



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 653 914 A5

⑤① Int. Cl.⁴: B 01 J 13/02

// A 61 K 9/52, 37/26

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳① Gesuchsnummer:	2423/80	⑳③ Inhaber:	Damon Biotech, Inc., Needham Heights/MA (US)
⑳② Anmeldungsdatum:	27.03.1980	⑳④ Erfinder:	Lim, Franklin, Richmond/VA (US)
⑳③ Priorität(en):	28.03.1979 US 024600	⑳④ Vertreter:	A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel
⑳④ Patent erteilt:	31.01.1986		
⑳⑤ Patentschrift veröffentlicht:	31.01.1986		

⑳⑤ **Verfahren zum Einkapseln eines chemisch aktiven Kernmaterials.**

⑳⑤⑦ Chemisch aktives Kernmaterial, wie z.B. Langerhans-Inseln oder Lebergewebe aus Mensch oder Tier, wird in eine semipermeable Membran eingekapselt, welche den Durchlass von Sauerstoff, Aminosäuren und Nährstoffen, die für die Erhaltung des Gewebes und das Fortschreiten eines Stoffwechsels erforderlich sind, erlaubt, jedoch in bezug auf Bakterien, Lymphozyten und Proteine, welche ein höheres Molekulargewicht als einen bestimmten Wert besitzen, undurchlässig ist und dadurch potentiell schädliche grosse Moleküle, wie z.B. Immunglobuline, ausschliesst.

Das Verfahren umfasst das Suspendieren des einzukapselnden Materials in einem physiologisch verträglichen Medium, z.B. einem Kulturmedium, welches eine wasserlösliche, gummiartige Substanz enthält, welche in Tropfenform geliert werden kann, um einzelne, die Form beibehaltende temporäre Kapseln zu bilden, die Bildung einer semipermeablen Membran um die temporären Kapseln und gegebenenfalls die erneute Verflüssigung des im Inneren vorhandenen gelierten Materials. Das Verfahren kann auch zum Einkapseln von chemisch reaktiven Substanzen, wie z.B. Aktivkohlepartikeln, und labilen biologischen Materialien verwendet werden.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Einkapseln eines chemisch aktiven Kernmaterials innerhalb einer semipermeablen Membran, dadurch gekennzeichnet, dass man

A) das Material in fein verteilter Form in eine Lösung eines wasserlöslichen, gummiartigen Materials einlegt,

B) die so erhaltene Lösung in Tropfenform überführt,

C) die Tröpfchen so behandelt, dass eine Lösung entsteht, in welcher Bestandteile gelöst sind, welche das gummiartige Material unter Bildung von diskreten, die Form beibehaltenden temporären Kapseln zu gelieren vermögen; und

D) um die temporären Kapseln semipermeable Membranen bildet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ausserdem nach der Bildung der besagten Membranen das gummiartige Material erneut auflöst.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das gummiartige Material freie saure Gruppen aufweist und die Bildung der besagten Membranen dadurch bewirkt wird, dass man die temporären Kapseln mit einem Polymer mit einem Molekulargewicht von 3000 bis 100 000 Dalton, welches freie Amino- oder Iminogruppen aufweist, in Berührung bringt, wobei dieses Inberührungbringen so geschieht, dass permanente Polymervernetzungen zwischen den Amino- oder Iminogruppen und den sauren Gruppen in einer Oberflächenschicht der Kapseln gebildet werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das für die Vernetzung verwendete Polymer ein Polypeptid oder ein Protein ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran durch eine Grenzflächenpolymerisation gebildet wird, wobei die gelierten Massen als Kernmaterial in der wässrigen Phase einer Wasser-in-Öl-Emulsion verwendet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kernmaterial aus einem Enzym, einem Immunprotein oder einem Aktivkohleteilchen besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wasserlösliche zu gelieren vermögende Material aus einem freie Säuregruppen enthaltenden Polysaccharid besteht.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wasserlösliche zu gelieren vermögende Material ein Alkalimetallalginat ist.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kernmaterial aus Enzymen, Immunoproteinen, Aktivkohleteilchen oder lebefähigem Gewebe oder Fraktionen davon besteht.

10. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das freie Aminogruppen enthaltende Polymer aus Polylysin besteht.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ausserdem die besagte Membran mit einem Alginat behandelt.

12. Nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 9 eingekapseltes aktives Kernmaterial.

13. Kernmaterial nach Anspruch 12, in welchem das Kernmaterial aus Aktivkohle besteht.

14. Kernmaterial nach Anspruch 12, in welchem das Kernmaterial nicht lebendes, biologisch aktives Material enthält.

15. Kernmaterial nach Anspruch 12, hergestellt gemäss einem der Ansprüche 9 bis 11.

zwar so, dass dieses Material innerhalb einer Membran, welche beispielsweise für Nährstoffe, Ionen, Sauerstoff und andere, zum Beständighalten eines Gewebes und zur Unterstützung seiner normalen metabolischen Funktionen erforderlichen Materialien durchlässig, jedoch für Bakterien, Lymphociten und grosse Proteine solcher Beschaffenheit, wie sie für beim Abstossen sich ergebende immunochemische Reaktionen verantwortlich sind, undurchlässig ist, lebensfähig und in geschützter Form gehalten werden. Das vorliegende Verfahren erlaubt die Produktion beispielsweise eines Insulin erzeugenden Systems oder eines anderen Hormon produzierenden Systems, weil es das Einkapseln von Pankreas-B-Zellen, -A-Zellen, intakten Langerhans-Inseln aus der Bauchspeicheldrüse von Säugetieren und Menschen und anderen Geweben oder Gewebefraktionen, welche Hormone absondern, erlaubt. Solche Kapseln lassen sich in einem Kulturmedium suspendieren und sondern im Verlaufe einer bestimmten Zeit Hormon ab. Diese Kapseln können auch als künstliches Pankreas, welches beispielsweise durch Injektion in ein an Diabetes leidendes Säugetier oder einen an Diabetes leidenden Menschen implantiert werden kann, verwendet werden und funktionieren dann in vivo, wobei sie je nach der vorhandenen Zuckerkonzentration Insulin und andere Hormone absondern.

Es darf angenommen werden, dass Verfahren zum Einkapseln von lebendem Gewebe unter Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit desselben bisher nicht bekannt sind. Versuche zur Erreichung dieses Zieles waren bisher vergebens, weil die für die Kapselmembranbildung erforderlichen Bedingungen sich lebenden Systemen feindlich gegenüberstanden. Die amerikanische Patentschrift Nr. (Serial Nr. 606 166), von welcher in der vorliegenden Beschreibung ebenfalls die Rede sein wird, offenbart eine Technik zum Einkapseln von labilen biologischen Materialien in einer semipermeablen Membran. Diese Technik ermöglicht beispielsweise das Einkapseln von Enzymen in einer Membran, aus welcher das Enzym nicht entweichen kann, während andererseits dem Enzymsubstrat freier Durchlass gewährt wird. Wenngleich diese Patentschrift Reaktionsbedingungen offenbart, welche die Behandlung von biologischen Materialien ermöglichen, ist doch darauf hinzuweisen, dass jene Patentschrift nirgends das Einkapseln von lebendem Gewebe anregt.

Eingekapselte lebende Zellen, Organellen oder Gewebe besitzen manche interessante Verwendungszwecke. So kann beispielsweise das in einer semipermeablen Membran eingekapselte lebende Material in einer permanenten sterilen Umgebung gehalten und gegen eine direkte Kontaktnahme mit grossen, potentiell zerstörenden Molekeltypen abgeschirmt werden, während andererseits niedrigmolekularen Gewebenährstoffen und metabolischen Produkten freier Durchlass gewährt wird. Das Entwickeln einer solchen Einkapselungsmethode dürfte somit zu Systemen für das Freisetzen wertvoller Hormone, wie z. B. Insulin, führen. In solchen Systemen würde das für die Erzeugung des Materials verantwortliche Gewebe von Säugetieren in solcher Weise eingekapselt, dass ein freier Durchlass der Nährstoffe und der metabolischen Produkte durch die Membran gewährleistet, andererseits aber der Durchlass von Bakterien verhindert würde. Könnte man die Membrandurchlässigkeit steuern, so würde es möglich, einerseits auch künstliche Organe einzubeziehen, welche in Säugetieren oder Menschen, z. B. Diabetikern, implantiert werden könnten, ohne dass ein Abstossen erfolgen würde, und andererseits einen gesteuerten Hormonausstoss, z. B. das Infreisetzen von Insulin, das durch Glukosekonzentration eingeleitet wird, zu erzielen.

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, um für die Implantation in Säugetieren oder Menschen geeignete künstliche Organe zu erzeugen, indem man eine mechanische

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Einkapseln eines chemisch aktiven Kernmaterials und

semipermeable Trennwand, wie z. B. eine Millipore-Diffusionskammer oder eine Kapillarrohrkammer, um das einem Donator entnommene Gewebe vorsah. Solche künstliche Organe erfordern normalerweise eine chirurgische Implantation. Hinzu kommt, dass die Schutzmechanismen der menschlichen oder tierischen Körper das Implantat isolieren, indem durch fibroblastisches Überwachstum Poren verstopft werden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zum Einkapseln von Kernmaterialien, wie z. B. lebendem Gewebe, individuellen Zellen oder biologisch aktiven Materialien, in einer semipermeablen Membran. Dies geschieht dadurch, dass man

- A) das Material in fein verteilter Form in einer Lösung eines wasserlöslichen, gummiartigen Materials einlegt,
- B) die so erhaltene Lösung in Tropfenform überführt,
- C) die Tröpfchen so behandelt, dass eine Lösung entsteht, in welcher Bestandteile gelöst sind, welche das gummiartige Material unter Bildung von diskreten, die Form beibehaltenden temporären Kapseln zu gelieren vermögen; und
- D) um die temporären Kapseln semipermeable Membranen bildet.

Die temporären Kapseln können aus irgendeiner beliebigen gummiartigen, wasserlöslichen Substanz gebildet werden, welche sich bei Änderung der Bedingungen im Medium, in welchem die Behandlung erfolgt, unter Bildung einer die Form nicht verändernden Masse gelieren lassen. Sie enthalten auch eine Mehrzahl von Gruppen, welche sich leicht unter Bildung von anionischen oder kationischen Gruppen ionisieren lassen. Die Anwesenheit solcher Gruppen im Polymer erlaubt eine Quervernetzung der Oberflächenschichten der Kapsel unter Bildung einer «permanenten» Membran, sofern eine Behandlung mit Polymeren, die mehrere funktionelle Gruppen mit entgegengesetzter Ladung enthalten, erfolgt.

Das für die Bildung von temporären Kapseln bevorzugte Material ist entweder ein natürliches oder synthetisches Polysaccharid solcher Art, welches

- a) sich unter Bildung einer durch Ändern der bestehenden Bedingungen, wie z. B. pH-Bereich, oder durch Behandlung mit mehrwertigen Kationen, wie z. B.  $\text{Ca}^{++}$ , die Form beibehaltenden Masse gelieren lässt oder
- b) mittels reaktionsfähige Gruppen, wie z. B. Amin- oder Imingruppen, welche mit sauren Polysaccharidbestandteilen reagieren können, enthaltenden Polymeren permanent «vernetzt» oder gehärtet werden kann. Zur Zeit bevorzugtes gummiartiges Material sind Alkalimetallalginat. Andere wasserlösliche, verwendbare gummiartige Materialien sind Guargummi, Gummi-arabikum, Carragen, Pektin, Tragantgummi, Xanthangummi oder saure Fraktionen davon.

Die bevorzugte Methode für die Bildung der Tröpfchen besteht darin, dass man die das gummiartige Material, Nährstoffe und Gewebe enthaltende Suspension durch ein vibrierendes Kapillarrohr einzwängt, welches sich im Zentrum eines durch rasches Rühren einer ein mehrwertiges Kation enthaltenden Lösung erzeugten Wirbels angeordnet ist. Die aus der Spitze des Kapillarrohrs ausströmenden Tröpfchen kommen unmittelbar mit der Lösung in Berührung und liefern ein Gel in Form von sphäroidisch geformten Körpern.

Die bevorzugte Methode zur Bildung einer permanenten semipermeablen Membran rings um die temporären Kapseln besteht in der «Vernetzung» der Oberflächenschichten eines gelierten gummiartigen, freie saure Gruppen aufweisenden Materials mit Polymeren, welche mit Säuren reagierende Gruppen, wie z. B. Amin- oder Imingruppen, enthalten. Dies erfolgt mit Vorteil in einer verdünnten Lösung des ausgewählten Polymers. Je niedriger das Molekulargewicht des Polymers ist, umso grösser erfolgt im allgemeinen das Ein-

dringen in die Oberfläche der temporären Kapseln. Je grösser das Eindringen ist, umso weniger wird die erzielte Membran durchlässig sein. Permanente Vernetzungen werden zufolge der Salzbildung zwischen den mit Säuren reagierenden Gruppen des vernetzenden Polymers und den sauren Gruppen des Polysaccharidmaterials erzielt. Eine Semipermeabilität lässt sich in gewissen Grenzen dadurch steuern, dass man das Molekulargewicht des vernetzenden Polymers, dessen Konzentration und die Dauer der Reaktion richtig wählt. Mit Erfolg verwendete, vernetzende Polymere sind Polyäthylenimin und Polylysin. Das Molekulargewicht kann je nach dem Ausmass der erforderlichen Permeabilität zwischen 3000 und 100 000 schwanken. Gute Resultate erzielt man unter Verwendung von Polymeren mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht im Bereiche von ungefähr 35 000.

Die Kapseln können so gestaltet werden, dass sie dank einer besonderen Auswahl des vernetzenden Polymers eine gute in vivo-Lebensdauer aufweisen. Proteine oder Polypeptidvernetzer, wie z. B. Polylysin, werden in vivo leicht angegriffen, wodurch die Membran relativ rasch zerstört wird. Durch Säugetiere oder Menschen nicht leicht verwertbare Vernetzungsmittel, wie z. B. Polyäthylenimin, erlauben eine längere Lebensdauer der Membranen. Durch Auswahl des vernetzenden Polymers oder durch gleichzeitige oder nachträgliche Vernetzung mit zwei oder mehreren solcher Materialien ist es möglich, die Lebensdauer des implantierten Gewebes nach dem gesteckten Ziele zu erreichen.

Es ist ferner auch bei gewissen zur Bildung der temporären Kapseln verwendeten Materialien möglich, den Massentransfer innerhalb der Kapsel nach erfolgter Bildung der permanenten Membran dadurch zu verbessern, dass man die Bedingungen, unter welchen das Material flüssig ist, wiederum herzustellen, beispielsweise durch Entfernen des mehrwertigen Kations. Dies kann durch Ionenaustausch, z. B. durch Eintauchen in einen mit Phosphat gepufferten salzhaltigen Puffer oder Citratpuffer geschehen. In gewissen Fällen, z. B. dann, wenn man das eingekapselte Gewebe konservieren will oder wenn die temporär gelierte Kapsel permeabel ist, kann es von Vorteil sein, das eingekapselte gummiartige Material in vernetztem, geliertem Zustande zu belassen.

Eine andere Methode der Membranbildung besteht in einer Grenzflächenpolykondensation oder -polyaddition, ähnlich der in der amerikanischen Patentschrift Nr. (Serie Nr. 606 166) beschriebenen Methode. Gemäss dieser Methode wird eine Suspension von temporären Kapseln in einer wässrigen Lösung eines wasserlöslichen Reaktionsmittels aus einem Paar komplementärer Monomere, welche ein Polymer zu bilden vermögen, hergestellt. Hierauf wird die wässrige Phase in einer hydrophoben Flüssigkeit, in welcher das komplementäre Reaktionsmittel löslich ist, suspendiert. Bei der Zugabe des zweiten Reaktionsmittels zum Zweiphasensystem tritt an der Grenzfläche Polymerisation ein. Die Permeabilität lässt sich dadurch steuern, dass man das hydrophobe Lösungsmittel und die Konzentration der Reaktionsteilnehmer in richtiger Weise aufeinander abstimmt. Eine weitere Möglichkeit zur Bildung einer semipermeablen Membran besteht darin, dass man eine gewisse Proteinmenge in eine temporäre Kapsel einbringt, worauf an den Grenzflächenschichten durch Behandlung mit einer Lösung eines vernetzenden Mittels, wie z. B. Glutaraldehyd, die Vernetzung stattfinden kann.

Das vorbeschriebene Verfahren wurde zum Einkapseln von lebefähigen Langerhans-Inseln angewandt, welche in einem Medium, welches die für die Lebensfähigkeit und das Aufrechterhalten des in vitro Metabolismus des Gewebes erforderlichen Materialien enthält, in Gegenwart von Glucose Insulin aussstossen. Dermassen eingekapseltes Gewebe liess

sich während drei Monaten in lebensfähigem Zustande erhalten. Auch Leberzellen wurden eingekapselt und haben sich in einem physiologisch aktiven Zustande gezeigt.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine Gewebeimplantationsmethode, welche keinen chirurgischen Eingriff erfordert und keine Probleme der Immunreaktion mit sich bringt. Dafür werden die Kapseln an einer geeigneten Stelle des Körpers injiziert und funktionieren solange normal, bis das Gewebe erschöpft ist oder bis die natürlichen Körpervorgänge die Kapseln isolieren, weil die für die Lebensfähigkeit des Gewebes erforderlichen Substanzen nicht mehr zur Verfügung stehen. In diesem Zeitpunkt kann man, da für das Implantat kein chirurgischer Eingriff erforderlich war, frisches Gewebe durch eine weitere Injektion leicht zuführen. Der menschliche oder tierische Körper kann daher, solange erwünscht, mit der spezifischen Funktion versehen werden.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden tierische oder menschliche Langerhans-Inseln oder -Inselpräparate, welche die gewünschten Mengen an A-, B- und/oder D-Zellen aus den Inseln enthalten, in mit Polylysin und/oder Polyäthylenimin vernetzten Alginatmembranen eingekapselt. Diese lassen sich periodisch beispielsweise in die Bauchhöhle eines an Diabetes leidenden menschlichen oder tierischen Körpers injizieren und funktionieren als künstliche Bauchspeicheldrüse.

Ein erstes Ziel der vorliegenden Erfindung ist daher die Schaffung eines Verfahrens zum Einkapseln von lebenden Zellen, Organellen oder Gewebe in eine Membran, welche für Nährmittel und andere für das Aufrechterhalten der Lebensfähigkeit und des Metabolismus erforderliche Substanzen und für metabolische Produkte permeabel ist, für Bakterien und für ein Molekulargewicht über einem bestimmten Wert aufweisende Substanzen jedoch undurchlässig ist, um auf diese Weise für das immunologische Abstossen fremden Gewebes verantwortliche Mittel auszuschliessen. Andere Ziele der Erfindung umfassen die Schaffung von eingekapseltem lebendem Gewebe, welches für die Erzeugung von Hormonen, wie z. B. Insulin, und für die Bewirkung komplexer chemischer Veränderungen im in vivo-Gewebe brauchbar ist. Auf diese Weise kann man ein Insulin erzeugendes System, ein Körperflüssigkeiten entgiftendes System und eingekapselte Aktivkohle herstellen.

Die vorerwähnten Ziele und Aspekte der vorliegenden Erfindung werden durch die folgende Beschreibung anhand bevorzugter Ausführungsformen und mit Hilfe der beiliegenden Zeichnung erläutert.

Die beiliegende Zeichnung veranschaulicht in schematischer Weise eine bevorzugte Methode für das Einkapseln von für das erfindungsgemässe Verfahren verwendbarem lebendem Gewebe, sowie die in Frage kommende Mikrokapsel.

Die einzukapselnden Gewebe, Organellen oder Zellen werden in an sich bekannter Weise in fein verteilter Form hergestellt und in einem für die Aufrechterhaltung und das Fördern der vor sich gehenden metabolischen Prozesse des in Frage stehenden Gewebes geeigneten, wässrigen Medium suspendiert. Für diesen Zweck geeignete Medien sind im Handel zugänglich. Der mittlere Durchmesser des einzukapselnden Materials kann weitgehend zwischen weniger als 1 Mikron und mehreren Millimetern schwanken. Langerhans-Inseln von Menschen und Tieren besitzen im allgemeinen einen Durchmesser von 140 bis 200 Mikron. Gewünschensfalls kann man selbstverständlich individuelle Zellen, wie z. B. Pankreas-B-Zellen, -A-Zellen, -D-Zellen oder verschiedene Mischungen davon, ganze Langerhans' Inseln, individuelle Hepatozyten, Organellen oder andere Gewebeeinheiten inkapseln. Auch Mikroorganismen sowie nichtlebende

Materialien, wie z. B. biologische Materialien, können eingekapselt werden.

Die Dauer der Lebensfähigkeit solcher lebenden Bestandteile hängt unter anderem von der Zugänglichkeit der erforderlichen Nährstoffe, dem Sauerstofftransfer, der Abwesenheit toxischer Substanzen im Medium und vom pH-Wert des Mediums ab. Bisher war es nicht möglich, solche lebende Materialien in einer physiologisch verträglichen Umgebung bei gleichzeitiger Einkapselung beständig zu erhalten. Das Problem lag darin, dass die für die Membranbildung erforderlichen Bedingungen für das Gewebe tödlich oder schädlich waren. Es bestand keine Methode zur Membranbildung bei Anwesenheit eines in gesundem Zustande lebensfähigen Gewebes. Es wurde nun festgestellt, dass gummiartige, wasserlösliche Substanzen, welche mit dem lebenden Gewebe physiologisch verträglich sind und unter Bildung einer Form beibehaltenden, kohärenten Masse in einen wasserunlöslichen Zustand übergehen können, zur Bildung einer «temporären Kapsel» oder einer Schutzschicht um die Gewebepartikel verwendet werden können. Solche Materialien werden vorzugsweise bei niedriger Konzentration dem Gewebekulturmedium zugesetzt. Die Lösung wird hierauf zu Tropfen verformt, welche neben dem Aufrechterhaltungsmedium Gewebe enthalten, worauf die Lösung unmittelbar in einen wasserunlöslichen Zustand übergeführt und mindestens an der Oberflächenschicht geliert wird. Hierauf werden die die Form beibehaltenden temporären Kapseln mit einer permanenten, semipermeablen Membran ausgerüstet. In jenen Fällen, in denen das zur Bildung der temporären Kapseln verwendete Material dies zulässt, kann der Kapselinhalt nach der Bildung der permanenten Membran erneut verflüssigt werden. Dies geschieht durch erneutes Zustandebringen solcher Bedingungen im Medium, bei welchen das Material löslich ist.

Das zur Bildung der temporären Kapseln verwendete Material kann ein beliebiges nichttoxisches, wasserlösliches, gummiartiges Material sein, welches durch Verändern der Umgebungstemperatur, des pH-Wertes oder der ionischen Umgebung oder der Konzentration in eine die Form beibehaltende Masse übergeführt werden kann. Bevorzugterweise enthält dieses Material mehrere, leicht ionisierbare Gruppen, wie z. B. Carboxyl- oder Aminogruppen, welche unter Salzbildung mit Polymeren, welche mehrere Gruppen enthalten, die unter Bildung von entgegengesetzten Ladungen ionisierbar sind, reagieren können. Wie weiter unten erläutert wird, erlaubt diese Art von Materialien die Entstehung einer permanenten Membran mit gewünschter Porosität und eine vorbestimmte in vivo-Lebensdauer in den Oberflächenschichten der temporären Kapsel.

Die zur Bildung der temporären Kapseln bevorzugten Materialien sind wasserlösliche, natürliche oder synthetische Polysaccharidmassen. Solche Materialien sind im Handel zugänglich. Dabei handelt es sich vorwiegend um aus vegetabilischen Materialien extrahierte Substanzen, wie sie häufig als Zusatzstoffe zu verschiedenen Nahrungsmitteln eingesetzt werden. Natriumalginat gilt als besonders bevorzugtes wasserlösliches Material. Andere verwendbare, gummiartige Materialien sind Guar gummi, Gummi-arabikum, Carrageenan, Pektin, Tragant gummi, Xanthan gummi oder deren saure Fraktionen.

Diese Materialien enthalten glucosidvernetzte Saccharidketten. Viele dieser Materialien enthalten freie saure Gruppen, die häufig in Form von Salzen mit Alkalimetallionen, z. B. Natrium, vorhanden sind. Wird ein mehrwertiges Ion, z. B. Calcium oder Strontium, durch ein Alkalimetallion ausgetauscht, so werden die flüssigen, wasserlöslichen Polysaccharidmoleküle «vernetzt», und zwar unter Bildung eines wasserunlöslichen, seine Form beibehaltenden Gels, das

nach der Entfernung der Ionen durch Ionenaustausch oder mit Hilfe eines Sequestriermittels wiederum löslich gemacht werden kann. Im wesentlichen lassen sich beliebige mehrwertige, Salze bildende Ionen einsetzen. Vorzugsweise wird man physiologisch verträgliche Ionen, wie z. B. Calcium, verwenden. Dadurch wird das Halten des Gewebes im lebenden Zustande begünstigt. Für weniger empfindliche Materialien können auch andere mehrwertige Kationen eingesetzt werden.

Andere gummiartige Materialien können durch Verändern des pH-Wertes des Mediums, in welchem sie gelöst sind, aus dem wasserlöslichen in den gelierten, wasserunlöslichen Zustände übergeführt werden und umgekehrt.

Eine typische Lösungszubereitung aus Gewebe-Gewebe-medium-Gummimasse besteht aus gleichen Volumina Gewebe in seinem Medium und einer 1 bis 2%-igen Lösung des gummiartigen Materials in physiologischer Kochsalzlösung. Bei Verwendung von Natriumalginat wird mit Erfolg eine 1,0 bis 1,5%-ige Lösung verwendet.

Beim Einkapseln von gegen Temperatureinflüsse widerstandsfähigen Materialien kann man Gelatine oder Agar zur Bildung der temporären Kapseln verwenden. Diese Materialien lassen sich durch Injektion in eine niedrige Temperatur aufweisenden Umgebung gelieren. Andere wasserlösliche Substanzen, wie z. B. Hydroxyäthylmethacrylat, können ebenfalls verwendet werden.

In der nächsten Stufe des Einkapselungsverfahrens wird die das Gewebe enthaltende gummiartige Lösung zu Tröpfchen gewünschter Grösse verformt. Hierauf werden die Tröpfchen unmittelbar zu die Form beibehaltenden sphärischen oder spheroidischen Massen geliert. Eine für die Durchführung dieser Arbeitsstufen verwendbare Vorrichtung ist in der beiliegenden Zeichnung BC veranschaulicht. Ein eine wässrige Lösung mit mehrwertigem Kation, z. B. eine 1,5%ige Calciumchloridlösung, enthaltender Becher 10 wird mit einem magnetischen Rührstab 11 und einem Rührwerk 12 ausgerüstet. Der Rührmechanismus wird so betätigt, dass ein Wirbel 14 mit einem hohlen Zentrum 16 entwickelt wird. Ein Kapillarrohr 18 mit bestimmtem Innendurchmesser wird innerhalb des Hohlbereiches 16 des Wirbels angeordnet und mit einem Vibrator 20 ausgerüstet. Die das Gewebe und das gelöste, gummiartige Material enthaltende Suspension wird durch die Kapillare zugeführt. Die Wirkung der Oberflächenspannung, welche die Bildung von verhältnismässig grossen Tropfen mit sich bringen würde, wird mit Hilfe des Vibrators so verringert, dass Tröpfchen, wie durch 22 erläutert, von einer mit dem Innendurchmesser des Kapillarrohres vergleichbaren Grösse aus der Spitze des Kapillarrohres weggeschüttelt werden. Diese Tröpfchen kommen unmittelbar mit der Lösung in Berührung, wobei die Calciumionen absorbieren. Daraus ergibt sich eine «Quervernetzung» des Gels und die Bildung einer die Form behaltenden, hochviskosen, schützenden Temporärkapsel, welche das suspendierte Gewebe und sein Medium enthält. Die Kapseln werden in der Lösung als separate Phase gesammelt und durch Ansaugen abgetrennt.

Gemäss einer Ausführungsform des Verfahrens wird eine kleine Menge des Polymers der für das permanente Quervernetzen des gummiartigen Materials verwendeten Art gleichzeitig mit den mehrwertigen Ionen und der Lösung (oder einer das verwendete gummiartige Material zu gelieren vermögenden anderen Lösung) einbezogen. Daraus ergibt sich die Bildung von permanenten Vernetzungen. Kapseln dieser Art besitzen gewisse Vorteile, wenn es darum geht, das Gewebe möglichst beständig zu erhalten.

Bei der nächsten Arbeitsstufe wird eine semipermeable Membran um die Oberfläche der temporären Kapseln gebildet. Zur Bewirkung dieses Effektes kann man sich verschiede-

ner bekannter Methoden bedienen. So kann man beispielsweise Grenzflächenpolymerisationstechniken anwenden. Bei der Grenzflächenpolymerisation bringt man ein Paar mindestens difunktionaler, miteinander reaktionsfähiger Monomere oder ein Monomer und ein relativ niedrigmolekulares Polymer, von denen eines in polaren Lösungsmitteln, wie z. B. Wasser, und das andere in hydrophoben Lösungsmitteln, wie z. B. Hexan, löslich ist, an der Grenzfläche einer Emulsion vom Wasser-in-Öltypus zur Umsetzung. Gemäss dem in der obigen amerikanischen Patentschrift genannten Verfahren wird das einzukapselnde Material in Wasser zusammen mit der wasserlöslichen Reaktionskomponente suspendiert oder gelöst, die wässrige Phase in einem hydrophoben Lösungsmittel emulgiert und das komplementäre Monomer der kontinuierlichen Phase des Systems so zugegeben, dass eine Polymerisation an den wässrigen Tröpfchen stattfindet. Durch Steuern der Beschaffenheit des kontinuierlichen Phasenlösungsmittels und der Konzentration des darin vorhandenen Reaktionsmittels ist es möglich, die Porengrösse zu steuern und semipermeable Mikrokapseln zu bilden.

Diese Arbeitsweise kann erfindungsgemäss dann eingesetzt werden, wenn das wasserlösliche Reaktionsmittel in einer wässrigen Lösung gelöst und die Lösung dazu verwendet wird, um die temporären Kapseln zu suspendieren. Diese flüssige Suspension wird hierauf beispielsweise in Hexan oder einer Mischung von Hexan und Chloroform emulgiert. Das komplementäre Monomer wird hierauf, vorzugsweise in nacheinander zugesetzten Portionen, hinzugegeben, um die Grenzflächenpolymerisation an der Oberfläche der wässrigen Tröpfchen zu erzielen. Wegen der das suspendierte Gewebe umgebenden gelierten Masse aus Polysaccharid und insbesondere dann, wenn als wasserlöslicher Reaktionspartner in geeigneter Weise gepufferte, polyfunktionelle Aminogruppen enthaltende Polymere, wie z. B. gewisse Proteine, verwendet werden, erfolgt das Verfahren derart, dass das Gewebe die Einkapselung in lebensfähigem Zustande überlebt. Zu den für die Bildung von Membranen mit polyfunktionellen Aminen brauchbaren Substanzen gehören Disäuren, Disäurehalogenide und multifunktionelle Sulfonylhalogenide. Ausser den Polyamiden können auch Diamine, Polyole und Dirole verwendet werden. Mehrere Aminogruppen enthaltende Moleküle können ebenfalls mit Glutaraldehyd unter Bildung einer Membran vernetzt werden. Eine andere wertvolle Methode zur Membranbildung ist die Grenzflächenpolymerisation unter Anwendung von Polyadditionsreaktionen. In diesem Falle reagieren beispielsweise an den Oberflächenschichten der temporären Kapseln absorbierte multifunktionelle Amine mit Epichlorhydrin, epoxydierten Polyestern oder Diisocyanat.

Die in der beiliegenden Zeichnung als Stufe D wiedergegebene bevorzugte Methode zur Bildung der Membran ist die permanente Vernetzung der Oberflächenschichten der Tröpfchen, indem man sie mit einer wässrigen Lösung eines Polymers behandelt, welches Gruppen enthält, die mit funktionellen Gruppen in den Gelmolekülen zu reagieren vermögen. Gewisse langkettige quaternäre Ammoniumsalze lassen sich unter gewissen Umständen für diesen Zweck verwenden. Verwendet man saure gummiartige Materialien, so kann es sich um Polymere handeln, welche saure reaktionsfähige Gruppen enthalten, wie z. B. Polyäthylenimin und Polylysin. In diesen Fällen werden die Polysaccharide durch Reaktion der Carboxylgruppen mit den Amingruppen quervernetzt. Die Durchlässigkeit lässt sich durch Wahl des Molekulargewichtes des Vernetzungspolymers steuern. So wird beispielsweise eine Lösung eines Polymers mit niedrigem Molekulargewicht in einer bestimmten Zeitdauer stärker in die temporären Kapseln eindringen als ein Polymer mit hohem

Molekulargewicht. Das Eindringungsausmass des vernetzen-  
den Mittels entspricht der erreichbaren Permeabilität. Im all-  
gemeinen werden die Porengrößen mit zunehmendem Mole-  
kulargewicht und geringerer Durchdringung grösser sein. Im  
allgemeinen lassen sich Polymere mit einem Molekularge-  
wicht von 3000 bis 100 000 Dalton oder mehr je nach der  
Reaktionsdauer, der Konzentration der Polymerlösung und  
dem gewünschten Durchlässigkeitsausmass verwenden. Eine  
Art erfolgreicher Umsetzungsbedingungen besteht in der  
Verwendung von Polylysin mit einem durchschnittlichen  
Molekulargewicht von ungefähr 35 000 Dalton bei einer Re-  
aktionsdauer von 2 Minuten und unter Rühren einer physio-  
logischen Kochsalzlösung, welche 0,0167% Polylysin ent-  
hält. Für das Steuern der Durchlässigkeit geeignete, optima-  
le Reaktionsbedingungen für ein gegebenes System lassen  
sich leicht empirisch bestimmen.

Die Wahl des Vernetzungsmittels bzw. der Vernetzungsmittel  
bestimmt gleichfalls die in vivo-Verweilzeit der Kapseln.  
Im oben beschriebenen System umfasst die permanente  
Kapselmembran ein entweder mit einem Polypeptid und/  
oder Protein, z. B. Polylysin, oder einer synthetischen Sub-  
stanz, wie z. B. Polyäthylenimin, vernetztes Polysaccharid  
(eine leicht injizierbare Substanz). Die Polymeren schwanken  
je nach dem, wie sie in vivo dispergiert werden können. Ge-  
wisse Polymere, wie z. B. Protein, lassen sich leicht digerieren,  
während andere sich leicht zersetzen und noch andere  
unverändert bleiben. Das erfindungsgemässe Verfahren  
macht sich eine Quervernetzung mit einem oder mehreren  
Polymeren zunutze, um auf diese Weise Kapseln zu erzeugen,  
welche einen bestimmten Auflösungsgrad in vivo auf-  
weisen, wobei dieser Auflösungsbereich im allgemeinen zwi-  
schen einigen Stunden oder Tagen liegt, um endgültig zu  
sein. Nachstehend findet sich ein Beispiel darüber, wie Kapseln  
erzeugt werden, welche mindestens ungefähr 2 Monate  
innerhalb der Bauchhöhle von Ratten intakt bleiben. Die Er-  
findung sei aber keineswegs auf diese bestimmten Kapsel-  
membranen oder auf Kapseln mit einer derartigen in vivo-  
Laufzeit eingeschränkt. Die optimale in vivo-Lebensdauer  
der Mikrokapseln hängt nämlich vom beabsichtigten Zweck  
und Gebrauch und von der Stelle der Implantation ab. Der  
Fachmann weiss, wie er Mikrokapseln empirisch mit einer  
bestimmten in vivo-Lebensdauer herstellen kann.

In diesem Zeitpunkte der Einkapselung kann man die  
Kapseln, welche eine permanente semipermeable Membran  
aufweisen, welche eine gelierte Lösung eines gummiartigen  
Materials, ein mit dem Gewebe verträgliches Kulturmedium  
und Gewebepartikel umhüllt, sammeln. Soll das Gewebe in  
einer Schutzumgebung bloss aufbewahrt werden, so braucht  
man keine weiteren Schritte einzuleiten. Ist aber innerhalb  
der Kapseln und durch die Membranen hindurch ein Transfer  
der Masse vorzunehmen, so ist es vorteilhaft, das Gel  
wiederum in seine wasserlösliche Form zu verflüssigen. Dies  
kann dadurch geschehen, dass man die Bedingungen, unter  
welchen das gummiartige Material eine Flüssigkeit ist, wieder  
herstellt, indem man beispielsweise den pH-Wert des  
Mediums verändert oder die verwendeten Calcium- oder anderen  
mehrwertigen Kationen entfernt. In den in Gegenwart  
von mehrwertigen Kationen unlöslichen Gelen kann man  
das Medium in der Kapsel durch blosses Eintauchen der  
Kapseln in eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung,  
welche Alkalimetallionen und Wasserstoffionen enthält, wie-  
derum auflösen. Einwertige Ionen führen zu einem Aus-  
tausch mit den Calciumionen oder anderen mehrwertigen  
Ionen innerhalb des gummiartigen Materials, wenn, wie dies  
durch Fig. E der beiliegenden Zeichnung ersichtlich ist, die  
Kapseln unter Rühren in die Lösung eingetaucht werden.  
Für den gleichen Zweck kann man auch andere Salze, wie  
z. B. Natriumzitat, verwenden.

Je nach der Art der verwendeten Technik für die Herstel-  
lung der semipermeablen Membran kann es schliesslich  
wünschenswert sein, die Kapseln so zu behandeln, dass freie  
Aminogruppen oder ähnliche Gruppen, welche ansonsten  
den Kapseln eine Neigung zur Klumpenbildung geben könn-  
ten, gebunden werden. Dies kann beispielsweise durch Ein-  
tauchen der Kapseln in eine Natriumalginatlösung gesche-  
hen.

Die Erfindung ermöglicht, wie dies bereits erwähnt wor-  
den ist, die Injektion von eingekapseltem, fein verteiltem Ge-  
webe, von mehrzelligen Fraktionen davon oder von indivi-  
duellen Zellen in eine bestimmte Stelle eines tierischen oder  
menschlichen Körpers zum Zwecke, diesen Körper wenig-  
stens temporär mit der dem Gewebe eigenen physiologischen  
Funktion zu versehen. Dies bringt die beiden folgenden Vor-  
teile mit sich, nämlich man braucht nicht zu einer chirurgi-  
schen Implantation zu greifen (obgleich die Kapseln ge-  
wünschtenfalls auch chirurgisch implantiert werden können)  
und man vermeidet mit Erfolg die Probleme der Immunre-  
aktion und der natürlichen physikalischen Abstossung. Die  
Kapselmembranen werden vorzugsweise aus Substanzen be-  
stehen, welche nach der Verwertung des Gewebes abgestos-  
sen werden. Wie bereits oben erwähnt worden ist, kann dies  
durch Verwendung eines Quervernetzers erfolgen, welcher  
einem in vivo-Zusammenbruch widersteht, wodurch eine  
wertvolle in vivo-Lebensdauer erreicht wird.

Aus den obigen Ausführungen geht hervor, dass das er-  
findungsgemässe Einkapselungsverfahren (und die darauf  
beruhende Implantationstechnik) unter Verwendung einer  
grossen Zahl von Reaktionsmitteln und eingekapselten Ma-  
terialien durchgeführt werden kann, wobei man, ohne vom  
Erfindungsgedanken abzugehen, diese Methoden stark vari-  
rieren kann.

Die nachstehenden Beispiele sollen die Erfindung näher  
erläutern, ohne sie einzuschränken.

#### Beispiel 1

Langerhans-Inseln wurden aus Rattenpankreas gewon-  
nen und einer kompletten Gewebekultur (CMRL-1969 Con-  
naught Laboratories, Toronto, Canada) bei einer Konzen-  
tration von ungefähr  $10^3$  Inseln pro ml hinzugegeben. Die  
Gewebekultur enthielt sämtliche für eine kontinuierliche Le-  
befähigkeit der Inseln sowie der Aminosäuren, welches  
durch die B-Zellen für die Herstellung von Insulin verwendet  
wurden, erforderlichen Nährstoffe. Vier Zehntel eines Milli-  
liters der Inselnsuspension wurde hierauf zu einhalb Milliliter  
1,2%-igem Natriumalginat (Sigma Chemical Company) in  
physiologischer Kochsalzlösung hinzugegeben.

Hierauf wurden 80 ml einer 1,5%-igen Calciumchloridlö-  
sung in einen 150 ml Becher, welcher mit einem Rührwerk  
versehen ist, eingebracht und so gerührt, dass die Bildung ei-  
nes Wirbels, welcher im Zentrum einen konisch geformten  
Hohlraum bildet, erzeugt wurde. Hierauf wurde ein Kapil-  
larrohr aus Glas mit allmählich abnehmendem Durchmesser  
und in einer Spitze mit einem inneren Durchmesser von un-  
gefähr  $300 \mu$  endend mit einem Vibrationsgerät (60 Umdre-  
hungen pro Sekunde) ausgerüstet. Die Kapillarspitze wurde  
hierauf in das Zentrum des Wirbels eingesetzt, das Vibra-  
tionsgerät eingeschaltet und die aus Natriumalginat, Kultur-  
medium und Gewebe bestehende Suspension mit einer Infu-  
sionspumpe hindurchgezogen. Von der Spitze des Kapillar-  
rohrs wurden auf diese Weise Tröpfchen mit einem Durch-  
messer von 300 bis 400 Mikron ausgestossen und sofort in  
die Calciumlösung eingeführt.

Nach Ablauf von 10 Minuten wurde der Rührer abge-  
stellt und die obenauf fliessende Lösung durch Ansaugen  
entfernt. Die gelierten Kapseln wurden hierauf in einen Be-  
cher übertragen, welcher 15 ml einer Lösung enthielt, welche

aus 1 Teil einer 2%-igen 2-(Cyclohexylamino)-äthansulfonsäurelösung in 0,6%-igem Natriumchlorid (isotonisch, pH = 8,2), verdünnt mit 20 Teilen 1%-igem Calciumchlorid, bestand. Nach 3 minütigem Eintauchen wurden die Kapseln zweimal in 1%-iger Calciumchloridlösung gewaschen.

Die Kapseln wurden hierauf in eine 32 ml Lösung eingebracht, welche 1:80 1%-iges Polylysin (durchschnittliches Molekulargewicht 35 000 atomare Masseneinheiten) in physiologischer Kochsalzlösung enthielt. Nach 3 Minuten wurde die Polylysinlösung dekantiert. Die Kapseln wurden hierauf mit 1%-iger Calciumchloridlösung gewaschen und erneut während 3 Minuten in einer Lösung von Polyäthylenimin (Molekulargewicht 40 000 bis 60 000), erhalten durch Verdünnen einer 3,3%-igen Polyäthyleniminlösung in Morpholino-propansulfonsäure-Pufferlösung (0,2 molar, pH = 6) mit genügend 1%-iger Calciumchloridlösung, um letztendlich eine Polymerkonzentration von 0,12% zu erhalten, suspendiert. Die so erhaltenen Kapseln, welche permanente semipermeable Membranen enthielten, wurden hierauf zweimal mit 1%-iger Calciumchloridlösung und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann mit 10 ml einer 0,12%-igen Alginsäurelösung vermischt.

Diese Kapseln widerstanden einer Klumpenbildung, wobei manche der Kapseln in wahrnehmbarer Weise Langerhans-Inseln zeigten. Das in den Kapseln vorhandene Gel wurde durch Eintauchen der Kapseln in eine Mischung einer Kochsalzlösung und Citratpufferlösung (pH = 7,4) während 5 Minuten erneut flüssig gemacht. Schliesslich wurden die Kapseln in einem CMLR-69-Medium suspendiert.

Unter dem Mikroskop betrachtet, zeigen diese Kapseln das in der beiliegenden Zeichnung wiedergegebene Aussehen. Sie besitzen eine äusserst dünne Membran 24, welche eine Insel 26 umschliesst, worin einzelne Zellen 28 festgestellt werden können. Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zu ungefähr 100 000 können durch die Membran 24 hindurchgehen. Auf diese Weise können Sauerstoff, Aminosäuren, Nährstoffe und Plasmakomponenten, welche in den Kulturmedien verwendet werden (z. B. fötale Kalbplasmakomponenten), die Inseln erreichen und eine Exkretion vom Insulin ermöglichen.

#### Beispiel 2

Nach wiederholtem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung wurden nach dem Beispiel 1 erhaltene Mikrokap-  
seln, welche ungefähr 15 Inseln aufwiesen, in 3 ml CMRL-  
1969 suspendiert. Nach Ablauf von 8 Tagen in Gegenwart  
von 600 mg/dl Glucose haben die Kapseln 67 Einheiten/ml  
Insulin in 1 1/2 Stunden abgesondert. Bei einem zweiten An-  
lauf wurden in der gleichen Zeitspanne 68 Einheiten/ml In-  
sulin erzeugt. Einwöchige Kapseln im gleichen Medium, je-  
doch in Gegenwart von 100 mg/dl Glucose ergaben im ersten  
Anlauf einen Ausstoss von 25 Einheiten/ml Insulin in 80 Mi-  
nuten und im zweiten Anlauf einen solchen von 10 Einhei-  
ten/ml.

#### Beispiel 3

Diabetes-Ratten mit Blutglucosespiegeln im Bereiche  
von 500 bis 700 mg/dl wurden jeweils mit ungefähr  $10^3$  In-  
seln, welche gemäss Angaben gemäss Beispiel 1 eingekapselt  
und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert worden  
waren, behandelt. Die Kapseln wurden durch Injektion in  
die Bauchhöhle mit Hilfe von 19 Nadeln, die mit einer Sprit-  
ze versehen waren, eingeführt. Die Blutzuckerspiegel wurden  
täglich gemessen und waren gleichmässig auf einem Wert  
von weniger als 300 mg/dl. Nach 2 Monaten getötete Tiere  
zeigten keine Zeichen irgendeiner toxischen Reaktion an der  
Implantationsstelle. Die Kapseln wurden aus den getöteten  
Tieren nach 2 monatiger Lebensdauer in vivo intakt ent-  
nommen und zeigten keine Anzeichen der Zersetzung.

#### Beispiel 4

##### Einkapselung von Hepatozyten

Es wurde wie beim Beispiel 1 gearbeitet mit dem Unter-  
schied, dass 0,5 ml einer Leberzellensuspension in einer  
Hank' Lösung anstelle der 0,4 ml Insel-Suspension verwen-  
det wurden. Die Lebefähigkeit des Lebergewebes wurde  
durch Farbstoffausschlusstechnik (Trypanblauausschluss)  
demonstriert. Bekanntlich kann Lebergewebe in vitro aus  
der Umgebung Toxine aufnehmen. Daher werden Toxine  
mit genügend niedrigem Molekulargewicht, um durch die se-  
mipermeable Membran hindurchzugehen, aufgenommen  
und durch das Gewebe zerstört. Im wesentlichen sind sämtli-  
che durch die Leber behandelten Toxine niedrigmolekulare  
Materialien. Die Toxine können aber Proteinkomplexe bil-  
den. Die Kapselpermeabilität kann je nach Notwendigkeit  
schwanken.

#### Beispiel 5

Die Arbeitsweise von Beispiel 1 wurde wiederholt mit  
dem Unterschied, dass Aktivkohle in Partikelform direkt in  
der Natriumalginatlösung suspendiert wurde, wobei die  
0,5 ml Gewebesuspension weggief und Polylysin mit einem  
durchschnittlichen Molekulargewicht von 35 000 als Vernet-  
zungsmittel verwendet wurde. Solange die Kohlepartikel  
kleiner waren als die kleinsten inneren Durchmesser der für  
die Tröpfchenbildung verwendeten Kapillare ergab sich  
Kohle von hoher Oberfläche, umgeben durch eine semiper-  
meable Membran. Diese Tröpfchen verhinderten in wirksa-  
mer Weise das Entweichen von Kohleteilchen oder -staub,  
konnten aber zum Absorbieren von Materialien mit mittlere-  
rem Molekulargewicht von bis zu ungefähr 2000 Dalton aus  
der Flüssigkeit, welche die Kapseln passierte, Verwendung  
finden.

Das vorliegende Verfahren lässt sich auch mit anderen le-  
benden Zellen, einschliesslich roter Blutzellen unter Verwen-  
dung von Serum als Medium, Spermienzellen unter Verwen-  
dung von Samen als Medium und Baker' Hefe verwenden.  
Der Fachmann wird es schätzen, dass viele andere Materia-  
lien ausser den oben erwähnten eingekapselt werden können  
und dass die Durchlässigkeit je nach Anwendungsgebiet ge-  
steuert werden kann.

