(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 635040 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C08L005/04 A A61K009/16 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1993.04.01

(30) *Prioridade:* 1992.04.08 US 866038

(43) *Data de publicação do pedido:*
1995.01.25

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.06.15

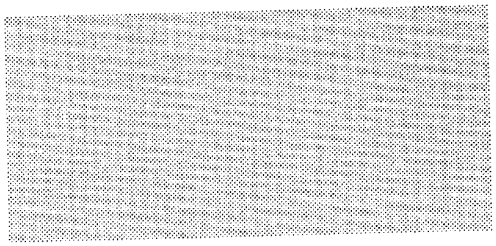
(73) *Titular(es):*
VIVORX, INCORPORATED
3212 NEBRASKA AVENUE, 2ND FLOOR SANTA MONICA, CA 90404
US

(72) *Inventor(es):*
NEIL P. DESAI US
ROSWITHA A. HEINTZ US
PAUL A. SANDFORD. US
PATRICK SOON-SHIONG US

(74) *Mandatário(s):*
CARMEN FERREIRA FURTADO LUZ DE OLIVEIRA E SILVA
AV.CONSELHEIRO FERNANDO SOUSA 25 3/AND. 1070 LISBOA
PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSOS E COMPOSIÇÕES DE ENCAPSULAÇÃO RETICULADAS BIOCOMPATÍVEIS

(57) *Resumo:*



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

INPI
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV.	MOD. UTI.	MOD. IND.	DES. IND.	TOP. SEMIC.
☐	☐	☐ N.º Objectos ☐	☐ N.º Desenhos ☐	☐

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)

N.º 635040 (11) DATA DO PEDIDO —/—/— (22)

REQUERENTE (71)
(NOME E MORADA)
VIVORX, INCORPORATED, norte-americana, 3212 Nebraska Avenue, 2nd Floor, Santa Monica, CA 90404, Estados Unidos da América

CÓDIGO POSTAL

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)
DESAI, Neil, P., 847 Alandele Avenue, Los Angeles, CA 90036, Estados Unidos da América, **SOON-SHIONG, Patrick**, 1755 Chenault Street, Los Angeles, CA 90049, Estados Unidos da América, **SANDFORD, Paul, A.**, 2822 Overland Avenue, Los Angeles, CA 90064, Estados Unidos da América, **HEINTZ, Roswitha**, 1940 Malcolm Avenue, Los Angeles, CA 90025, Estados Unidos da América

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO

FIGURA (para interpretação do resumo)

EPÍGRAFE (54)

"PROCESSOS E COMPOSIÇÕES DE ENCAPSULAÇÃO RETICULADAS BIOCOMPATÍVEIS"

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

A presente invenção diz respeito a composições biocompatíveis reticuladas compreendendo um componente ionicamente reticulado e um componente covalentemente foto-reticulado para encapsulação de produtos biológicos.
De harmonia com a presente invenção, também são apresentadas misturas biocompatíveis reticuláveis compreendendo um componente ionicamente reticulável e um componente covalentemente foto-reticulável. São descritos processos para a encapsulação de produtos biológicos com as composições biocompatíveis reticuladas e reticuláveis. Também são apresentadas macrocápsulas recuperáveis para encapsulação das microcápsulas ou produtos biológicos.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

DESCRIÇÃO

"PROCESSOS E COMPOSIÇÕES DE ENCAPSULAÇÃO RETICULADAS BIOCOMPATÍVEIS "

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a composições e processos para encapsulação de produtos biológicos tais como materiais biologicamente activos especialmente células de mamíferos ou marcadores de diagnóstico.

Mais especificamente, a presente invenção diz respeito a um material biocompatível foto-reticulado iónica e covalentemente que fornece uma barreira imunoprotectora não citotóxica para um produto biológico, inclusive um produto biológico xenotransplantado.

Num outro aspecto, a presente invenção diz respeito a uma mistura de um

componente ionicamente reticulável e um componente covalentemente foto-reticulável, adequados para uso na encapsulação de células de mamíferos.

A presente invenção também diz respeito a processos para encapsulação de produtos biológicos com o material reticulado biocompatível.

Muitos materiais biocompatíveis tais como lípidos, policatiões e polissacarídeos, tais como ácido hialurónico, vêm sendo usados para encapsular materiais tais como células e tecido vivos.

Por exemplo, o alginato polissacarídeo vem sendo usado para a encapsulação, imunoisolamento e imobilização de células.

A combinação de alginato com catiões multivalentes, tal como cálcio, pode formar microcápsulas ionicamente reticuladas e mecanicamente estáveis.

No entanto, quando usadas num ambiente fisiológico, tal como no transplante de células ou ilhotas microencapsuladas, a estabilidade mecânica das microcápsulas de alginato ionicamente reticuladas irá desgastar-se uma vez que a concentração extracelular de catiões monovalentes excede a concentração dos catiões de cálcio bivalentes, resultando na troca por difusão dos catiões monovalentes e bivalentes.

Foram feitas tentativas para modificar quimicamente microcápsulas ou gel de alginato utilizando a reticulação covalente ao invés da reticulação iónica para aperfeiçoar a estabilidade mecânica.

No entanto, os reagentes e as condições de reacção envolvidas com estas técnicas frequentemente mostram-se tóxicos e até fatais para os materiais encapsulados.

Para aperfeiçoar ainda mais a estabilidade mecânica, dos alginatos covalentemente modificados foram foto-polimerizados para produzir geles de alginato covalentemente reticulados.

A rápida foto-polimerização ou foto-reticulação do alginato evita a exposição dos materiais encapsulados às espécies tóxicas que estão presentes durante os processos acima descritos.

Também foi constatado que geles de alginato implantados tendo fracções maiores de ácido α-L-gulurónico (blocos G) são mais biocompatíveis que aqueles contendo uma fracção maior de ácido β-D-manurónico (blocos M), uma vez que eles não induzem uma resposta de citocina dos monócitos.

Os alginatos com uma fracção maior de blocos M, por outro lado, induzem uma resposta de citocina quando implantados num ambiente fisiológico.

Esta resposta de citocina induzida dos blocos M resulta num crescimento fibroso excessivo do material de encapsulação do alginato implantado, limitando, dessa forma o suprimento de nutrientes e impedindo que o material encapsulado penetre na barreira de encapsulação para distribuição ao ambiente fisiológico.

A polilisina tem sido usada como uma camada adicional com microcápsulas que usam alginatos com alto teor de blocos G para aperfeiçoar a estabilidade química e mecânica.

Não obstante, embora os geles de alginato com alto teor de blocos G-polilisina tenham demonstrado reverter com êxito a diabetes em cães com diabetes espontânea quando usados para encapsular ilhotas de Langerhans transplantadas, a função a longo prazo destes geles ionicamente reticulados foi dificultada pelo rompimento químico e/ou mecânico da membrana de alginato-polilisina, dessa forma resultando em rejeição e crescimento fibroso excessivo.

Polímeros insolúveis em água, tais como polímeros ou copolímeros de acrilato, e polímeros ou copolímeros de metacrilato, vêm sendo usados em esforços para aperfeiçoar a estabilidade de materiais de encapsulação.

Poliacrilamidas foto-polimerizadas também são usadas para tal.

De maneira similar, no entanto, estes materiais, ou os solventes orgânicos associados com eles, mostram-se frequentemente citotóxicos para células vivas encapsuladas.

Além disso, estes polímeros insolúveis em água tendem a ser bioincompatíveis in vivo a longo prazo.

Geles de polietileno glicol (PEG) reticulados vêm sendo usados para imobilizar enzimas e células microbianas.

Derivados polimerizáveis de PEG, tal como PEG dimetacrilato, vêm sendo foto-reticulados usando-se luz ultravioleta na presença de um iniciador adequado para formar um gel.

Esta técnica é desejável para a encapsulação não apenas de enzimas, mas também para células e organelas, devido à ausência de aquecimento, e à acção de evitar de valores extremos do pH, e à ausência de produtos químicos tóxicos no processo de foto-polimerização.

O polietileno glicol é geralmente adequado como um modificador biocompatível, repelente de proteínas, não inflamatório e não imunogénico para drogas, proteínas, enzimas e superfícies de material implantado.

Estas características do polietileno glicol são atribuíveis ao seu carácter

não iónico, sua solubilidade na água, a flexibilidade de sua estrutura, e seu efeito de exclusão de volume na solução ou quando imobilizado numa superfície.

Além disso, as superfícies modificadas com PEG mostraram ser extremamente não trombogénicas, resistentes ao crescimento fibroso excessivo in vivo, e resistentes à adesão bacteriana.

O PEG ligado à albumina de sangue bovino mostrou ter imunogenicidade reduzida e tempos de circulação aumentados num coelho.

O PEG foi covalentemente ligado à poli-L-lisina (PLL) para melhorar a biocompatibilidade das microcápsulas de alginato-PLL (PLL) para encapsulação de células.

O PEG também foi covalentemente ligado a polissacarídeos tais como alginatos para torná-los solúveis em meios orgânicos.

No entanto, este material requer etapas adicionais necessárias para modificar quimicamente o alginato antes de ele poder ser reticulado.

O polietileno glicol também tem sido utilizado como um componente de redes de polímeros interpenetrantes (ou IPNs), que são uma combinação de dois ou mais sistemas poliméricos diferentes, dos quais pelo menos um é sintetizado ou reticulado individualmente na presença do outro.

Em particular, o polietileno glicol tem sido usado como um componente em IPNs com vários polímeros e monómeros tais como N-acriloilpirrolidina, polisiloxano, resinas epoxi e ácido poliacrílico.

Não obstante, as IPNs conhecidas no estado da técnica não utilizaram alginatos como um dos componentes reticulados, nem são IPNs conhecidas nas quais um dos componentes é ionicamente reticulado.

Embora muitos dos geles de polietileno glicol conhecidos na técnica obtenham uma resposta fibrótica muito baixa em ambientes fisiológicos, estes geles com frequência requerem uma etapa essencial de emulsão ou co-extrusão com uma fase miscível em óleo ou água para a formação de gotículas ou microcápsulas.

Isto pode resultar em alguma toxicidade devido à possibilidade de que um pouco da fase oleosa pode ser transportada para o hóspede implantado.

Consequentemente, existe uma necessidade definitiva de materiais de encapsulação ou gel que não sejam instáveis sob condições fisiológicas.

Também existe a necessidade de métodos muito suaves e moderados para a encapsulação de produtos biológicos, especialmente a encapsulação de células ou tecidos vivos, por exemplo, células de mamíferos, num ambiente aquoso, pelo que estes métodos permitem uma foto-reticulação covalente

subsequente ou simultânea para estabilidade química e mecânica sem a necessidade de uma fase oleosa potencialmente tóxica.

Além disso, existe a necessidade de materiais de encapsulação ou microencapsulação biocompatíveis que sejam mecânica e quimicamente estáveis em ambientes fisiológicos.

Existe também a necessidade de estes materiais que forneçam imunoprotectividade dos produtos biológicos encapsulados.

Adicionalmente, existe a necessidade de materiais de encapsulação biocompatíveis que permitam a libertação controlada de um produto biológico encapsulado.

A Patente Americana Nº. US 4.791.061 descreve um processo de imobilização de microorganismos meio activados.

Este documento versa especificamente a combinação de microorganismos semi activados com uma mistura de alginato e um monómero.

A mistura resultante é posta em contacto com uma solução contendo catiões bivalentes e peróxidos de forma a provocarem a polimerização do alginato e do monómero dentro da massa polimerizada.

Todavia, este documento baseia-se em processos químicos bastante rígidos para a iniciação da polimerização.

A Patente Americana N.º US 4.352.883 descreve a encapsulação de células vivas numa cápsula de duas camadas.

A camada interna da cápsula é formada pela suspensão das células numa solução de goma solúvel e água e pela polimerização da goma pela adição de catiões bivalentes.

A cápsula de goma resultante é depois exposta à solução de polímero aniónico, tal como polilisina, que fica ligada à superfície da cápsula de goma pela interacção iónica, criando, deste modo, uma membrana semi permeável na camada exterior.

Os dois tipos de polímeros não são combinados com um outro antes da polimerização e não se interpenetram um no outro.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, são fornecidos composições e processos para encapsulação de produtos biológicos, e em especial, células de mamíferos.

Mais especificamente, as composições da presente invenção compreendem um artigo biocompatível reticulado, compreendendo células de mamíferos encapsuladas tendo pelo menos um componente ionicamente reticulável e pelo menos um componente covalentemente foto-reticulável.

Os materiais biocompatíveis reticulados são formados de misturas tendo células de mamíferos, e, pelo menos, um componente ionicamente reticulável e pelo menos um componente covalentemente foto-reticulável.

A combinação de um componente ionicamente reticulável e um componente covalentemente foto-reticulável oferece um gel não citotóxico e imunoprotector que pode ser usado para atrair ou encapsular um produto biológico numa rede rigorosamente reticulada, ao mesmo tempo que impede a difusão do componente ionicamente reticulado para fora do gel reticulado mesmo na presença de iões monovalentes ou quelantes de iões.

O componente covalentemente foto-reticulado fornece ainda estabilidade mecânica e química ao material ou gel de encapsulação.

O componente ionicamente reticulado fornece uma matriz ou gel pre-formado que facilita a rápida foto-reticulação covalente do componente covalentemente foto-reticulável sem a necessidade de uma fase oleosa miscível, potencialmente tóxica, requerida para a formação de gotículas ou cápsulas gelificadas.

Estes materiais duplamente reticulados fornecem as propriedades requeridas para a imunoprotectividade dos produtos biológicos encapsulados (inclusive produtos biológicos xenotransplantados) impedindo a migração de moléculas através do material, as quais são potencialmente prejudiciais aos produtos biológicos.

Além disso, os materiais ou composições biocompatíveis da presente invenção proporcionam a libertação controlada de produtos biológicos, ou componentes dos mesmos, no ambiente fisiológico com fins terapêuticos, tais como fornecimento de drogas.

A presente invenção também está incorporada em uma mistura biocompatível reticulável adequada para encapsulação de células de mamíferos, uma vez que se apresenta apropriadamente reticulada.

A mistura biocompatível reticulável é compreendida por células de mamíferos de um componente ionicamente reticulável e um componente covalentemente foto-reticulável.

A presente invenção diz ainda respeito a processos para encapsulação de um produto biológico, especialmente células de mamíferos, compreendendo o revestimento do produto biológico com uma composição tendo um componente covalentemente foto-reticulável e um componente ionicamente reticulável.

Ainda num outro aspecto da invenção, é proporcionado um material de encapsulação recuperável que é compreendido por uma macrocápsula do material biocompatível reticulado da presente invenção para encapsulação de células livres ou outras microcápsulas.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição detalhada a seguir, tomada em conjunto com os desenhos e exemplos anexos, que ilustram os princípios da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG 1 representa um gráfico mostrando a permeabilidade de um gel de encapsulação reticulado de alginato/PEG-DA (AP) 10K para dextranos de pesos moleculares diferentes.

A FIG 2 representa um gráfico comparando a perifusão de ilhotas caninas em microcápsulas de alginato/poli-L-lisina e as microcápsulas de AP 10K da presente invenção.

A FIG 3 representa um gráfico comparando a perifusão de ilhotas caninas em macrocápsulas de AP de pesos moleculares diferentes da presente invenção.

A FIG 4 representa um gráfico mostrando a resposta de secreção de insulina de ilhotas caninas em microcápsulas de alginato-polilisina ainda encapsuladas em macrocápsulas de AP.

A FIG 5 representa um gráfico dos efeitos sobre a glicose no sangue, o volume de urina e o peso corpóreo de ilhotas xenotransplantadas de cão em rato em micro- cápsulas de AP 10K da presente invenção.

A FIG 6 representa um gráfico da perifusão de ilhotas xenotransplantadas de cão em rato, recuperadas, em microcápsulas de AP 10K da presente invenção.

A FIG 7 representa um gráfico de um teste de tolerância da glicose intravenosa em ratos tendo ilhotas caninas transplantadas em microcápsulas de AP da presente invenção.

A FIG 8 representa um gráfico mostrando os efeitos de um xenotransplante de cão em rato de macrocápsulas de AP da presente invenção contendo ilhotas caninas em microcápsulas de alginato/PLL.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE UM MODO PREFERENCIAL DE REALIZAÇÃO.

De harmonia com a presente invenção é fornecida uma mistura biocompatível reticulável para encapsulação de produtos biológicos, tais como células de mamíferos.

A mistura biocompatível reticulável é compreendida por células de mamíferos e um componente ionicamente reticulável e um componente covalentemente foto-reticulável.

O componente ionicamente reticulável é seleccionado de um polissacarídeo, um polianião ou um policatião.

O componente covalentemente foto-reticulável é seleccionado de um óxido de polialquileno tendo pelo menos um grupo funcional capaz de sofrer polimerização de radicais livres.

A presente invenção também se refere a materiais biocompatíveis artigos compreendendo células de mamíferos encapsuladas por, pelo menos um componente ionicamente reticulado e pelo menos um componente covalentemente foto-reticulado.

Polissacarídeos ionicamente reticuláveis adequados para a presente invenção incluem, mas não se limitam a estes, alginato e polissacarídeos iónicos naturais tais como quitosana, goma gelana, goma xantana, ácido hialurónico, heparina, pectina e carragenan.

Exemplos de polianiões ionicamente reticuláveis adequados para uso na prática da presente invenção incluem, mas não se limitam a estes, ácido poliacrílico e ácido polimetacrílico.

Policatiões ionicamente reticuláveis tais como polietileno imina e polilisina também são adequados para uso na presente invenção.

Num modo preferencial da presente invenção, o polissacarídeo alginato serve como o componente ionicamente reticulável. (Alginato conforme aqui usado, refere-se a sais do ácido algínico.)

De preferência, o alginato tem uma grande fracção de ácido α-L-gulurónico (blocos G) para impedir o estímulo de uma resposta de citocina dos monócitos.

Mais particularmente, alginatos tendo pelo menos 60 por cento, e de preferência, 70 por cento ou mais, de blocos de ácido α-L-gulurónico são usados de harmonia com a presente invenção.

Alginatos tendo maiores fracções de ácido α-L-gulurónico ou blocos G são mais biocompatíveis que aqueles contendo uma fracção maior de ácido β-D-manurónico ou blocos M uma vez que os alginatos com mais blocos M mostraram induzir o crescimento fibrótico excessivo.

O alginato numa faixa de concentração de cerca de 0,1% a 5% p/v é geralmente adequado quando usado como o componente ionicamente reticulável na mistura biocompatível da presente invenção.

De preferência, o alginato é fornecido numa gama de concentração de 1,5-2,0% p/v quando usado numa mistura contendo concentrações particulares de polietileno glicol diacrilato (como descrito abaixo) como o componente covalentemente foto-reticulável.

Deve observar-se, no entanto, que podem ser utilizadas quantidades ou gamas de concentração variáveis de alginatos na mistura final para realizar o objectivo da presente invenção.

O componente ionicamente reticulável é ionicamente reticulado pela adição à mistura de encapsulação biocompatível de catiões polivalentes, tais como cálcio, zinco, bário, estrôncio, alumínio, ferro, manganês, níquel, cobalto, cobre, cádmio, chumbo ou misturas de quaisquer dois ou mais dos mesmos.

Cálcio, bário e estrôncio são preferíveis, sendo o cálcio o mais preferido para reticular ionicamente o componente ionicamente reticulável da mistura.

Um óxido de polialquileno tendo pelo menos um grupo funcional capaz de sofrer polimerização de radicais livres é adequado como o componente covalentemente foto-reticulável da presente invenção.

Um exemplo de um óxido de polialquileno adequado é polietileno glicol que é modificado com pelo menos um grupo acrilato para torná-lo polimerizável.

O polietileno glicol acrilato, tal como polietileno diacrilato, ou (PEG-DA), é capaz de sofrer polimerização de radicais livres.

Uma ampla variedade de grupos funcionais tais como grupos acrilato, grupos vinilo, grupos metacrilato e outros também podem ser usados para modificar o polietileno glicol para torná-lo polimerizável.

Podem ser utilizados outros processos adequados, no entanto, para modificar o PEG para que ele se torne foto-reticulável.

Por exemplo, podem ser utilizados vários processos para preparar um PEG modificado que é foto-reticulável ou polimerizável por introdução de insaturação nas extremidades da cadeia do PEG.

Um modo preferencial de modificar o polietileno glicol é tratá-lo com halogeneto de acriloil, tal como cloreto de acriloil.

Uma reacção de esterificação entre o PEG e ácido acrílico (ou um homólogo superior ou derivado do mesmo) pode ser realizada num solvente orgânico tal como tolueno para tornar o PEG polimerizável.

Uma pequena quantidade de ácido tal como ácido p-tolueno sulfónico pode ser usada para catalisar a reacção.

O excesso de um dos reagentes, tal como o ácido acrílico, levará esta reacção de equilíbrio ao término.

A mistura de reacção é sujeita a refluxo durante várias horas.

Como a água é formada como um produto da reacção, a água pode ser continuamente removida por destilação do azeótropo formado com tolueno para levar o equilíbrio aos produtos.

Podem ser utilizados esquemas estandardizados de purificação.

Ácido metacrílico, alquil metacrilatos ou halogenetos de metacriloil podem ser postos a reagir de maneira similar com PEG para obter um derivado foto-reticulável, como descrito por Fukui, S. e Tanaka, A., 1976; FEBS. Letters 66:179.

Alternativamente, alcóxido de PEG pode reagir com gás de acetileno para produzir os éteres de vinilo de PEG para produzir um derivado de PEG foto-reticulável, como apresentado em Mathias, L. J., Canterberry, J. B., e South, M., 1982; J. Polym. Sci., polym. Lett. Ed. 20:473.

O PEG pode reagir com anidrido metacrílico para obtenção de dimetacrilato de PEG.

Uma reacção entre PEG e cloreto de alilo num solvente seco, catalisada por pequenas quantidades de cloreto estânico, também resultará num PEG foto-reticulável.

Deve ser observado pelos peritos na técnica que várias outras técnicas conhecidas podem ser utilizadas para obtenção de derivados de PEG polimerizável.

Polietileno glicóis ou PEGs tendo uma ampla gama de pesos moleculares podem ser modificados para uso de harmonia com a presente invenção.

Por exemplo, PEGs tendo pesos moleculares de 200 a 500.000 poderiam ser modificados como descrito acima para torná-los polimerizáveis.

PEGs numa gama intermediária de cerca de 1.000 - 35.000 são particularmente preferidos.

De harmonia com um modo de realização preferencial, PEG tendo um peso molecular na faixa de cerca de 3.000 -10.000 é modificado com acrilato usando-se cloreto de acriloil para uso na presente invenção.

Os derivados de PEG modificado são foto-reticulados por polimerização de radicais livres, de preferência iniciada por irradiação da mistura com radiação electromagnética, tal como luz visível, radiação ultravioleta ou raios laser.

Para reticular covalentemente o PEG-DA, é adicionado um iniciador de radicais livres que poderia ser uma combinação de um foto-iniciador tal como etil eosina, um co-catalisador tal como trietanolamina, e opcionalmente, um co-monómero tal como 1-vinil 2-pirrolidinona.

Deve ter-se em conta, no entanto, que outros foto-iniciadores, co-catalisadores e co-monómeros podem ser usados para foto-reticular o PEG-DA.

Por exemplo, se o PEG-DA for foto-reticulado usando-se luz ultravioleta (UV) ao invés da luz visível, foto-iniciadores adequados de UV incluem 2,2-dimetóxi-2-fenil acetofenona, etil éter de benzoína, 2,2-dimetil fenoxiacetofenona, benzofenonas e derivados iónicos das mesmas (para solubilidade em água), benzilos e derivados iónicos das mesmas, e tioxantonas e derivados iónicos das mesmas.

Foto-iniciadores de luz visível, tais como etil eosina, eritrosina, rosa bengala, tionina, azul de metileno, riboflavina e outros, também são adequados.

Outros co-catalisadores adequados incluem trietanolamina, metil dietanolamina, trietilamina, arginina e outros.

Deve observar-se que a quantidade e o tipo do co-monómero usado, se desejado, podem variar.

De harmonia com a presente invenção, constatou-se que uma gama de razões de composição do componente ionicamente reticulável com o componente covalentemente foto-reticulável na mistura é adequada para a formação de um material ou gel de encapsulação biocompatível reticulado estável.

Uma faixa de concentrações para o PEG-DA de peso(s) molecular(es) particular(es) e a razão de composição entre alginato e PEG-DAS na mistura, adequadas para a formação de um gel de encapsulação biocompatível reticulado estável, podem ser determinadas de harmonia com a presente invenção.

Como apresentado imediatamente abaixo e como descrito mais especificamente nos exemplos, as seguintes concentrações de PEG-DA de pesos moleculares particulares e as razões de composição acompanhantes (alginato para PEG-DA) mostraram-se eficazes para a formação de um gel de encapsulação ionicamente reticulado e covalentemente foto-reticulado estável.

Peso molecular do PEG-DA	faixa de concentração do PEG-DA adequada para propriedades de reticulação estável quando adicionada à solução de alginato 1,8%	faixa de razões (alginato: PEG-DA) aceitável para reticulação iônica e covalente estável
1000	14 - 17%	1 : 9,5 -11,5
3400	9 - 12%	1 : 5,5 – 1 : 7,5
10000	4 - 8%	1 : 2,5 – 1 : 5,0
20000	4 - 8%	1 : 3,0 – 1 : 5,0
35000	5 - 9%	1 : 3,0 – 1 : 5,0
20M	5 - 7%	1 : 3,0 - 1 : 4,5

Ainda de harmonia com a presente invenção, usando-se um componente covalentemente foto-reticulável de um peso molecular particular ou uma combinação de pesos moleculares, é possível ajustar a permeabilidade ou corte de peso molecular (MWCO) da mistura como pode ser requerido para obter imuno-protectividade das células de mamíferos num ambiente fisiológico, logo que a mistura tenha sido reticulada.

Também, a este respeito, é possível ajustar uma mistura biocompatível reticulável tendo uma porosidade eficaz para a libertação controlada de pelo menos uma parte dos produtos biológicos, encapsulados ou qualquer material produzido ou segregado pelos produtos biológicos logo que a mistura tenha sido reticulada.

Conhecendo-se as dimensões moleculares de drogas, enzimas ou similares que têm uso terapêutico, poderia ser sintetizado um gel de encapsulação da presente invenção que libertaria o produto biológico encapsulado a uma taxa desejada.

Exemplos desta terapia de implantação poderiam incluir o tratamento da hemofilia por uma libertação ininterrupta de Factor VIII; a libertação ininterrupta da hormona de crescimento humano; a libertação ininterrupta de suplementos ou substitutos da tiróide em pacientes que tenham sofrido tiroidectomias; a libertação ininterrupta de suplementos ou substitutos da adrenal para substituição da função adrenal; a libertação ininterrupta de estrogénio para o controle da natalidade e similares.

Ainda num outro aspecto da presente invenção, a osmolaridade e o pH da mistura de encapsulação biocompativel reticulável são ajustados de tal maneira que sejam adequados para as células de mamíferos a serem encapsulados.

A osmolaridade e o pH das misturas ou soluções preparadas para tratamento celular devem estar o mais próximo possível das condições fisiológicas.

A osmolaridade fisiológica é mantida a cerca de 290 miliosmoles (mOsm)/kg e o pH fisiológico é considerado como cerca de 7,4.

Na manipulação das ilhotas de Langerhans, foi determinado que um ambiente ligeiramente hiperosmolar (> 290 mOsm/kg) é preferível, ao invés de um ambiente ligeiramente hipoosmolar)< 290 mOsm/kg).

Assim, a mistura biocompatível da presente invenção compreende um material de encapsulação que pode ser idealmente adequado para sistemas de distribuição de drogas ou produtos biológicos.

Os exemplos apresentados abaixo descrevem o uso de geles de alginato/polietileno glicol diacrilato ou AP para proporcionar uma barreira imunoprotectora para as ilhotas de Langerhans para o tratamento da diabetes do tipo I auto-imune.

Importante, as composições da presente invenção podem proporcionar imunoprotecção para as ilhotas de Langerhans, ou outras células de mamíferos, de espécies altamente discordantes quando xenotransplantadas in vivo, sem qualquer outra necessidade de imunossupressão.

Esta técnica abre assim as possibilidades para o tratamento de uma ampla variedade de doenças.

Vários estados doentios poderiam ser tratados por encapsulação dos tipos de células apropriados.

Entre os tipos de células potenciais encontram-se as células secretoras de dopamina para o tratamento da doença de Parkinson, células secretoras do factor de crescimento dos nervos para o tratamento da doença de Alzheimer, hepatócitos para o tratamento de disfunções do fígado, células secretoras de adrenalina/angiotensina para a regulação da hipo/hipertensão, células da paratiróide para substituição da função da tiróide, células secretoras de norepinefrina/metencefálicas para o controle da dor, e células secretoras de eritropoietina para uso como eritrócitos artificiais ou células vermelhas do sangue para transporte de oxigénio.

Além disso, o tratamento de várias doenças requer a cultura in vitro de células de biópsias para testar os efeitos de drogas que oferecem tratamentos potenciais.

A cultura destas células frequentemente leva vários dias e, com frequência, podem passar semanas antes que seja encontrada uma droga eficaz que afecte as células em cultura da forma desejada.

Um rápido substituto para esta técnica pode ser a encapsulação destas células de acordo com a presente invenção e subsequente implante em animais.

Estes animais seriam então tratados ou protegidos com uma variedade de drogas ou agentes quimioterápicos, e uma imagem in vivo mais realista da toxicidade e eficácia destas drogas nas células encapsuladas pode ser obtida examinando-se estas células depois do restabelecimento do animal.

Estas avaliações in vivo seriam de realização difícil ou impossível sem os benefícios do imunoisolamento fornecido por esta tecnologia de encapsulação.

De acordo ainda com um outro aspecto da presente invenção, é fornecido um processo para a encapsulação de um produto biológico, o qual compreende revestir o produto biológico com um material biocompatível reticulado tendo um componente ionicamente reticulado e um componente covalentemente foto-reticulado.

Num modo de realização alternativo, um produto biológico é encapsulado numa rede reticulada por foto-reticulação iónica e covalente de uma suspensão contendo um produto biológico, um componente ionicamente reticulável e um componente covalentemente foto-reticulável.

Ainda num outro modo de realização alternativo, o processo compreende a suspensão do material biológico numa mistura de um componente ionicamente reticulável e um componente covalentemente foto-reticulável; reticular ionicamente o componente ionicamente reticulável; e foto-reticular covalentemente o componente covalentemente foto-reticulável.

O componente ionicamente reticulável, tal como alginato, é reticulado pela adição à mistura de catiões multivalentes, tal como cálcio.

O componente covalentemente foto-reticulável é reticulado pela iniciação da polimerização de radicais livres, por exemplo, por exposição da mistura à radiação electromagnética, especialmente radiação de UV ou luz visível, na presença de um sistema foto-iniciador como descrito.

O processo da presente invenção proporciona um curto intervalo de tempo entre a reticulação iónica e a foto-reticulação covalente da mistura.

Quanto mais tempo o gel ionicamente reticulado for formado antes da foto-reticulação covalente do componente covalentemente foto-reticulável, maior é a possibilidade de os componentes do sistema foto-iniciador difundirem para fora do gel e enfraquecerem o processo de reticulação.

Assim, minimizando-se o período de tempo entre a foto-reticulação covalente e a reticulação iónica da mistura, é formado um material de encapsulação reticulado estável.

De preferência, o intervalo de tempo deve ser limitado a menos de cerca de 5 minutos.

No entanto, deve ser ainda reconhecido que esferas ou cápsulas de encapsulação de tamanhos diferentes podem requerer um intervalo de tempo muito mais curto ou mais longo entre as etapas de reticulação.

Em geral, esferas de tamanho menor terão uma superfície de difusão maior comparadas com esferas maiores contendo o mesmo volume total de material.

Assim, o potencial para perda dos componentes essenciais para a foto-reticulação por difusão é maior em esferas menores e, portanto, o intervalo de tempo entre as etapas de reticulação iónica e foto-reticulação seria adequadamente minimizado.

A presente invenção também contempla a reticulação iónica e a foto-reticulação covalente simultâneas dos componentes da mistura.

Microcápsulas geradas por técnicas convencionais, tal como por fluxo coaxial com uma corrente de ar, são de recuperação difícil depois do implante peritoneal devido ao seu tamanho pequeno (da ordem de poucas centenas de microns).

Uma dosagem típica num cão envolve a implantação de aproximadamente 30 ml de cápsulas.

Consequentemente, é fornecida uma macrocápsula recuperável para conter microcápsulas ou células livres, de acordo com a presente invenção.

Um grande número de microcápsulas individuais ou células livres pode ser localizado numa região preferida na cavidade peritoneal (ou outro sítio de implantação) encerrando-se estas microcápsulas ou células numa macrocápsula.

A macrocápsula contém, de preferência, uma dosagem terapêutica de microcápsulas ou células livres.

A macrocápsula é fabricada a partir das misturas de AP ou das misturas de encapsulação duplamente reticuláveis da presente invenção.

Por exemplo, as microcápsulas podem ser suspensas numa mistura de AP que está de harmonia com a presente invenção para obtenção de uma macrocápsula gelificada contendo as microcápsulas em seu interior.

Podem também ser encapsuladas células livres numa macrocápsula na ausência de microcápsulas.

Tal sistema de distribuição é facilmente recuperável devido às suas dimensões físicas.

Como exemplos, estas macrocápsulas recuperáveis poderiam ter o formato de uma esfera, uma haste cilíndrica, um disco circular, uma placa plana, um fio comprido ou outros.

Os exemplos a seguir destinam-se a ilustrar e não a limitar os processos e aplicações da presente invenção.

SÍNTESE DE GLICÓIS DE POLIETILENO FOTO-RETICULÁVEIS

Exemplo 1

Preparação de diacrilato de polietileno qlicol usando-se cloreto de acriloil

Polietileno glicol (PEG) (disponível da Aldrich Inc.) tendo um peso molecular de 10000 (abreviado 10k) foi quimicamente modificado para incorporar funcionalidades de acrilato na molécula para torná-lo foto-reticulável ou polimerizável por espécies de radicais livres.

O PEG 10k foi completamente seco por aquecimento do mesmo num forno a vácuo a 80°C durante 24 horas.

Alternativamente, o PEG poderia ser dissolvido em tolueno e a solução destilada onde qualquer humidade presente poderia ser removida como um azeótropo com o tolueno.

Foram então dissolvidos 40 g de PEG seco em 200-250 ml de tolueno seco (podem também ser usados acetona, benzeno e outros solventes orgânicos secos).

A solução foi arrefecida num banho de gelo antes da adição do cloreto de acriloil.

Foi adicionado um excesso molar de cinco vezes de cloreto de acriloil (3,26 ml) e foi adicionada uma base, trietilamina (5,54 ml), para remover HCl mediante formação.

A reacção também poderia ser realizada na ausência de uma base e o HCl libertado, desprendido em forma gasosa.

A reacção foi realizada num balão de fundo redondo sob argónio com refluxo constante durante 24 horas.

A mistura de reaccão foi filtrada para remover o cloridrato de trietilamina insolúvel, enquanto o filtrado era adicionado a um excesso de dietil éter para precipitar o PEG diacrilato (PEG-DA).

O produto foi novamente dissolvido em tolueno e precipitado duas vezes com dietil éter para ulterior purificação, e qualquer solvente remanescente removido no forno a vácuo.

O rendimento foi de 35 g de PEG-DA.

Outros esquemas de purificação, tal como diálise de uma solução de PEG-água contra água desionizada, seguida de secagem por congelamento também são aceitáveis.

FOTO-RETICULAÇÃO DE DERIVADOS DE PEG

Exemplo 2

Foto-reticulação com luz visível para produzir geles de PEG

Foram dissolvidos derivados de PEG preparados, como descrito no exemplo 1, numa solução salina tamponada com bicarbonato aquoso com um pH de 7,4 (ou outros tampões) e numa concentração de 1-40%.

Foram adicionados um foto-iniciador, etil eosina ($0,10^{-7}$M a 10^{-4}M), um co-catalisador, trietanolamina (10^{-4} M a 10^{-1} M), e um co-monómero, 1-vinil 2-pirrolidinona (0,001 a 1,0% do volume total, porém não essencial), à solução que ficou protegida da luz até ao processo de foto-reticulação ou foto-polimerização.

Uma pequena quantidade da solução preparada foi colocada num tubo de ensaio e exposta à radiação visível seja de um laser de iões de argónio com um comprimento de onda de 514 nm a potências entre 10 mW e 2 W, seja de uma lâmpada de arco de mercúrio de 100 watts que tem uma emissão bem forte cerca de 500-550 nm.

O tempo de gelificação foi observado e verificado ser extremamente rápido com laser (da ordem de milissegundos) e bem rápido com a lâmpada de mercúrio (da ordem de segundos), e variou com as concentrações do polímero, do iniciador, do co-catalisador e dos co-monómeros no sistema.

Exemplo 3

Foto-polimerização ou foto-reticulacão com luz UV para produzir qeles de PEG

Foi utilizado um sistema iniciador diferente do acima descrito para produzir

geles de PEG.

Foi adicionado um foto-iniciador de ultravioleta (UV), 2,2-dimetoxi-2-fenil acetofenona, a uma solução de PEG polimerizável em tampão aquoso com uma concentração de 1000-1500 ppm.

Poderia ser adicionada uma pequena quantidade de dimetil sulfóxido (DMSO) para melhorar a solubilidade do foto-iniciador.

Esta solução foi exposta a uma radiação de UV com comprimento de onda longo de uma lâmpada de UV de 100 watts.

O tempo requerido para gelificação foi da ordem de segundos e foi uma função da concentração do iniciador e da adição de um co-monómero polimerizável tal como vinil pirrolidinona (0,001 a 1,0%).

Pode também ser usado um laser de UV para a foto-polimerização do PEG.

ALGINATOS COM ALTO TEOR DE BLOCOS G

Exemplo 4

Foi preparado alginato de harmonia com métodos bastante conhecidos do estado da técnica.

Por exemplo, podem ser comercialmente obtidos alginatos de numerosas fontes, inclusive Sigma (St. Louis, MO) e Protan A/S (Drammen, Noruega).

Pode ser obtido alginato Poli G da Protan (Noruega ou Seattle) , ou pode ser obtido por isolamento do material de fontes naturais ou por conversão química por métodos bastante conhecidos na técnica.

Alguns alginatos possuem relativamente muitos resíduos de blocos M e devem ser convertidos em poucos blocos M para uso de harmonia com o modo de realização preferido desta invenção.

Um exemplo de um processo que pode ser usado para reduzir o nível de blocos M no alginato é o seguinte:

Foi obtido da Protan A/S, Drammen, Noruega (lote número BL 5417368 da Protan) Alginato comercial da alga *Laminaria hvperborea* contendo 64% de resíduos de ácido gulurónico.

A contaminação com lipopolissacarídeo (LPS) no alginato foi removida pelo método descrito por Karplus et al. «"A new method for reduction of endotoxin contamination from protein solutions"; J. Immunol. Methods, (1987) 105 211)) usando-se uma combinação de

(1) ligação por afinidade de Polimixin-B-sefarose 4B (PB-seph 4B) (Pharmacia, Uppsala, Suécia) e

(2) dissociação da endotoxina-proteína do tensoactivo dialisável octil-β-D-glucopiranoside (OBDG, Sigma, St. Louis, Mo, EUA).

Resumidamente, foi adicionado OBDG a 1% (p/v) a 1% (p/v) da solução de alginato (dissolvida em tampão de eluição consistindo em $NaHCO_3$ pH 8,5), e misturado durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Foram misturados e transferidos volumes iguais do gel de PB-seph 4B e da solução de OBDG/alginato para uma bolsa de diálise (PM 12-14000).

A bolsa foi então colocada num recipiente com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e dialisada durante 48 horas à temperatura ambiente.

Subsequentemente, o gel de PB-seph 4B foi removido por centrifugação a 2750 rpm, durante 10 minutos a 4°C.

Foi adicionado NaCl a 0,2% (p/v) à solução de alginato e o alginato foi precipitado com etanol a 96%.

O alginato foi então lavado duas vezes com etanol a 96% e finalmente uma vez com etanol a 96% e uma vez com dietil éter antes de ser seco.

Este alginato é aqui denominado alginato poli-G ou alginato com blocos G ou alginato com alto teor de blocos G.

Também podem ser preparados fragmentos de alginato contendo mais de 85% de unidades G e um grau de polimerização de 40 blocos G (ou DPn = 40) a partir de *Laminaria digitata*.

MISTURAS DE ALGINATO E PEG-DIACRILATO PARA GELES DE ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA OU SEQUENCIALMENTE RETICULADOS OU INTERPENETRAÇÃO DE REDES DE POLÍMEROS

Exemplo 5

Determinação de gamas de concentração de misturas de alginato e PEG-diacrilato requeridas para a formação de geles de encapsulação reticulados estáveis.

Foi preparada uma solução de alginato de sódio em solução salina com uma concentração final de 1,8% (p/v).

Foi adicionado PEG-DA 10k preparado, como descrito no exemplo 1, a esta solução em concentrações finais variando de 1% a 30% (p/v) e estas soluções testadas quanto à reticulabilidade iónica do alginato seguida pela foto-reticulabilidade covalente do PEG-DA.

Como era desejada uma solução de propriedade dupla, a saber, uma solução possuindo as qualidades únicas de reticulabilidade iónica bem como foto-reticulabilidade química ou covalente, estas soluções foram testadas para satisfazer as duas exigências.

A reticulação iónica foi testada pingando-se uma pequena quantidade da solução numa proveta contendo uma solução de cloreto de cálcio a 4%.

O critério de aprovação neste teste era a formação instantânea de uma massa gelificada mediante contacto da mistura de alginato/PEG-DA (abreviada AP) com a solução de cálcio.

Aquelas soluções formando geles muito moles ou aquelas que não formaram um gel rapidamente foram consideradas como não aprovadas neste teste.

De forma similar, o teste para a foto-reticulação química ou covalente foi realizado por adição de 5 µl/ml de uma solução de etil eosina (consistindo em 5 mg de etil eosina em 1 ml de 1-vinil 2-pirrolidinona), e 5 µl/ml de uma solução de trietanolamina (TEA), 70% por volume em solução salina, às soluções de AP.

As misturas de AP foram então expostas a uma lâmpada de mercúrio de 100 watts durante 15 segundos seguindo-se mistura completa.

Se não fosse formado um gel consistente durante esta exposição, a solução de AP era considerada instável e assim não era aprovada no teste quanto à foto-reticulabilidade química ou covalente.

Estes resultados estão resumidos na tabela a seguir.

Concentração de PEG-DA 10k (p/v) %	reticulação iónica 0,4% de CaCl3	exposição de 15 seg para foto-reticulação
1	++	-
2	++	-
3	++	-
4	++	+
5	+	+
6	+	+
7	+	++
8	-	++
9	- -	++
10	- -	++
15	- -	++
20	- -	++
30	- -	++

Em conformidade,

"++" é igual a gel muito consistente;

"+" é igual a gel moderadamente consistente;

" - " é igual a gel de qualidade pobre;

"- -" é igual à não gelificação.

As misturas de AP que são aprovadas nos dois critérios acima (isto é, aquelas que têm uma classificação positiva nítida, a saber, as misturas de AP contendo 1-8% de PEG-DA) foram ainda testadas da seguinte forma.

Foram formadas gotículas destas misturas de AP contendo etil eosina e trietanolamina nas concentrações acima mencionadas numa solução de cálcio.

As gotículas foram expostas a uma lâmpada de mercúrio (Hg) de 100 watts enquanto suspensas na solução de cálcio.

O descoramento da etil eosina (isto é, vermelho para incolor) foi observado durante 30 segundos.

O foto-descoramento do corante é uma indicação de polimerização.

Em seguida a este processo, as gotículas agora duplamente reticuladas foram testadas quanto à estabilidade em uma solução de citrato de sódio (1,0 M, um quelante de cálcio).

Uma dissolução ou fragmentação dos geles duplamente reticulados sob estas condições rigorosas foi considerada como um fracasso de foto-reticulação covalente adequada.

Chegou-se a uma faixa de concentrações de misturas de AP que formou um gel estável de harmonia com o teste do citrato de sódio.

As concentrações dentro desta faixa foram consideradas para uso ulterior em aplicações biológicas.

A tabela a seguir resume os critérios de selecção para os testes descritos acima.

Concentração de PEG-DA 10k (p/v)%	descoramento depois de 30 seg de exposição	exposição a citrato de sódio 1M, 15 minutos
1	Sim	- -
2	Sim	- -
3	Sim	-
4	Sim	+
5	Sim	++
6	Sim	++
7	Sim	++
8	sim	++

Em conformidade:

"++" é igual a nenhuma dissolução;

"+" é igual a dissolução moderada;

"_" é igual a fragmentação;

"--" é igual a dissolução total.

Das tabelas acima, foi seleccionada uma faixa de concentrações (4-8%) como adequada para formação de geles de AP duplamente quer com reticulação iónica quer com foto-reticulação covalente.

É evidente que foi observada uma interferência na reticulação iónica a concentrações de PEG-DA 10k acima de 8%.

Testes similares aos acima descritos foram realizados com diacrilatos PEG sintetizados de PEG de pesos moleculares variando de 1000 a 35000 g/mole.

Para cada peso molecular de PEG-DA, foi encontrada uma faixa adequada de concentrações de PEG-DA na mistura de AP na qual foram possíveis tanto a reticulação iónica como a foto-reticulação covalente.

Também é possível utilizar misturas de PEGs de pesos moleculares diferentes em proporções diferentes para obtenção das capacidades de dupla reticulação.

Este último método pode ser útil no ajustamento do corte de peso molecular (MWCO) de um gel de alginato/PEG-DA reticulado.

As características de difusão e o MWCO destes geles estão apresentados no exemplo 7.

As faixas de concentração adequadas de PEG-DA em misturas de AP (numa razão de peso/volume final) que mostram propriedades de dupla reticulação estável estão resumidas abaixo.

Peso molecular do PEG-DA	faixa de concentração do PEG-DA10 adequada para propriedades de reticulação dupla estável quando adicionado à solução de alginato 1,8%.
10 00	14 - 17%
3400	9 - 12%
10000	4 - 8 %
35000	5 - 9 %
20 M	5 - 7 %

É evidente que a preparação das soluções acima pela adição de PEG-DA numa solução de 1,8% de alginato resultou na diluição do alginato naquela

solução e uma queda simultânea na concentração de alginato que foi proporcional à quantidade de PEG-DA adicionado.

A concentração final de alginato foi no entanto mantida entre 1,5-2,0 %.

Para tornar a composição das misturas facilmente compreensível, a quantidade de PEG-DA adicionada foi normalizada para a quantidade de alginato presente na solução e expressa como uma relação.

Uma gama aceitável de proporções (alginato : PEG-DA) foi determinada para cada peso mole-cular de PEG-DA testado.

Os resultados expressos desta forma estão apresentados na tabela abaixo.

Peso molecular de PEG-DA	gama de proporções (alginato : PEG-DA) aceitáveis para dupla reticulação estável
1000	1 : 9,5 - 1 : 11,5
3400	1 : 5,5 - 1 : 7,5
10000	1 : 2,5 - 1 : 5,0
20000	1 : 3,0 - 1 : 5,0
35000	1 : 3,0 - 1 : 5,0
20 M	1 : 3,0 - 1 : 4,5

Utilizando-se estas proporções, uma solução de alginato e PEG-DA pode ser feita com uma concentração final de alginato na solução, de preferência, entre 1,5% e 2%(peso/volume final), porém não limitada a esta faixa.

Como um exemplo, é feita uma mistura iónica reticulável e covalente foto-reticulável ou duplamente contendo PEG-DA 10k com a proporção de 1:3,5, utilizando 1 g de alginato com 3,5g de PEG-DA 10k, e levando-se a mistura até uma concentração final de alginato de 1,7%, isto é, elevando-se o volume para 58,8 ml por adição de água (concentração final de alginato =(1/58,8) x 100 = 1,7%).

A concentração de PEG-DA na solução é então = (3,5/58,8) x 100 = 5,95%.

Para testar o efeito da diluição com água numa mistura de AP aceitável particular (como determinado pela tabela acima), a mistura acima descrita (1 : 3,5 alginato: PEG-DA 10k) foi preparada com três concentrações finais diferentes de alginato a 1,2%, 1,7% e 2,1%.

Foram formadas gotículas destas misturas (contendo foto-catalisadores) numa solução de cálcio seguida de exposição à luz e uma solução de citrato de sódio 1 M.

Em cada caso, as gotículas permaneceram estáveis no citrato indicando que uma diluição na gama de 1,2 - 2,1% de alginato não rompia a capacidade de

gelificação dupla.

Exemplo 6

Efeito do intervalo de tempo entre a reticulação iónica e a foto-reticulação covalente sobre a estabilidade do material ou gel de encapsulação reticulado.

É provável que uma esfera ionicamente gelificada de uma mistura de AP que ainda não fora covalentemente foto-reticulada perca sua capacidade de foto-reticular covalentemente caso haja um longo intervalo de tempo entre as etapas de reticulação iónica e foto-reticulação.

Esta perda da capacidade de foto-reticular é provavelmente devida à difusão de espécies que são activas no processo de foto-reticulação provenientes da esfera ionicamente gelificada para a solução circundante.

Como as concentrações locais destas espécies (por exemplo PEG-DA, etil eosina, trietanolamina, vinil pirrolidinona) na esfera gelificada diminuem, a sua capacidade para formar foto-reticulações covalentes suficientes para manter a estabilidade mediante exposição a uma solução de citrato de sódio diminui de maneira correspondente.

Assim, é provável que o intervalo de tempo entre as duas etapas de reticulação seja de suma importância na formação de um gel ionicamente reticulado e covalentemente foto-reticulado estável.

O efeito de um intervalo de tempo entre as etapas de foto-reticulação iónica e covalente foi testado com uma mistura de AP contendo uma concentração de 5% de PEG-DA e um sistema iniciador (como descrito acima).

Esferas gelificadas (3-4 mm de diâmetro) foram preparadas numa solução de cloreto de cálcio 0,4% e, depois, expostas à radiação de uma lâmpada de Hg (por 30 segundos) seguindo-se um intervalo de tempo conhecido.

As esferas foram observadas quanto ao descoramento (uma indicação de reticulação ou polimerização) e então transferidas para uma solução de citrato de sódio durante 15 minutos.

A integridade das esferas foi examinada e foram tiradas conclusões segundo o intervalo de tempo máximo permissível entre as duas etapas de reticulação que resultaria num gel duplamente reticulado estável.

Os resultados estão resumidos na tabela abaixo.

Intervalo de tempo entre a reticulação iónica e a foto-reticulação	descoramento depois de 30 segundos de exposição à lâmpada de Hg	estado do gel exposto à solução de citrato de sódio 1 M, 15 minutos
10 segundos	Sim	++
30 segundos	Sim	+++
1 minuto	Sim	++
5 minutos	Sim	++
10 minutos	Sim	-
15 minutos	Sim	-

Em conformidade:

"++" é igual a manutenção da integridade;

"+" é igual a dissolução moderada;

"_" é igual a perda da forma;

"_ _" é igual a fragmentação.

Os resultados acima indicam claramente a importância de limitar o intervalo de tempo de preferência em não mais que cerca de cinco minutos entre as duas etapas de reticulação.

Mediante exame destas esferas em citrato depois de 24 horas, constatou-se que as esferas submetidas a um intervalo de tempo de 15 minutos foram fragmentadas ao passo que as restantes mantiveram seus estados que

foram observados depois de 15 minutos de exposição à solução de citrato de sódio.

Naturalmente deve ser reconhecido que para esferas de tamanho e formato diferentes, o intervalo de tempo aceitável pode ser facilmente determinado, mas é suficiente dizer que o intervalo de tempo deve ser tão pequeno quanto possível.

ENSAIOS PARA A ADEQUABILIDADE DE GELES DUPLAMENTE RETICULÁVEIS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Exemplo 7

Efeitos imunoprotectores de geles de encapsulação de AP como determinado por difusão de macromoléculas julgadas adequadas.

A difusão de dextranos rotulados com FITC (isotiocianato de fluorceinal) de pesos moleculares conhecidos através de contas de gel de AP reticulado foi usada para determinar a capacidade de difusão ou corte de peso molecular (MWCO) das contas de gel para elucidar sua natureza imunoprotectora.

Foram preparadas soluções de AP contendo 6% de PEG-DA 10k e
FITC-dextranos tendo pesos moleculares de 10000, 70000 e 150000.

Foram adicionadas quantidades apropriadas dos foto-iniciadores à soluçã
contas esféricas foram preparadas pingando-se um volume fixo (0,5 ml)
solução numa solução de cloreto de cálcio a 0,4% usando-se uma seringa
1 ml com uma agulha calibre 20.

Cerca de 35-45 contas foram produzidas a partir de 0,5 ml da solução.

Imediatamente depois desta etapa, as contas ionicamente gelificadas f
covalentemente foto-reticuladas por exposição a uma lâmpada de Hg du
30 segundos.

As contas foram então deixadas assentar na solução de cálcio duran
minutos, e depois foram lavadas três vezes numa solução de sal equili
de Hanks (obtida no Flow Laboratories, Inc., McLean, Virginia) e incu
em 5 ml desta solução a 4°C.

A absorvência destas soluções a 490 nm era medida periodicamente
espectómetro e a quantidade de FITC - dextranos libertados das co
calculada a partir de curvas padrão de absorvência versus concen
preparadas antes da experiência.

A FIG 1 mostra a permeabilidade de um gel duplamente reticulado de alginato/PEG-DA 10k, a dextranos de pesos moleculares diferentes.

Claramente, a permeabilidade do gel de encapsulação reticulado é uma função do peso molecular dos dextranos, com o dextrano 150k mostrando uma libertação significativamente menor do que os dextranos de peso molecular mais baixo.

Usando-se uma concentração maior do PEG-DA 10k, ou um PEG-DA de peso molecular mais baixo, ou misturas de PEG-DA de pesos moleculares variáveis, ou uma combinação de PEG-DA com monómeros de baixo peso molecular solúveis em água (por exemplo 1-vinil-2-pirrolidinona, hidroxietil metacrilato ou acrilamida ou similares), a permeabilidade dos geles duplamente reticulados pode ser ajustada a especificações particulares.

Um exemplo de uma especificação desejada seria uma permeabilidade muito baixa a macromoléculas tendo pesos moleculares maiores que 150.000 daltons como pode ser requerido para atingir a imunoprotectividade.

Como aqui descrito, os geles duplamente reticulados da presente invenção também proporcionam imunoprotecção, sem a necessidade de ulterior imunossupressão, para produtos biológicos de espécies altamente discordantes quando xenotransplantadas in vivo.

Exemplo 8

Preparação de uma mistura de AP para encapsulação de células de ilhotas

Foram feitas misturas ou soluções de AP enquanto se monitorizava cuidadosamente o pH e a osmolaridade.

Um exemplo da preparação de uma solução de AP contendo PEG-DA 10k está aqui apresentado.

São seguidas etapas similares quando PEGs diferentes ou outros monómeros são usados nesta mistura.

Pretendia-se preparar uma solução de AP contendo PEG-DA 10k numa concentração final de 6% (p/v) e alginato de sódio numa concentração final de cerca de 1,7% (p/v).

Pretendia-se um volume final de 200 ml.

Foram misturados entre si os seguintes componentes: água desionizada (186,4 ml), uma solução a 70% de trietanolamina em solução salina 0,9% (1 ml), uma solução de 5 mg/ml de etil eosina em vinil pirrolidinona (1 ml), e cloreto de sódio (0,8 g).

O pH desta solução foi ajustado para 7,2 por adição de HCl 5 N.

Foram adicionados 12 g de PEG-DA 10k e 3,4 g de alginato de sódio e a solução agitada durante uma noite no escuro.

Esta solução era sensível à luz e foi portanto protegida da luz todas as vezes.

Depois da dissolução de PEG e alginato, a osmolaridade desta solução foi ajustada em 290-350 mOsm/kg por adição de uma pequena quantidade de um solução saturada de NaCl em água desionizada.

A verificação do pH da solução mostrou ser de importância crítica uma vez que um pH elevado afectou fortemente a função das ilhotas ao passo que um pH abaixo de 6,4 - 6,5 tornaria a mistura não polimerizável ou não foto-reticulável quando exposta à radiação electromagnética ou luz porque a maior parte da trietanolamina estaria presente na forma de protões e portanto seria incapaz de produzir os radicais livres necessários para a polimerização.

A solução foi testada quanto à reticulação iónica bem como quanto à foto-reticulação covalente e também foi submetida ao teste do citrato descrito anteriormente para verificação de sua estabilidade.

A solução foi então filtrada estéril por bombagem da mesma através de um sistema de fibras ocas de 0,2 mícrons.

A solução estéril foi armazenada num refrigerador para uso posterior.

Exemplo 9

Encapsulacão de ilhotas de Langerhans em geles de encapsulação de AP

Foram obtidas por técnicas conhecidas na literatura e mantidas em cultura ilhotas de Langerhans isoladas de cães, ratos, porcos ou seres humanos.

Antes da encapsulação, elas foram lavadas em solução salina e precipitadas como uma pequena bola por centrifugação.

Esta pequena bola foi novamente suspensa na mistura de AP numa concentração de aproximadamente 5000 ilhotas/ml da mistura de AP.

Esta suspensão foi bombeada através de uma coluna de jacto de fluxo coaxial com fluxo de ar concêntrico para produzir gotículas de um tamanho desejado.

As gotículas produzidas por esta técnica tinham essencialmente 200 - 700 mícrons de diâmetro.

As gotículas foram colhidas numa proveta contendo solução de cloreto de cálcio a 0,4% onde elas gelificaram instantaneamente por reticulação iónica mediante contacto com a solução.

Pode ser usada uma solução de cloreto de cálcio de 0,1-2,0 %, mas, de preferência, é usada uma solução 0,4-0,8 %.

O vaso de colheita de vidro transparente foi exposto à radiação electromagnética (lâmpada de Hg, 100 watts) com um filtro verde de banda (transmissão 500-580 nm) com um pico de transmissão em cerca de 550 nm.

Esta faixa de comprimentos de onda é coincidente com o espectro de absorção de etil eosina que funciona como o corante ou foto-iniciador no sistema.

Foram ocultados comprimentos de onda do ultravioleta ou outros comprimentos de onda para impedir dano potencial às ilhotas.

As gotículas ou cápsulas ionicamente reticuladas foram simultaneamente polimerizadas ou foto-reticuladas mediante exposição à radiação electromagnética, ou luz.

Isto resultou em gotículas ou cápsulas duplamente reticuladas (isto é, iónica e covalente) contendo ilhotas.

A exposição destas células à luz foi limitada a cerca de cinco minutos embora nenhuma evidência de deterioração ou dano ao funcionamento das ilhotas fosse observado em períodos mais longos.

As cápsulas foram completamente enxaguadas em solução salina e meios de cultura e depois colocadas em cultura.

Alternativamente, puderam ser preparadas cápsulas grandes (da ordem de mm) por injecção da solução através de uma seringa.

Também, microcápsulas preparadas por técnicas convencionais puderam ser ainda encapsuladas numa "macrocápsula" por esta técnica, cujos benefícios estão descritos abaixo.

Exemplo 10

Teste in vitro do funcionamento de ilhotas depois de encapsulação com misturas de AP

Foram realizadas estimulações com glicose estática (SGS) nas ilhotas encapsuladas para avaliar o funcionamento das ilhotas.

Foi feita coloração com ditizona ou laranja de acridina/iodeto de propídio para avaliar a viabilidade.

Resumidamente, a técnica de SGS envolve a estimulação de ilhotas com um nível elevado de glicose e medição da insulina segregada (por RIA) em resposta ao nível de glicose.

As ilhotas são primeiro incubadas durante uma hora em nível da base de glicose (tipicamente 40-60 mg%) seguida por incubação num nível estimulatório durante uma hora (300-400 mg%) e então de volta para um nível básico de glicose durante uma hora.

Um aumento no nível de secreção da insulina acima da secreção base durante a fase de estimulação, seguido por um retorno da insulina segregada para níveis de base é um requisito para o bom funcionamento das ilhotas.

Dois controles foram usados para esta experiência.

Havia ilhotas livres e ilhotas encapsuladas nas microcápsulas de alginato/polilisina convencionais (tais como aquelas apresentadas nas Patentes Americanas US Nºs 4.325.883, 4.391.909 e 4.409.331).

As relações de estimulação (em relação aos níveis de base iniciais de insulina) para as ilhotas livres eram 1,0 : 6, 6 : 1,6, as relações para as

ilhotas encapsuladas em alginato/polilisina eram 1,0 : 11, 0 : 2,5, enquanto os níveis para as ilhotas encapsuladas em AP eram 1,0 : 17, 0 : 6,35.

(O primeiro número na relação refere-se ao nível de base de insulina normalizado, o segundo refere-se ao nível de insulina em resposta ao desafio da glicose, e o terceiro ao nível de base depois do desafio da glicose).

Estes resultados indicaram funcionamento adequado das ilhotas e, junto com a tintura de viabilidade, confirmaram que não houve dano aparente ao funcionamento das ilhotas como resultado do processo de polimerização ou presença de outros monómeros e catalisadores.

Isto indicou, na verdade, que o tratamento de ilhotas com as misturas de AP resultou em uma melhor estimulação das ilhotas em termos de descarga de insulina.

Exemplo 11

Testes in vitro do funcionamento de ilhotas por perifusão depois da encapsulacão das ilhotas com misturas de AP. Efeito do tamanho das cápsulas sobre a cinética da libertação de insulina.

Foram testadas ilhotas caninas em microcápsulas de alginato-polilisina convencionais como descritas na Patente Americana US N° 4.663.286) bem como ilhotas encapsuladas pelas misturas de AP da presente invenção (300-800 mícrons de diâmetro) quanto à secreção de insulina num aparelho de perifusão.

A perifusão envolve o teste da resposta das ilhotas a um nível estimulatório de glicose num sistema em movimento ao invés de um sistema estático como descrito acima.

É portanto possível obter a cinética da libertação de insulina pelo uso desta técnica.

O meio de cultura contendo uma quantidade apropriada de glicose é perfundido através do sistema que tem uma câmara contendo ilhotas encapsuladas e o meio perfundido é colhido periodicamente num colector de fracções e ensaiado quanto à insulina libertada por RIA.

Neste teste particular, um nível de glicose de base (40 mg %, ou 40 mg de glicose/100 ml de meio) foi mantido pelos primeiros 60 minutos seguido por um nível estimulatório de glicose (300 mg %) durante 30 minutos e um retorno para níveis básicos de glicose (40 mg%) para o restante da experiência.

Os resultados como ilustrados na FIG 2 mostram um aumento distinto na descarga de insulina medida em relação aos níveis de base de insulina (a 40 mg% de glicose) segregada pelas ilhotas quando a câmara é perfundida com meio contendo 300 mg%.

Existe uma fase de retardamento de tipicamente cerca de 10 minutos antes de as ilhotas começarem a segregar uma quantidade aumentada de insulina em resposta ao nível estimulatório de glicose.

Cerca de 15 minutos depois de terminada a estimulação, a descarga de insulina das ilhotas cai de volta para os níveis de base da secreção.

Claramente, não há qualquer diferença na cinética da resposta (ou rapidez da resposta) aos níveis aumentados de glicose entre as ilhotas convencionalmente encapsuladas (cápsula de alg/PLL) e as ilhotas encapsuladas em AP.

As ilhotas encapsuladas em AP no entanto mostram uma estimulação maior em termos de descarga de insulina do que as ilhotas encapsuladas em alginato/PLL.

Para avaliar o efeito do tamanho das microcápsulas sobre a cinética da libertação de insulina, foram preparadas microcápsulas maiores ou "macrocápsulas" contendo ilhotas caninas.

Estas macrocápsulas (tipicamente 5-7 mm de diâmetro) foram preparadas simplesmente por extrusão de uma suspensão de ilhotas na solução de AP através de uma seringa e formação de gotículas numa solução de cálcio seguida de foto-reticulação.

Foram preparadas soluções de AP contendo dois pesos moleculares diferentes de PEG-DA.

Elas eram AP 10k (com PEG-DA PM 10000) e AP 3,4k (com PEG-DA PM 3400).

Macrocápsulas destes materiais contendo ilhotas caninas foram perifundidas para obtenção dos perfis de libertação de insulina como mostrado na FIG 3.

As ilhotas encapsuladas nas diferentes soluções de AP apresentaram, as duas, uma resposta à glicose aumentada em 10 -15 minutos depois de iniciado o estímulo.

Não houve assim qualquer diferença significativa entre as microcápsulas e as macrocápsulas em termos de rapidez de libertação de insulina depois de um estímulo de glicose.

Esta foi uma observação importante já que sugeriu que o tamanho da cápsula não pode ter importância na cinética da resposta de insulina.

Por outro lado, a "downregulation" ("regulação para um nível mais baixo") da libertação de insulina pareceu ocorrer muito mais lentamente para as ilhotas macroencapsuladas fornecendo um sistema de libertação lenta de insulina que pode ter vantagens sobre a rápida "downregulation" vista nas ilhotas microencapsuladas.

Esta oferece a vantagem potencial de uma linha de base de nível baixo contínuo de insulina in vitro.

Assim, estava claro que a porosidade diminuída esperada no caso do gel de AP 3,4k em comparação com a do gel de AP 10k não afectou a difusão de moléculas pequenas tais como glicose e insulina através destes geles embora a difusão de macromoléculas possa ser afectada.

Ilhotas caninas em microcápsulas de alginato-polilisina convencionais também foram ainda encapsuladas em macrocápsulas de AP.

Os resultados na FIG 4 mostram claramente o nível de base inicial de insulina segregada seguido por uma resposta de secreção de insulina ao nível estimulatório de glicose (por um período de tempo entre linhas tracejadas) e um lento retorno para os níveis de base de secreção de insulina em direcção ao fim da experiência.

Deve ser observado mais uma vez que a resposta ao estímulo atrasa

cerca de 10-15 minutos e isto é comparável às microcápsulas e macrocápsulas acima.

A "downregulation" é mais lenta em comparação com as microcápsulas conforme observado para as macrocápsulas acima.

Não obstante, os resultados são mais uma vez indicativos de ilhotas com funcionamento saudável e do procedimento de encapsulação relativamente inócuo

Exemplo 12

Testes in vivo de funcionamento de ilhotas encapsuladas em AP num modelo xenotransplantado seguidos de recuperação de implantes em funcionamento

Foram encapsuladas ilhotas numa microcápsula da solução de AP 10k.

O processo envolveu a suspensão das ilhotas numa solução de AP e a formação de gotículas minúsculas (300-800 mícrons) por injecção da suspensão através de uma coluna de jacto de fluxo coaxial (com um fluxo de ar externo) e subsequente foto-polimerização por exposição à luz verde de uma lâmpada de Hg.

As gotículas foram completamente enxaguadas em solução salina e meios de cultura.

Elas foram cultivadas em cultura durante três dias antes do transplante para as cavidades peritoneais de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ).

Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas e sua glicose no sangue, volume de urina e peso corpóreo foram medidos de forma rotineira.

A FIG 5 mostra a glicose no sangue, volume de urina e pesos corpóreos dos ratos que receberam ilhotas microencapsuladas (soluções de AP 10k).

Foram transplantadas 10.000 ilhotas caninas para as cavidades peritoneais destes ratos.

A glicose no sangue mostra uma queda imediata para níveis normais.

A glicémia normal é mantida por 34 dias, em cujo período estes transplantes são recuperados (embora eles estejam funcionando normalmente) com a finalidade de avaliar o estado do implante.

Imediatamente depois da recuperação, vê-se que a glicose no sangue e os volumes de urina aumentam novamente para os níveis diabéticos.

Constatou-se que os pesos corpóreos destes ratos aumentaram a uma taxa fixa de aproximadamente um grama por dia durante o período do transplante, o que é típico num rato saudável.

As microcápsulas implantadas foram recuperadas em 34 dias e os animais sacrificados.

As microcápsulas recuperadas foram cultivadas em cultura in vitro, observadas quanto à reacção do tecido ao material, submetidas à tintura de viabilidade, estimulação de glicose estática (SGS), e perifusão para avaliação do funcionamento das ilhotas.

A maioria das microcápsulas eram livres do crescimento excessivo do tecido e a tintura das ilhotas com ditizona (tintura para insulina) mostrou a presença de insulina em mais de 80% das ilhotas recuperadas.

A SGS mostrou relações de estimulação de 1,0 : 50, 8 : 10,9 indicando ilhotas extremamente saudáveis.

O perfil de perifusão (FIG 6) destas ilhotas recuperadas apresentou um resultado que essencialmente coincidia com a SGS em termos de razões de estimulação mostrando os perfis característicos de secreção de insulina que foram observados em estudos in vitro antes da implantação.

Um teste de tolerância de glicose intravenosa (IVGTT) foi realizado nos ratos transplantados antes da recuperação dos implantes para determinar a cinética da libertação de glicose do sistema vascular destes ratos quando desafiada por uma injecção de glicose.

O procedimento envolveu a canalização da veia jugular externa destes ratos com um cateter sob anestesia geral.

Deixou-se então que os animais recuperassem por um ou dois dias.

A glicose (500 mg/kg de peso corpóreo) foi administrada através do cateter e foi colhido sangue periodicamente depois da injecção em 1, 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos.

A glicose no sangue foi medida e representada num gráfico em função do tempo para determinar a rapidez de libertação do sistema vascular do rato.

A FIG 7 mostra estes resultados.

A rapidez de libertação é medida em termos de um valor K que é calculado por determinação da inclinação de uma linha entre os valores da glicose em 1 minuto e 30 minutos representados em gráfico numa escala logarítmica.

Quanto maior o valor de K, mais rápida a libertação de glicose.

Para um rato normal, o valor de K é tipicamente maior que 3,0 ao passo que para animais diabéticos ele é significativamente mais baixo.

As curvas na FIG 7 mostram os resultados para um rato normal, um rato diabético, e um rato diabético recebendo um xenotransplante de ilhotas caninas em microcápsulas de AP, 30 dias depois do transplante.

A curva de libertação de glicose para o rato transplantado aproxima-se bastante da do rato normal, indicando o sucesso do transplante e o alívio dos sintomas da diabetes.

Exemplo 13

Testes in vivo do funcionamento das ilhotas num modelo de xenotransplante com microcápsulas de alginato PLL convencionais encapsuladas além disso em macrocápsulas de AP.

Foram ainda encapsuladas ilhotas caninas encapsuladas em microcápsulas de alginato/PLL convencionais (MIC) em macrocápsulas de AP 10k por suspensão das MICs na mistura de AP e extrusão através de uma seringa para formar gotículas (5-7 mm de diâmetro) numa solução de cálcio seguida por foto-reticulação.

Estas foram transplantadas para a cavidade peritoneal de ratos com diabetes induzida por STZ e a glicose no sangue, volumes de urina e pesos corpóreos monitorizados ao longo do tempo.

A FIG 8 mostra os resultados dos transplantes, indicando uma reversão completa da diabetes nestes ratos, conforme determinado pelos seus níveis de glicose no sangue normais (< 200 mg/dl), volumes de urina normais (15-25 ml/24 horas), e aumento nos pesos corpóreos de aproximadamente um grama por dia.

O estado destes transplantes permaneceu constante por mais de 45 dias no momento desta aplicação, totalmente independente das exigências de insulina exógena.

LISBOA, 10 de SETEMBRO de 2001

REIVINDICAÇÕES

1. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, caracterizado por compreender, pelo menos, um componente ionicamente reticulado; e, pelo menos, um componente covalentemente foto-reticulado; e por o componente ionicamente reticulado ser seleccionado de um polissacarídeo, um polianião ou um policatião.

2. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, de harmonia com a reivindicação 1, caracterizado por o componente ionicamente reticulado ser alginato.

3. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, de harmonia com a reivindicação 2, caracterizado por o alginato ser um alginato com alto teor de blocos G, tendo, pelo menos, 60% de ácido α-L-gulurónico.

4. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, de harmonia com a reivindicação 3, caracterizado por o alginato compreender pelo menos 70% de ácido α-L-gulurónico.

5. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, de harmonia com a reivindicação 1, caracterizado por as células serem seleccionadas das ilhotas de Langerhans, das células secretoras de dopamina, células secretoras de eritropoietina, células secretoras do factor de crescimento dos nervos, hepatócitos, células secretoras de adrenalina/angiotensina, células da paratiroide ou células secretoras de norepinefrina/metacefalina.

6. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, compreendendo células de mamíferos encapsuladas por:

- pelo menos um componente ionicamente reticulado; e,
- pelo menos, um componente covalentemente foto-reticulado;

caracterizado por o componente covalentemente reticulado ser um óxido de polialquileno.

7. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, de harmonia com a reivindicação 6, caracterizado por o componente covalentemente reticulado ser diacrilato polietileno glicol.

8. MATERIAL BIOCOMPATÍVEL RETICULADO, de harmonia com a reivindicação 6, caracterizado por as células de mamíferos serem seleccionadas das ilhotas de Langerhans, das células secretoras de dopamina, células secretoras de eritropoietina, células secretoras do factor de crescimento dos nervos, hepatócitos, células secretoras de adrenalina/angiotensina, células da paratiroide ou células secretoras de norepinefrina/metacefalina.

9. MISTURA BIOCOMPATÍVEL RETICULÁVEL compreendendo células de mamíferos; pelo menos, um componente ionicamente reticulado; e, pelo menos, um componente covalentemente foto-reticulado, caracterizado por o componente ionicamente reticulado ser seleccionado de um polissacarídeo, um polianião ou um policatião.

10. MISTURA BIOCOMPATÍVEL RETICULÁVEL, de harmonia com a reivindicação 9, caracterizado por o componente ionicamente reticulado

ser alginato.

11. MISTURA BIOCOMPATÍVEL RETICULÁVEL, de harmonia com a reivindicação 9, caracterizado por a osmolaridade da mistura ser de cerca de 290 miliosmoles por quilograma e o pH ser de cerca de 7,4.

12. MISTURA BIOCOMPATÍVEL RETICULÁVEL compreendendo células de mamíferos; em pelo menos um componente ionicamente reticulável; e, pelo menos, um componente covalentemente foto-reticulado, caracterizado por o componente covalentemente foto-reticulado ser um óxido de polialquileno.

13. MISTURA BIOCOMPATÍVEL RETICULÁVEL, de harmonia com a reivindicação 12, caracterizada por o óxido de polialquileno ser diacrilato glicol.

14. MISTURA BIOCOMPATÍVEL RETICULÁVEL, de harmonia com a reivindicação 12, caracterizada por a osmolaridade da mistura ser de cerca de 290 miliosmoles por quilograma e o pH ser de cerca de 7,4.

15. MATERIAL DE IMPLANTE RECUPERÁVEL, compreendendo uma macrocápsula biocompatível reticulada, caracterizado por compreender pelo menos um componente ionicamente reticulado e pelo menos um componente covalentemente foto-reticulado, e células de mamíferos ou uma(s) microcápsula(s) contendo células de mamíferos encapsuladas dentro da mencionada macrocápsula.

16. PROCESSO PARA ENCAPSULAR CÉLULAS DE MAMÍFEROS num material biocompatível reticulado, compreendendo o revestimento das células de mamíferos com um material biocompatível reticulado tendo, pelo menos, um componente ionicamente reticulado e, pelo menos um componente covalentemente foto-reticulado, caracterizado por o componente ionicamente reticulado ser seleccionado de um polisacarídeo, um polianião ou um policatião.

17. PROCESSO PARA ENCAPSULAR CÉLULAS DE MAMÍFEROS, de harmonia com a reivindicação 16, caracterizado por o componente ionicamente reticulado ser um alginato.

18. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, compreendendo o mencionado processo: reticular ionicamente um componente ionicamente reticulável numa suspensão tendo ainda um produto biológico e um componente covalentemente foto-reticulável e foto-reticulação covalentemente do componente covalentemente foto-reticulável, caracterizado por o mencionado componente ionicamente reticulável ser seleccionado de um polissacarídeo, um polianião ou um policatião.

19. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO de harmonia com a reivindicação 18, caracterizado por o componente ionicamente reticulado ser um alginato.

20. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado compreendendo: - suspensão do

produto biológico numa mistura compreendendo um componente covalentemente foto-reticulável e um componente ionicamente reticulável; - reticulação iónica do componente ionicamente reticulável; e – foto-reticulação covalente do componente covalentemente foto-reticulável, caracterizado por o componente ionicamente reticulável ser seleccionado de um polissacarídeo, um polianião ou um policatião.

21. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 20, caracterizado por o componente ionicamente reticulável ser um alginato.

22. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 21, caracterizado por o alginato ser um alginato com alto teor de blocos G tendo, pelo menos, 60% de ácido α-L-glurónico.

23. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 20,

caracterizado por o componente covalentemente foto-reticulável ser covalentemente foto-reticulado pela exposição da mistura à radiação electromagnética na presença de um sistema iniciador.

24. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 23, caracterizado por a radiação electromagnética ser luz ultravioleta.

25. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 23, caracterizado por a radiação electromagnética ser luz visível.

26. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 23, caracterizado por o sistema iniciador compreender um foto-iniciador e um co-catalisador eficaz para foto-reticular covalentemente o componente foto-reticulável covalentemente.

27. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 20, caracterizado por o produto biológico ser célula(s) viva(s) seleccionada(s) das ilhotas de Langerhans, células secretoras de dopamina, células secretoras de eritropoietina, células secretoras do factor de crescimento dos nervos, hepatócitos, células secretoras de adrenalina/angiotensina, células da paratiroide ou células secretoras de norepinefrina/metacefalina.

28. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, compreendendo o mencionado processo: o revestimento do produto biológico com um material biocompatível reticulado tendo, pelo menos, um componente ionicamente reticulado e, pelo menos um componente covalentemente foto-reticulado, caracterizado por o componente covalentemente foto-reticulado ser um óxido de polialquileno.

29. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, compreendendo o mencionado processo reticular ionicamente um componente ionicamente reticulável

numa suspensão tendo ainda um produto biológico e um componente covalentemente foto-reticulável ; e foto-reticular covalentemente o componente covalentemente foto-reticulável, caracterizado por o componente covalentemente foto-reticulável ser um óxido de polialquileno.

30. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 29, caracterizado por o óxido de polialquileno ser acrilato de polietileno glicol.

31. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 29, caracterizado por o produto biológico ser célula(s) viva(s) seleccionada(s) das ilhotas de Langerhans, células secretoras de dopamina, células secretoras de eritropoietina, células secretoras do factor de crescimento dos nervos, hepatócitos, células secretoras de

adrenalina/angiotensina, células da paratiroide ou células secretoras de norepinefrina/metacefalina.

32. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, compreendendoo mencionado processo: - a suspensão do produto biológico numa mistura compreendendo um componente covalentemente foto-reticulável e um componente ionicamente reticulável; - a reticulação iónica do componente ionicamente reticulável; e – a foto-reticulação covalente do componente covalentemente foto-reticulável, caracterizado por o componente covalentemente foto-reticulável ser um óxido de polialquileno.

33. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 32, caracterizado por o componente ionicamente reticulável ser alginato.

34. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 33,

caracterizado por o alginato ser um alginato com alto teor de blocos G tendo, pelo menos, 60% de ácido α-L-glurónico.

35. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 32, caracterizado por o óxido de polialquileno ser acrilato de polietileno glicol.

36. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 32, caracterizado por o componente covalentemente foto-reticulável ser covalentemente foto-reticulado pela exposição da mistura à radiação electromagnética na presença de um sistema iniciador

37. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 36, caracterizado por a radiação electromagnética ser luz ultravioleta.

38. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 36, caracterizado por a radiação electromagnética ser luz visível.

39. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 36, caracterizado por o sistema iniciador compreender um foto-iniciador e um co-catalisador eficaz para foto-reticular covalentemente o componente foto-reticulável covalentemente

40. PROCESSO PARA ENCAPSULAR UM PRODUTO BIOLÓGICO num material biocompatível reticulado, de harmonia com a reivindicação 32, caracterizado por o produto biológico ser célula(s) viva(s) seleccionada(s) das ilhotas de Langerhans, células secretoras de dopamina, células secretoras de eritropoietina, células secretoras do factor de crescimento dos nervos, hepatócitos, células secretoras de adrenalina/angiotensina, células da paratiroide ou células secretoras de norepinefrina/metacefalina.

LISBOA, 10 de SETEMBRO de 2001