

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Dezember 2004 (16.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/108810 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08J 9/26, A61L
27/56, 27/58, 27/50, 27/18

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/006140

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2004 (07.06.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 25 807.8 6. Juni 2003 (06.06.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): HUMANAUTOCELL GMBH [DE/DE];
Siegessstrasse 26, 80802 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GÖRNE, Martin
[DE/DE]; Am Stein 46, 22337 Hamburg (DE). KAUF-
MANN, Peter, Matthias [DE/DE]; Am Mühlenberg 14c,
30900 Wedemark (DE).

(74) Anwalt: REITSTÖTTER, KINZEBACH & PARTNER
(GBR); Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MATRIX, CELL IMPLANTATION AND METHOD FOR THEIR PRODUCTION AND USE

(54) Bezeichnung: MATRIX, ZELLIMPLANTAT, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to porous matrices based on a biologically compatible polymer or polymer mixture, to a cell implantation that is established on said matrices and to additional cell implantation based on cell mixtures of hepatocytes and islets of Langerhans. The invention also relates to a method for producing porous matrices, to matrices obtained according to said method and to a special method for obtaining cells for the inoculation of an implantable matrix.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft poröse Matrices auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers oder Polymergemisches, darauf aufbauende Zellimplantate, weitere Zellimplantate auf Basis von Zellgemischen aus Hepatozyten und Langerhans'schen Inselzellen, ein Verfahren zur Herstellung poröser Matrices sowie die nach diesem Verfahren erhältlichen Matrices, und ein spezielles Verfahren zur Gewinnung von Zellen für die Beimpfung einer implantierbaren Matrix.



WO 2004/108810 A1

Matrix, Zellimplantat, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung.

Die vorliegende Erfindung betrifft poröse Matrices auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers oder Polymergemisches, darauf aufbauende Zellimplantate, weitere Zellimplantate auf Basis von Zellgemischen aus Hepatozyten und Langerhans'schen Inselzellen, ein Verfahren zur Herstellung poröser Matrices sowie die nach diesem Verfahren erhältlichen Matrices, und ein spezielles Verfahren zur Gewinnung von Zellen für die Beimpfung einer implantierbaren Matrix.

Tissue engineering ist ein interdisziplinäres Gebiet, das Ingenieur- und Materialwissenschaften mit der Medizin verbindet. Ziel ist es, geschädigtes Gewebe wiederherzustellen oder seine Funktion zu verbessern.

Das Prinzip des Tissue engineering ist denkbar einfach: Zunächst werden dem Patienten einige Zellen entnommen und *in vitro* vermehrt. Die vermehrten Zellen können dann in eine Gerüstsubstanz eingebettet werden, wodurch ein kompletter, lebender Gewebeersatz entsteht, der dem Patienten wieder transplantiert wird. Im Gegensatz zur herkömmlichen, einen geeigneten Spender voraussetzenden und in der Regel eine lebenslängliche medikamentöse Immunsuppression erfordernden allogenen Transplantation bietet dieses Verfahren den entscheidenden Vorteil, körpereigene (autologe) Zellen verwenden zu können.

Von besonderer Bedeutung für die Annahme und Funktionsfähigkeit der Implantate sind Art und Aufbau der verwendeten Gerüstsubstanz, im folgenden auch Matrix genannt. Abgesehen von dem zu verwendenden Material, nämlich in der Regel biologisch abbaubaren Polymeren, spielen Porengröße, Porosität und Oberfläche genauso wie die Porengestalt, die Morphologie der Porenwand und die Konnektivität zwischen den Poren eine entscheidende Rolle für die weitere Entwicklung der in der Gerüstsubstanz eingebetteten Zellen und letztendlich für den dreidimensionalen Aufbau des zu regenerierenden Gewebes oder Organs.

Verfahren zur Erzeugung derartiger Biomatrices sind bereits bekannt. So wurden bereits Techniken aus dem Textilbereich angewendet, um webartige und auch vliesartige, faserige Biomatrices herzustellen. Ein weiteres geläufiges Verfahren, bei dem Salzkristalle zunächst in das biologisch abbaubare Polymer eingearbeitet und anschließend wieder herausgelöst werden, ermöglicht es, die Porengröße über die Größe der Salzpartikel und die Porosität über das Salz/Polymerverhältnis zu kontrollieren (WO 98/44027). Bei einer Abwandlung des Verfahrens werden die in

einem Lösungsmittel gelöst, biologisch abbaubaren Polymere auf ein sogenanntes porogenes Material aufgetragen, das anschließend aus dem Verbundmaterial wieder herausgelöst wird, wodurch Poren mit der Gestalt des negativen Abbildes besagten porogenen Materials hinterlassen werden (WO 01/87575 A2). Auch beschichtete Matrices sind bereits bekannt (siehe z.B. WO 99/09149 A1).

Nichtsdestotrotz stellen die bisher mit diesem Verfahren erzeugten Biomatrices insbesondere im Hinblick auf die Annahme und Funktionsfähigkeit darauf aufbauender Implantate nicht in allen Fällen zufrieden. Insbesondere mit Leber- und Pankreasimplantaten ist bisher noch kein annehmbarer Ersatz der Organe gelungen.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe, ein solches funktionsfähiges Implantat zur Verfügung zu stellen, löst die Erfindung durch bestimmte Biomatrices und entsprechende Implantate, die mit einem speziellen Verfahren erhältlich sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher die in den Patentansprüchen definierten Gegenstände.

Der Porositätsgrad ist die zahlenmäßige Angabe in % zum Anteil des Porenvolumens am Gesamtvolumen der Matrix.

Mit Poren bezeichnet man die in der erfindungsgemäßen Matrix vorhandenen Hohlräume, die im vorliegenden Fall im 2-dimensionalen Schnitt eine eckige, insbesondere oktagonale bzw. 3-dimensional gesehen eine kantige Gestalt haben. Vorzugsweise ist die Gestalt des weiteren durch Ausziehungen gekennzeichnet, so dass man die Gestalt der Hohlräume mit der Form von Nervenzellen vergleichen kann. Die Größe einer Pore kann mit Hilfe eines Durchmessers angegeben werden, das heißt dem Mittel aus dem längsten und dem kürzesten Durchmesser der im 2-dimensionalen Schnitt erkennbaren Poren.

Eine erfindungsgemäße Matrix weist Poren mit unterschiedlichen Größen auf, wobei die Größen über einen bestimmten Bereich verteilt sind (Porengrößenverteilung). Erfindungsgemäß von Bedeutung ist, dass eine Matrix eine breite Porengrößenverteilung aufweist. Diese sollte sich von Poren mit einer Größe im Bereich von etwa 150 µm bis zu Poren mit einer Größe im Bereich von etwa 300 µm erstrecken oder breiter sein. Demnach sollte eine erfindungsgemäße Matrix einem Aspekt zufolge Poren mit einer Größe von 150 µm oder weniger aufweisen. Matrices,

die Poren mit einer Größe von 140 µm oder weniger aufweisen, sind bevorzugt. Von besonderem Vorteil sind Matrices, die Poren mit einer Größe von 130 µm oder weniger aufweisen. Einem weiteren Aspekt zufolge sollte eine erfindungsgemäße Matrix Poren mit einer Größe von 300 µm oder mehr aufweisen. Matrices, die Poren mit einer Größe von 350 µm oder mehr aufweisen, sind bevorzugt. Von besonderem Vorteil sind Matrices, die Poren mit einer Größe von 370 µm oder mehr aufweisen. Matrices, die sowohl Poren mit einer Größe 150, 140 oder 130 µm oder weniger als auch Poren mit einer Größe von 300, 350, 370 µm oder mehr aufweisen, gehören zur Erfindung. Diese Werte lassen sich beliebig zu Mindestbereichen, über die sich die Porengrößenverteilung erstrecken soll, kombinieren, wobei insbesondere die Bereich 150 bis 300, 140 bis 350 und 130 bis 370 µm zu nennen sind. Insbesondere bevorzugt ist es, wenn die jeweilige Porengrößenverteilung Häufigkeitsmaxima außerhalb des Bereichs von 150 bis 300 µm aufweist, d.h. ein Häufigkeitsmaximum oberhalb einer Porengröße von 300 µm und ein weiteres Häufigkeitsmaximum unterhalb einer Porengröße von 150 µm liegt.

Eine typische erfindungsgemäße Matrix weist folgende Porengrößenverteilung auf. Etwa 0,5 % bis 6 %, vorzugsweise etwa 1 % bis 5 %, noch bevorzugter etwa 2 % bis 4 % und insbesondere etwa 3 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 70 bis 100 µm; etwa 2 % bis 8 %, vorzugsweise etwa 3 % bis 7 %, noch bevorzugter etwa 4 % bis 6 % und insbesondere etwa 5 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 101 bis 115 µm; etwa 2 % bis 8 %, vorzugsweise etwa 3 % bis 7 %, noch bevorzugter etwa 4 % bis 6 % und insbesondere etwa 5 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 116 bis 130 µm; etwa 1 % bis 7 %, vorzugsweise etwa 2 % bis 6 %, noch bevorzugter etwa 3 % bis 5 % und insbesondere etwa 4 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 131 bis 300 µm; etwa 11 % bis 23 %, vorzugsweise etwa 13 % bis 21 %, noch bevorzugter etwa 15 % bis 19 % und insbesondere etwa 17 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 301 bis 330 µm; etwa 4 % bis 10 %, vorzugsweise etwa 5 % bis 9 %, noch bevorzugter etwa 6 % bis 8 % und insbesondere etwa 7 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 331 bis 360 µm; etwa 5 % bis 17 %, vorzugsweise etwa 7 % bis 15 %, noch bevorzugter etwa 9 % bis 13 % und insbesondere etwa 11 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 361 bis 390 µm; etwa 7 % bis 19 %, vorzugsweise etwa 9 % bis 17 %, noch bevorzugter etwa 11 % bis 15 % und insbesondere etwa 13 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 391 bis 420 µm; etwa 3 % bis 9 %, vorzugsweise etwa 4 % bis 8 %, noch bevorzugter etwa 5 % bis 7 % und insbesondere etwa 6 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 421

bis 450 μm ; etwa 12 % bis 24 %, vorzugsweise etwa 14 % bis 22 %, noch bevorzugter etwa 16 % bis 20 % und insbesondere etwa 18 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 451 bis 480 μm ; und etwa 5 % bis 17 %, vorzugsweise etwa 7 % bis 15 %, noch bevorzugter etwa 9 % bis 13 % und insbesondere etwa 11 % Poren mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 481 bis 510 μm . Es ergibt sich also in der Regel eine Porengrößenverteilung mit mehr als einem Maximum, was einer Häufung von Poren in mehr als einem Größenbereich entspricht. Dies ist für die Eigenschaften erfindungsgemäßer Matrices von besonderer Bedeutung.

Das Hohlraumvolumen und damit der Porositätsgrad sind in an sich bekannter Weise durch Porosimetrie zu bestimmen.

Die Porengrößen und damit auch die Porengrößenverteilung können beispielsweise durch Rasterelektronenmikroskopie bestimmt werden. Dazu werden dünne Schnitte der zu untersuchenden Matrix angefertigt und mit Gold überzogen. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen werden ausgewertet, indem man sämtliche Poren einer definierten Fläche ausmisst, d.h. für jede Pore den längsten und den kürzesten Durchmesser bestimmt, aus beiden Werten die Summe bildet und die Summe durch 2 dividiert.

Der Begriff "Matrix" bezieht sich auf einen dreidimensionalen Träger, der für die Ansiedlung von Zellen geeignet ist. In diesem Sinne dient die Matrix als dreidimensionale Strukturvorlage (Templat) für die Ansiedlung von Zellen bzw. Geweben. Diese Ansiedlung kann *in vitro* oder *in vivo* erfolgen. Ferner dient die Matrix bei Transplantationen zur Lokalisierung des Transplantats und auch als Platzhalter für Gewebe, das sich nach und nach *in vivo* bildet.

Das Polymer kann im Prinzip jedes im Bereich der Medizin und insbesondere der Transplantationsmedizin verwendbare Polymer sein. Biologisch verträglich sind demnach auch Polymere, die von einem Wirt zwar als fremd erkannt werden, deren Abstoßung sich aber durch entsprechende Immunsuppression unterdrücken lässt. Es können Polymere zum Einsatz kommen, die im Wesentlichen biologisch nicht abbaubar sind. Bevorzugt sind allerdings Polymere, die zumindest zum überwiegenden Teil biologisch abbaubar sind.

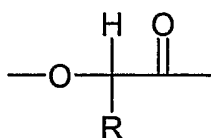
Der Ausdruck "biologisch abbaubar" bezieht sich auf ein Material, das Lebewesen (oder von Lebewesen ableitbare Körperflüssigkeiten oder Zellkulturen) in

verstoffwechselbare Produkte zu überführen vermögen. Zu biologisch abbaubaren Polymeren gehören beispielsweise bioresorbierbare und/oder bioerodierbare Polymere. Bioerodierbar bezeichnet die Fähigkeit, in biologischen Flüssigkeiten lösbar oder suspendierbar zu sein. Bioresorbierbar meint die Fähigkeit, von Zellen, Gewebe oder Flüssigkeiten eines Lebewesens aufgenommen werden zu können.

Zur erfindungsgemäß geeigneten biologisch abbaubaren Polymeren gehören im Prinzip sämtliche im Bereich der Medizin verwendbaren Polymere, wozu neben den im Bereich des Tissue engineering bereits etablierten Polymeren beispielsweise auch Polymere gehören, die in Wirkstoffabgabevorrichtungen, wie Pflastern und Wirkstoffimplantaten, Eingang gefunden haben.

Zu geeigneten natürlichen Polymeren gehören beispielsweise Polypeptide wie Albumin, Fibrinogen, Collagen und Gelatine, sowie Polysaccharide, wie Chitin, Chitosan, Alginat und Agarose. Unter Umständen können diese natürlichen Polymere auch modifiziert sein, beispielsweise können Proteine wie Collagen quervernetzt sein.

Zu geeigneten synthetischen Polymeren gehören beispielsweise bestimmte Polyanhydride, insbesondere Poly(sebacinsäure-hexadecandisäure), Poly(ϵ -caprolacton), Poly(orthoester), und vor allem Poly(α -hydroxyester) wie Poly(glykolsäure), Poly(milchsäure) und Poly(glykolsäuremilchsäure). So basieren die erfindungsgemäßen Matrices und Implantate vorzugsweise auf biologisch abbaubaren Polymeren, die Wiederholungseinheiten der Formel (I) enthalten:



worin R¹ für Wasserstoff oder Methyl steht. Was die Milchsäureeinheiten angeht, so wird die L-Form (das S-Enantiomer) bevorzugt. Als besonders bevorzugtes Polymer ist Poly(glykolsäuremilchsäure) mit einem Glykolsäure zu Milchsäure-Verhältnis von 99:1 bis 1:99, vorzugsweise 10:90 bis 90:10, beispielsweise 15:85 mol-% zu nennen.

Gemische aus zwei oder mehreren Polymeren können ebenfalls zweckmäßig sein.

Neben der Art des Polymers bestimmt auch sein Molekulargewicht die Eigenschaften der resultierenden Matrix mit. Allgemein gilt, dass die Porosität der Matrix mit

zunehmendem Molekulargewicht des verwendeten Polymers abnimmt. Dies gilt insbesondere dann, wenn bei der Herstellung der Matrix das Material geschäumt wird, d.h. unter Druck mit einem Gas wie CO₂ versetzt wird, das sich zunächst in dem Polymer löst und bei Absenkung des Drucks Poren bildet.

Ferner wirkt sich die Kristallinität des eingesetzten Polymers auf die Eigenschaften der resultierenden Matrix aus. Hier gilt, dass die Porosität der resultierenden Matrix mit abnehmender Kristallinität im allgemeinen zunimmt, weshalb amorphes Polymer insbesondere für Matrices mit hoher Porosität bevorzugt ist. Auch dieser Aspekt spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn das Material bei der Herstellung der Matrix geschäumt wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind poröse Matrices auf Basis eines biologisch abbaubaren Polymers, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Oberfläche der Matrix mit wenigstens einem extrazellulären Matrixprotein beschichtet ist.

Extrazelluläre Matrixproteine sind allgemein bekannt. Erfindungsgemäß bevorzugt sind Collagene, insbesondere Collagene des Typs I und IV, Laminin und Fibronectin. Diese Proteine können in an sich bekannter Weise in aufgereinigter Form hergestellt oder auch kommerziell erworben werden. Gemäß einer Ausführungsform enthalten Beschichtungen erfindungsgemäßer Matrices als extrazelluläres Matrixprotein Fibronectin. Gemäß einer weiteren Ausführungsform enthalten Beschichtungen erfindungsgemäßer Matrices als extrazelluläres Matrixprotein ein Gemisch aus Collagen vom Typ I, Laminin und Collagen vom Typ IV, wobei es in diesem Fall bevorzugt ist, dass das Gemisch die Proteine in etwa gleichen Gewichtsanteilen enthält.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind Matrices, die in der oben beschriebenen Art und Weise beschichtet sind und die wenigstens eines der folgenden zusätzlichen Kriterien erfüllen:

- Die Poren der Matrices weisen die oben angegebenen Porengrößen bzw. Porengrößenverteilung auf;
- der Porositätsgrad beträgt 93 bis 98 %;
- die Poren weisen die oben angegebene Gestalt auf;
- das biologisch abbaubare Polymer ist eines der oben angegebenen natürlichen oder synthetischen Polymere, insbesondere Poly(glycolsäure-

milchsäure) mit einem Milchsäureanteil von etwa 85 mol-% und einem Glykolsäureanteil von etwa 15 mol-%.

Derart beschichtete Matrices sind beispielsweise dadurch erhältlich, dass man die unbeschichtete Matrix in eine Lösung taucht, die das für die Beschichtung vorgesehene Protein oder Proteingemisch enthält, und anschließend die mit der Lösung befeuchtete Matrix trocknet. Dabei ist es in der Regel so, dass in Abhängigkeit von den Abmessungen des zu beschichtenden Matrixkörpers die Lösung vor allem die äußeren Bereiche des Matrixkörpers benetzt, während in das Innere des Matrixkörpers vergleichsweise weniger Lösung vordringt. Dies kann zur Folge haben, dass eine gleichmäßige Beschichtung der gesamten Matrixoberfläche nicht resultiert, sondern die Beschichtungsdichte von außen nach innen abnimmt.

Alternativ oder zusätzlich zu einer Beschichtung können biologisch aktive Substanzen im Polymer aufgenommen oder sogar damit verknüpft sein. Hierzu gehören beispielsweise synthetische Wirkstoffe (anorganische oder organische Moleküle), Proteine, Polysaccharide und weitere Zucker, Lipide und Nukleinsäuren, welche z.B. das Zellwachstum, die Zellmigration, die Zellteilung, die Zelldifferenzierung und/oder das Gewebewachstum beeinflussen, bzw. therapeutische, prophylaktische oder diagnostische Wirkungen besitzen. Zu nennen sind beispielsweise gefäßaktive Wirkstoffe, neuroaktive Wirkstoffe, Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Steroide, Antikoagulanzen, entzündungshemmende Wirkstoffe, immunmodulierende Wirkstoffe, zytotoxische Wirkstoffe, Antibiotika und antivirale Wirkstoffe.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer porösen Matrix auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers oder Polymergemisches, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Gemisch aus Polymerpartikeln und Kochsalzpartikeln mit definierter Korngröße kompaktiert und anschließend das Kochsalz herauslöst.

Polymerpartikel mit einer Korngröße im Bereich von etwa 20 bis 950 μm , vorteilhafterweise im Bereich von etwa 20 bis 760 μm und insbesondere im Bereich von etwa 108 bis 250 μm und Kochsalzpartikel mit einer Korngröße im Bereich von etwa 90 bis 670 μm , vorteilhafterweise im Bereich von etwa 110 bis 520 μm und insbesondere im Bereich von etwa 250 bis 425 μm haben sich zur Einstellung der gewünschten Porengrößen bzw. Porengrößenverteilung als zweckmäßig erwiesen. Ferner hat sich ein Gewichtsverhältnis von Polymerpartikeln zu Kochsalzpartikeln im

Bereich von 1:100 bis 1:10, vorteilhafterweise im Bereich von 1:50 bis 1:15 und insbesondere im Bereich von etwa 1:20 bis 1:18 zur Einstellung der gewünschten Porosität als zweckmäßig erwiesen.

Es hat sich weiterhin als zweckmäßig erwiesen, Salz und Polymer mit einer bestimmten Korngrößenverteilung zu verwenden. Was das zur Herstellung der Matrix verwendete Kochsalz angeht, so ist es günstig, wenn der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 250 µm bis 320 µm etwa 15 % bis 50 %, vorteilhafterweise etwa 18 % bis 42 % und bevorzugterweise etwa 22 % bis 28 %; der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 330 µm bis 380 µm etwa 20 % bis 65 %, vorteilhafterweise etwa 30 % bis 52 % und bevorzugterweise etwa 42 % bis 46 %; und der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 390 µm bis 425 µm etwa 15 % bis 62 %, vorteilhafterweise etwa 25 % bis 42 %, und bevorzugterweise etwa 29 % bis 33 % beträgt, wobei sich die Prozentangaben auf das zur Herstellung insgesamt verwendete Gewicht an Salz beziehen. Anteile mit Korngrößen ober- und/oder unterhalb der angegebenen Bereiche sind damit nicht ausgeschlossen.

Einer speziellen Ausführungsform zufolge hat es sich als günstig erwiesen, wenn der Anteil an Kochsalzpartikeln mit einer Korngröße von 108 µm bis 140 µm 1 bis 15 Gew.-%, vorzugsweise 4 bis 12 Gew.-% und insbesondere 7 bis 9 Gew.-%, der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 145 µm bis 180 µm 1 bis 11 Gew.-%, vorzugsweise 3 bis 9 Gew.-% und insbesondere 5 bis 7 Gew.-%, der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 185 µm bis 220 µm 3 bis 21 Gew.-%, vorzugsweise 7 bis 17 Gew.-% und insbesondere 10 bis 14 Gew.-%, der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 225 µm bis 250 µm 1 bis 11 Gew.-%, vorzugsweise 3 bis 9 Gew.-% und insbesondere 5 bis 7 Gew.-%, der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 250 µm bis 320 µm 15 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 18 bis 42 Gew.-% und insbesondere 22 bis 28 Gew.-%, der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 330 µm bis 380 µm 15 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 18 bis 42 Gew.-% und insbesondere 22 bis 28 Gew.-%, und der Anteil an Salz mit einer Korngröße von 390 µm bis 425 µm 5 bis 29 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 24 Gew.-% und insbesondere 15 bis 19 Gew.-% beträgt.

Was das zur Herstellung der Matrix verwendete Polymer angeht, so ist es günstig, wenn der Anteil an Polymer mit einer Korngröße von 108 µm bis 140 µm etwa 5 % bis 50 %, vorteilhafterweise etwa 10 % bis 30 % und bevorzugterweise etwa 14 % bis 18 %; der Anteil an Polymer mit einer Korngröße von 145 µm bis 180 µm etwa 10 % bis 55 %, vorteilhafterweise etwa 15 % bis 40 % und bevorzugterweise etwa 20 % bis 24; der Anteil an Polymer mit einer Korngröße von 185 µm bis 220 µm etwa 18 %

bis 88 %, vorteilhafterweise etwa 32 % bis 76 % und bevorzugterweise etwa 43 % bis 49 %, und der Anteil an Polymer mit einer Korngröße von 225 µm bis 250 µm etwa 5 % bis 45 %, vorteilhafterweise etwa 10 % bis 28 % und bevorzugterweise etwa 14 % bis 18 % beträgt, wobei sich die Prozentangaben auf das zur Herstellung insgesamt verwendete Gewicht an Polymer beziehen.

Um Salz- bzw. Polymerpartikel der gewünschten Korngrößenverteilung zu erhalten, ist es in der Regel zweckmäßig, handelsübliche Ware zunächst zu zerkleinern. Dies kann in dafür gebräuchlichen Vorrichtungen, z.B. Schlagwerken oder Mühlen, erfolgen. Bestimmend für die gewünschte Korngrößenverteilung ist allerdings das anschließende Aussieben mit Hilfe gebräuchlicher Analysesiebe.

Das Kompaktieren erfolgt vorzugsweise durch Einwirkung von Druck. Dazu kann man das Polymer/Kochsalz-Gemisch in einer herkömmlichen Hydraulikpresse bei einem Stempeldruck im Bereich von etwa 780 psi bis 1450 psi, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 840 psi bis 1230 psi und insbesondere im Bereich von etwa 900 psi bis 1100 psi verpressen. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, den Druck etwa 10 s bis 360 s, vorteilhafterweise etwa 40 s bis 180 s und insbesondere etwa 50 s bis 70 s bei Temperaturen im Bereich von 18 °C bis 25 °C einwirken zu lassen.

Das Herauslösen des Kochsalzes gelingt beispielsweise mit Wasser oder wässrigen Lösungen. So kann man das kompaktierte Gemisch (Matrixrohling) etwa 1 h bis 80 h, vorteilhafterweise etwa 12 h bis 62 h und insbesondere etwa 36 h bis 60 h wässern.

Zudem ist es von Vorteil, wenn das kompaktierte Gemisch vor dem Herauslösen des Kochsalzes zunächst in einer CO₂-Atmosphäre gelagert wird. So kann man das kompaktierte Gemisch beispielsweise bei einem CO₂-Druck im Bereich von etwa 140 psi bis 1650 psi, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 360 psi bis 1120 psi und insbesondere im Bereich von etwa 800 psi bis 900 psi begasen, wobei sich hierbei Zeiten im Bereich von etwa 1 h bis 180 h, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 3 h bis 60 h und insbesondere im Bereich von etwa 12 h bis 36 h als zweckmäßig erwiesen haben. Danach verringert man den Druck, wobei die Druckabsenkungsgeschwindigkeit Einfluss auf die Porenbildung hat. Wenngleich die Verwendung von CO₂ bevorzugt ist, können andere Gase, wie Luft, Stickstoff, Helium, Neon, Krypton, Argon, Xenon oder Sauerstoff ebenfalls geeignet sein.

Anschließend wird das Wasser oder die wässrige Lösung zwecks Trocknung in an sich bekannter Weise entfernt. Dazu kann man die Matrix beispielsweise auf Saugpapier legen.

Einer bevorzugten Ausführungsform zufolge setzt man dem Gemisch aus Polymerpartikeln und Kochsalzpartikeln eine Polymerlösung zu und entfernt das Lösungsmittel, bevor man kompaktiert. Dabei können Polymerpartikel und Polymerlösung auf dem gleichen Polymer basieren. Es kann sich aber auch um unterschiedliche Polymere, insbesondere mit unterschiedlicher biologischer Abbaubarkeit handeln. Der von Polymerlösung hat den Vorteil, dass quasi Stützpfiler in die Matrix eingezogen werden, wodurch sich die mechanischen Eigenschaften der Matrix verbessern lassen. Eine solche Matrix weist insbesondere eine geringere Neigung auf zu zerkrümeln.

Das verwendete Lösungsmittel sollte das Polymer, nicht aber das Salz lösen. Dadurch ist gewährleistet, dass die porogenen Eigenschaften des Salzes nicht oder nur unwesentlich beeinflusst werden. Aceton, Ethylacetat, Methylenchlorid, Chloroform, Hexafluorisopropanol, chlorierte und fluorierte, aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Tetrahydrofuran, Ethylmethylketon, Diethylketon sowie Gemische davon eignen sind beispielsweise zum Lösen der vorstehend genannten Polymere. Zum Lösen von Poly(glykolsäure), Poly(milchsäure) oder Poly(glykolsäuremilchsäure) und mit Blick auf die medizinische Verwendung eignet sich insbesondere Chloroform.

Gibt man die Polymerlösung und das Polymerpartikel/Salzpartikel-Gemisch zusammen, entsteht zunächst eine rührbarer Brei, der dann unter Entfernung des Lösungsmittel rasch fest wird. Konzentration des Polymers in der Lösung sind zweckmäßigerweise so zu wählen, dass einerseits das Polymer vollständig gelöst ist, andererseits das Lösungsmittel rasch entfernt werden kann ohne die Polymerpartikel in nennenswertem Umfang anzulösen.

Als günstig hat sich ein Gewichtsverhältnis von Polymerpartikeln zu gelöstem Polymer 10:1 bis 1:100, vorteilhafterweise 2:1 bis 1:25 und insbesondere 1:1 bis 1:10 erwiesen.

Was das Gewichtsverhältnis von Polymerpartikeln zu Kochsalzpartikeln angeht, so kann im Rahmen dieser Ausführungsform ein zugunsten von Kochsalz höheres Gewichtsverhältnis von bis zu 1:200, 1:500 oder 1:1000 gewählt werden, wobei das

Gewichtsverhältnis von Gesamtpolymer zu Kochsalz nach wie größer als 1:100 ist. Auf diese Art und Weise gelingt es, Porositäten oberhalb von 98 % einzustellen.

Bei dem vorstehend beschriebenen Verfahren dient das Kochsalz als porogenes Material, womit definitionsgemäß ein festes oder zumindest halbfestes Material gemeint ist, das mit dem matrixbildenden Polymer zunächst zu einem Gemisch vereinigt und dann aus dem Gemisch wieder entfernt wird, wodurch Hohlräume (Poren) entstehen. Dazu ist es zweckmäßig, dass das porogene Material in wenigstens einem Lösungsmittel löslich und in wenigstens einem weiteren Lösungsmittel im Wesentlichen unlöslich ist. Im Wesentlichen unlöslich ist ein Material insbesondere dann, wenn es unter den Verarbeitungsbedingungen, d.h. in der Regel bei Temperaturen im Bereich von 18 °C bis 25 °C und unter Normaldruck, zu weniger als 30 Gew.-%, vorzugsweise zu weniger als 20 Gew.-%, insbesondere zu weniger als 10 Gew.-%, beispielsweise zu weniger als 5, 4, 3, 2 und 1 Gew.-% löslich ist.

Struktur und Eigenschaften der resultierenden Matrices werden wesentlich durch das zu ihrer Herstellung verwendete porogene Material bestimmt. Dabei spielen nicht nur die Art des porogenen Materials, sondern vor allem die Korngrößenverteilung der porogenen Partikel eine Rolle. So gilt im Allgemeinen, dass mit zunehmender Korngröße nicht nur die Porengröße, sondern auch die Konnektivität, d.h. das Netzwerk miteinander kommunizierender Hohlräume, zunimmt. Dieses Netzwerk, auch Makrostruktur oder makroporöse Struktur genannt, ist zu unterscheiden von den durch Schäumen erhältlichen Poren, die in der Regel geschlossen sind und daher eine als Mikrostruktur oder mikroporös bezeichnete Struktur ausbilden.

Verfahren zur Herstellung einer porösen Matrix auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers oder Polymergemisches, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Gemisch aus Polymerpartikeln, Partikeln eines porogenen Materials und einer Polymerlösung kompaktiert und anschließend das porogene Material herauslöst.

Diese Verfahren ist grundsätzlich nicht auf die zuvor beschriebenen Merkmale beschränkt. So kann das Polymer ausgewählt sein unter Polyanhydriden, Poly(orthoestern), Poly(α -hydroxyestern), Poly(esteramiden), Polyamiden, Poly(esterethern), Polycarbonaten, Polyalkylenen, Polyalkylenglykolen, Polyalkylenoxiden, Polyalkylenterephthalaten, Polyvinylalkoholen, Polyvinylethern, Polyvinylestern, Polyvinylhalogeniden, Polyvinylpyrrolidonen, Polysiloxanen, Polystyrolen, Polyurethanen, derivatisierten Cellulosen, (Meth)acrylsäurepolymeren

und -copolymeren. Das porogene Material ist vorzugsweise ausgewählt unter wasserlöslichen Salzen, z.B. Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumfluorid, Kaliumfluorid, Natriumiodid, Kaliumiodid, Natriumnitrat, Natriumsulfat Natriumcitrat, Natriumtartrat, Zuckern (z.B. Saccharose, Fructose, Glucose) und Gemischen davon, es kann sich aber auch um wachsartige Substanzen, wie Paraffine, Bienenwachs und ähnliches handeln. Polymer, porogenes Material und das zur Bildung der Lösung verwendete Lösungsmittel sind grundsätzlich so aufeinander abzustimmen, dass die Lösung Polymer in gelöster und Polymerpartikel in fester Form enthält sowie das porogene Material im wesentlichen nicht löst.

Die mit den vorstehend beschriebenen Verfahren erhältlichen Matrices sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Implantate, die wenigstens eine der vorstehend beschriebenen Matrices und wenigstens eine Zelle umfassen. Je nach Zweck des Implantats können die Zellen dabei insbesondere ausgewählt sein unter Leberzellen, Pankreaszellen, Fettzellen, Darmzellen, Hautzellen, Gefäßzellen, Nervenzellen, Muskelzellen, Schilddrüsenzellen und Zahnwurzelzellen. Besondere Ausführungsformen erfindungsgemäßer Implantate betreffen Leberzellen und Pankreaszellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Implantate, die wenigstens eine Matrix auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers und Zellen wenigstens zweier Zelltypen umfassen, wobei die Zellen des ersten Zelltyps Hepatozyten und die Zellen des zweiten Zelltyps Langerhans'sche Inselzellen sind. Dieser Gegenstand ist nicht auf die vorstehend beschriebenen Matrices, d.h. Implantate auf Basis der erfindungsgemäßen Matrices, beschränkt.

Je nach Zweck des Implantats, d.h. insbesondere der zu erfüllenden Funktion, sind bestimmte Verhältnisse von Hepatozyten zu Langerhans'schen Inselzellen von Vorteil. So betrifft eine Ausführungsform der Erfindung Implantate, die nach Implantation die endokrinen Eigenschaften eines äquivalenten Pankreasorgans zeigen. Hierfür hat sich ein Verhältnis von Hepatozyten zu Langerhans'schen Inselzellen von etwa 10^6 : 3000 als vorteilhaft erwiesen. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Implantate, die nach Implantation Stoffwechselfunktionen einer Leber vollziehen. Hierfür hat sich ein Verhältnis von Hepatozyten zu Langerhans'schen Inselzellen von etwa 10^6 : 3–200,

vorteilhafterweise von 10^6 : 10–100, insbesondere von 10^6 : 20–80 und besonders bevorzugt von etwa 10^6 : 35–45 als zweckmäßig erwiesen.

Es sei angemerkt, dass derartige Implantate in der Regel neben Hepatozyten und Langerhans'schen Inselzellen weitere Zellen beinhalten, nämlich insbesondere weitere Leber- und Pankreaszellen, die bei der Zellisolation mit anfallen.

Die zur Besiedlung erfindungsgemäßer Matrices zu verwendenden Zellen oder Zellgemische können in an sich bekannter Weise gewonnen werden. Im Sinne eines autologen Implantats stammen die Zellen vorzugsweise aus dem Individuum, dem das Implantat eingesetzt werden soll. So wird dem Individuum in der Regel geeignetes Gewebe, beispielsweise ein Stück Leber oder Pankreas, entnommen und in geeigneter Weise für die Beimpfung und *in vitro*-Kultur der Matrix vorbereitet. Hierbei ist es von Bedeutung, dass die Zellen eine möglichst hohe Vitalitätsrate aufweisen.

Gewinnt man Leberzellen aus Lebergewebe, ist zu beachten, dass die Leberzellen insbesondere im Falle einer Leberzirrhose von einer starken Bindegewebsschicht umgeben sind. Um die Leberzellen mit einem möglichst hohen Anteil vitaler Zellen isolieren zu können, werden erfindungsgemäß Lösungen bestimmter Zusammensetzung verwendet.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher eine NaCl, KCl und HEPES enthaltende, wässrige Zusammensetzung A mit einem pH-Wert von etwa 7,4 sowie deren Verwendung zum Perfundieren eines Leber- oder Pankreasstücks. Insbesondere enthalten 1000 ml dieser Lösung etwa 8,3 g NaCl, 0,5 g KCl und 2,38 g HEPES. Das Perfundieren erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur von etwa 37 °C und einer Flussrate von etwa 30 ml/min. Wenige Minuten, insbesondere etwa 5 bis 120 Minuten, beispielsweise etwa 7 Minuten, reichen aus, um bei der vorstehend genannten Flussrate das Gewebestück ausreichend zu perfundieren.

Alternativ dazu kann man auch eine Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) enthaltende, wässrige Zusammensetzung A' zum Perfundieren eines Leber- oder Pankreasstücks verwenden.

Die vorliegende Erfindung betrifft des weiteren eine wässrige Zusammensetzung B mit einem pH-Wert von etwa 7,3 bis 7,4, vorzugsweise etwa 7,35, welche NaCl, KCl, HEPES, CaCl₂, Collagenase und Trypsininhibitor enthält, sowie deren Verwendung

zum Perfundieren eines Leber- oder Pankreasstücks. Vorzugweise enthalten 1000 ml der Lösung 8,3 g NaCl, 0,5 g KCl, 2,38 g HEPES, 0,7 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 500 mg Collagenase H und 7,5 mg Trypsininhibitor. Auch in diesem Fall hat sich das Perfundieren bei etwa 37 °C und einer Flussrate von etwa 30 ml/min als zweckmäßig erwiesen. Wenige Minuten, insbesondere etwa 5 bis 10 Minuten, beispielsweise etwa 6 bis 7 Minuten, reichen aus, um das Gewebestück hinreichend zu perfundieren.

Alternativ dazu kann man auch eine wässrige Zusammensetzung B' zum Perfundieren eines Leber- oder Pankreasstücks verwenden, welche Kollagenase und Hyaluronidase enthält. Vorzugsweise enthalten 1000 ml der Lösung 5 bis 10 U/ml Kollagenase und 5 bis 10 U/ml Hyaluronidase.

Es ist für die Vitalität der zu gewinnenden Zellen von Vorteil, wenn das Gewebestück zunächst mit Zusammensetzung A und anschließend mit Zusammensetzung B behandelt wird. Alternativ dazu kann zunächst eine Zusammensetzung A' und dann eine Zusammensetzung B' verwendet werden.

Im Anschluss an die Perfusion kann das Gewebestück dann frei präpariert werden und in einem geeigneten Medium, beispielsweise Williams-Medium E, vorsichtig aufgeschüttelt werden. Enthält die resultierende Zellsuspension noch gröbere Zelltrümmer, können diese in an sich bekannter Weise entfernt werden, beispielsweise indem man die Zellsuspension über ein Nylonnetz (200 µm) filtriert. Die Zellen des Filtrats können dann vorsichtig pelletiert werden, wobei sich eine dreiminütige Zentrifugation bei 50 g und 4 °C als vorteilhaft erwiesen hat.

Die Auftragung der gewonnenen Zellen auf die Matrices erfolgt in an sich bekannter Weise. In der Regel werden die Zellen als zellhaltige Lösung auf die Matrix aufgetragen und anschließend – üblicherweise unter Zellkulturbedingungen - inkubiert, bis Zellen an der Matrix anhaften. Werden mehr als ein Zelltyp, beispielsweise Hepatocyten und Langerhans'sche Inselzellen, auf eine Matrix aufgetragen, können die verschiedenen Zelltypen im Prinzip gemeinsam oder aber nacheinander aufgetragen werden. Einer besonderen Ausführungsform zufolge trägt man zunächst Langerhans'schen Inselzellen und anschließend Hepatocyten auf, wobei man nach dem Auftragen jeweils inkubiert, bis zumindest ein Teil der Zellen an der Matrix anhaftet.

Erfindungsgemäße Matrices und Implantate weisen entscheidende Vorteile auf. So ermöglichen die inneren Dimensionen der Matrices eine effiziente Besiedlung mit

Zellen. Die Matrices sind einerseits frei verformbar und bieten andererseits ausreichend Stabilität und Rigidität, um die chirurgische Implantationsprozedur zu überstehen und den am Implantationsort einwirkenden mechanischen Kräften zu widerstehen. Der nach der Implantation einsetzende, initiale Zelluntergang ist begrenzt und implantiertes Gewebe kann nach kurzer Zeit die beabsichtigte Funktion aufnehmen. Kurz nach der Implantation kommt es zur Gefäßeingrossung bzw. zur Einsprossung von gefäßreichem Granulationsgewebe und auch von Nervengewebe. Die erfindungsgemäßen Matrices können hergestellt werden, ohne physiologisch bedenkliche Lösungsmittel, beispielsweise Formaldehyd, verwenden zu müssen, so dass kein spezielles Verfahren zur Elimination der Lösungsmittel erforderlich ist und die Gefahr verbleibender Restmengen dieser Lösungsmittel nicht besteht.

Erfindungsgemäße Matrices und Implantate weisen vielfältige Verwendungsmöglichkeiten auf. Hiervon sind insbesondere Verwendungen im medizinischen Bereich zu nennen. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher die erfindungsgemäßen Matrices und Implantate zur therapeutischen Verwendung.

Eine besondere Verwendung in diesem Bereich ist die des Aufbaus von Gewebe (Tissue Engineering). Dabei dienen die erfindungsgemäßen Matrices quasi als Gerüst (Scaffold), in das Zellen einwandern und/oder sich anheften.

Dazu kann man die Matrices beispielsweise in vitro mit den gewünschten Zellen beimpfen, z.B. mit einer zellhaltigen Lösung versetzen und inkubieren, bis Zellen sich an die Matrix angeheftet haben. Eine solche Matrix mit daran anhaftenden Zellen (hier mit Implantat bezeichnet) kann dann weiteren Verfahrensmaßnahmen, beispielsweise weiterer Kultivierung, gegebenenfalls unter Einwirkung von Wirkstoffen, z.B. zur weiteren Expansion der Zellen oder zur Modulierung ihrer Eigenschaften, unterzogen werden, und/oder bis zur Implantation in geeigneter Weise, beispielsweise auf Eis oder in einem Bioflussreaktor unter Standardbedingungen, aufbewahrt werden. Im Rahmen dieser Verwendung ist es von Vorteil, die zur Implantation bestimmten Zellen zunächst in vitro isolieren und gegebenenfalls auch expandieren zu können. Insbesondere wird dadurch das Aufbringen verschiedener Zelltypen, wie die oben beschriebenen Hepatozyten zusammen mit Langerhans'schen Inselzellen, auf eine Matrix ermöglicht.

Anstelle einer in vitro Beimpfung besteht eine weitere Möglichkeit darin, die Matrix (ohne vorherige Zellanheftung) zu implantieren mit dem Ziel, zur

Geweberegenerierung befähigte Vorläuferzellen zu veranlassen, in ein geschädigtes Gewebe einzuwandern und dort verloren gegangenes Gewebe zu regenerieren. Die Matrix muss dazu so gestaltet sein, dass erwünschte Zellen, nicht aber unerwünschte Zellen, in die Matrix einwandern können. Eine derartige Verwendung wird im Allgemeinen als geführte Geweberegenerierung (GTR für „Guided Tissue Regeneration“) bezeichnet.

Eine erfindungsgemäße Matrix oder ein erfindungsgemäßes Implantat kann daher zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers dienen. Dazu werden eine oder mehrere Matrices bzw. ein oder mehrere Implantate dem zu behandelnden Körper im Wege eines chirurgischen Eingriffs eingesetzt. Beinhaltet das Implantat Zellen mit Organfunktion bzw. sollen in die Matrix Zellen mit Organfunktion einwandern, wie es beispielsweise bei Hepatozyten oder Langerhans'schen Inselzellen der Fall ist, können die Matrices oder Implantate beispielsweise in das Mesenterium, subkutane Gewebe, Retroperitoneum, den properitonealen Raum oder den intramuskulären Raum des zu behandelnden Individuums implantiert werden.

Mit den erfindungsgemäßen Matrices bzw. Implantaten können im Prinzip sämtliche Individuen behandelt werden, die einen entsprechenden Gewebeersatz benötigen. Dies sind in der Regel Individuen, die an einer bestimmten Störung oder Erkrankung leiden, in deren Verlauf es zum Verlust von funktionsfähigem Gewebe kommt. Dies kann unter Umständen ganze Organe, beispielsweise die Leber oder das Pankreas betreffen. So richtet sich die vorliegende Erfindung insbesondere auf die Behandlung von Erkrankungen, die zu chronischem Leber- oder Pankreasversagen führen. Hierzu gehören beispielsweise chronische Hepatitis und biliäre Zirrhose bei Erwachsenen sowie biliäre Atresie und angeborene metabolische Defekte bei Kindern. Auch bei Leberkarzinomen kann eine Lebertransplantation angezeigt sein. Eine Pankreastransplantation hingegen ist insbesondere angezeigt bei allen Formen eines Diabetes mellitus, insbesondere einem vom Typ I oder II.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Matrix oder eines erfindungsgemäßen Implantats bei der Bereitstellung eines therapeutischen Mittels zur Transplantation eines Individuums und dabei insbesondere zur Behandlung eines Individuums, das an einem zumindest partiellen Verlust funktionsfähigen Gewebes leidet, welches durch das Transplantat ersetzt werden soll.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung veranschaulichen, ohne sie in ihrem Umfang einzuschränken.

Beispiel 1

Herstellung der Matrix

a) Ohne Polymerlösung

Polymer-Pellets (Resomer ® RG 858, erhältlich von der Firma Boehringer, Ingelheim) werden in Flüssigstickstoff gefroren und in gefrorenem Zustand geschreddert (Schlagwerk der Firma Däschle; 12000 U/min 2 min). Die geschredderten Polymerpartikel werden gesiebt. Partikel mit einer Größe von 108 µm bis 250 µm werden für die Matrixherstellung eingesetzt. Dabei besitzen 16 Gew.-% des eingesetzten Polymers eine Partikelgröße zwischen 108 µm und 140 µm, 22 Gew.-% des eingesetzten Polymers eine Partikelgröße zwischen 145 µm und 180 µm, 46 Gew.-% des eingesetzten Polymers eine Partikelgröße zwischen 185 µm und 220 µm, und 16 Gew.-% des eingesetzten Polymers eine Partikelgröße zwischen 225 µm und 250 µm. Kochsalz wird gesiebt und Kochsalzpartikel mit einer Korngröße von 250 µm bis 425 µm werden für die Matrixherstellung verwendet. Dabei besitzen 25 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 250 µm und 320 µm, 44 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 330 µm und 380 µm, und 31 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 390 µm und 425 µm. 760 mg Kochsalzpartikel und 40 mg Polymerpartikel werden miteinander vermischt. Das Gemisch wird in eine Stanzform eingebracht und mit einer Hydraulikpresse bei einem Stempeldruck von 1000 psi 1 Minute gepresst. Anschließend werden die Matrixrohlinge auf einen Teflonteller gelegt und 24 Stunden in einer CO-Atmosphäre (850 psi) begast. Dann werden die Rohlinge 24 Stunden gewässert, um die eingeschlossenen Salzkörner aufzulösen. Schließlich werden die Matrices 12 Stunden auf Saugpapier getrocknet.

Die resultierende Polymermatrix weist eine Porosität von 95 +/- 2% und eine mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmte, definierte Porengröße von 250 µm +/- 120 µm auf.

b) Mit Polymerlösung

Kochsalz (analytisch rein) wird gemahlen (Schlagwerk der Firma Däschle; 12000 U/min 2 min) und anschließend gesiebt, und Kochsalzpartikel mit einer Korngröße

von 108 bis 425 μm werden für die Matrixherstellung verwendet. Dabei besitzen 8 % des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 108 μm und 140 μm , 6 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 145 μm und 180 μm , 12 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 185 μm und 220 μm , 6 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 225 μm und 250 μm , 25 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 250 μm und 320 μm , 26 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 330 μm und 380 μm , und 17 Gew.-% des eingesetzten Salzes eine Partikelgröße zwischen 390 μm und 425 μm . 96 g Kochsalzpartikel werden mit 1 g der in Beispiel 1 a) beschriebenen Polymerpartikel vermischt und anschließend mit 100 ml einer Chloroformlösung, die 4 g des Polymers gelöst enthält, versetzt. Das so erhaltene Gemisch wird bei 45 °C bis 65 °C erwärmt, wodurch das Chloroform innerhalb von etwa 25 Minuten verdampft. Das verbleibende Salz-Polymer-Gemisch wird dann mit einer Hydraulikpresse bei einem Stempeldruck von 1000 psi eine Minute gepresst und anschließend 24 Stunden gewässert, um die eingeschlossenen Salzkörner aufzulösen. Anschließend wird die Matrix, wie oben beschrieben, begast und schließlich 12 Stunden auf Saugpapier getrocknet.

Die resultierende Polymermatrix weist eine Porosität von 96 % auf.

Vermischt man 98,5 g Salzpartikel mit 0,5 g Polymerpartikel und versetzt das Gemisch mit 100 ml einer Chloroform-Lösung, die 1 g Polymer enthält, erhält man eine Matrix mit einer Porosität von 99 %.

Vermischt man 99,2 g Salzpartikel mit 0,1 g Polymerpartikel und versetzt dieses Gemisch mit 100 ml einer Chloroform-Lösung, die etwa 0,9 g Polymer enthält, erhält man eine Polymermatrix mit einer Porosität von 99 %.

Beispiel 2

a) Beschichtung der Matrix mit Fibronectin

Die Matrix aus Beispiel 1 wird in eine 3 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin aus Humanplasma (Sigma) enthaltende Carbonatpufferlösung mit einem pH-Wert von 9,4 getaucht. Nach etwa 60 s wird die Matrix aus der Lösung entnommen, lyophilisiert und γ -sterilisiert.

Beispiel 3

Zellisolation

Dem zu transplantierenden Individuum wird in an sich bekannter Weise ein Leberstück entnommen. Das entnommene Leberstück wird zunächst 7 Minuten bei einer Flussrate von 30 ml/min und 37 °C mit einer Lösung (8,3 g NaCl; 0,5 g KCl; 2,38 g HEPES; ad 1000 ml destilliertes Wasser; pH-Wert 7,4) perfundiert. Anschließend wird das Leberstück weitere 6 bis 7 min bei einer Flussrate von 30 ml/min und 37 °C mit einer Collagenase-Trypsin-Inhibitor-Lösung (8,3 g NaCl; 0,5 g KCl; 2,38 g HEPES; 0,7 g CaCl₂ x 2 H₂O; 500 mg Collagenase (Collagenase H, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland); 7,5 mg Trypsin-Inhibitor (ICN, Eschwege, Deutschland); ad 1000 ml destilliertes Wasser; pH-Wert 7,35) perfundiert. Nach Beendigung der Perfusion wurde das Leberstück frei präpariert und in Williams-Medium E vorsichtig aufgeschüttelt. Die Zellsuspension wird filtriert (Nylonnetz; 200 µm) und anschließend mit Williams-Medium E gewaschen. Anschließend werden die Zellen bei 3 min bei 50 g und 4 °C zentrifugiert. Die mit Tryptan-Blau bestimmte Vitalität der Zellen beträgt 95 %.

In gleicher Weise werden Langerhans'sche Inselzellen aus einem Pankreasstück isoliert.

Beispiel 4

Zellbesiedlung

Die in Beispiel 2 beschichteten Matrices werden im ersten Schritt mit Langerhans'schen Inselzellen inkubiert, welche gemäß Beispiel 3 isoliert wurden.

Dazu wurden 3000 Inselzellen pro ml in einem Lösungsgemisch aus M199 und FKS (Volumenverhältnis von 19:1) suspendiert. Die Zellzahl wird bestimmt, indem man sie unter einem inversen Olympus-Mikroskop in einem 0,25-mm-Zählrohr ausgezählt. Dann werden 8 ml bis 10 ml dieser Lösung mit einer Pipette auf die Matrix aufgebracht. Die überschüssige Lösung, welche nicht in der Matrix verbleibt, wird verworfen. Die so behandelte Matrix wird anschließend zur Anheftung der Zellen 4 Stunden in den Zellkulturbrutschrank gestellt. Anschließend wird eine Lösung aus Williams Medium E, die pro ml eine nicht gereinigte Leberzellsuspension mit etwa $5,0 \times 10^7$ vitalen Hepatocyten und etwa $1,0 \times 10^6$ nichtperenchymatösen Leberzellen enthält, auf die Matrix aufgebracht. Es werden 8 ml bis 12 ml Lösung mit einer Pipette aufgetragen; die nicht von der Matrix aufgenommene überschüssige Lösung wird verworfen. Die Matrix kann bis zur Implantation etwa 1,5 Stunden auf Eis

gehalten werden. Ist eine Implantation zu einem späteren Zeitpunkt vorgesehen, kann die Matrix in einem Bioflussreaktor unter Standardbedingungen bis zu 5 Tagen aufbewahrt werden.

Beispiel 5

Sekretorische Aktivität und Proliferationsrate der Hepatozyten

Lewis-Ratten wurden mit zellbesiedelten Matrices nach Beispiel 4 transplantiert. Die Transplantate wurden den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten wieder entnommen und morphometrisch untersucht. Die Zellzahl der die Form einer kreisrunden Scheibe mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Dicke von 2 mm aufweisenden Transplantate betrug 1, 6 und 12 Monate nach Transplantation 94×10^3 , 140×10^3 bzw. 146×10^3 Zellen. Hepatozyten des einen Monat nach Transplantation entnommenen Transplantats weisen eine normale Albumin-Expression auf. In allen Präparaten werden proliferierende Hepatozyten gefunden, ohne dass eine pathologisch erhöhte Proliferationsrate vorliegt. Im Vergleich zu Leberstandardpräparaten weisen die erfindungsgemäß transplantierten Hepatozyten einen um den Faktor 3 erhöhten Einbau von BrdU auf.

Beispiel 6

Vaskularisierung

Die weitere Untersuchung der in Beispiel 4 beschriebenen Matrices ergibt, dass diese bereits einen Monat nach Implantation hervorragend vaskularisiert sind. Die Blutgefäße reichen makroskopisch bis zur Matrix und die transplantierten Hepatozyten und Langerhans'sche Inselzellen bekommen durch eine ausreichende Kapillarisation Kontakt zum kardiovaskulären System des Transplantatempfängers.

Es ist weiterhin festzustellen, dass die cotransplantierten Langerhans'sche Inselzellen beim Empfänger keine Hypoglykämie verursachen. Die endokrine Sekretionsleistung dieser Zellen sowie der empfängereigenen Inselzellen wird vermutlich durch einen Rückkopplungsmechanismus geregelt.

Beispiel 7

Leberfunktionsübernahme

Gunn-Ratten gelten als Tiermodell für das menschliche Crigler-Najar-Syndrom, da ihre Leber infolge eines spezifischen angeborenen metabolischen Enzymdefekts nicht ausreichend Bilirubin konjugieren kann. Als Folge führen toxische Blutplasmaspiegel unkonjugierten Bilirubins über zahlreiche Folgeschäden zum Tod.

Drei Gunn-Ratten werden mit einer zellbesiedelten Matrix gemäß Beispiel 4 transplantiert. Die Matrix besitzt eine Außenfläche von insgesamt 10 cm².

Bereits vier Wochen nach Transplantation sinkt der Bilirubinspiegel der Versuchstiere. Bilirubin wird nunmehr konjugiert. Das konjugierte Bilirubin kann in allen drei Fällen in den Gallengängen der noch vorhandenen Leber mit Hilfe einer Gallengangsonde nachgewiesen werden. Somit gelangt das in der Matrix konjugierte Bilirubin hämatogen in die Leber und kann dort über das Gallengangsystem ausgeschieden werden.

Beispiel 8

Humane Patienten

Ein Patient mit einer ausgeprägten Leberzirrhose wird mit zellbesiedelten Matrices gemäß Beispiel 4 in die Bauchhöhle transplantiert. Die folgende Tabelle 1 fasst die Laborbefunde des Patienten vor der Transplantation zusammen.

Tabelle 1

Parameter	Patient 1
GOT	27
GPT	35
gGt	89
CHE	2421
Serumalbumin	24,1

Patient 1 (Ethyltoxische Leberzirrhose, zuvor mehrfach dekompenziert, jetzt nicht aktiv) erhielt 4 Matrices (je 124 mm x 45 mm x 5 mm).

Die folgende Tabelle 2 fasst die Leberwerte 3, 10 bzw. 20 Wochen nach Transplantation zusammen.

Tabelle 2

	Patient 1		
	3	10	20
GOT	22	10	11
GPT	28	9	28
gGt	71	10	9
Serumalbumin	28,6	42	44
CHE	2652	4400	4600

Patentansprüche

1. Poröse Matrix auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers oder Polymergemisches, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix Poren mit einer Größe von 150 μm oder weniger und Poren mit einer Größe von 300 μm oder mehr aufweist und der Porositätsgrad 93 bis 98 % beträgt.
2. Matrix nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix Poren mit einer Größe von 130 μm oder weniger aufweist.
3. Matrix nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix Poren mit einer Größe von 370 μm oder mehr aufweist.
4. Matrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das biologisch verträgliche Polymer ein biologisch abbaubares Polymer ist.
5. Matrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das biologisch abbaubare Polymer ausgewählt ist unter natürlichen Polymeren, wie Albumin, Fibrinogen, Collagen, Gelatine, Chitin, Chitosan, Agarose, Alginat und synthetischen Polymeren, wie Polyanhydriden, Poly(ϵ -caprolacton) und Poly(α -hydroxyestern).
6. Matrix nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das biologisch abbaubare Polymer Poly(glycolsäure-milchsäure) mit einem Milchsäure-Anteil von etwa 85 mol-% und einem Glycolsäure-Anteil von etwa 15 mol-% ist.
7. Poröse Matrix nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche der Matrix mit wenigstens einem extrazellulären Matrixprotein beschichtet ist.
8. Matrix nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das extrazelluläre Matrixprotein ausgewählt ist unter Collagenen, Laminin und Fibronectin.
9. Matrix nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung Fibronectin enthält.

10. Matrix nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung ein Gemisch aus Collagen vom Typ I, Laminin und Collagen vom Typ IV enthält.
11. Matrix nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch die Proteine in etwa gleichen Gewichtsanteilen enthält.
12. Verfahren zur Herstellung einer porösen Matrix auf Basis eines biologisch abbaubaren Polymers oder Polymergemisches, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Gemisch aus Polymerpartikeln mit einer Korngröße im Bereich von etwa 20 bis 950 μm , vorteilhafterweise im Bereich von etwa 50 bis 760 μm und insbesondere im Bereich von etwa 108 bis 250 μm , und Kochsalzpartikeln mit einer Korngröße im Bereich von etwa 90 bis 670 μm , vorteilhafterweise im Bereich von etwa 110 bis 520 μm und insbesondere im Bereich von etwa 250 bis 425 μm , kompaktiert und anschließend das Kochsalz herauslöst.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Kochsalzpartikelgemisch aus 15 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 18 bis 42 Gew.-% und insbesondere 22 bis 28 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 250 μm bis 320 μm , 20 bis 65 Gew.-%, vorzugsweise 30 bis 52 Gew.-% und insbesondere 42 bis 46 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 330 bis 380 μm , und 15 bis 62 Gew.-%, vorzugsweise 25 bis 42 Gew.-% und insbesondere 29 bis 33 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 390 μm bis 425 μm besteht.
14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Kochsalzpartikelgemisch aus 1 bis 15 Gew.-%, vorzugsweise 4 bis 12 Gew.-% und insbesondere 7 bis 9 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 108 μm bis 140 μm , 1 bis 11 Gew.-%, vorzugsweise 3 bis 9 Gew.-% und insbesondere 5 bis 7 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 145 μm bis 180 μm , 3 bis 21 Gew.-%, vorzugsweise 7 bis 17 Gew.-% und insbesondere 10 bis 14 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 185 μm bis 220 μm , 1 bis 11 Gew.-%, vorzugsweise 3 bis 9 Gew.-% und insbesondere 5 bis 7 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 225 μm bis 250 μm , 15 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 18 bis 42 Gew.-% und insbesondere 22 bis 28 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 250 μm bis 320 μm , 15 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 18 bis 42 Gew.-% und insbesondere 22 bis 28 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 330 μm bis 380 μm , und 5 bis 29 Gew.-%,

vorzugsweise 10 bis 24 Gew.-% und insbesondere 15 bis 19 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 390 µm bis 425 µm besteht.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymerpartikelgemisch aus 5 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 30 Gew.-% und insbesondere 14 bis 18 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 108 µm bis 140 µm, 10 bis 55 Gew.-%, vorzugsweise 15 bis 40 Gew.-% und insbesondere 20 bis 24 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 145 µm bis 180 µm, 18 bis 88 Gew.-%, vorzugsweise 32 bis 76 Gew.-% und insbesondere 43 bis 49 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 185 µm bis 220 µm, und 5 bis 45 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 28 Gew.-% und insbesondere 14 bis 18 Gew.-% Partikel mit einer Korngröße von 225 µm bis 250 µm besteht.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewichtsverhältnis von Polymerpartikeln zu Kochsalzpartikeln 1:100 bis 1:10, vorteilhafterweise 1:50 bis 1:15 und insbesondere 1:20 bis 1:18 beträgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass man vor dem Kompaktieren dem Gemisch aus Polymerpartikeln und Kochsalzpartikeln eine Polymerlösung zusetzt und das Lösungsmittel entfernt.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel das Polymer, nicht aber das Salz löst.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel ausgewählt ist unter Aceton, Ethylacetat, Methylenchlorid, Chloroform, Hexafluorisopropanol, chlorierten und fluorierten, aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, Tetrahydrofuran, Ethylmethylketon, Diethylketon sowie Gemischen davon.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer Poly(glykolsäure), Poly(milchsäure) oder Poly(glykolsäuremilchsäure) und das Lösungsmittel Chloroform ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewichtsverhältnis von Polymerpartikeln zu gelöstem Polymer 10:1 bis 1:100, vorteilhafterweise 2:1 bis 1:25 und insbesondere 1:1 bis 1:10 beträgt.
22. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Kompaktieren durch Einwirken von Druck erfolgt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Druck im Bereich von etwa 780 psi bis 1450 psi, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 840 psi bis 1230 psi und insbesondere im Bereich von etwa 900 psi bis 1100 psi liegt.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Einwirkungszeit im Bereich von etwa 10 s bis 360 s, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 40 s bis 180 s und insbesondere im Bereich von etwa 50 s bis 70 s liegt.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Einwirkungstemperatur im Bereich von -76°C bis 42°C , vorteilhafterweise im Bereich von 0°C bis 32°C und insbesondere im Bereich von 18°C bis 25°C liegt.
26. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man zum Herauslösen des Kochsalzes Wasser auf das kompaktierte Gemisch einwirken lässt.
27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Einwirkungszeit im Bereich von etwa 1 h bis 80 h, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 12 h bis 62 h und insbesondere im Bereich von etwa 36 h bis 60 h liegt.
28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass man das Wasser wieder entfernt.
29. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das kompaktierte Gemisch zunächst in einer CO_2 -Atmosphäre gelagert und anschließend das Kochsalz herauslöst wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, der CO₂-Druck im Bereich von etwa 140 psi bis 1650 psi, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 360 psi bis 1120 psi und insbesondere im Bereich von etwa 800 psi bis 900 psi liegt.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Lagerungszeit im Bereich von etwa 1 h bis 180 h, vorteilhafterweise im Bereich von etwa 3 h bis 60 h und insbesondere im Bereich von etwa 12 h bis 36 h liegt.
32. Verfahren zur Herstellung einer porösen Matrix auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers oder Polymergemisches, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Gemisch aus Polymerpartikeln, Partikeln eines porogenen Materials und einer Polymerlösung kompaktiert und anschließend das porogene Material herauslöst.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ausgewählt ist unter Polyanhydriden, Poly(orthoestern), Poly(α -hydroxyestern), Poly(esteramiden), Polyamiden, Poly(esterethern), Polycarbonaten, Polyalkylenen, Polyalkylenglykolen, Polyalkylenoxiden, Polyalkylenterephthalaten, Polyvinylalkoholen, Polyvinylethern, Polyvinylestern, Polyvinylhalogeniden, Polyvinylpyrrolidonen, Polysiloxanen, Polystyrolen, Polyurethanen, derivatisierten Cellulosen, (Meth)acrylsäurepolymeren und -copolymeren.
34. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass das porogene Material ausgewählt ist unter wasserlöslichen Salzen.
35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass das wasserlösliche Salz ausgewählt ist unter Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumfluorid, Kaliumfluorid, Natriumiodid, Kaliumiodid, Natriumnitrat, Natriumsulfat Natriumcitrat, Natriumtartrat, Zuckern und Gemischen davon.
36. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung Polymer in gelöster und Polymerpartikel in fester Form enthält.

37. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung das porogene Material nicht löst.
38. Matrix, erhältlich nach einem Verfahren der Ansprüche 11 bis 37.
39. Implantat, umfassend eine Matrix nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 38 und wenigstens eine Zelle.
40. Implantat, umfassend eine Matrix auf Basis eines biologisch verträglichen Polymers, und Zellen wenigstens zweier Zelltypen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen des ersten Zelltyps Hepatozyten und die Zellen des zweiten Zelltyps Langerhans'sche Inselzellen sind.
41. Implantat nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Hepatozyten zu Langerhans'schen Inselzellen etwa $10^6 : 3000$ beträgt.
42. Implantat nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Hepatozyten zu Langerhans'schen Inselzellen etwa $10^6 : 3-200$, vorteilhafterweise etwa $10^6 : 10-100$, insbesondere etwa $10^6 : 20-80$ und besonders bevorzugt etwa $10^6 : 35-45$ beträgt.
43. Verfahren zur Gewinnung von Zellen für die Beimpfung einer implantierbaren Matrix, wobei man
 - (i) einem Individuum ein Gewebestück entnimmt;
 - (ii) das Gewebestück mit einer Zusammensetzung behandelt, die NaCl, KCl, HEPES, CaCl_2 , Collagenase und Trypsininhibitor enthält und einem pH-Wert von etwa 7,3 bis 7,4 aufweist;
 - (iii) das behandelte Gewebestück erforderlichenfalls freipräpariert;
 - (iv) das Gewebestück in einem geeigneten Medium aufschüttelt;
 - (v) und zumindest einen Teil der resultierenden Zellsuspension gewinnt.
44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass man das Gewebestück nach der Entnahme zunächst mit einer weiteren Zusammensetzung behandelt, die NaCl, KCl und HEPES enthält und einen pH-Wert von etwa 7,4 aufweist.

45. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass man die resultierende Zellsuspension bei etwa 50 g und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet gewinnt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C08J9/26 A61L27/56 A61L27/58 A61L27/50 A61L27/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C08J A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HOU Q ET AL: "Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 24, no. 11, May 2003 (2003-05), pages 1937-1947, XP004412414 ISSN: 0142-9612 abstract page 1938, right-hand column, last paragraph - page 1947, left-hand column, paragraph 2; figures; tables</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-42

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2004

Date of mailing of the international search report

23/09/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Otegui Rebollo, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006140

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 01/35932 A (RICHARDSON THOMAS P ; LIAO ELLY (US); SHEA LONNIE D (US); UNIV MICHIGA) 25 May 2001 (2001-05-25) page 1, lines 12-18 page 8, line 30 - page 12, line 30 page 13, line 17 - page 15, line 4 page 18, line 6 - page 19, line 12 page 20, line 26 - page 21, line 28 page 24, line 24 - page 29, line 31 page 32, line 4 - page 38, line 16; claims; examples</p>	1-31, 38-42
X	<p>WO 98/44027 A (SHEA LONNIE ; UNIV MICHIGAN (US); HARRIS LEATRESE (US); MOONEY DAVID J) 8 October 1998 (1998-10-08) cited in the application page 1, lines 2-6 page 2, line 24 - page 15; claims; examples</p>	1-31, 38-42
X	<p>US 6 337 198 B1 (LHOMMEAU CHRISTELLE M ET AL) 8 January 2002 (2002-01-08) column 1, lines 13-22 column 2, line 31 - column 3, line 29 column 3, line 66 - column 7, line 14 column 8, line 63 - column 9, line 44; claims; examples</p>	1-11, 32-42
X	<p>SOHIER J ET AL: "A novel method to obtain protein release from porous polymer scaffolds: emulsion coating" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 87, no. 1-3, 21 February 2003 (2003-02-21), pages 57-68, XP004412747 ISSN: 0168-3659 abstract page 58, right-hand column, paragraph 2 - page 66, right-hand column, paragraph 1; figures</p>	12-28
X	<p>CHEN G ET AL: "Preparation of poly(l-lactic acid) and poly(dl-lactic-co-glycolic acid) foams by use of ice microparticulates" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 22, no. 18, September 2001 (2001-09), pages 2563-2567, XP004273584 ISSN: 0142-9612 abstract page 2563, right-hand column, last line - page 2567, left-hand column, line 2; figures; tables</p>	1-11, 38-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006140

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 99/32204 A (UNIV TEXAS) 1 July 1999 (1999-07-01) page 5, paragraph 1 - page 18, paragraph 2 page 22, paragraph 1 - page 23, paragraph 1 page 29, paragraph 3 - page 30, paragraph 1 page 32, paragraph 2 - page 35, paragraph 2; claims; example 2</p> <p>-----</p>	1-11, 32-42
X	<p>HARRIS L D ET AL: "OPEN PORE BIODEGRADABLE MATRICES FORMED WITH GAS FOAMING" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 42, 1998, pages 396-402, XP001021110 ISSN: 0021-9304 abstract page 396, right-hand column, last paragraph - page 402, left-hand column, last paragraph; figures; tables</p> <p>-----</p>	1-42
X	<p>US 5 626 861 A (DEVIN JESSICA ET AL) 6 May 1997 (1997-05-06) column 1, lines 10-12 column 3, line 65 - column 4, line 23 column 5, line 19 - column 6, line 31 column 9, line 21 - column 10, line 65; examples column 16, line 15 - column 19, line 43; claims</p> <p>-----</p>	1-11, 32-42
X	<p>WHANG K ET AL: "A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds" POLYMER, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, GB, vol. 36, no. 4, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 837-842, XP004025968 ISSN: 0032-3861 abstract page 839, left-hand column, last paragraph - page 841, right-hand column, paragraph 3; figures; tables</p> <p>-----</p>	1-11, 38-42
X	<p>WO 99/09149 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY ; SHASTRI VENKATRAM R (US); MARTIN IVAN) 25 February 1999 (1999-02-25) cited in the application page 1, line 20 - page 4, line 6 page 5, line 21 - page 6, line 2 page 7, line 18 - page 9, line 21 page 14, line 17 - page 26, line 25 page 34, lines 15-19 page 36, lines 9-17; claims; examples</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-11,32, 33,36-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006140

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>WO 03/064509 A (GRIJPMA DIRK WYBE ; UNIV TWENTE (NL); FEIJEN JAN (NL); HOU QINGPU (NL)) 7 August 2003 (2003-08-07) page 1, lines 1-5 page 2, line 29 - page 7, line 9; claims; figures; examples -----</p>	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/006140

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **45-43**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box II.1

Claims 43-45

The subject matter of claims 43 to 45 is a multi-stage method for treatment of the human or animal body ("tissue engineering": see also page 13, second paragraph of the application), a surgical method step (i) lending the aforementioned multi-stage method a surgical character. No International Searching Authority is required to establish a search report in relation to this type of subject matter (PCT Rule 39.1(iv)).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/006140

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0135932	A	25-05-2001	AU 1622801 A WO 0135932 A2	30-05-2001 25-05-2001
WO 9844027	A	08-10-1998	AT 249491 T AU 736102 B2 AU 6786098 A CA 2285329 A1 DE 69818052 D1 DE 69818052 T2 DK 991705 T3 EP 0991705 A1 ES 2205467 T3 JP 2002514253 T WO 9844027 A1 US 6281256 B1	15-09-2003 26-07-2001 22-10-1998 08-10-1998 16-10-2003 08-07-2004 12-01-2004 12-04-2000 01-05-2004 14-05-2002 08-10-1998 28-08-2001
US 6337198	B1	08-01-2002	US 6103255 A	15-08-2000
WO 9932204	A	01-07-1999	US 6255359 B1 AU 2091499 A WO 9932204 A2	03-07-2001 12-07-1999 01-07-1999
US 5626861	A	06-05-1997	US 5766618 A	16-06-1998
WO 9909149	A	25-02-1999	AU 8681098 A WO 9909149 A1 US 6471993 B1	08-03-1999 25-02-1999 29-10-2002
WO 03064509	A	07-08-2003	NL 1019888 C2 WO 03064509 A2	25-08-2003 07-08-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006140

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C08J9/26 A61L27/56 A61L27/58 A61L27/50 A61L27/18		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C08J A61L		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HOU Q ET AL: "Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, Bd. 24, Nr. 11, Mai 2003 (2003-05), Seiten 1937-1947, XP004412414 ISSN: 0142-9612 Zusammenfassung Seite 1938, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 1947, linke Spalte, Absatz 2; Abbildungen; Tabellen ----- -/--	1-42
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann hahellegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 15. September 2004		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 23/09/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Otegui Rebollo, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006140

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 01/35932 A (RICHARDSON THOMAS P ; LIAO ELLY (US); SHEA LONNIE D (US); UNIV MICHIGA) 25. Mai 2001 (2001-05-25) Seite 1, Zeilen 12-18 Seite 8, Zeile 30 - Seite 12, Zeile 30 Seite 13, Zeile 17 - Seite 15, Zeile 4 Seite 18, Zeile 6 - Seite 19, Zeile 12 Seite 20, Zeile 26 - Seite 21, Zeile 28 Seite 24, Zeile 24 - Seite 29, Zeile 31 Seite 32, Zeile 4 - Seite 38, Zeile 16; Ansprüche; Beispiele</p>	1-31, 38-42
X	<p>WO 98/44027 A (SHEA LONNIE ; UNIV MICHIGAN (US); HARRIS LEATRESE (US); MOONEY DAVID J) 8. Oktober 1998 (1998-10-08) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeilen 2-6 Seite 2, Zeile 24 - Seite 15; Ansprüche; Beispiele</p>	1-31, 38-42
X	<p>US 6 337 198 B1 (LHOMMEAU CHRISTELLE M ET AL) 8. Januar 2002 (2002-01-08) Spalte 1, Zeilen 13-22 Spalte 2, Zeile 31 - Spalte 3, Zeile 29 Spalte 3, Zeile 66 - Spalte 7, Zeile 14 Spalte 8, Zeile 63 - Spalte 9, Zeile 44; Ansprüche; Beispiele</p>	1-11, 32-42
X	<p>SOHIER J ET AL: "A novel method to obtain protein release from porous polymer scaffolds: emulsion coating" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 87, Nr. 1-3, 21. Februar 2003 (2003-02-21), Seiten 57-68, XP004412747 ISSN: 0168-3659 Zusammenfassung Seite 58, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 66, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildungen</p>	12-28
X	<p>CHEN G ET AL: "Preparation of poly(l-lactic acid) and poly(dl-lactic-co-glycolic acid) foams by use of ice microparticulates" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, Bd. 22, Nr. 18, September 2001 (2001-09), Seiten 2563-2567, XP004273584 ISSN: 0142-9612 Zusammenfassung Seite 2563, rechte Spalte, letzte Zeile - Seite 2567, linke Spalte, Zeile 2; Abbildungen; Tabellen</p>	1-11, 38-42
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006140

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 99/32204 A (UNIV TEXAS) 1. Juli 1999 (1999-07-01) Seite 5, Absatz 1 - Seite 18, Absatz 2 Seite 22, Absatz 1 - Seite 23, Absatz 1 Seite 29, Absatz 3 - Seite 30, Absatz 1 Seite 32, Absatz 2 - Seite 35, Absatz 2; Ansprüche; Beispiel 2</p>	1-11, 32-42
X	<p>HARRIS L D ET AL: "OPEN PORE BIODEGRADABLE MATRICES FORMED WITH GAS FOAMING" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, WILEY, NEW YORK, NY, US, Bd. 42, 1998, Seiten 396-402, XPO01021110 ISSN: 0021-9304 Zusammenfassung Seite 396, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 402, linke Spalte, letzter Absatz; Abbildungen; Tabellen</p>	1-42
X	<p>US 5 626 861 A (DEVIN JESSICA ET AL) 6. Mai 1997 (1997-05-06) Spalte 1, Zeilen 10-12 Spalte 3, Zeile 65 - Spalte 4, Zeile 23 Spalte 5, Zeile 19 - Spalte 6, Zeile 31 Spalte 9, Zeile 21 - Spalte 10, Zeile 65; Beispiele Spalte 16, Zeile 15 - Spalte 19, Zeile 43; Ansprüche</p>	1-11, 32-42
X	<p>WHANG K ET AL: "A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds" POLYMER, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, GB, Bd. 36, Nr. 4, 1. Februar 1995 (1995-02-01), Seiten 837-842, XPO04025968 ISSN: 0032-3861 Zusammenfassung Seite 839, linke Spalte, letzter Absatz - Seite 841, rechte Spalte, Absatz 3; Abbildungen; Tabellen</p>	1-11, 38-42
X	<p>WO 99/09149 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY ; SHASTRI VENKATRAM R (US); MARTIN IVAN) 25. Februar 1999 (1999-02-25) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 20 - Seite 4, Zeile 6 Seite 5, Zeile 21 - Seite 6, Zeile 2 Seite 7, Zeile 18 - Seite 9, Zeile 21 Seite 14, Zeile 17 - Seite 26, Zeile 25 Seite 34, Zeilen 15-19 Seite 36, Zeilen 9-17; Ansprüche; Beispiele</p>	1-11,32, 33,36-42

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006140

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	WO 03/064509 A (GRIJPMA DIRK WYBE ; UNIV TWENTE (NL); FEIJEN JAN (NL); HOU QINGPU (NL)) 7. August 2003 (2003-08-07) Seite 1, Zeilen 1-5 Seite 2, Zeile 29 - Seite 7, Zeile 9; Ansprüche; Abbildungen; Beispiele -----	1-42

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. 43-45
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.1

Ansprüche Nr.: 43-45

Der Gegenstand der Ansprüche 43 bis 45 stellt ein mehrstufiges Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers ("tissue engineering": siehe auch Seite 13, 2. Absatz der Anmeldung) dar, worin ein chirurgischer Verfahrensschritt (i) dem o.a. mehrstufigen Verfahren einen chirurgischen Charakter verleiht. Keine mit einer internationalen Recherche beauftragte Behörde ist verpflichtet, einen Recherchenbericht für den o.a. Gegenstand zu erstellen (Regel 39.1(iv) PCT).

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006140

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0135932	A	25-05-2001	AU 1622801 A	30-05-2001
			WO 0135932 A2	25-05-2001
WO 9844027	A	08-10-1998	AT 249491 T	15-09-2003
			AU 736102 B2	26-07-2001
			AU 6786098 A	22-10-1998
			CA 2285329 A1	08-10-1998
			DE 69818052 D1	16-10-2003
			DE 69818052 T2	08-07-2004
			DK 991705 T3	12-01-2004
			EP 0991705 A1	12-04-2000
			ES 2205467 T3	01-05-2004
			JP 2002514253 T	14-05-2002
			WO 9844027 A1	08-10-1998
			US 6281256 B1	28-08-2001
			US 6337198	B1
WO 9932204	A	01-07-1999	US 6255359 B1	03-07-2001
			AU 2091499 A	12-07-1999
			WO 9932204 A2	01-07-1999
US 5626861	A	06-05-1997	US 5766618 A	16-06-1998
WO 9909149	A	25-02-1999	AU 8681098 A	08-03-1999
			WO 9909149 A1	25-02-1999
			US 6471993 B1	29-10-2002
WO 03064509	A	07-08-2003	NL 1019888 C2	25-08-2003
			WO 03064509 A2	07-08-2003