auto-geleificantes são usados em aplicações biomédicas. Os alginatos auto-geleificantes biocompatíveis pode ser aplicados topicamente. Os alginatos auto-geleificantes biocompatíveis são particularmente úteis naquelas aplicações biomédicas em que é desejado que a matriz de gel acomode-se a um espaço in situ tal que o alginato auto-geleificante pode ser distribuído como uma dispersão no sítio onde a matriz é desejada. A dispersão enche a cavidade ou espaço na forma de líquido/pasta fluida e ajusta-se para formar um sólido dentro da cavidade ou espaço. Alternativamente, a dispersão pode ser distribuída topicamente onde ela podem ser difundida antes do ajuste. Em algumas formas de realização, os alginatos auto-geleificantes são usados na fabricação de matrizes que podem ser preparadas com formas específicas preparando-se uma mistura de líquido/pasta fluida que é distribuída em um molde

onde ela ajusta-se para formar um sólido com uma forma moldada e/ou para preparar matrizes com células encapsuladas úteis como substituições de tecido ou órgão.

**[0063]** Os sistemas de auto-geleificação de alginato que são controláveis, biocompatíveis e particularmente designados para propósitos de implantação de formação de gel *in situ* são fornecidos. As soluções que podem ser facilmente usadas para injeções ou aplicadas em outros modos dentro ou fora do corpo são fornecidas que ajustam-se para formar matrizes de gel sólidas. Misturando-se um alginato na presença de um solvente com uma fonte de íon geleificante de que os íons geleificantes são ligados dentro da rede de gel de um partícula insolúvel, o material de formação de gel podem ser distribuído como um líquido e ajustado em um padrão desejável e estrutura de tempo. A solução em um tempo predefinido endurece e forma um gel. A formulação é biocompatível, como variações no pH e a presença de compostos tóxicos é omitida. Desvios significantes de pH biológico são desnecessários.

**[0064]** Em algumas formas de realização, o alginato auto-geleificante é usado em aplicações biomédicas tais como aumento de volume de tecido tal como para o tratamento de problemas de refluxo (isto é, tratamento de problemas de incontinência, refluxo renal ou refluxo esofágico), embolização tal como no tratamento de tumores benignos ou malignos, tratamento anti-adesão como procedimentos pós cirúrgicos, e tratamento da ferida. A tecnologia corrente pode ser usada em várias aplicações, incluindo construções de tecido *ex vivo* ou *in vivo*, visto que as células ou outros biomateriais podem ser misturados no sistema de geleificação criando deste modo uma matriz extracelular bioartificial que sustenta células ou tecido. De acordo com algumas aplicações, depósitos sólidos biocompatíveis podem ser implantados que liberam ingredientes ativos tais como proteínas e drogas com o passar do tempo.

**[0065]** O alginato auto-geleificante é particularmente útil como um material de aumento de volume de tecido em que ele podem ser introduzido a um sítio que é remotamente acessível e distribuído como uma pasta fluida líquida para acomodar-

se mais completamente a uma cavidade em relação a outros tipos de implantes. A dispersão pode ser distribuída em uma quantidade suficiente para deslocar e sustentar outros tecidos ou órgãos no corpo e na formação de um gel in situ fornecem estrutura para manter e sustentar o outro tecido ou órgãos. O alginato auto-geleificante pode compreender componentes que o tornam bem adequado para aplicações de aumento de volume de tecido. Por exemplo, o uso de estrôncio como um agente geleificante resultará em um gel que inibe o supercrescimento celular e formação de tecido indesejada.

**[0066]** O alginato auto-geleificante é particularmente útil em procedimentos de embolização em que ele pode ser introduzido a um vaso sanguíneo que é remotamente acessível e distribuído como uma pasta fluida líquida para completamente acomodar-se ao interior ou ao vaso sanguíneo e mais completa e eficazmente bloqueá-lo em relação a outros tipos de fechamentos tais como suturas. A dispersão pode ser distribuída em uma quantidade suficiente para bloquear a circulação na formação de um gel in situ. O alginato auto-geleificante pode compreender componentes que o tornam bem adequado para aplicações de embolização. Por exemplo, os componentes podem ser selecionados quanto ao ajuste relativamente rápido e resistência alta. O alginato auto-geleificante usado em aplicações de embolização podem incluir reagentes de contraste para monitorar sua presença e local.

**[0067]** O alginato auto-geleificante é particularmente útil em tratamento anti-adesão como procedimentos pós cirúrgicos em que ele pode ser introduzido por toda a área da intervenção cirúrgica como uma pasta fluida líquida para cobrir completamente as superfícies expostas particularmente em ou próximo aos sítios de incisão. O alginato auto-geleificante pode compreender componentes que o tornam bem adequado para aplicações anti-adesão. Por exemplo, o uso de estrôncio como um agente geleificante resultará em um gel que inibe o supercrescimento celular e a formação de tecido indesejada.

**[0068]** O alginato auto-geleificante é particularmente útil para o tratamento da ferida em que ele podem ser introduzido por toda a área da ferida como uma pasta

fluida líquida para cobrir completamente as superfícies expostas. Além disso, o alginato auto-geleificante pode ser distribuído internamente através do sítio da ferida por exemplo como uma pasta fluida líquida. A dispersão pode ser distribuída em uma quantidade suficientemente para encher a cavidade interna depois do que a formação de um gel in situ o gel bloqueará quaisquer feridas internas e impedirá a perda de sangue através de hemorragia interna. O alginato auto-geleificante pode compreender componentes que o tornam bem adequado para aplicações de tratamento da ferida. Por exemplo, os componentes de coagulação sangüínea assim como composições anti-sépticas e antibióticas podem ser incluídos.

**[0069]** O alginato auto-geleificante é particularmente útil para produzir construções de tecido ex vivo ou in vivo. As células ou outros biomateriais podem ser misturados no sistema de geleificação criando deste modo uma matriz extracelular bioartificial que sustenta células ou tecido. A dispersão pode ser introduzido in situ como uma pasta fluida líquida a um sítio onde o tecido/células podem funcionar para obter um efeito terapêutico. Os exemplos de construções de tecido incluem osso, cartilagem, tecido conjuntivo, músculo, fígado, cardíaco, pâncreas e pele. Os exemplos destes pode ser preparações contendo células que secretam insulina para o tratamento de diabete, formulações contendo condrócitos para o reparo de articulações defeituosas, e células para tratar doença de Parkinson. Tais células podem ser incorporadas na pasta fluida líquida e distribuídas no sítio onde na formação de gel elas existirão e funcionarão dentro de uma matriz de alginato biocompatível. O gel também pode ser usado como uma célula capturada de proteção de barreira imune contra o sistema imune do hospedeiro. O alginato auto-geleificante também pode ser usado para encapsular células ex vivo por meio das quais o gel pode ser formado em uma forma compatível com seu uso intencionado. Em algumas formas de realização, o alginato auto-geleificante pode ser usado para encapsular células, tais como células dérmicas, e preparar a pele artificial tal como aquela que é usada para tratar vítimas de queimadura e outras em necessidade de enxertos de pele ou cura da ferida de área grande. Em algumas formas de realização, os alginatos auto-geleificantes podem ser usados para

encapsular células e formar matrizes que podem ser implantadas.

**[0070]** O tratamento da diabetes pode compreender a produção de uma matriz biocompatível compreendendo células que produzem insulina preparando-se a dispersão compreendendo partículas de alginato insolúvel/íon geleificante e células que produzem insulina em uma solução de alginato solúvel e distribuindo-se a dispersão a um sítio em um corpo de indivíduo onde a matriz biocompatível se forma. O sítio dentro do corpo individual pode ser uma cavidade ou uma estrutura implantada dentro do indivíduo. A dispersão pode ser distribuída em um molde, estrutura ou recipiente onde ela forma uma matriz biocompatível que é implantada no corpo de um indivíduo. A insulina produzida pelas células na matriz é secretada pelas células e liberadas da matriz no corpo do indivíduo onde ela funciona para aliviar os sintomas da condição diabética. Em algumas formas de realização, as células que produzem insulina são células das ilhotas pancreáticas. Em algumas formas de realização, as células que produzem insulina são células recombinantes produzidas para expressar e secretar insulina.

**[0071]** O alginato auto-geleificante é particularmente útil para produzir dispositivos revestidos tais como dispositivos implantáveis. Em algumas formas de realização, o dispositivo é selecionado dentre o grupo consistindo de: um sonda, um marca-passo cardíaco, um cateter, uma prótese implantável, um parafuso cirúrgico, um arame cirúrgico, um implante de aumento de volume de tecido, um implante inibidor do refluxo esofágico, um implante inibidor de incontinência, um refluxo renal, um recipiente adequado para conter células que são depositadas no exterior de uma superfície e/ou encapsuladas com uma matriz de alginato tal como um dispositivo sólido ou macrocápsula, um implante de mama, um implante de queixo, um implante de bochecha, um implante peitoral, um implante de glúteo e um implante dental. O revestimento usando alginato auto-geleificante produz um revestimento eficaz não obstante da forma. O uso de estrôncio como íon geleificante é particularmente útil para inibir o supercrescimento celular na implantação.

**[0072]** Os alginatos auto-geleificantes podem ser usados na fabricação de matrizes que podem ser implantadas. Tais matrizes podem ser preparadas com

formas específicas preparando-se uma mistura de líquido/pasta fluida que é distribuída em um molde onde ela ajusta-se para formar um sólido com uma forma moldada. As matrizes preparadas para a implantação podem compreender agentes biologicamente ativos e/ou célula. Os géis podem ser produzidos e implantados cirurgicamente, aplicados topicamente ou em um órgão através de aberturas externas.

**[0073]** De acordo com algumas formas de realização, kits são fornecidos para produzir um gel de alginato. Os kits podem compreender um primeiro recipiente compreendendo alginato solúvel; e um segundo recipiente compreendendo partículas de alginato insolúvel/íon geleificante. Os recipientes individuais podem ser compartimentos do recipiente separados de um sistema de recipiente integrado.

**[0074]** Em algumas formas de realização, os kits compreendem alginato solúvel na forma de uma solução. Em algumas formas de realização, os kits compreendem alginato solúvel isento de um solvente. Em algumas formas de realização, os kits compreendem um recipiente adicional compreendendo um solvente.

**[0075]** Em algumas formas de realização, os kits compreendem partículas de alginato insolúvel/íon geleificante na forma de um pó. Em algumas formas de realização, os kits compreendem partículas de alginato insolúvel/íon geleificante na forma de uma dispersão.

**[0076]** Em algumas formas de realização, os kits compreendem um recipiente adicional compreendendo uma droga, um peptídeo, uma proteína, uma célula, um rótulo detectável ou um reagente de contraste. Em algumas formas de realização, os kits compreendem uma droga, um peptídeo, uma proteína, uma célula, um rótulo detectável ou um reagente de contraste incluído no recipiente compreendendo solução ou pó de alginato solúvel e/ou no recipiente compreendendo pó ou dispersão de alginato insolúvel/íon geleificante.

**[0077]** De acordo com algumas formas de realização, as composições são fornecidas para preparar um gel. A composição compreende um alginato imediatamente solúvel e partículas de alginato insolúvel/íon geleificante. A composição pode compreender ainda uma droga, um peptídeo, uma proteína, um

rótulo detectável ou um reagente de contraste. A composição pode ser um componente em um kit. Um tal kit pode compreender ainda um recipiente com um solvente.

**[0078]** Os kits preferivelmente contêm instruções para o uso.

**[0079]** Em algumas formas de realização, os kits compreendem um dispositivo de misturação. Os dispositivos de misturação podem ser integrados como parte de um recipiente ou sistema de recipiente. Em algumas formas de realização, o dispositivo de misturação compreende um sistema de válvula que leva em consideração a passagem da dispersão de um recipiente a um recipiente diferente para facilitar a mistura.

**[0080]** Em algumas formas de realização, os kits compreendem um dispositivo distribuidor. O dispositivo distribuidor pode ser um aplicador em comunicação com um dispositivo de misturação e/ou um recipiente adaptado para conter a dispersão. Em algumas formas de realização, o dispositivo distribuidor compreende um cateter. Em algumas formas de realização, o dispositivo distribuidor compreende uma seringa.

#### EXEMPLOS

**[0081]** Exemplo 1: Geleificação com concentrações de cálcio diferentes

**[0082]** Neste experimento os géis foram fabricados misturando-se uma solução de alginato de sódio (Protanal SF 120) e uma dispersão de alginato de cálcio (Protaweld TX 120). A quantidade de alginato de cálcio variou (1,0%, 1,5% ou 2,0% no gel), enquanto a quantidade de alginato de sódio foi constante (1,0% no gel). O ajuste do sistema de auto-geleificação com o passar do tempo foi medido usando-se um reômetro Physica MCR 300 (Sistema de medição: PP50, dentado, Temperatura: 20° C, Intervalo: 1 mm, Freqüência: 1 Hz, Força: 0,005). A solução e a dispersão foram misturadas imediatamente antes da adição de uma amostra de 3 ml ao reômetro, e o teste de oscilação foi realizado durante um período de 18 a 24 horas.

**[0083]** Como mostrado na Figura 1, a resistência do gel aumentou rapidamente com o tempo durante as primeiras 1 a 2 horas, e depois disso a mudança na resistência do gel foi reduzida visto que o gel apresentou uma tendência a

estabilizar. Os dados também mostram que a resistência do gel foi aumentada na concentração de cálcio mais alta.

**[0084]** Exemplo 2: Geleificação com concentrações de alginato diferentes

**[0085]** Os sistemas de auto-geleificação de alginato foram fabricados misturando-se uma solução de alginato de sódio (Protanal SF 120) com uma suspensão de alginato de cálcio e medições realizadas como descrito no Exemplo 1. As medições de oscilação foram feitas durante um período de 18 a 24 horas. Quantidades iguais de alginato de sódio (Protanal SF 120) e alginato de cálcio (Protaweld TX 120) foram usadas. A quantidade de alginato de sódio e alginato de cálcio foi toda ajustada para ser 0,75%, 1%, 1,25% e 1,5% no gel final respectivamente (Figura 2). A cinética de geleificação seguiu um padrão similar em todos os quatro casos. Entretanto, como no Exemplo 1 a resistência do gel claramente aumentou com concentrações de alginato crescentes.

**[0086]** Exemplo 3: Geleificação com alginatos de peso molecular diferente

**[0087]** Neste experimento a cinética de geleificação para alginatos de sódio e cálcio com peso molecular diferente foi comparada (Figura 3). Uma amostra de MW reduzido do alginato (Protaweld TX 120) foi obtida aumentando-se a temperatura durante vários dias (Figura 3, Painel A) Os alginatos de sódio Protanal SF 120 e Protanal SF/LF com MW diferente também foram comparados (Figura 3, Painel B). As medições reológicas foram realizadas como descrito no Exemplo 1 e os dados são mostrados na Figura 3. Como mostrado na figura o processo de geleificação foi claramente dependente do peso molecular do alginato tanto para alginato de sódio quanto de cálcio. Em ambos os casos a resistência do gel aumentou mais rapidamente quanto ao alginato de peso molecular alto e também atingiu um nível mais alto.

**[0088]** Similarmente ao que é observado na Figura 3, a Figura 11 também mostra a geleificação de uma amostra de MW reduzido de alginato de sódio (PRONOVA UP G 100) obtida aumentando-se a temperatura. Entretanto, neste caso a geleificação foi iniciada misturando-se com alginato de estrôncio. Como mostrado na Figura 11 o processo de geleificação foi claramente dependente do peso

molecular do alginato visto que a resistência do gel atingiu um nível mais alto quanto ao alginato de peso molecular alto. Os dados da Figura 11, que usaram alginato de cálcio ou alginato de estrôncio a 100% de estequiometria de saturação, também mostram que o aumento da concentração de alginato pode compensar quanto à redução em MW com referência à resistência do gel.

**[0089]** Exemplo 4: Geleificação com íons geleificantes diferentes

**[0090]** Neste experimento alginato de cálcio ou estrôncio foi misturado com alginato de sódio (Protanal SF 120). Os alginatos de cálcio e estrôncio foram fabricados amassando-se ácido algínico com carbonato de cálcio. As medições reológicas foram realizadas como descrito no Exemplo 1 e os dados são mostrados na Figura 4. A quantidade de alginato de sódio e alginato de estrôncio/cálcio foi toda ajustada para ser 0,75% no gel. Claramente, o uso de estrôncio como íon geleificante deu origem a uma estrutura em gel mais forte assim como uma cinética de geleificação mais rápida.

**[0091]** Exemplo 5: Geleificação com teor diferente de ácido glicurônico

**[0092]** Visto que o teor de ácido glicurônico em alginatos é conhecido ter influência maior na resistência do gel de géis de alginato o efeito de usar alginatos de sódio (Protanal SF 120 e Protanal HF 60D) com teor diferente de ácido glicurônico foi testado. Na Figura 5, painel A é mostrado o módulo de armazenamento como uma função do tempo para géis contendo alginato de sódio com um teor de ácido glicurônico alto ou baixo. Em ambas as curvas o sistema foi geleificado misturando-se com uma dispersão de alginato de cálcio (Protaweld TX 120) com um teor de ácido glicurônico alto. A quantidade alginato de cálcio e alginato de sódio usada foi ajustada para ser 1,0% de cada no gel. As medições foram realizadas como descrito no Exemplo 1. Claramente o uso de um alginato de sódio com um teor de ácido glicurônico alto aumentou a resistência do gel do sistema embora em ambos os casos um alginato de cálcio com um teor de ácido glicurônico alto foi usado. Na Figura 5, painel B, alginato de estrôncio (produto do processo FMC com um teor de ácido glicurônico alto para o Exemplo 14) também foi misturado com alginatos de sódio com um teor alto e baixo de ácido glicurônico. Os

algínatos de sódio usados foram PRONOVA UP 100G (69% de G, MW: 122 000) e PRONOVA UP 100M (46% de G, MW: 119 000). O MW (e viscosidade) dos dois lotes de alginato de sódio foi selecionado para ser similar (tão próximo quanto possível). Como os dados claramente mostram, também quando usando alginato de estrôncio como a fonte de íon geleificante, o uso de alginato de sódio com um teor de ácido glicurônico alto aumentou a resistência do gel comparado a um alginato de sódio com um teor de ácido glicurônico baixo.

**[0093]** Exemplo 6: Estabilidade de géis fabricados com teor de cálcio diferente sob condições fisiológicas

**[0094]** Neste exemplo, a estabilidade e biodegradabilidade de géis de alginato fabricados com teor diferente de íons cálcio foi observada (Figura 6). Os discos de géis foram fabricados misturando-se alginato de cálcio (Protaweld TX 120) submetido à autoclave para esterilidade e um alginato de sódio filtrado estéril (Pronova UP LVG) a uma concentração final de 1,0% e 0,7% respectivamente. As dispersões foram geleificadas em duas placas de Petri. Os discos de gel em uma placa (marcada V) depois da geleificação inicial foram lavados com 50 mM de cloreto de cálcio durante 10 minutos e ambas as placas depois disso foram adicionadas com meio de cultura celular (DMEM suplementado com 10% de FBS). O meio nas placas depois foi mudado com meio fresco regularmente três vezes por semana e as placas foram armazenadas em uma incubadora de CO<sub>2</sub> a 37° C sob condições estéreis. O tamanho inicial do maior disco de gel em cada placa foi do mesmo tamanho. Depois de seis meses uma fração maior do gel não lavado com cálcio como mostrado na Figura 6 desapareceu enquanto os discos de gel lavados com cálcio adicional permaneceram com pouca ou nenhuma mudança no tamanho com o passar do tempo. Isto claramente mostra que o gel de alginato fabricado com um teor de cálcio limitado pode ser fortemente degradado sob condições fisiológicas.

**[0095]** Exemplo 7: Encapsulamento celular

**[0096]** A encapsulação de células em micropérolas de alginato é uma técnica amplamente usada correntemente sob desenvolvimento para aplicações biomédicas diferentes. As pérolas de alginato são usadas como um “biofábrica” para substâncias

terapêuticas. O gel de alginato permite o influxo de nutrientes essenciais como oxigênio e glicose e o efluxo de moléculas terapêuticas desejadas e produtos residuais. Usando-se células responsivas como células das ilhotas a “biofábrica” responde ao hospedeiro. Entretanto, a rede de gel precisa proteger as células capturadas do sistema imune do hospedeiro que é altamente crítica quando implantando células estranhas no corpo. Entretanto, foi mostrado que as células podem ser capturadas com êxito em outras estruturas de alginato que não micropérolas.

**[0097]** O efeito do gel em células capturadas em nossa matriz de alginato auto-gelificante também são mostrados (Figura 7). Em um dos experimentos (Figura 7, painel A) as células de mioblasto de camundongo C2C12 foram misturadas com solução de alginato PRONOVA UP MVG antes da mistura com uma dispersão de alginato de cálcio submetida à autoclave (Protaweld TX 120). A mistura contendo células e 0,7% de alginato de sódio e 1,0% de alginato de cálcio foi injetada em uma placa de Petri e moldada como discos. Depois de alguns minutos o gel foi lavado com 50 mM de cloreto de cálcio durante 10 minutos de modo a prevenir a degradação do gel (ver Exemplo 6) e o meio de crescimento celular (DMEM suplementado com 10% de FBS) depois disso foi adicionado ao gel. O gel de alginato/cultura celular foi armazenado em uma incubadora de CO<sub>2</sub> a 37° C sob condições estéreis e o meio depois disso foi regularmente mudado três vezes por semana. Depois de 45 dias em cultura a presença de células viáveis foi visualizada sob microscópio por tingimento com calceína. Um microscópio de fluorescência foi usado para visualizar as células vivas.

**[0098]** A imagem mostrada na Figura 7, painel A, mostra a presença de células viáveis tanto fora quanto dentro do gel. Por causa da focagem diferente no microscópio na parte diferente do gel manchas diferentes são mais ou menos claras na imagem. Numerosas células viáveis ou colônias de célula pequena podem ser observadas dentro do gel como manchas ilustradas pequenas. A área ilustrada grande que cobre uma parte grande da imagem mostra as células viáveis que entraram na superfície do gel e multiplicaram lá. Esta parte da superfície do gel é

coberta completamente com células que crescem como monocamadas. Alguns agregados celulares na superfície do gel, entretanto, estão também presentes em outras áreas.

**[0099]** Em um outro experimento (Figura 7, painel B) os condrócitos humanos foram capturados em auto-gel de alginato. Neste caso o gel foi fabricado de auto-gel misturado de 5 ml de PRONOVA SLG 20 (alginatos estéreis liofilizados de viscosidade baixa com alto teor de ácido glicurônico) e alginato de cálcio (produto do processo FMC, Exemplo 14) contendo condrócitos humanos. Três dias depois da geleificação o gel foi seccionado em fatias de 600 µm usando um vibratome. As fatias de gel foram armazenadas em meio de crescimento celular em uma incubadora de CO<sub>2</sub> e a imagem foi tomada depois de seis meses. A imagem foi tomada usando um microscópio de fluorescência depois de tingir as células com calceína como um indicador de viabilidade celular. A imagem demonstra claramente a presença de um número alto de células viáveis. A rede de gel de alginato portanto deve ser uma matriz boa em sustentar as células durante um longo período de tempo. Em conclusão os dados demonstram claramente que o gel pode ser uma matriz biocompatível para células e crescimento celular.

**[00100]** Uma série de amostras de alginato diferentes contendo condrócitos humanos também foram preparadas. Neste caso os alginatos de peso molecular mais alto foram selecionados de modo a reter a resistência do gel em concentrações baixas de íon geleificante e alginato. Estes foram PRONOVA SLG 100 e PRONOVA SLM 100 (alginatos estéreis liofilizados de viscosidade alta com teor de ácido glicurônico alto e baixo respectivamente). Os condrócitos foram misturados em uma solução de aproximadamente 2% de alginatos em meio celular. As suspensões de alginato/célula depois foram mantidas durante cerca de meia hora de modo a permitir a liberação de bolhas de ar antes de outro uso. As suspensões de células depois foram misturadas com alginatos estéreis de cálcio ou estrôncio insolúveis (produto do processo FMC preparado para o Exemplo 14, em frascos contendo 5 ml de dispersão de alginato a 10%, totalmente 0,5 mg de alginato). Cada frasco de alginato insolúvel conteve um magneto para agitação e foi usado no mesmo dia

depois da abertura. Os produtos insolúveis também foram moídos e separados de modo a controlar o tamanho de partícula e foram fabricados como alginatos de estrôncio e cálcio com um teor de ácido glicurônico alto ou baixo. A mistura da suspensão de alginato/célula e dispersão de alginato insolúvel foi feita em volumes pequenos em tubos de teste pequenos. As dispersões de alginato insolúvel foram mantidas sob agitação com magneto quando os volumes desejados foram retirados dos frascos. Amostras diferentes foram misturadas como descrito na tabela abaixo.

**[00101]** Sistemas de gel contendo células (concentrações iniciais em parênteses)

<b>Grupo</b>	<b>Solução de alginato</b>	<b>Alginatos de fonte de íons</b>	<b>Mistura</b>
Alt. 1	1,6% de PRONOVA SLG 100 (2,0%)	2,0% de G com alto teor de estrôncio (10%)	4:1
Alt. 2	1,6% de PRONOVA SLG 100 (2,0%)	2,0% G com alto teor de cálcio (10%)	4:1
Alt. 3	1,6% de PRONOVA SLM 100 (2,0%)	2,0% G com alto teor de estrôncio (10%)	4:1
Alt. 4	1,6% de PRONOVA SLG 100 (2,0%)	2,0% M com alto teor de estrôncio (10%)	4:1

**[00102]** Depois de uma geleificação inicial das mistura durante alguns minutos os pedaços de gel pequenos foram armazenados no meio de cultura celular em uma incubadora de CO<sub>2</sub> e a viabilidade celular foi verificada com tingimento com calceína (como previamente descrito) depois de uma semana. Neste estudo, a boa viabilidade celular no total as amostras de gel de alginato/célula foram observadas. Alternativamente, as amostras de alginato/condrócito podem ser preparadas in situ. Dependendo da aplicação, formulações de auto-gel diferentes podem ser adaptadas para cada uso particular. O gel pode conter células diretamente mas também pode conter micropérolas ou outras bioestruturas contendo células. A formulação pode ser injetada antes que a geleificação fosse considerada mas o gel também poderia ser deixado ajustar ex vivo, completa ou parcialmente antes da implantação. Além disso, o gel pode ser feito mais ou menos forte ou poroso de modo a permitir a proliferação celular dentro do gel ou não, para adaptar ao ambiente ou fornecer imunoproteção.

Dependendo do tipo de íon geleificante e tipo de alginato o gel pode ser formulado para ser menos atrativo para o supercrescimento das células. Também a estrutura em gel pode ser feita mais ou menos biodegradável usando-se um teor de cálcio baixo (como mostrado no Exemplo 6 e Figura 6), alginato de peso molecular baixo ou concentrações baixas de alginato. O gel também pode ser misturado com outros biopolímeros como hialuronato ou quitosano para propriedades melhoradas. O gel também pode ser reforçado ainda aplicando-se cálcio adicional à construção através de um procedimento de embebimento ou pulverização adequado.

**[00103]** Exemplo 8: Sistemas de liberação controlada

**[00104]** A utilidade do alginato em sistemas de liberação controlada para a liberação de uma droga ou outras moléculas terapêuticas foi demonstrada. O tipo de preparações de gel demonstradas aqui também pode ser usado similarmente e têm vantagens em formulações diferentes. Um exemplo é o uso de géis biodegradáveis, isto é, usando-se uma concentração baixa de íons geleificantes de modo a limitar o período de tratamento. No tratamento de pacientes com câncer um gel de enchimento de espaço contendo uma droga ou isótopos radioativos pode ser aplicado durante procedimentos cirúrgicos de modo a prevenir a reincidência da doença. Depois que as substâncias ativas são liberadas ou a radioatividade decaiu pode ser desejável que o gel dissolva e seja excretado do corpo. As formulações de liberação controlada de alginato auto-geleificante certamente também podem ser injetadas diretamente no corpo sem nenhum procedimento cirúrgico e a solução de gel/alginato também pode ser usada para a liberação de uma droga oral. Para o uso oral o alginato é correntemente bem conhecido em formulações como um remédio anti-refluxo. Portanto também é possível que as formulações de alginato auto-geleificante formulações podem encontrar usos similares.

**[00105]** Exemplo 9: Aplicações de engenharia tecidual

**[00106]** O encapsulamento de células dentro do gel de alginato como apresentado aqui pode ser usado para produzir "biofábricas" implantáveis excretando substâncias ativas para o tratamento de uma variedade de doenças. Entretanto, o encapsulamento de células dentro do gel de alginato também pode ser usado em

aplicações de engenharia tecidual. Para a engenharia tecidual o crescimento de células dentro de ou nas construções tridimensionais é necessário e portanto bons biomateriais para tais aplicações são necessários. A liberação de retardo de tempo de íons reticulantes permite que a suspensão de alginato de íon geleificante seja moldada em geometrias complexas antes que a geleificação ocorra. Sob condições ex vivo tais estruturas de alginato podem ser usadas como um substrato de crescimento no desenvolvimento de tecido ou órgãos artificiais. As células crescem na superfície de pérolas de gel de alginato visto que a superfície do gel pode ser um substrato de crescimento para as células. O crescimento de células em géis de alginato foi descoberto ser dependente do alginato e dos íons geleificantes usados. A presente formulação auto-geleificante pode ser usada para criar camadas múltiplas de células que crescem dentro de ou na superfície de folhas de alginato ou outras estruturas em forma de gel.

**[00107]** Além disso, o gel de alginato mais tarde pode ser removido através de tratamento com citrato, fosfatos ou outros agentes quelantes de íon geleificante. Isto fornece a possibilidade para combinar várias camadas celulares na construção de tecidos ou órgãos. Vários tipos de células dentro de ou na superfície de estruturas em gel podem ser combinados se isto for desejável para o desenvolvimento da construção.

**[00108]** A regeneração de nervo é um exemplo interessante do uso de alginato dentro da engenharia tecidual. O enchimento de condutos de nervo artificiais com alginato auto-geleificante pode ser adequado para a criação de construções com orientação e biocompatibilidade melhoradas para o recrescimento de nervo. Este sistema pode fornecer melhor flexibilidade e melhor controle sobre processos de moldagem e propriedades de estrutura quanto comparado a outras técnicas.

**[00109]** Os sistemas de suspensão de alginato/célula injetáveis também podem ser liberados ao sítio de tecido defeituoso ou danificado mesmo sem intervenção cirúrgica. Para tais aplicações pode ser crítico ter um certo tempo de trabalho para formar o material antes que ele geleifica. Entretanto, a taxa de geleificação também pode ser necessária para ser razoavelmente rápida de modo que um tempo de

espera de paciente prolongado ou problemas com aplicação de gel/solução podem ser evitados. O sistema de auto-geleificação como mostrado aqui e previamente mencionado pode ser adaptado com curvas de tempo de geleificação diferentes e propriedades de resistência e estabilidade diferentes. Esta variabilidade portanto pode ser usada para adaptar a cada tipo de procedimentos de injeção. Como um exemplo o reparo de defeitos na cartilagem mantém um potencial para o uso de estruturas de alginato auto-geleificante. O alginato foi descoberto ser um biomaterial útil a ser usado para a engenharia tecidual de cartilagem, e foi descoberto que o alginato pode estimular condrogênese. Portanto as soluções de alginato auto-geleificante com ou sem condrócitos ou outras células podem ser diretamente injetadas no tratamento de defeitos articulares. Os pacientes com osteoartrite hoje já estão sendo tratados com “terapia de fluido da junta” e existem dois produtos no mercado, hialuronato de sódio (Hyalgan) e hylan G-F 20 (Synvisc) que acredita-se que funcionem como lubrificantes suplementando-se ácido hialurônico, a substância que fornece fluido da junta em sua viscosidade. O alívio da dor continua tão longo quanto seis a 13 meses em algumas pessoas. As terapias provaram ser o mais eficazes para pessoas com osteoartrite no joelho média à moderada. Entretanto, visto que o ácido hialurônico é conhecido ser degradado no corpo o uso de outros biopolímeros como alginato com menos biodegradabilidade e boa biocompatibilidade fornece vantagens.

**[00110]** Os hidrogéis de alginato podem ser liofilizados ou a água ser removida parcial ou completamente em outras maneiras tratados de modo a criar estruturas biocompatíveis como esponjas ou fibras. O uso da tecnologia apresentada aqui, usando sistemas de alginato auto-geleificante, também pode ser usado como uma etapa na fabricação de esponjas biocompatíveis ou outras estruturas que são úteis para a engenharia tecidual ou outras aplicações.

**[00111]** As formulações de alginato auto-geleificante podem ser usadas no revestimento de sondas ou enxertos ou outros dispositivos de implantação. Dependendo do tipo de formulação de alginato a camada de revestimento pode ser feita mais ou menos biodegradável e fornece mais ou menos suporte para o

encravamento de células hospedeiras ou o crescimento de células adicionadas ao dispositivo.

**[00112]** Exemplo 10: Aumento de volume de tecido

**[00113]** O alginato pode ser liberado na submucosa proximal ao esfíncter uretral para fornecer aumento de volume para o tratamento de incontinência da bexiga e os procedimentos já foram realizados na clínica. Um outro exemplo pode ser a liberação de formulações de alginato na junção entre o esôfago e o estômago para auxiliar no tratamento de distúrbios de refluxo gastro-esofágico. O grau alto de compatibilidade de alginatos torna o uso como uma solução injetável em procedimentos cosméticos uma alternativa atrativa para outros materiais.

**[00114]** As formulações com base em sistemas de alginato auto-geleificante podem ser usadas para criar soluções injetáveis ou pastas com tempo de endurecimento predefinido com o propósito de encher um volume predefinido. Como previamente mencionado as formulações de gel podem ser feitas mais ou menos biodegradáveis fornecendo a formulação de aumento de volume com uma propriedade desejável.

**[00115]** Exemplo 11: Embolização de vasos sangüíneos

**[00116]** Os métodos para formar oclusões endovasculares podem ser usados para tratar condições tais como malformações arteriovenosas, aneurismas, sangue excessivo fornecido aos tumores, controle de hemorragia vascular maciça, e outras condições que requerem uma embolização para aliviar a condição. Alguns sistemas embólicos incluem o uso de soluções de polímeros que começam a solidificar ou precipitar quando contatadas com sangue ou outros fluidos corpóreos. Tais sistemas, entretanto, sofrem do problema da solução de polímero que migram em partes indesejadas do corpo por causa do retardo de tempo necessário para causar a formação ou precipitação do polímero sólido. A migração nestes sistemas de solução de polímero é particularmente problemática quando a solução é injetada em áreas de “fluxo alto”, tais como sistemas vasculares. As fibras formadas de sistemas de solução de polímero também tendem a sofrer de outros problemas, tais como não embolizando bem, sendo excessivamente frágeis, ou não sendo biocompatíveis. O

uso de partículas ou pérolas de PVA (álcool polivinílico) ou pérolas de gelatina foi descoberto ser útil para a embolização e é correntemente usado em clínicas.

**[00117]** As formulações com base em alginato também foram propostas para o uso em procedimentos de embolização. Foi sugerido que as oclusões endovasculares podem ser induzidas usando alginato de cálcio controlando-se as injeções de um líquido de alginato e uma solução de cloreto de cálcio para satisfazer e polimerizar em um sítio dentro do sistema vascular alvejado para a oclusão. Comparado a tais sistemas, o uso de formulações de alginato auto-geleificante como apresentado aqui têm vantagens. O tratamento pode ser realizado como injeções únicas e a concentração da formulação de auto-endurecimento pode ser ajustada com melhor controle do sistema. Em formulações de alginato auto-geleificante particulares são úteis quando o tempo antes da geleificação e biodegradabilidade precisa ser controlado.

**[00118]** Exemplo 12: Formulações anti-adesão

**[00119]** A formação de adesões são atribuíveis às operações cirúrgicas, trauma, infecções etc. As adesões freqüentemente ocorrem depois de operações abdominais e representam um problema clínico maior resultando em obstrução intestinal, infertilidade, e dor. Esforços para prevenir ou reduzir adesões foram grandemente mal sucedidos; entretanto, as barreiras mecânicas recentemente desenvolvidas usando biopolímeros diferentes demonstraram progresso clínico na prevenção da adesão.

**[00120]** As formulações com base em alginato também foram propostas como barreiras anti-adesão. As barreiras anti-adesão podem ser formuladas usando-se o sistema de alginato auto-geleificante apresentado aqui. A formulação de solução/gel é pré misturada imediatamente antes do uso e fabricada com biodegradabilidade adequada. Tais tipos de formulações também podem incluir outros polímeros, uma droga ou outros compostos sustentadores. Os polímeros adicionais podem ser usados para melhorar as propriedades do gel, entre outras para aumentar a adesão entre a estrutura em gel e tecido.

**[00121]** Exemplo 13: Formulações de cura da ferida

**[00122]** Os curativos de alginato são comumente usados para tratar feridas de exsudação. Os produtos de alginato correntes para a cura da ferida são compostos de fibras ou almofadas não tecidas, macias. Os alginatos podem absorver muitas vezes seu próprio peso e formar um gel dentro da ferida para encher no espaço morto e manter um ambiente úmido. Também foi sugerido que os alginatos podem influenciar o processo de cura da ferida através de mecanismos mais desconhecidos, e foi postulado que o cálcio presente dentro do curativo de ferida de alginato pode influenciar o processo de cura da ferida através da influência em certas células.

**[00123]** As estruturas de alginato auto-geleificante são capazes de conformar à estrutura tridimensional de uma superfície do tecido durante os processos de cura. Entre outras formulações com um teor de cálcio mais controlável e definido podem ser obtíveis assim como as estruturas com grau alto de resorvabilidade.

**[00124]** Exemplo 14: Produção de alginato de cálcio insolúvel

**[00125]** Um alginato de cálcio foi preparado usando um alginato comercial ultrapuro (teor de endotoxina reduzido). Além disso, o teor de cálcio foi de uma natureza estequiométrica. Especificamente 60 g de alginato de sódio PRONOVA UP LVG (lote FP-008-04) tendo um peso molecular de aproximadamente 130.000, uma viscosidade de aproximadamente 150 mPas (1% de solução, 20° C), um teor de glicuronato de 64%, e um teor de endotoxina de 260 EU/grama, foi dissolvida em 5 litros de água purificada. 26 gramas de carbonato de sódio foram adicionados. 165 gramas de cloreto de cálcio desidratado primeiro foram dissolvidos em 500 ml de água purificada e o pH foi ajustado com ácido nítrico até neutralidade. A solução de alginato foi adicionada cuidadosamente à solução de cloreto de cálcio sob agitação contínua. O alginato de cálcio precipitado depois foi lavado sucessivamente 4 a 8 vezes com água purificada até que a condutividade fosse reduzida a um nível similar àquele da água purificada. O alginato de cálcio lavado depois foi seco sob vácuo e subsequentemente moído. O alginato de estrôncio insolúvel pode ser preparado por um método similar usando sal de estrôncio no lugar de cloreto de cálcio. Os alginatos insolúveis resultantes têm quantidades estequiométricas ou

subestequiométricas controladas de cálcio ou estrôncio que quando usadas nos sistemas de geleificação produzem géis de consistência reproduzível maior do que aqueles fabricados usando alginatos insolúveis produzidos por outros métodos.

**[00126]** Exemplo 15: Geleificação na presença de outros íons e agentes de ligação de cálcio

**[00127]** Nos experimentos nós realizamos medições de oscilação como descrito mais no início (Exemplo 1). O módulo de armazenamento foi medido como uma função do tempo para géis contendo 1,25% de alginato de sódio (PRONOVA UP 100 G) misturado com 5,5% de alginato de estrôncio (Exemplo 14) em uma razão de 4:1 (concentração de alginato final foi de 2,1%). O desenvolvimento do gel foi medido na presença ou ausência de cloreto de sódio ou hexametáfosfato de sódio (Figura 8). Duas concentrações diferentes de cloreto de sódio foram testadas e os dados demonstram claramente uma taxa de geleificação aumentada quando aumentando a concentração de íons sódio. A presença de um agente de ligação de cálcio como hexametáfosfato de sódio claramente também mudou a cinética de geleificação e reduziu a resistência final do gel. Os dados assim mostram que a presença de íons não geleificantes como compostos complexantes de sódio ou cálcio como hexametáfosfato podem ser usados para modificar a cinética de geleificação e propriedades finais do gel.

**[00128]** Exemplo 16: Geleificação com partículas de alginato de cálcio de tamanho diferente

**[00129]** Durante o processo de fabricação para alginatos insolúveis o tamanho de partícula do produto final pode ser controlado. Neste exemplo nós fabricamos um lote de alginato de cálcio que foi moído e separado através de filtros diferentes de modo a separar entre tamanhos de partícula diferentes. Quando partículas de alginato de estrôncio diferentes foram geleificadas com alginato de sódio sob condições de outro modo idênticas existiu uma diferença grande no processo de geleificação e propriedades finais do gel (Figura 9). Embora o geleificante fosse muito rápido para tamanhos de partícula menores, o tempo de geleificação total foi consideravelmente mais longo para os tamanhos de partícula maiores e este

também forneceu géis com resistência muito mais alta. Entretanto, para os tamanhos de partícula menores deve ser observado que alguma degradação do gel provavelmente ocorreu durante a mistura dos dois componentes visto que a velocidade de geleificação foi muito rápida (em particular para partículas menores do que 25  $\mu\text{m}$ ). Este efeito portanto também pode contribuir um pouco para a diferença na resistência do gel final. Não obstante, em conclusão nossos dados mostram que o tamanho das partículas precisa ser considerado e pode ser ativamente usado de modo a obter propriedades desejáveis.

**[00130]** Exemplo 17: Geleificação em temperaturas diferentes

**[00131]** Nós também testamos se o ajuste da temperatura pode ser ativamente usado para controlar o ajuste do sistema de gel. Na Figura 10 mostrou dados reológicos para uma mistura de alginato de cálcio e alginato de sódio em temperaturas diferentes. Claramente, a taxa de geleificação foi reduzida a 10° C e também aumentou a 37° C quanto comparada à temperatura ambiente. Os dados assim mostram que a temperatura pode ser ativamente usada de modo a controlar a cinética de geleificação. Entre outros esta pode ser ativamente usada reduzindo-se a temperatura para permitir mais tempo para a preparação de gel e manejo antes da administração in vivo.

**[00132]** Exemplo 18: Geleificação com partículas de alginato de cálcio ou estrôncio não saturadas

**[00133]** Os alginatos de cálcio e alginatos de estrôncio foram preparados que foram estequiométricos não saturados com íons geleificantes (menos do que 100% saturado). Tais partículas ao contrário das partículas saturadas reidrataram muito rapidamente em contato com água contendo soluções. As partículas não saturadas portanto podem ser usadas para formar um estrutura em gel presente que consiste de partículas de gel (gel não sólido). Embora a estrutura em gel fosse fraca ela foi facilmente formável durante um período longo. As células ou outros materiais facilmente podem ser misturados na estrutura em gel adicionando-os simplesmente à solução contendo água antes da mistura no pó. Também outras partículas ou materiais podem ser misturados na estrutura em gel pré misturando-se com as

partículas não saturadas antes de adicionar a solução contendo água. Um exemplo disto é pré misturar alginato de sódio seco, alginato insolúvel saturado e alginato insolúvel não saturado antes que a solução contendo água seja adicionada. Em contato com a água esta mistura como previamente fornecerá uma estrutura em gel que absorve a água presente, entretanto, a resistência do gel também aumentará mais com o tempo visto que as partículas de alginato solúvel e alginato insolúvel saturado no gel gradualmente começam a hidratar e geleificar na dissolução. As formulações mencionadas aqui, utilizando as propriedades de absorção de água de alginatos insolúveis não saturados assim também podem ser usadas em combinações com células ou outros materiais e ser muito úteis para a engenharia tecidual e outras aplicações.

**[00134]** Exemplo 19: FP-411-03, Produção de alginato de cálcio com quantidade estequiométrica de cálcio (100% de saturação), alginato rico em G, com carbonato de sódio e ácido nítrico.

**[00135]** 50 gramas de alginato de sódio PRONOVA UP LVG, lote FP-008-04 (64% de teor de ácido glicurônico, 130.000 g/mol de peso molecular, 146 mPas de viscosidade de uma solução a 1% a 20° C, 400 EU/grama de teor de endotoxina) foram dissolvidos em 3 litros de água purificada. 15 gramas de carbonato de sódio foram adicionados. Uma solução de cálcio foi adicionada que consiste de 139 gramas de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em 300 ml de água purificada com a adição de 12 ml de  $\text{HNO}_3$  (65%). Uma precipitação fina resultou. A condutividade desta solução foi medida para ser de 55 mS/cm. O precipitado foi lavado sucessivamente (8 vezes) com água purificada até que a condutividade fosse de 0,08 mS/cm. O precipitado foi seco a vácuo.

**[00136]** Exemplo 20: FP-411-04, Produção de alginato de cálcio com quantidade sub-estequiométrica de cálcio (50% de saturação), alginato rico em G, com carbonato de sódio e ácido nítrico.

**[00137]** 25 gramas de PRONOVA UP LVG (descrição como dada no Exemplo 19) foram dissolvidos em 1,5 litro de água purificada. Para calcular a quantidade de cálcio necessária, 25 gramas de alginato representam 0,146 mol de alginato (usando

um peso molecular monomérico de 171 g/mol). O alginato usado, PRONOVA UP LVG lote FP-008-04 tem um teor de ácido glicurônico de 64% que resulta em 0,093 mol de sítios de ligação de cálcio (0,146 mol de alginato x 64% de monômeros de ácido glicurônico). Para uma substituição de 50% com cálcio isto requereria 0,0465 mol de cálcio ( $0,093/2 = 0,0465$  mol). 0,0465 mol de sal de cálcio é calculado para ser 6,84 gramas do diidrato ( $0,0465 \text{ mol} \times 147,02 \text{ g/mol} (\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 6,84 \text{ g}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). 6,84 gramas de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  são dissolvidos em 150 ml de água purificada e 6 ml de  $\text{HNO}_3$  (65%). 7,5 gramas de carbonato de sódio são adicionados à solução de alginato. Uma precipitação fina resulta. A condutividade é medida para ser de 8 mS/cm. O precipitado é lavado sucessivamente (6 vezes) até que a condutividade seja de 0,4 mS/cm. O precipitado é seco a vácuo.

**[00138]** Exemplo 21: FP-411-05, Produção de alginato de estrôncio com quantidade estequiométrica de estrôncio (100% de saturação), alginato rico em G, com carbonato de sódio e ácido nítrico.

**[00139]** 47 gramas de alginato de sódio PRONOVA UP LVG, lote FP-008-04 (64% de teor de ácido glicurônico, 130.000 g/mol de peso molecular, 146 mPas de viscosidade de uma solução a 1% a 20° C, 400 EU/grama de teor de endotoxina) foram dissolvidos em 3 litros de água purificada. 15 gramas de carbonato de sódio foram adicionados. Uma solução de estrôncio foi adicionada que consiste de 252 gramas de  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em 300 ml de água purificada com a adição de 12 ml de  $\text{HNO}_3$  (65%). Uma precipitação fina resultou. A condutividade desta solução foi medida para ser de 78 mS/cm. O precipitado foi lavado sucessivamente (8 lavagens) com água purificada até que a condutividade fosse de 0,0159 mS/cm. O precipitado foi seco a vácuo.

**[00140]** Exemplo 22: FP-411-06, Produção de alginato de estrôncio com quantidade sub-estequiométrica de estrôncio (50% de saturação), alginato rico em G, com carbonato de sódio e ácido nítrico.

**[00141]** 23,3 gramas de PRONOVA UP LVG (descrição como dada no Exemplo 19) foram dissolvidos em 1,5 litro de água purificada. Para calcular a quantidade de cálcio necessária, 23,3 gramas de alginato representam 0,136 mol de alginato

(usando um peso molecular monomérico de 171 g/mol). O alginato usado, PRONOVA UP LVG lote FP-008-04 tem um teor de ácido glicurônico de 64% que resulta em 0,087 mol de sítios de ligação de cálcio (0,136 mol de alginato x 64% de monômeros de ácido glicurônico). Para uma substituição de 50% com estrôncio isto requereria 0,0435 mol de estrôncio ( $0,087/2 = 0,0435$  mol). 0,04 a 35 mol de sal de estrôncio são calculados para ser 11,6 gramas do hexaidrato (0,0435 mol x 266,62 g/mol ( $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) = 11,6 g de  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . 11,6 gramas de  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  são dissolvidos em 150 ml de água purificada e 6 ml de  $\text{HNO}_3$  (65%). 7,5 gramas de carbonato de sódio são adicionados à solução de alginato. Uma precipitação fina resulta. A condutividade é medida para ser 22 mS/cm. O precipitado é lavado sucessivamente (3 vezes) até que a condutividade seja de 0,6 mS/cm. O precipitado é seco a vácuo

**[00142]** Exemplo 23: FP-506-03, Produção de alginato de estrôncio com quantidade estequiométrica de estrôncio (100% de saturação), alginato rico em M, sem carbonato de sódio e ácido nítrico.

**[00143]** 50 gramas de alginato de sódio PRONOVA UP LVM, lote FP-408-01 (44% de teor de ácido glicurônico, 220.000 g/mol de peso molecular, 127 mPas de viscosidade de uma solução a 1% a 20° C, <25 EU/grama de teor de endotoxina) foram dissolvidos em 3 litros de água purificada. Uma solução de estrôncio foi adicionada que consiste de 252 gramas de  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dissolvida em 400 ml de purificado. Uma precipitação fina resultou. A condutividade desta solução foi medida para ser 43 mS/cm. O precipitado foi lavado sucessivamente (8 lavagens) com água purificada até que a condutividade fosse de 0,143 mS/cm. O precipitado foi seco a vácuo, moído e fracionado.

**[00144]** Exemplo 24: FP-505-05, Produção de alginato de estrôncio com quantidade estequiométrica de estrôncio (100% de saturação), alginato rico em G, sem carbonato de sódio ou ácido nítrico.

**[00145]** 50 gramas de alginato de sódio PRONOVA UP LVG, lote FP-408-02 (69% de teor de ácido glicurônico, 219.000 g/mol de peso molecular, 138 mPas de viscosidade de uma solução a 1% a 20° C, <25 EU/grama de teor de endotoxina)

foram dissolvidos em 3 litros de água purificada. Uma solução de estrôncio foi adicionada que consiste de 252 gramas de  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em 400 ml de purificado. Uma precipitação fina resultou. A condutividade desta solução foi medida para ser 40 mS/cm. O precipitado foi lavado sucessivamente (7 lavagens) com água purificada até que a condutividade fosse de 0,1 mS/cm. O precipitado foi seco a vácuo, moído e fracionado.

**[00146]** Exemplo 25: FP-505-02, Produção de alginato de cálcio com quantidade estequiométrica de cálcio (100% de saturação), alginato rico em M, sem carbonato de sódio e ácido nítrico.

**[00147]** 50 gramas de alginato de sódio PRONOVA UP LVM, lote FP-408-01 (44% de teor de ácido glicurônico, 220.000 g/mol de peso molecular, 127 mPas de viscosidade de uma solução a 1% a 20° C, <25 EU/grama de teor de endotoxina) foram dissolvidos em 3 litros de água purificada. Uma solução de cálcio foi adicionada que consiste de 137 gramas de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissolvida em 300 ml de água purificada. Uma precipitação fina resultou. A condutividade desta solução foi medida para ser 45 mS/cm. O precipitado foi lavado sucessivamente (8 lavagens) com água purificada até que a condutividade fosse de 0,0129 mS/cm. O precipitado foi seco a vácuo, moído e fracionado.

**[00148]** Exemplo 26: FP-504-02, Produção de alginato de cálcio com quantidade estequiométrica de cálcio (100% de saturação), alginato rico em G, sem carbonato de sódio e ácido nítrico.

**[00149]** 50 gramas de alginato de sódio PRONOVA UP LVG, lote FP-408-02 (69% de teor de ácido glicurônico, 219.000 g/mol de peso molecular, 138 mPas de viscosidade de uma solução a 1% a 20° C, <25 EU/grama de teor de endotoxina) foram dissolvidos em 5 litros de água purificada. Uma solução de cálcio foi adicionada que consiste de 231 gramas de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em 500 ml de purificado. Uma precipitação fina resultou. A condutividade desta solução foi medida para ser 43 mS/cm. O precipitado foi lavado sucessivamente (8 lavagens) com água purificada até que a condutividade fosse de 0,0068 mS/cm. O precipitado foi seco a vácuo, moído e fracionado.

**[00150]** Exemplo 27: Outros exemplos de produtos produzidos com estequiometrias variadas de teor de cálcio e estrôncio, assim como variações no tipo de alginato usado (rico em giluronato (G) ou rico em manuronato (M)) são mostrados na tabela anexa.

<b>Lote</b>	<b>Sal</b>	<b>Tipo de Alginato</b>	<b>Saturação</b>	<b>% de Na</b>	<b>% de Ca</b>	<b>% de Sr</b>	<b>Tamanho de partícula, µm</b>
FP-508-03	Ca	G 113	100%				125, 75, 45, 25
FP-506-03	Sr	M 127	100%				125, 75, 45, 25
FP-505-05	Sr	G 425	100%				125, 75, 45, 25
FP-505-02	Ca	M 410	100%				125, 75, 45, 25
FP-504-02	Ca	G 993	100%				
FP-502-02	Sr	M 663	100%	0,12		21,6	75
FP-502-01	Ca	M 663	100%	0,16	9,2		75
FP-501-06	Sr	G 149	100%	0,58		20,5	
FP-501-05	Ca	G 149	100%	0,44	8,0		
FP-501-03	Sr	M 110	100%				
FP-501-02	Ca	M 110	100%	0,22	8,6		

FP-412-01	Sr	M 110	90%	3,1		14,5	
FP-411-06	Sr	G 146	64%				
FP-411-05	Sr	G 146	100%	0,46		20,0	
FP-411-04	Ca	G 146	64%	3,4	6,4		
FP-411-03	Ca	G 146	100%	0,16	9,5		
16.09.2004	Ca	G 190	100%	0,21	10,3		

## REIVINDICAÇÕES

1. Kit para produzir um gel de alginato biocompatível, caracterizado pelo fato de compreender: um primeiro recipiente compreendendo alginato solúvel estéril biocompatível; e um segundo recipiente compreendendo partículas de íon geleificante/alginato insolúvel estéril biocompatíveis;

em que as partículas de íons de geleificante/alginato insolúvel estéril são separadas em um tamanho predeterminado.

2. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda um dispositivo de misturação e/ou um dispositivo distribuidor.

3. Kit de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de misturação é um conector T.

4. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda um recipiente adicional compreendendo um solvente.

5. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda uma droga, um peptídeo, uma proteína, uma célula, um agregado multicelular, um tecido, um rótulo detectável ou um reagente de contraste.

6. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que se tem um excesso de alginato solúvel estéril biocompatível em comparação com o alginato insolúvel estéril biocompatível.

7. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de alginato solúvel estéril biocompatível para alginato insolúvel estéril biocompatível está entre 5:1 e 1:5.

8. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tamanho de partícula de íon geleificante/alginato insolúvel estéril biocompatível é selecionado dentre o grupo consistindo de: < 25 µm, 25-45 µm, 45-75 µm, 75-125 µm e > 125 µm.

9. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alginato solúvel estéril biocompatível e/ou o alginato insolúvel estéril biocompatível compreende(m) um alginato de teor de G elevado.

10. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o

alginate solúvel estéril biocompatível e/ou o alginate insolúvel estéril biocompatível tem um peso molecular de cerca de 5-350 kD.

11. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alginate solúvel estéril biocompatível e/ou o alginate insolúvel estéril biocompatível compreende(m) níveis de endotoxina de < 25 EU/grama.

12. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alginate solúvel estéril biocompatível e/ou o alginate insolúvel estéril biocompatível compreende(m) níveis de endotoxina de 400 EU/grama.

13. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alginate solúvel estéril biocompatível compreende um ou mais dentre Na-alginate, K-alginate, PEG-alginate ou NH<sub>4</sub>-alginate.

14. Kit de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alginate insolúvel estéril biocompatível compreende um ou mais dentre cálcio, estrôncio, bário, cobre, manganês, chumbo, cobalto ou níquel.

15. Composição para preparar um gel, caracterizada pelo fato de compreender partículas de íon geleificante/alginate insolúvel estéril biocompatível e alginate imediatamente solúvel estéril biocompatível.

16. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de compreender ainda uma droga, um peptídeo, uma proteína, um rótulo detectável ou um reagente de contraste.

17. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o alginate solúvel estéril biocompatível e/ou o alginate insolúvel estéril biocompatível compreende(m) alginate de teor de G elevado.

18. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o alginate solúvel estéril biocompatível e/ou o alginate insolúvel estéril biocompatível tem um peso molecular de 5-350 kD.

19. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o alginate solúvel estéril biocompatível e/ou o alginate insolúvel estéril biocompatível compreende(m) níveis de endotoxina de < 25 EU/grama.

20. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo

fato de que o alginato solúvel estéril biocompatível e/ou o alginato insolúvel estéril biocompatível compreende(m) níveis de endotoxina de 400 EU/grama.

21. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o alginato solúvel estéril biocompatível compreende um ou mais dentre Na-alginato, K-alginato, PEG-alginato ou NH<sub>4</sub> alginato.

22. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o alginato insolúvel estéril biocompatível compreende um ou mais dentre cálcio, estrôncio, bário, cobre, manganês, chumbo, cobalto ou níquel.

23. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que se tem um excesso de alginato solúvel estéril biocompatível em comparação com alginato insolúvel estéril biocompatível.

24. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a concentração de alginato solúvel estéril biocompatível para alginato insolúvel estéril biocompatível está entre 5:1 e 1:5.

25. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o tamanho de partícula de íon geleificante/alginato insolúvel estéril biocompatível é selecionado dentre o grupo consistindo de: < 25 µm, 25-45 µm, 45-75 µm, 75-125 µm e > 125 µm.

26. Uso de uma solução compreendendo um alginato solúvel estéril biocompatível com partículas de íon geleificante/alginato insolúvel estéril biocompatível ou de alginato imediatamente solúvel estéril biocompatível, partículas de íon geleificante/alginato insolúvel estéril biocompatível e um solvente, caracterizado pelo fato de ser para formar uma dispersão de alginato auto-geleificante, em que a dita dispersão forma uma matriz de gel de alginato quando dispensada.

27. Uso de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a referida dispersão de alginato auto-geleificante biocompatível é dispensada para melhorar a viabilidade de ilhotas pancreáticas, ou outros agregados celulares ou tecido.

FIGURA 1

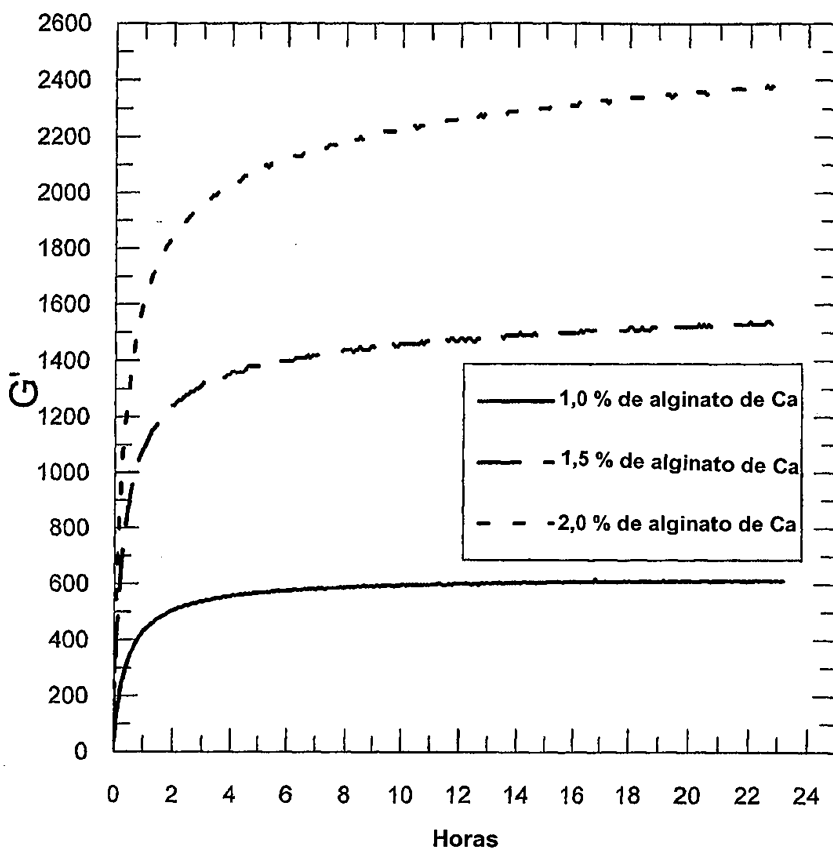


FIGURA 2

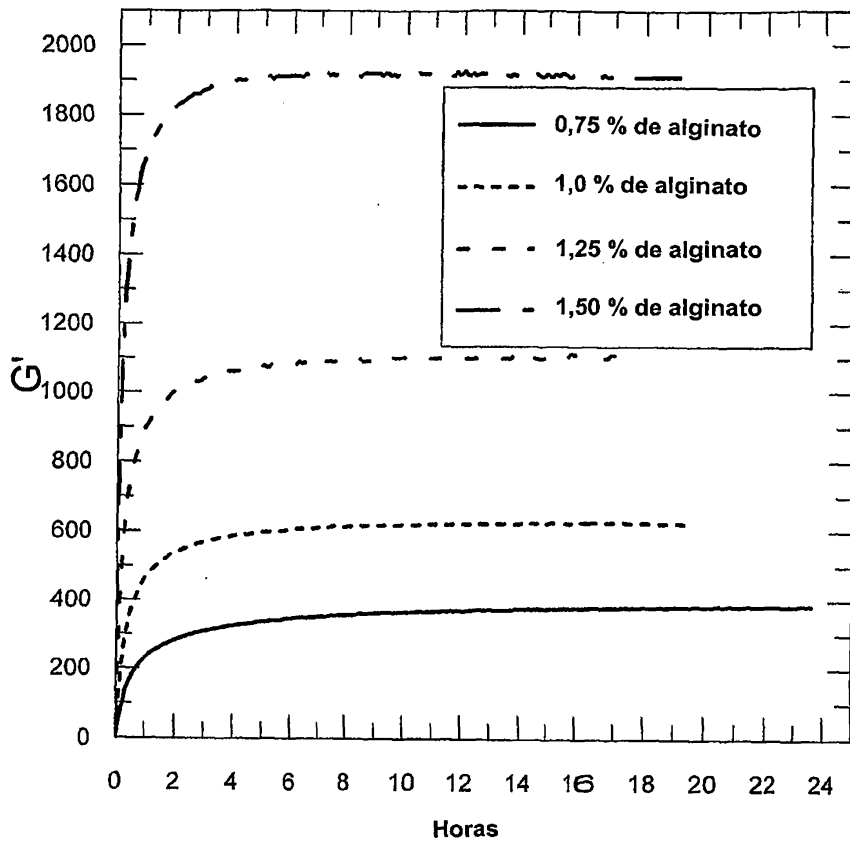


FIGURA 3

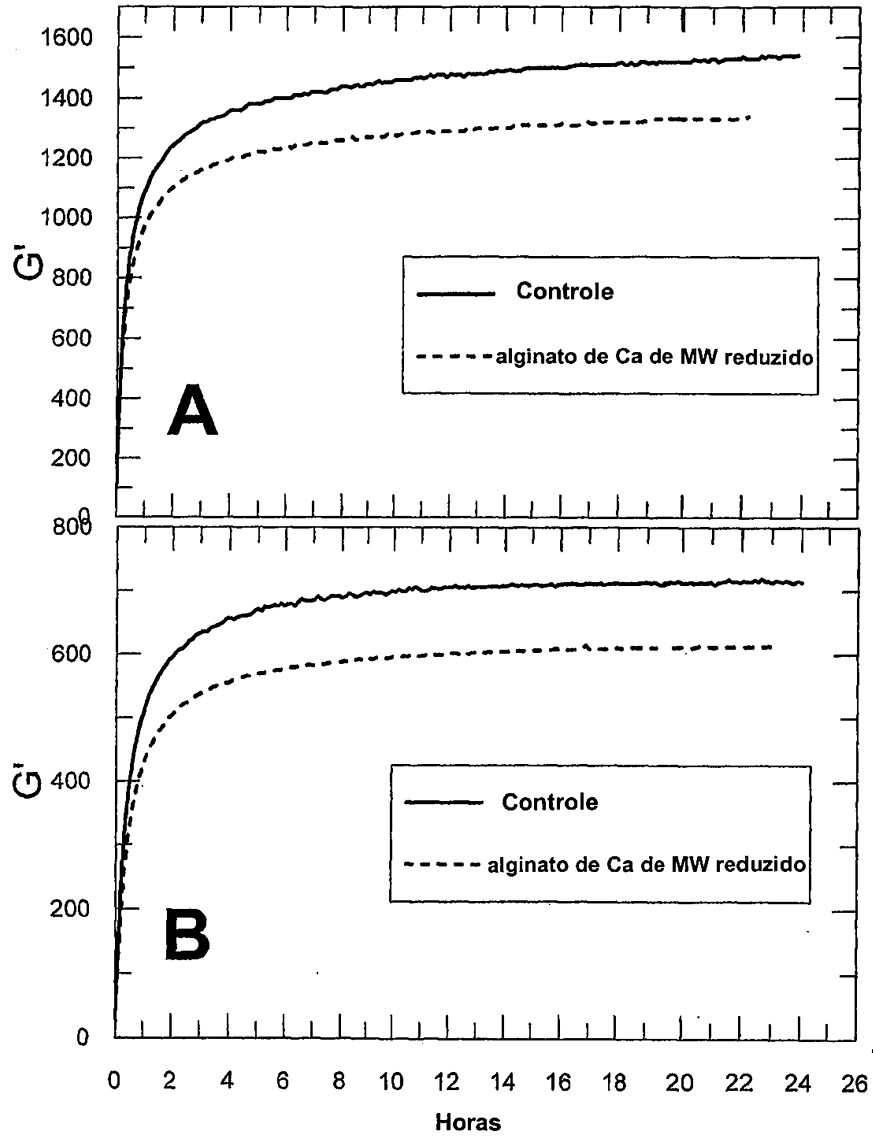
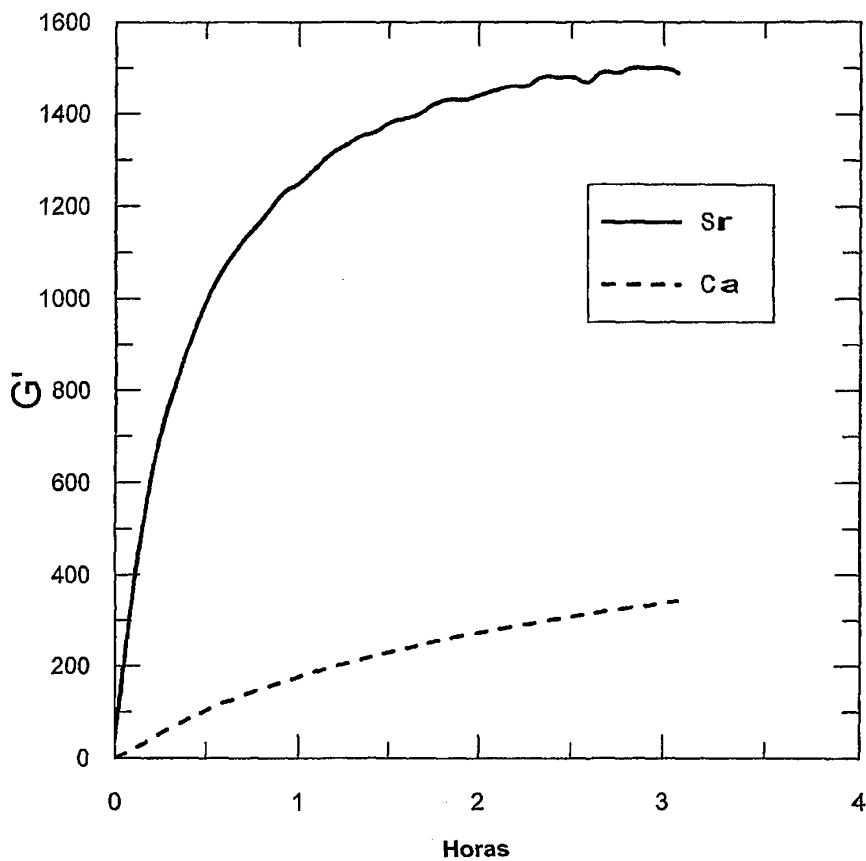
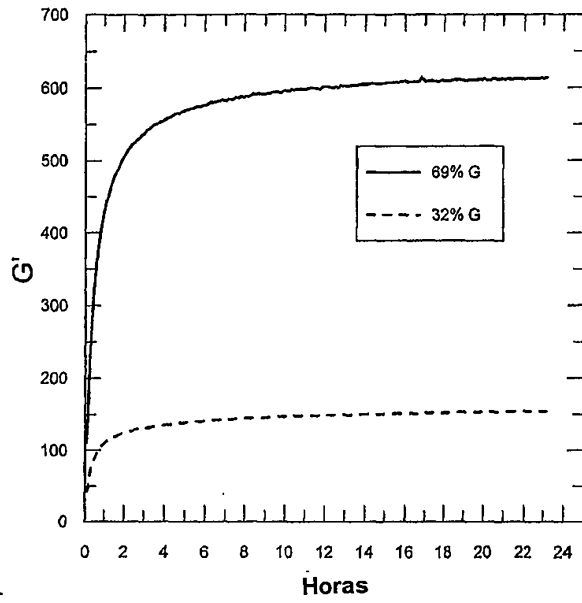


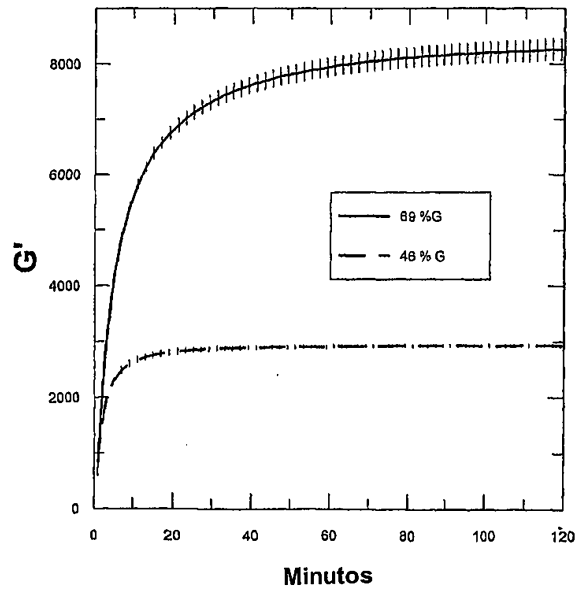
FIGURA 4



### FIGURA 5

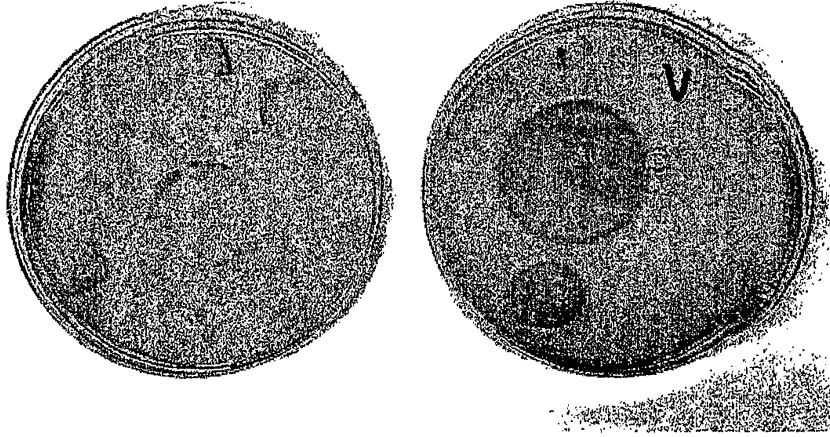


A



B

**FIGURA 6**



**FIGURA 7**

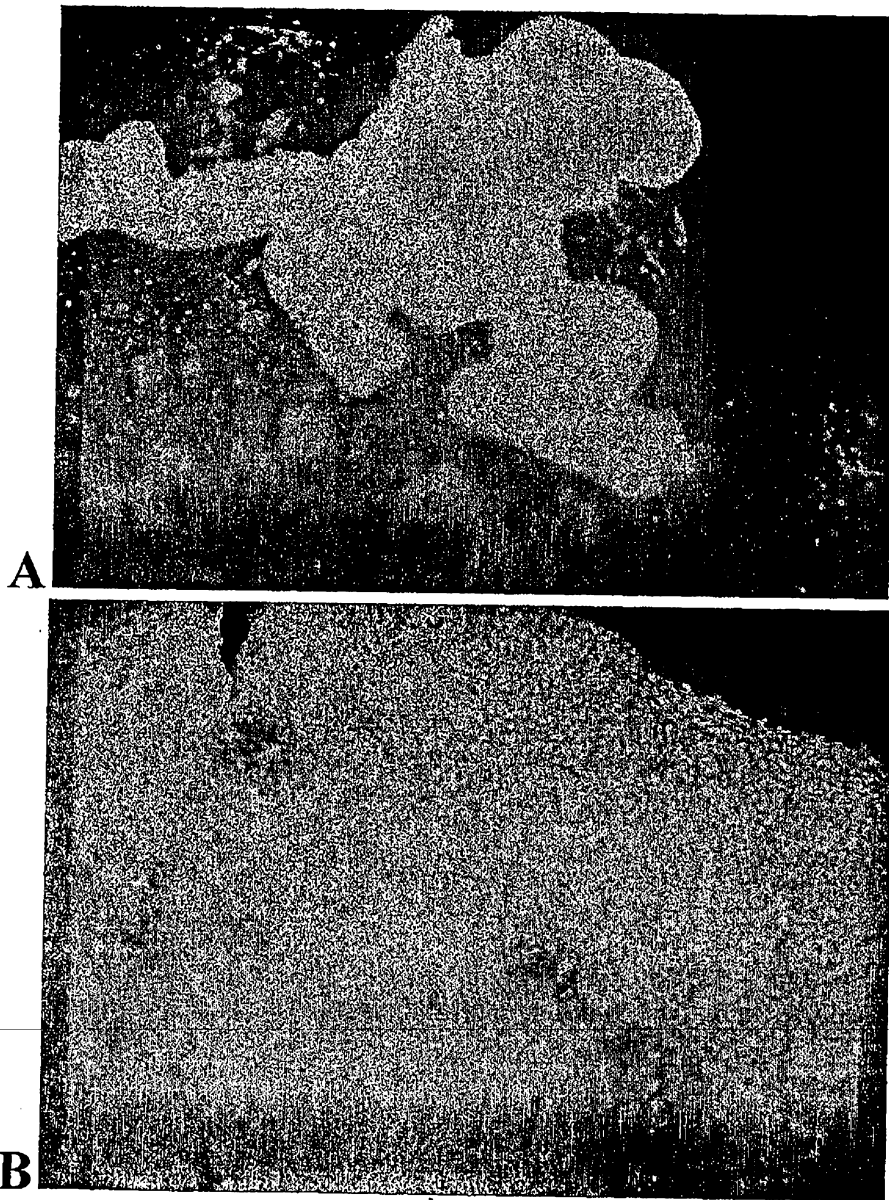


FIGURA 8

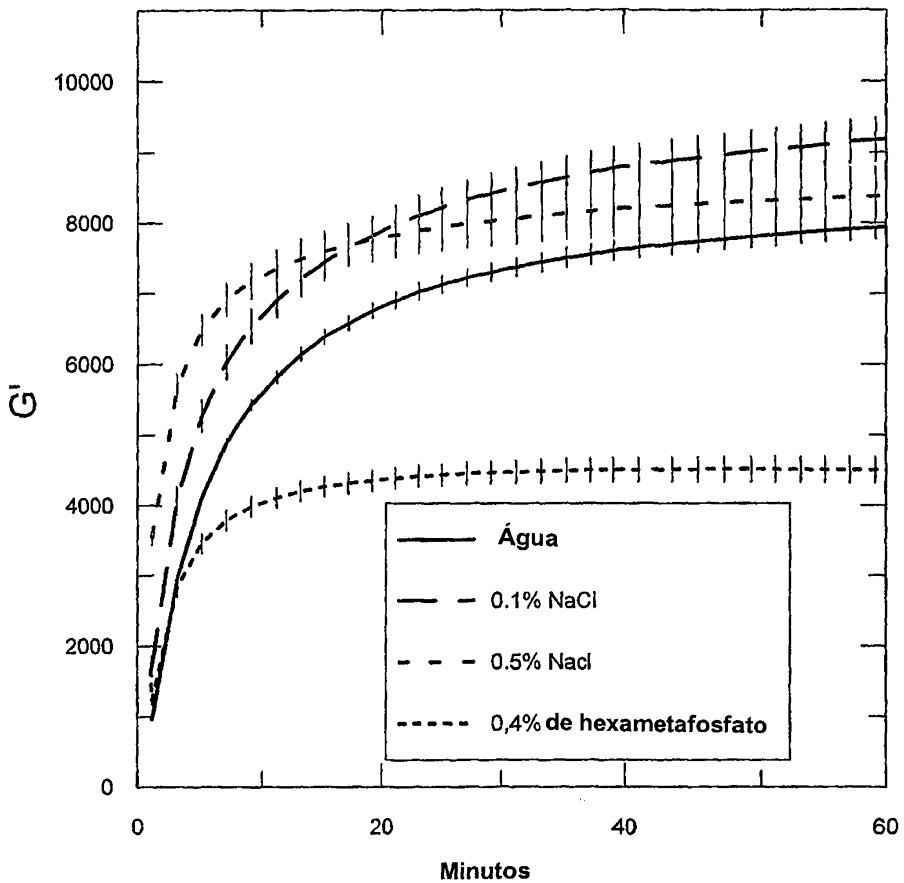


FIGURA 9

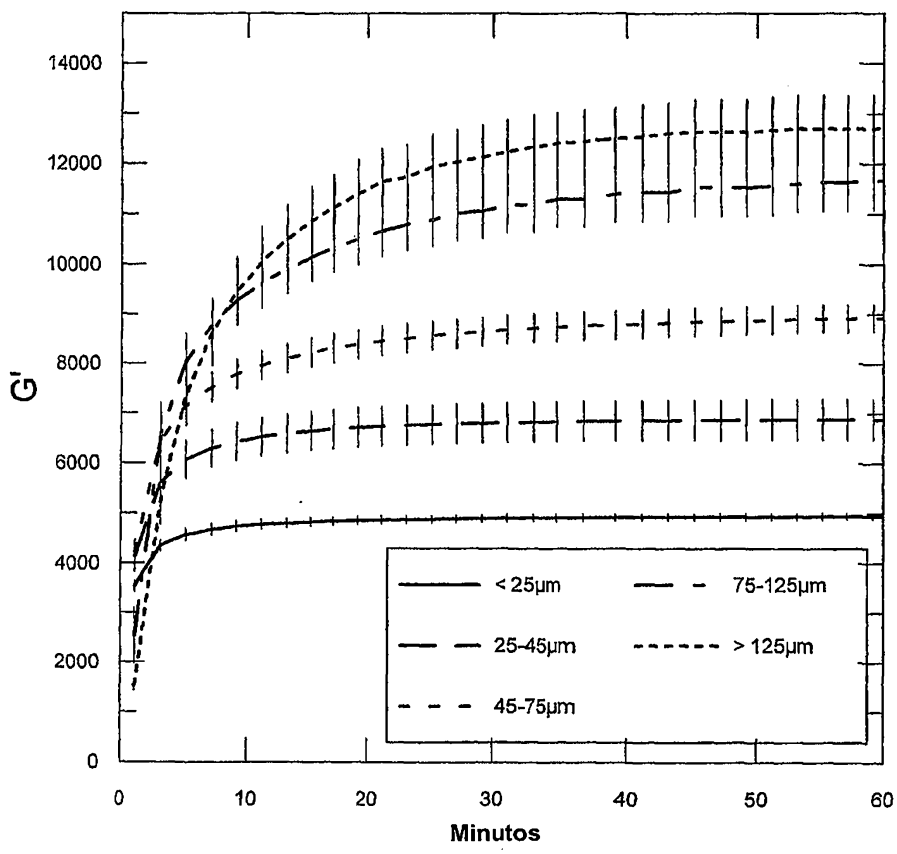


FIGURA 10

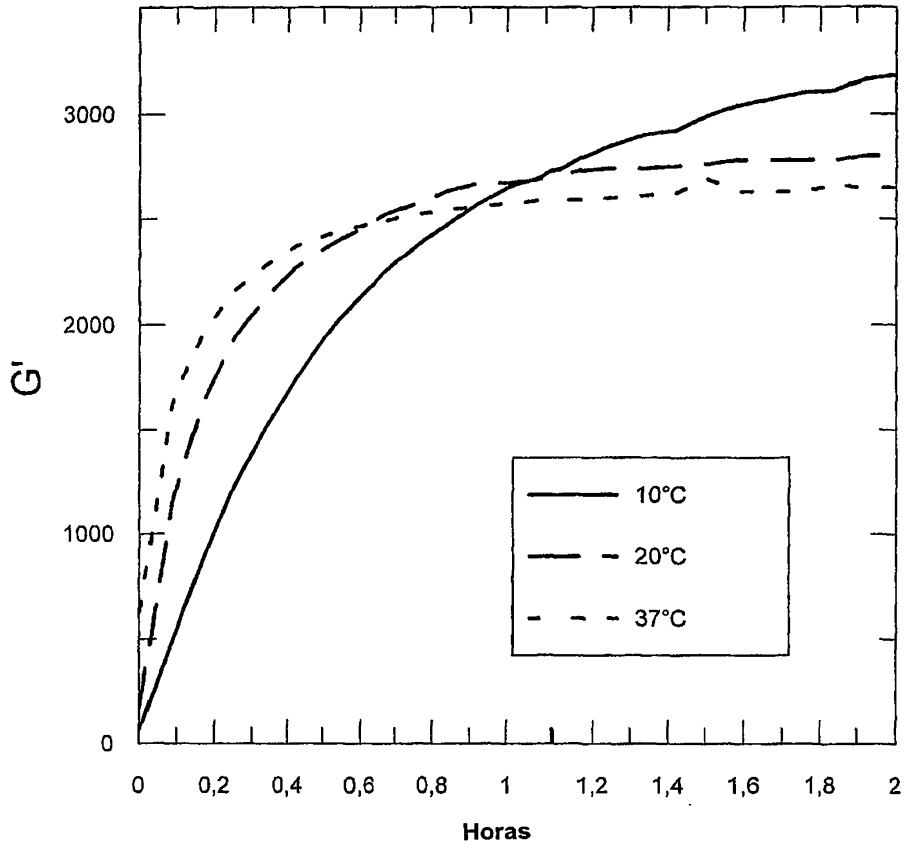


FIGURA 11

