(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 512 T2** 2005.05.12

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 627 912 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 512.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/01776**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 907 078.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/016687**
(86) PCT-Anmeldetag: **01.03.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.09.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.12.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.05.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.05.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 9/50**
A61K 9/16, A61L 27/00, C12N 11/04

(30) Unionspriorität:

843485	**28.02.1992**	**US**
870540	**20.04.1992**	**US**
958870	**07.10.1992**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Board of Regents, The University of Texas System, Austin, Tex., US

(74) Vertreter:
Andrae Flach Haug, 83022 Rosenheim

(72) Erfinder:
HUBBELL, Jeffrey A., Austin, US; PATHAK, Chandrashekhar P., Waltham, US; SAWHNEY, Amarpreet S., Newton, US; DESAI, Neil P., Los Angeles, US; HILL, Jennifer L., Austin, US; HOSSAINY, Syed F.A., Austin, US

(54) Bezeichnung: **GELE ZUR VERKAPSELUNG VON BIOLOGISCHEN MATERIALIEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Beschichtung und/oder Verkapselung von Oberflächen und dreidimensionalen Objekten mit Netzwerken aus wasserlöslichen Polymeren.

[0002] Die Mikroverkapselungstechnologie bietet der Medizin auf vielen Gebieten große Möglichkeiten. Einige wichtige Anwendungen sind z.B. die Verkapselung von Zellen für die Behandlung des Diabetes (Lim, F., Sun, A.M., „Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas", (1980) Science 210: 908–910), die Verkapselung von Hämoglobin für den Ersatz von roten Blutzellen sowie die verzögerte Freisetzung von Arzneimitteln. Beim Einsatz der Techniken nach dem bisherigen Stande der Technik werden die Materialien, die verkapselt werden sollen, jedoch häufig Verarbeitungsbedingungen ausgesetzt, einschließlich von Wärme, organischen Lösemitteln und nicht-physiologischen pH-Werten, die Zellen abtöten oder in ihrer Funktion beeinträchtigen oder Proteine denaturieren können, was zu einem Verlust der biologischen Aktivität führt. Weiterhin beschränken, selbst wenn die Zellen die Verarbeitungsbedingungen überleben, die strengen Anforderungen, die hinsichtlich der Biokompatibilität, der chemischen Stabilität, des Schutzes vor dem Immunsystem und der Widerstandsfähigkeit gegen eine Überwachsung durch die Zellen an die Verkapselungsmaterialien gestellt werden müssen, die Anwendbarkeit der Verfahren nach dem bisherigen Stand der Technik.

[0003] Zum Beispiel bietet das Verkapselungsverfahren, das auf der ionischen Vernetzung von Alginat (einem Polyanion) mit Polylysin oder Polyornithin (Polykationen) beruht (Goosen et al., (1985) Biotechnology and Bioengineering 27: 146), relativ milde Verkapselungsbedingungen, aber die langfristige mechanische und chemische Stabilität derartiger ionisch vernetzter Polymere erscheint zweifelhaft. Darüber hinaus können diese Polymere, wenn sie in vivo implantiert werden, von den Zellen überwachsen werden (McMahon et al., (1990) J. Nat. Cancer Inst. 82(22): 1761–1765), was mit der Zeit die Durchlässigkeit der Mikrokapsel für Nährstoffe, Metaboliten und Transportproteine aus der Umgebung einschränkt. Das hat zum Nährstoffmangel und zum Absterben verkapselter Langerhansscher Inseln geführt (O'Shea, G. M. et al. (1986) Diabetes, 35: 943–946).

[0004] Es besteht somit weiterhin ein Bedarf an einem relativ milden Verfahren zur Zellverkapselung, das eine Steuerung der Eigenschaften des verkapselnden Polymers ermöglicht und in Gegenwart von Zellen zu Membranen führt, die selektiv bezüglich der Permeabilität, chemisch stabil und äußerst biokompatibel sind. Ein ähnlicher Bedarf besteht bezüglich der Verkapselung biologischer Materialien, die keine Zellen und Gewebe sind, sowie von Materialien, die mit biologischen Materialien in Berührung kommen.

[0005] Materialien werden als biokompatibel angesehen, wenn das Material entweder eine reduzierte spezifische humorale oder zelluläre Immunantwort hervorruft, oder wenn es keine unspezifische Reaktion auf einen Fremdkörper hervorruft, die das Material daran hindert, die vorgesehene Funktion auszuüben, und wenn das Material nach einer oralen Aufnahme oder nach einer Implantation nicht toxisch ist. Das Material darf auch keine spezifische Reaktion, wie eine Thrombose, hervorrufen, wenn es sich in Kontakt mit dem Blut befindet.

[0006] Von Gelen, die aus Polymeren hergestellt wurden, die in Wasser unter Bildung eines Hydrogels quellen, wie Poly(hydroxyethylmethacrylat) (Poly(HEMA)), wasserunlöslichen Polyacrylaten und Agarose, wurde gezeigt, dass sie für die Verkapselung von Inseln und anderem tierischen Gewebe nützlich sind (Iwata et al., (1989) Diabetes 38: 224–225; Lamberti et al., (1984) Appl. Biochem. Biotech. 10: 101–105). Allerdings haben diese Gele unerwünschte mechanische Eigenschaften. Agarose bildet ein schwaches Gel, und die Polyacrylate müssen aus organischen Lösemitteln gefällt werden, die potenziell zytotoxisch sind. Dupuy et al. (1988) haben über die Mikroverkapselung von Inseln durch die Polymerisation von Acrylamid unter Bildung von Polyacrylamidgelen berichtet. Allerdings erfordert der Polymerisationsprozess die Gegenwart toxischer Monomere wie Acrylamid und von Quervernetzern, und sie erzeugt, wenn man sie schnell vollständig ablaufen lässt, lokal Wärme.

[0007] Mikrokapseln, die durch die Koazervierung von Alginat und Poly-L-lysin gebildet wurden, haben sich als immunprotektiv erwiesen, wie es beispielsweise von O'Shea et al., 1986, beschrieben wurde. Es wurde allerdings eine schwerwiegende fibröse Überwachsung dieser Mikrokapseln nach der Implantation beobachtet (McMahon et al., 1990; O'Shea et al., 1986). Die Verwendung von Poly(ethylenoxid) (PEO) zur Erhöhung der Biokompatibilität ist in der Literatur gut dokumentiert. Es wurde berichtet, dass die Biokompatibilität von Mikrokapseln aus Algin-poly(L-Lysin) durch die Einarbeitung eines Pfropfcopolymers von PLL und PEO auf der

Oberfläche der Mikrokapsel beträchtlich verbessert wurde (Sawhney et al., „Poly(ethylene oxide)-Graft-Poly-L-lysine) Copolymers to Enhance the Biocompatibility of Poly-L-lysine)-Alginate Microcapsule Membranes," (1991) Biomaterials 13: 863–870).

[0008] Die PEO-Kette ist sehr gut wasserlöslich und sehr flexibel. PEO-Ketten zeigen eine extrem hohe Beweglichkeit in Wasser und haben eine im wesentlichen nicht-ionische Struktur. Die Immobilisierung von PEO auf einer Oberfläche erfolgte im wesentlichen über die Synthese von Pfropfcopolymeren mit PEO-Seitenketten (Sawhney et al.; Miyama et al., 1988; Nagoaka et al.). Dieser Prozess beinhaltet eine an die jeweilige Anwendung angepasste Synthese von Monomeren und Polymeren. Die Verwendung von Pfropfcopolymeren garantiert jedoch immer noch nicht, dass die Oberfläche, die von einem Makromolekül „gesehen" wird, ausschließlich aus PEO besteht.

[0009] Es wurde eine Elektronenstrahlvernetzung zur Synthese von PEO-Hydrogelen eingesetzt, von denen berichtet wurde, dass sie nicht thrombogen sind (Sun et al., (1987) Polymer Prepr., 28: 292–294; Dennison, K. A., (1986) Doktorarbeit, Massachusetts Institute of Technology). Die Verwendung eines Elektronenstrahls schließt es allerdings aus, irgendein lebendes Gewebe in das Polymer einzuschließen, da die Strahlung zytotoxisch ist. Außerdem ist es wegen der durch den Elektronenstrahl induzierten unspezifischen Vernetzung schwierig, die mit diesem Verfahren erzeugten Netzwerke zu charakterisieren.

[0010] Eine Photopolymerisation von PEG-Diacrylaten über eine Initiation durch kurzwelliges ultraviolettes Licht wurde dazu verwendet, Hefezellen für eine Fermentierung und chemische Konvertierung einzuschließen (Kimura et al. (1981), „Some properties of immobilized glycolysis system of yeast in fermentative phosphorylation of nucleotides," Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11: 78–80; Omata et al. (1981), „Steroselectic hydrolysis of dl-methyl succinate by gel-entrapped Rhodotorula minuta uzr. texensis cells in organic solvent", Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11: 199–204; Okada, T. et al., „Application of Entrapped Growing Yeast Cells to Peptide Secretion System", Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 112–116 (1987)). Andere Verfahren zur Verkapselung von Zellen in Materialien, die mit kurzwelligem ultraviolettem Licht photopolymerisierbar sind, wurden auf Mikroorganismen angewendet (Kimura et al, 1981; Omata et al., 1981; Okada et al., 1987; Tanaka et al., 1977; Omata et al., 1979a; Omata et al., 1979b; Chun et al., 1981; Fukui et al., 1976; Fukui et al., 1984). Allerdings sind Hefezellen und einige Bakterienzellen viel härter und widerstandsfähiger gegenüber ungünstigen Umgebungen, erhöhten Temperaturen und kurzwelliger ultravioletter Strahlung als Säugetierzellen und humane Gewebe.

[0011] Das US-Patent Nr. 4 298 002 betrifft ein synthetisches, hydrophiles, Polymermaterial für die Verkapselung von biologisch aktivem Gewebe. Das hydrophile Material ist unlöslich in Wasser, und das biologisch aktive Gewebe wird entweder in eine vorgeformte Kammer aus dem polymeren Material injiziert oder im polymeren Material verteilt, das anschließend polymerisiert wird.

[0012] Mit diesen Verfahren sind mehrere Probleme verbunden, zu denen der Einsatz von Methoden und/oder Materialien gehört, die thrombogen oder instabil in vivo sind oder die Polymerisationsbedingungen erfordern, die dazu neigen, lebendes Säugetiergewebe oder biologisch aktive Moleküle zu zerstören, beispielsweise kurzwellige ultraviolette Strahlung. Zur Verkapselung von lebendem Gewebe für eine Implantation in einen Menschen oder ein anderes Säugetier dürfen die Polymerisationsbedingungen das lebende Gewebe nicht zerstören, und die resultierenden, mit dem Polymer beschichteten Zellen müssen biokompatibel sein.

[0013] Es besteht auch ein Bedarf daran, Materialien im Inneren einer sehr dünnen Materialschicht zu verkapseln, die durchlässig für Nährstoffe und Gase ist, die aber stabil und nicht immunogen ist. Zum Beispiel wurden in der Vergangenheit für die Transplantation von Langerhansschen Inseln die Inseln, die einen Durchmesser von 100 bis 200 Mikrometer haben, in Mikrokügelchen verkapselt, die einen Durchmesser von 400 bis 1000 Mikrometer haben. Dieser große Durchmesser kann zu einer verlangsamten Diffusion von Nährstoffmolekülen und zu großen Transplantationsvolumina führen.

[0014] Es besteht also, um das ganze zusammen zu fassen, ein Bedarf an Materialien sowie Verfahren zu ihrer Verwendung, die zur Verkapselung von Zellen und Geweben oder biologisch aktiven Molekülen verwendet werden können und die biokompatibel sind, keine spezifischen oder unspezifischen Immunreaktionen auslösen und in Kontakt mit lebenden Zellen oder lebendem Gewebe polymerisiert werden können, ohne dass die Zellen geschädigt oder abgetötet werden, und zwar innerhalb eines sehr kurzen Zeitrahmens und in Form einer sehr dünnen Schicht. Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung dieser Materialien in vivo besteht darin, dass sie innerhalb des Zeitrahmens eines kurzen chirurgischen Eingriffes oder ehe sich das Material, das verkapselt werden soll, auflöst, beschädigt wird oder abstirbt, polymerisiert werden können.

[0015] Es ist deshalb ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Polymermaterial bereit zu stellen, das im Kontakt mit lebenden Zellen oder Geweben polymerisiert werden kann, und zwar innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes.

[0016] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Polymermaterial bereit zu stellen, das biokompatibel und widerstandsfähig gegenüber einem Abbau über einen bestimmten Zeitraum ist.

[0017] Es ist noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Polymermaterial bereit zu stellen, das durchlässig für Nährstoffe und Gase ist und trotzdem Zellen und Gewebe vor einem Angriff durch andere Zellen in vivo schützen kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0018] Es wird hier ein Verfahren zur Polymerisation von Makromeren mittels sichtbaren Lichtes oder mittels langwelligen ultravioletten Lichtes (Iw UV-Licht, 320 nm oder darüber) für die direkte oder indirekte Verkapselung oder Beschichtung von lebendem Gewebe mit polymeren Überzügen, die sich an die Oberflächen der Zellen der Gewebe oder deren Träger unter den Bedingungen einer schnellen und milden Polymerisation anpassen, offenbart. Aspekte der Erfindung werden in den beigefügten Ansprüchen 1, 2, 31, 32, 33 und 34 definiert. Die Polymere werden aus nicht-toxischen Präpolymeren, die hier als Makromere bezeichnet werden, gebildet, die wasserlöslich oder im wesentlich wasserlöslich sind und zu groß, als dass sie in die Zellen, die beschichtet werden sollen, diffundieren könnten. Beispiele für die Makromere sind die sehr biokompatiblen PEG-Hydrogele, die schnell in Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff gebildet werden können, und zwar ohne die Verwendung toxischer Polymerisationsinitiatoren, bei Raumtemperatur oder physiologischen Temperaturen und bei physiologischem pH. Die Polymerisation kann mittels nicht-toxischer Farbstoffe initiiert werden, beispielsweise mit Methylenblau oder Eosin Y, die mit sichtbarem Licht oder langwelligem UV-Licht photopolymerisiert werden können. Es können auch andere Farbstoffe verwendet werden, die in die Zellen diffundieren, aber nicht toxisch sind, wie Ethyleosin. Der Prozess ist nicht zytotoxisch, da in Abwesenheit des geeigneten Chromophors nur wenig Licht von den Zellen absorbiert wird. Die Zellen sind für dieses Licht im wesentlichen transparent, im Gegensatz zu kurzwelligem UV-Licht, das von zellulären Proteinen und Nukleinsäuren stark absorbiert wird und zytotoxisch sein kann. Es reichen gewöhnlich für die meisten Makromere niedrige Bestrahlungsintensitäten (5–500 mW) zur Induktion der Polymerisation in einem Zeitraum von Millisekunden bis zu wenigen Sekunden aus. Ein zweiter Grund für das Fehlen einer Zytotoxizität besteht darin, dass die polymerisierbaren Spezies nicht in Zellen diffundieren.

[0019] Die resultierenden Polymere können als semipermeable Membranen wirken, als Klebstoffe, als Gewebeträger, als Stöpsel, als Barrieren zur Veränderung der Wechselwirkung einer Zelle oder eines Gewebes mit einer anderen Zelle oder anderem Gewebe sowie als Träger für bioaktive Spezies. Es kann eine große Vielzahl von Oberflächen mit unterschiedlichen Abmessungen mit einem dreidimensional vernetzten Netzwerk aus diesen polymeren Materialien beschichtet werden. Die Polymere können als eine Matrix für die Bereitstellung biologisch aktiver Materialien, zu denen Proteine, Polysaccharide, organische Verbindungen mit Arzneimittelaktivität und Nukleinsäuren gehören, ausgebildet werden.

[0020] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Polymer zur Bildung einer Schicht auf der Innenseite des Lumens eines Blutgefässes verwendet, entweder für die Bereitstellung einer Stützwirkung, für eine Verhinderung einer Thrombose oder Entzündungsreaktionen an der Oberfläche des Lumens und/oder für die Abgabe therapeutischer Mittel in das Blutgefäss. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Polymer dazu eingesetzt, eine semipermeable Sperre um Zellen herum zu bilden, beispielsweise um Langerhanssche Inseln, um die Zellen durch eine Verhinderung des Durchtretens von Immunglobulinmolekülen oder Zellen zu schützen, während es den freien Durchtritt von Nährstoffen, Gasen oder kleinen Zellprodukten ermöglicht. Derartige behandelte Inseln können für die Behandlung von Krankheiten nützlich sein, die aus Störungen der metabolischen Verarbeitung resultieren, oder von Erkrankungen wie Diabetes, die aus unzureichenden Konzentrationen biologischer Regulatormoleküle resultieren.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0021] Fig. 1 ist ein Reaktionsschema für eine durch Ethyleosin initiierte Polymerisation.

[0022] Fig. 2a ist eine schematische Darstellung einer Farbstoff-initiierten Polymerisation einer PEG-Schicht um Mikrokügelchen aus vernetztem Alginat.

[0023] Fig. 2b ist eine mikroskopische Aufnahme der Mikrokügelchen aus Alginat/Poly-L-lysin, die menschliche Langerhanssche Inseln enthalten, die mittels des in der Fig. 2A dargestellten Farbstoffbindungsverfahrens mit einem Hydrogel aus PEG-18,5K-Tetraacrylat beschichtet wurden.

[0024] Fig. 3 ist eine schematische Darstellung einer Photopolymerisation einer PEG-Beschichtung auf in Mineralöl suspendierten Mikrokügelchen aus Alginat/Poly-L-lysin.

[0025] Fig. 4 ist eine mikroskopische Aufnahme von Langerhansschen Inseln, die aus einem menschlichen Pankreas isoliert und in einem Hydrogel aus PEG-18,5K-Tetraacrylat verkapselt wurden.

[0026] Fig. 5 ist eine schematische Darstellung der Coextrusionsapparatur, die für die Mikroverkapselung mittels Laserpolymerisation verwendet wurde.

[0027] Fig. 6 ist eine mikroskopische Aufnahme von Mikrokügelchen, die über eine Laserpolymerisation von PEG-400-Diacrylat um Zellen herum erzeugt wurden.

[0028] Fig. 7a ist eine mikroskopische Aufnahme von Mikrokügelchen aus Alginat-PLL, die 4 Tage nach einer i.p.-Implantation in Mäuse wiedergewonnen wurden.

[0029] Fig. 7b ist eine mikroskopische Aufnahme von Mikrokügelchen aus Alginat-PLL, die mittels der in Fig. 1 dargestellten Farbstoffdiffusionsmethode mit einem PEG-18,5K-Tetraacrylat beschichtet wurden.

[0030] Fig. 8a–f ist jeweils eine grafische Darstellung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Gelzusammensetzung für die nicht angehafteten Zellen, die über einer Lavage der Bauchfellhöhle von Mäusen erhalten wurden für unterschiedlichen Zusammensetzungen eines PEO-Gels als Überzug: a – 18,5 K; b – 10% 0,5 K, 90% 18,5 k; c – 50% 18,5 K, 50% 0,4 K; d – 10% 0,4 K, 90% 35 K; e – 50% 0,4 K, 50% 35 K; und f – Alginat-Poly-L-lysin (Kontrolle).

[0031] **Fig.** 9 ist eine grafische Darstellung des Proteinanteils (in %), freigesetzt in Abhängigkeit von der Zeit in Minuten, für die Diffusion von Rinderserumalbumin (offene Quadrate), humanes IgG (Dreiecke) und humanes Fibrinogen (ausgefüllte Quadrate) durch ein Gel aus PEO-Tetraacrylat.

[0032] Fig. 10 ist eine grafische Darstellung der Diffusion (in %) von Rinderserumalbumin in Abhängigkeit von der Zeit in Minuten durch Gele aus PEO-400-Diacrylat (offene Quadrate) und PEG-18,5K-Tetraacrylat (Dreiecke).

[0033] Fig. 11a ist eine grafische Darstellung der Länge (in mm) eines mittels einer Argonionenlaser-induzierten Polymerisation unter Verwendung eines Initiationssystems aus einem Amin und Ethyleosin aus Trimethylolpropan gebildeten Gels in Abhängigkeit vom Logarithmus der Zeit (ms).

[0034] Fig. 11b ist eine mikroskopische Aufnahme der als Ergebnis der Laserbestrahlung von ethoxyliertem Trimethylolpropantriacrylat für Zeiträume von 67 ms, 125 ms, 250 ms, 500 ms und 1 s erzeugten Spikes.

[0035] Fig. 12a ist eine mikroskopische Aufnahme menschlicher Vorhautfibroblasten, die 6 Stunden auf einem mit einem Gel aus PEG-Tetraacrylat beschichteten Deckgläschen kultiviert wurden.

[0036] Fig. 12b ist eine mikroskopische Aufnahme menschlicher Vorhautfibroblasten, die 6 Stunden auf einem Glas, das nicht mit PEG beschichtet war, kultiviert wurden.

[0037] Fig. 13 ist eine mikroskopische Aufnahme von Gelen aus PEG-18,5K-Tetraacrylat, die Mäusen implantiert und nach 4 Tagen explantiert wurden und eine sehr geringe fibröse Überwachsung zeigen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0038] Es werden, wie hier beschrieben wird, biokompatible Polymermaterialien für eine Verwendung in direktem Kontakt mit biologisch aktiven Materialien oder Zellen und Gewebe gebildet, und zwar über eine über freie Radikale verlaufende Polymerisation biokompatibler, wasserlöslicher Makromere, die wenigstens zwei polymerisierbare Substituenten aufweisen.

[0039] Diese polymeren Überzugsmaterialien können entweder Homopolymere, Copolymere oder Blockco-

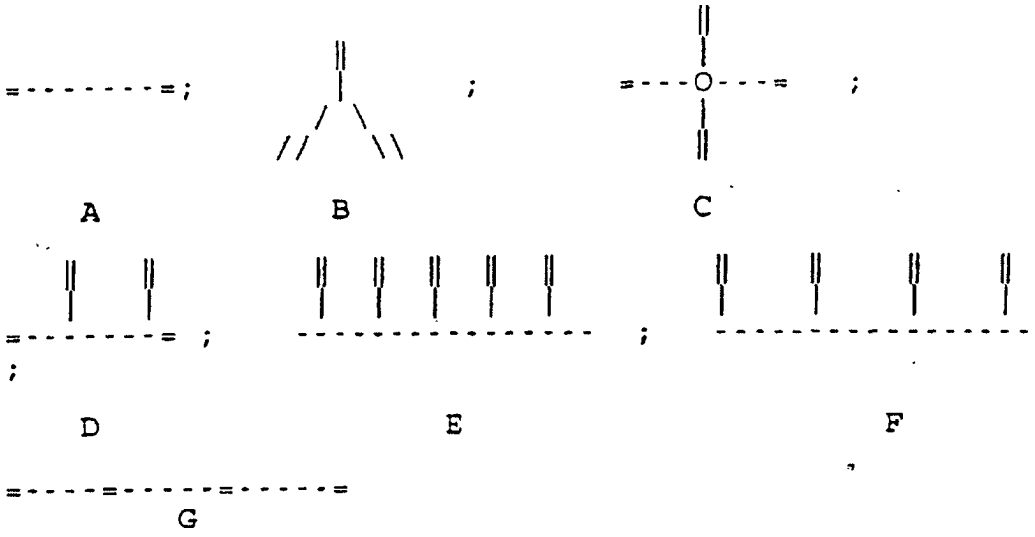
polymere sein. Ein Polymer ist, so wie der Begriff hier verwendet wird, eine gebildete Einheit, die einen Polymerisationsgrad von über 10 hat, und ein Oligomer hat einen Polymerisationsgrad von 2 bis 10, wobei „Polymerisationsgrad" („degree of polymerisation", „d.p.") die Zahl der sich wiederholenden Einheiten in der Struktur bedeutet; z.B. bezieht sich d.p. = 3 auf ein Trimer. Die Polymerisation einer Komponente, die wenigstens zwei polymerisierbare Substituenten aufweist, entspricht einer Gelbildung; die Polymerisation läuft unter Bildung eines dreidimensionalen vernetzten Gels ab.

Präpolymere(Makromere), die für die Herstellung von Gelen nützlich sind

[0040] Die generellen Kriterien für Präpolymere (die hier als Makromere bezeichnet werden), die in Kontakt mit biologischen Materialien oder Zellen polymerisiert werden können, sind die folgenden: sie sind wasserlöslich oder im wesentlichen wasserlöslich, sie können über eine Polymerisation, die über freie Radikale verläuft, weiter polymerisiert oder vernetzt werden, sie sind nicht toxisch, und sie sind zu groß, als dass sie in Zellen diffundieren könnten, d.h. sie haben ein Molekulargewicht von über 200. „Im wesentlichen wasserlöslich" ist hier so definiert, dass es löslich in einer Mischung aus Wasser und einem organischen Lösemittel oder organischen Lösemitteln bedeutet, wobei Wasser den Hauptanteil der Mischung der Lösemittel ausmacht.

[0041] Die Makromere, die hier verwendet werden, müssen mit Licht allein oder in Gegenwart eines Initiators und/oder Katalysators, beispielsweise eines Initiators einer freien Radikalreaktion, photopolymerisierbar sein, wobei das Licht im sichtbaren Bereich oder im langwelligen ultravioletten Bereich liegt, d.h. eine Wellenlänge gleich oder größer 320 nm hat. Es können andere Reaktionsbedingungen zur Initiation der Polymerisation über freie Radikale geeignet sein, sofern sie die Vitalität des lebenden Gewebes, das verkapselt werden soll, nicht beeinträchtigen. Die Makromere dürfen auch während der Polymerisation keine Produkte oder Wärmemengen erzeugen, die für lebendes Gewebe toxisch sind. Der Katalysator oder der Initiator der freien Radikalreaktion darf unter den gewählten Bedingungen ebenfalls nicht toxisch sein.

[0042] Es existiert eine große Vielzahl im wesentlichen wasserlöslicher Polymere, von denen einige schematisch unten dargestellt sind. (_____) repräsentiert einen im wesentlichen wasserlöslichen Bereich des Polymers und (=) repräsentiert eine über freie Radikale polymerisierbare Spezies. Die folgenden Strukturen stellen Beispiele dar:



[0043] Beispiele für A sind PEG-Diacrylat aus einem PEG-Diol; für B ist es PEG-Triacrylat, gebildet aus einem PEG-Triol; für C ist es PEG-Cyclodextrintetraacrylat, gebildet durch das Pfropfen von PEG auf einem zentralen Cyclodextrin-Ring und eine weitere Acrylierung; für D ist es PEG-Tetraacrylat, gebildet durch das Pfropfen von zwei PEG-Diolen auf ein Bis-Epoxid und eine weitere Acrylierung; für E ist es Hyaluronsäuremethacrylat, gebildet durch das Acrylieren vieler Stellen einer Hyaluronsäurekette; für F ist es PEG-Hyaluronsäuremultiacrylat, gebildet durch das Pfropfen von PEG auf Hyaluronsäure und weiteres Acrylieren; für G ist es ein ungesättigter Disäureester von PEG, gebildet durch das Verestern eines PEG-Diols mit einer ungesättigten Disäure.

[0044] Zu Polysacchariden gehören beispielsweise Alginat, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dextran, Dextransulfat, Heparin, Heparinsulfat, Heparansulfat, Chitosan, Gellangummi, Xanthangummi, Guargummi und κ-Carrageenan. Zu Proteinen gehören beispielsweise Gelatine, Collagen, Elastin und Albumin, unabhängig davon, ob sie aus natürlichen oder gentechnologischen Quellen stammen.

[0045] Zu photopolymerisierbaren Substituenten gehören vorzugsweise Acrylate, Diacrylate, Oligoacrylate, Dimethacrylate oder Oligomethacrylate sowie andere, biologisch annehmbare, photopolymerisierbare Gruppen.

Synthetische polymere Makromere

[0046] Das wasserlösliche Makromer kann aus wasserlöslichen Polymeren abgeleitet sein, zu denen, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein, Poly(ethylenoxid) (PEO), Poly(ethylenglycol) (PEG), Poly(vinylalkohol) (PVA), Poly(vinylpyrrolidon) (PVP), Poly(ethyloxazolin) (PEOX), Polyaminosäuren, Pseudopolyaminosäuren und Polyethyloxazolin gehören, sowie aus Copolymeren von diesen miteinander oder mit anderen wasserlöslichen Polymeren oder wasserunlöslichen Polymeren, mit der Maßgabe, dass das Konjugat wasserlöslich ist. Ein Beispiel für ein wasserlösliches Konjugat ist ein Blockcopolymer von Polyethylenglycol und Polypropylenoxid, das im Handel als ein Pluronic^{TM}-Tensid erhältlich ist.

Polysaccharid-Makromere

[0047] Polysaccharide, wie Alginat, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dextran, Dextransulfat, Heparin, Heparinsulfat, Heparansulfat, Chitosan, Gellangummi, Xanthangummi, Guargummi, wasserlösliche Cellulosederivate und Carrageenan, die über eine Reaktion mit Hydroxygruppen oder Aminen auf den Polysacchariden verknüpft sind, können ebenfalls zur Bildung der Makromerlösung verwendet werden.

Protein-Makromere

[0048] Proteine wie Gelatine, Collagen, Elastin, Zein und Albumin, unabhängig davon, ob sie aus natürlichen oder gentechnologisch veränderten Quellen stammen, wobei die Proteine über die Einführung von Gruppen, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppel- oder -Dreifachbindungen enthalten, über freie Radikale polymerisierbar gemacht werden, wobei zu diesen Gruppen Acrylat, Diacrylat, Methacrylat, Ethacrylat, 2-Phenylacrylat, 2-Chloracrylat, 2-Bromacrylat, Itaconat, Oligoacrylat, Dimethacrylat, Oligomethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Styrolgruppen sowie andere, biologisch annehmbare, photopolymerisierbare Gruppen gehören, können ebenfalls zur Bildung der Makromerlösung verwendet werden.

Farbstoff-sensibilisierte Polymerisation

[0049] Die Farbstoff-sensibilisierte Polymerisation ist in der chemischen Literatur gut bekannt. Zum Beispiel dient Licht eines Argonionenlasers (514 nm), in Gegenwart eines Xanthin-Farbstoffes und eines Elektronendonors wie Triethanolamin zur Katalyse der Initiation, zur Induktion einer über freie Radikale verlaufenden Polymerisation der Acrylgruppen in einer Reaktionsmischung (Neckers et al., (1989) Polym. Materials Sci. Eng. 60: 15; Fouassier et. al., (1991) Makromol. Chem. 192:245–260). Nach dem Absorbieren des Laserlichtes wird der Farbstoff in einen Triplett-Zustand angeregt. Der Triplett-Zustand reagiert mit einem tertiären Amin wie Triethanolamin unter Bildung eines freien Radikals, das die Polymerisationsreaktion initiiert. Die Polymerisation erfolgt extrem schnell und hängt von der Funktionalität des Makromers und dessen Konzentration, von der Lichtintensität und den Konzentrationen des Farbstoffes und des Amins ab.

Photoinitiierende Farbstoffe

[0050] Es kann jeder beliebige Farbstoff verwendet werden, der Licht mit einer Wellenlänge zwischen 320 nm und 900 nm absorbiert, freie Radikale bilden kann, wenigstens zum Teil wasserlöslich ist und für das biologische Material in der Konzentration, die für die Polymerisation verwendet wird, nicht toxisch ist. Es gibt eine große Zahl durch Licht anregbarer Farbstoffe, die für eine optische Initiation der Polymerisation verwendet werden können, beispielsweise Ethyleosin, Eosin Y, Fluorescein, 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon, 2-Methoxy-2-phenylacetoephenon, Kampferchinon, Bengalrosa, Methylenblau, Erythrosin, Phloxim, Thionin, Riboflavin, Methylengrün, Acridinorange, Xanthin-Farbstoff und Thioxanthin-Farbstoffe.

[0051] Der bevorzugte Initiatorfarbstoff ist aufgrund seiner spektralen Eigenschaften in wässriger Lösung Ethyleosin (Absorptionsmaximum = 528 nm, Extinktionskoeffizient = $1{,}1 \times 10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$, Fluoreszenzmaximum = 547 nm, Quantenausbeute = 0,59). Ein Reaktionsschema für die Verwendung von Ethyleosin ist beispielhaft in der Fig. 1 gezeigt. Der Farbstoff bleicht nach der Belichtung und der Reaktion mit einem Amin zu einem farblosen Produkt aus, was ein weiteres Eindringen des Strahls in das Reaktionssystem ermöglicht.

Cokatalysator

[0052] Die Cokatalysatoren, die zusammen mit den photoinitiierenden Farbstoffen nützlich sind, sind auf Stickstoff basierende Verbindungen, die im Stande sind, die freie Radikalreaktion zu stimulieren. Primäre, sekundäre, tertiäre oder quaternäre Amine sind geeignete Cokatalysatoren, wie auch beliebige andere Moleküle, die Stickstoffatome enthalten und elektronenreich sind. Zu Cokatalysatoren gehören, ohne aber auf sie beschränkt zu sein, Triethanolamin, Triethylamin, Ethanolamin, N-Methyldiethanolamin, N,N-Dimethylbenzylamin, Dibenzylamin, N-Benzylethanolamin, N-Isopropylbenzylamin, Tetramethylethylendiamin, Kaliumpersulfat, Tetramethylethylendiamin, Lysin, Ornithin, Histidin und Arginin.

[0053] Beispiele für Systeme aus Farbstoff und Photoinitiator sind Ethyleosin mit einem Amin, Eosin Y mit einem Amin, 2,2-Dimethoxy-2-phenoxyacetophenon, 2-Methoxy-2-phenoxyacetophenon, Kampferchinon mit einem Amin und Bengalrosa mit einem Amin.

[0054] In bestimmten Fällen kann der Farbstoff ohne irgend einen zusätzlichen Initiator, wie das Amin, Licht absorbieren und die Polymerisation initiieren. In diesen Fällen brauchen nur der Farbstoff und das Makromer vorhanden zu sein, damit die Polymerisation bei einer Exposition gegen Licht beginnt. Die Erzeugung der freien Radikale hört auf, wenn das Laserlicht entfernt wird. Einige Photoinitiatoren, wie 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon, brauchen keinerlei unterstützendes Amin für die Induktion der Photopolymerisation; in diesen Fällen wird nur die Anwesenheit des Farbstoffes, des Makromers und von Licht geeigneter Wellenlänge benötigt.

Mittel zur Pelymerisation

Photopolymerisation

[0055] Zu bevorzugten Lichtquellen gehören verschiedene Lampen und Laser, wie diejenigen, die in den folgenden Beispielen beschrieben werden, die eine Wellenlänge von ungefähr 320–800 nm, am bevorzugtesten ungefähr 365 nm oder 514 nm, erzeugen.

[0056] Dieses Licht kann von jeder beliebigen geeigneten Quelle bereit gestellt werden, die im Stande ist, die gewünschte Strahlung zu erzeugen, beispielsweise einer Quecksilberlampe, einer Lampe für langwelliges UV-Licht, einem He-Ne-Laser oder einem Argonionenlaser oder über die Verwendung eines Lichtwellenleiters.

Andere Mittel zur Polymerisation

[0057] Es können andere Mittel als Licht für die Polymerisation eingesetzt werden. Beispiele sind die Initiation über thermische Initiatoren, die freie Radikale bei mäßigen Temperaturen bilden, wie Benzoylperoxid, mit oder ohne Triethanolamin, Kaliumpersulfat, mit oder ohne Tetramethylethylendiamin, und Ammoniumpersulfat mit Natriumbisulfit.

Inkorporation biologisch aktiver Materialien

[0058] Die wasserlöslichen Makromere können um biologisch aktive Moleküle herum polymerisiert werden, so dass ein Abgabesystem für die Moleküle gebildet wird, oder sie können um Zellen, Gewebe, subzelluläre Organellen oder andere subzellulären Komponenten herum polymerisiert werden, um das biologische Material zu verkapseln. Die wasserlöslichen Makromere können auch so polymerisiert werden, dass sie biologisch aktive Moleküle inkorporiert enthalten, so dass dem Polymer zusätzliche Eigenschaften verliehen werden, wie eine Widerstandsfähigkeit gegenüber einem Wachstum von Bakterien oder eine Verminderung einer Entzündungsreaktion, und auch zur Verkapselung von Geweben dienen. Es kann eine große Vielzahl biologisch aktiver Materialien verkapselt oder inkorporiert werden, zu denen Proteine, Peptide, Polysaccharide, organische oder anorganische Arzneimittel, Nukleinsäuren, Zucker, Zellen und Gewebe gehören.

[0059] Beispiele für Zellen, die verkapselt werden können, sind Primärkulturen sowie etablierte Zelllinien einschließlich transformierter Zellen. Zu diesen gehören, ohne aber auf sie beschränkt zu sein, Inselzellen des Pankreas, menschliche Vorhautfibroblasten, Chinese-Hamster-Ovary-Zellen, Betazell-Insulome, Zellen der lymphoblastischen Leukämie, 3T3-Mausfibroblasten, Dopamin-sekretierende Zellen des ventralen Mesencephalons, neuroblastoide Zellen, Zellen des Nebennierenmarks und T-Zellen. Wie aus dieser unvollständigen Liste hervor geht, können Zellen jedes Typs, einschließlich dermaler und neuraler Zellen, Blutzellen, Zellen von Organen, Muskeln, Drüsen und des Immunsystems sowie von unterschiedlichen Spezies mittels dieses Ver-

fahrens erfolgreich verkapselt werden. Beispiele für Proteine, die verkapselt werden können, sind Hämoglobin, Enzyme wie die Adenosindesaminase, Enzymsysteme, Blutgerinnungsfaktoren, Inhibitoren oder Gerinnsel-auflösende Mittel wie die Streptokinase und der Gewebe-Plasminogenaktivator, Antigene für eine Immunisierung, und es können Hormone, Polysaccharide wie Heparin, Oligonukleotide wie Antisense-Nukleinsäuren, Bakterien und andere mikrobielle Organismen, einschließlich von Viren, Vitamine, Cofaktoren und Retroviren für eine Gentherapie mittels dieser Techniken verkapselt werden.

[0060] Das biologische Material kann zunächst in einer Struktur wie einem Polysaccharidgel eingeschlossen werden (Lim, US-Patent Nr. 4 352 883; Lim, US-Patent Nr. 4 391 909; Lim, US-Patent Nr. 4 409 331; Tsang et al., US-Patent Nr. 4 663 286; Goosen et al., US-Patent Nr. 4 673 556; Goosen et al., US-Patent Nr. 4 689 293; Goosen et al., US-Patent Nr. 4 806 355; Rha et al., US-Patent Nr. 4 744 933; Rha et al., US-Patent Nr. 4 749 620). Solche Gele können einen zusätzlichen Schutz sowie eine sekundäre Ebene einer Selektivität hinsichtlich der Permeabilität bereit stellen.

Polymerisation

[0061] Die Makromere werden vorzugsweise mit dem Initiator gemischt, zu dem Material oder der Stelle, wo sie polymerisiert werden sollen, gegeben und dem initiierenden Mittel, beispielsweise Licht oder Wärme, ausgesetzt.

[0062] Bei einem bevorzugten Verfahren wird ein photoinitiierendes System einer wässrigen Lösung eines photopolymerisierbaren Makromers zugesetzt, um eine wässrige Mischung zu erzeugen; es wird das biologisch aktive Material zugesetzt; und die wässrige Lösung wird mit Licht bestrahlt. Das Makromer besteht vorzugsweise aus einem wasserlöslichen Polymer mit photopolymerisierbaren Substituenten. Eine Absorption von Licht durch das System aus Farbstoff und Initiator führt zur Bildung freier Radikale, die die Polymerisation initiieren.

[0063] Bei einem zweiten bevorzugten Verfahren wird das Makromer auf die Oberfläche eines dreidimensionalen Gegenstandes aufgetragen, der biologischen Ursprungs sein kann oder der ein synthetischer Träger für eine Implantation in ein Tier sein kann. Das wasserlösliche Makromer wird mit einem photoinitiierenden System gemischt, um eine wässrige Mischung zu erzeugen; die Mischung wird auf eine Oberfläche aufgetragen, die beschichtet werden soll, so dass eine beschichtete Oberfläche gebildet wird; und die beschichtete Oberfläche wird mit Licht bestrahlt, um die Polymerisation des Makromers zu initiieren.

[0064] Bei einer Variante dieser Ausführungsform kann der synthetische Träger ein hydrophiles Mikrokügelchen, eine Mikrokapsel oder ein Kügelchen sein. Die hydrophilen Mikrokügelchen werden mit der Lösung eines wasserlöslichen Makromers zusammen mit dem Photoinitiatorsystem unter Bildung einer wässrigen Mischung gemischt; die Mikrokügelchen werden unter Rühren mit dem Makromer in Öl unter Bildung einer Ölsuspension gemischt, und die Mikrokügelchen werden mit Licht bestrahlt.

[0065] Bei einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform wird ein lichtempfindlicher Farbstoff an eine Gewebeoberfläche adsorbiert, die behandelt werden soll, der nichtadsorbierte Farbstoff wird durch Verdünnen entfernt oder vom Gewebe abgespült, die Makromerlösung wird auf die Farbstoff-gekoppelte Oberfläche aufgetragen und die Polymerisation wird initiiert, was zu einer Grenzflächenpolymerisation führt.

[0066] Die Polymerisation kann über mindestens fünf unterschiedliche Verfahren bewirkt werden, und zwar unter Einsatz entweder einer Polymerisation der gesamten Masse oder einer Grenzflächenpolymerisation. Diese Ausführungsformen werden unten unter Bezugnahme auf spezifische Anwendungen des Materials und der Verfahren zu ihrer Polymerisation weiter beschrieben.

Massenpolymerisation

[0067] Bei der Massenpolymerisation wird das Material, das beschichtet werden soll, in Kontakt mit einer Lösung des Makromers, des Photoinitiators und gegebenenfalls des Cokatalysators gebracht, und dann wird die Polymerisation induziert, beispielsweise durch eine Exposition gegen Strahlung. Es folgen drei Beispiele für eine Massenpolymerisation:

Verfahren einer Massen-Suspensionspolymerisation zur Verkapselung von Materialien

[0068] Das biologische Material, das verkapselt werden soll, wird mit einer wässrigen Lösung des Makromers,

die das Makromer, den Cokatalysator und gegebenenfalls einen Beschleuniger enthält, sowie einem Initiator gemischt. Es werden kleine Strukturen von globulärer Form, wie Kügelchen und Ovoide, oder Rechtecke gebildet, vorzugsweise entweder über eine Coextrusion der wässrigen Lösung mit Luft oder einer nicht-mischbaren Substanz wie Öl, vorzugsweise Mineralöl, oder über ein Rühren der wässrigen Phase in Kontakt mit einer nicht-mischbaren Phase, beispielsweise einer Ölphase, unter Bildung kleiner Tröpfchen. Das Makromer in den globulären Strukturen wird dann durch eine Exposition gegen Strahlung polymerisiert. Dalton das Makromer und der Initiator auf die Kügelchen begrenzt sind, ist die Struktur, die aus der Polymerisation resultiert, eine Kapsel, in der das biologische Material eingeschlossen ist. Das ist eine „Suspensionspolymerisation", durch die der gesamte wässrige Anteil des Kügelchens unter Ausbildung einer dicken Membran um das zelluläre Material herum polymerisiert.

Verfahren einer Mikrokapsel-Suspensionspolymerisation

[0069] Bei einer Variante des Massen-Suspensionsverfahrens wird mikroverkapseltes Material als ein Kern verwendet, um den das Makromer in einer Suspensionspolymerisationsreaktion polymerisiert wird. Das biologische Material wird zuerst im Inneren eines Mikrokügelchens, einer Mikrokapsel oder eines Mikroteilchens (die hier gemeinsam als Mikrokapseln bezeichnet werden) verkapselt, beispielsweise in Mikrokapseln aus Alginat. Die Mikrokapseln werden dann mit der Makromerlösung und dem Initiator gemischt, und die Makromerlösung wird polymerisiert.

[0070] Dieses Verfahren ist besonders für eine Verwendung mit PEG-Makromeren geeignet, wobei die extreme Hydrophilie der PEG-Makromere ausgenützt wird, und sie ist besonders gut für eine Verwendung mit Mikrokapseln aus einem Hydrogel wie Alginat-Poly-L-lysin ausgelegt. Das Mikrokügelchen wird in Wasser gequollen. Wenn eine Makromerlösung, die einen Katalysator und/oder einen Initiator oder Beschleuniger enthält, in einem hydrophoben Medium, beispielsweise in Mineralöl, zu einer Phasentrennung gezwungen wird, dann bleibt die PEG-Makromerlösung bevorzugt auf der hydrophilen Oberfläche der Mikrokapsel aus Alginat. Wenn diese Suspension bestrahlt wird durchläuft das PEG-Makromer eine Polymerisation und Gelbildung, wobei sich eine dünne Schicht eines polymeren, wasserunlöslichen Gels um das Mikrokügelchen ausbildet.

[0071] Diese Technik umfasst vorzugsweise die Coextrusion der Mikrokapsel in einer Lösung aus dem Makromer und dem Initiator, wobei die Lösung in Kontakt mit Luft oder einer Flüssigkeit, die nicht mit Wasser mischbar ist, vorliegt, so dass sich Tröpfchen bilden, die in eine Lösung, beispielsweise Mineralöl, fallen, mit der die Tröpfchen nicht mischbar sind. Die nicht-mischbare Flüssigkeit wird hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Tröpfchenbildung aufrecht zu erhalten, ausgewählt. Außerdem sollte, wenn das membranverkapselte Material in ein Tier injiziert oder diesem implantiert werden soll, jeder Rest nicht-toxisch und nicht-immunogen sein. Mineralöl ist eine bevorzugte nicht-mischbare Flüssigkeit. Sobald die Tröpfchen mit der nichtmischbaren Flüssigkeit in Kontakt gekommen sind, werden sie polymerisiert.

[0072] Diese Coextrusionstechnik führt zu einer Beschichtung aus einem vernetzten Polymer mit einer Dicke von über 50 Mikrometer. Alternativ können die Mikrokapseln in einer Lösung eines Makromers und eines Initiators suspendiert werden, die in Kontakt mit einer nichtmischbaren Phase, wie einer Ölphase, gerührt wird. Die resultierende Emulsion wird unter Bildung eines Polymerüberzuges, ebenfalls mit einer Dicke von über 50 Mikrometer, um die Mikrokapseln herum polymerisiert.

Verfahren einer Massenpolymerisation für die Gewebeadhäsion

[0073] Das Polymermaterial kann auch für die Anheftung von Gewebe verwendet werden. Es wird ein wasserlösliches, polymerisierbares Makromer zusammen mit einem Photoinitiator auf eine Gewebeoberfläche aufgetragen, für die eine Gewebsadhäsion gewünscht ist; die Gewebeoberfläche wird mit dem Gewebe in Kontakt gebracht, an das eine Adhäsion gewünscht wird, wodurch eine Gewebeverbindung erzeugt wird; und die Gewebeverbindung wird mit Licht bestrahlt, bis die Makromere polymerisiert sind. Bei der bevorzugten Ausführungsform wird das innerhalb von Sekunden bis Minuten erreicht, am bevorzugtesten innerhalb von Sekunden.

[0074] Bei der bevorzugten Ausführungsform ist die Makromermischung eine wässrige Lösung, wie diejenige von PEG-400-Diacrylat oder PEG-18,5K-Tetraacrylat. Wenn diese Lösung mit Gewebe in Kontakt kommt, das eine feuchte Schicht aus Schleim oder Flüssigkeit, die es bedeckt, aufweist, dann vermischt sie sich mit der Feuchtigkeit des Gewebes. Die Schleimschicht auf dem Gewebe enthält wasserlösliche Polysaccharide, die in engem Kontakt mit Zelloberflächen stehen. Diese wiederum sind reich an Glycoproteinen und Proteoglycanen. Somit sind eine physikalische Vermischung und Kräfte einer Oberflächendurchdringung aufgrund einer Penetration in Spalten einige der Kräfte, die für die Adhäsion des PEG-Gels an einer Gewebeoberfläche nach der

Vernetzung verantwortlich sind.

[0075] Zu spezifischen Anwendungen für derartige Klebstoffe können Anastomosen von Blutgefässen gehören, eine Wiederverbindung von weichem Gewebe, Verbände für Verbrennungen und eine Wiederbefestigung der Netzhaut.

Massenpolymerisation zur Bildung von Gewebebarrieren

[0076] Wenn das PEG-Gel entfernt vom Gewebe polymerisiert wird, dann bietet es Zellen und generell Gewebe eine ausgesprochen nicht-adhäsive Oberfläche, und zwar aufgrund der äußerst hydrophilen Natur des Materials.

[0077] Dieses Merkmal kann zur Ausbildung von Barrieren auf Geweben zur Verhinderung der Anheftung von Zellen auf dem beschichteten Gewebe ausgenützt werden. Beispiele für diese Anwendung sind die Bildung von Barrieren auf Langerhansschen Inseln oder auf dem Lumen von Blutgefässen zur Verhinderung einer Thrombose oder von Gefäßspasmen oder einer Kollabierung von Gefäßen; und zwar unabhängig davon, ob sie über eine Massenpolymerisation (bei der der Initiator der Polymerisation mit dem Makromer vermischt ist) oder über eine Grenzflächenpolymerisation (bei der der Initiator an die Oberfläche adsorbiert ist) erfolgt.

Grenzflächenpolymerisation

[0078] Für die Grenzflächenpolymerisation wird der Initiator der Radikalreaktion an die Oberfläche des Materials, das beschichtet werden soll, adsorbiert, der nicht-adsorbierte Initiator wird durch Verdünnen entfernt oder mittels einer Waschlösung oder durch die Anwendung der Makromerlösung abgespült, und die Makromerlösung, die gegebenenfalls einen Cokatalysator enthält, wird auf das Material aufgetragen, das dann polymerisiert wird. Es folgen zwei Beispiele für eine Grenzflächenpolymerisation:

Verfahren der Mikrokapsel-Grenzflächenpolymerisation

[0079] Ein biologisches Material kann, wie oben unter Bezugnahme auf eine Suspensionspolymerisation beschrieben wurde, verkapselt werden, wobei jedoch eine Grenzflächenpolymerisation zur Bildung der Membran auf der Oberfläche des biologischen Materials oder der Mikrokapsel eingesetzt wird. Das beinhaltet das Beschichten des biologischen Materials oder der Mikrokapsel mit dem Photoinitiator, das Suspendieren des biologischen Materials oder der Mikrokapseln in der Makromerlösung und das sofortige Polymerisieren, beispielsweise durch Bestrahlung. Es wird ein dünner Polymerüberzug von weniger als 50 µm Dicke um die biologischen Materialien oder die Mikrokapseln herum gebildet, da der Photoinitiator lediglich an der Oberfläche der Mikrokapsel vorhanden ist und keine Zeit bekommt, weit in die Makromerlösung hinein zu diffundieren.

[0080] In den meisten Fällen dringt der Initiator, beispielsweise ein Farbstoff, neben der Adsorption an die Oberfläche auch in das Innere des biologischen Materials oder der Mikrokapsel ein. Wenn die Makromerlösung, die gegebenenfalls einen Cokatalysator wie Triethanolamin enthält, auf die Oberfläche aufgetragen und einem Initiationsmittel wie Laserlicht ausgesetzt wird, sind alle essentiellen Komponenten der Reaktion nur an oder knapp innerhalb der Grenzfläche zwischen dem biologischen Material oder der Mikrokapsel und der Makromerlösung vorhanden. Somit erfolgen die Polymerisation und die Gelbildung (wenn ein multifunktionelles Makromer verwendet wird), die typischerweise innerhalb von ungefähr 100 ms erfolgt, zunächst lediglich an der Grenzfläche, knapp unterhalb von ihr und knapp jenseits von ihr. Wenn man längere Zeiträume zulässt, dann beginnt der Initiator, aus dem inneren Kern des Mikrokügelchens in die Lösung zu diffundieren. Ganz ähnlich beginnen die Makromere, in das Innere des Kerns zu diffundieren, und es wird eine dickere Schicht des Polymers gebildet.

Direktes Verfahren der Grenzflächenpolymerisation

[0081] Grenzflächenpolymerisation zur Bildung einer Membran direkt auf der Oberfläche von Geweben. Das Gewebe wird direkt mit dem Initiator beschichtet, überschüssiger Initiator wird entfernt, und die Makromerlösung wird auf das Gewebe aufgetragen und polymerisiert.

Steuerung der Permeabilität des Pelymere

[0082] Die Permeabilität der Beschichtung wird zum Teil vom Molekulargewicht und der Vernetzung des Polymers bestimmt. Zum Beispiel hat im Falle kurzer PEG-Ketten zwischen den Vernetzungen die erzeugte „Po-

re" im Netzwerk relativ starre Grenzen und ist relativ klein, so dass ein Makromolekül, das versucht, durch dieses Gel zu diffundieren, in erster Linie durch einen Siebeffekt behindert wird. Wenn die Kettenlänge zwischen den Vernetzungen lang ist, dann kann sich die Kette falten und mit hoher Beweglichkeit umher bewegen, so dass sich diffundierende Makromoleküle sowohl einer Volumenausschlusswirkung als auch einem Siebeffekt gegenüber sehen.

[0083] Aufgrund dieser beiden unterschiedlichen Wirkungen lässt sich eine direkte Beziehung zwischen der Ausschlussgrenze des Molekulargewichts bezüglich der Diffusion und dem Molekulargewicht des Ausgangsoligomers nicht vollständig definieren. Trotzdem kann ein gewünschtes Freisetzungsprofil für ein bestimmtes Protein oder ein Arzneimittel, wie ein Peptid, über eine Einstellung der Vernetzungsdichte und der Länge der PEG-Segmente erzielt werden. Dementsprechend kann ein gewünschtes Profil der Proteinpermeabilität entworfen werden, um die Diffusion von Nährstoffen, Sauerstoff, Kohlendioxid, Abfallprodukten, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Transportproteinen und sekretierten, in der Zelle synthetisierten Produkten, wie Proteinen, zu gewährleisten und gleichzeitig die Diffusion von Immunmodulatoren, wie Antikörpern und Komplementproteinen, sowie das Eintreten von Zellen in das Gel im Inneren des Gels zu begrenzen, um die transplantierten Zellen oder das transplantierte Gewebe zu schützen. Das dreidimensional vernetzte, kovalent verknüpfte polymere Netzwerk ist bei langfristigen In-vivo-Anwendungen stabil.

[0084] Für eine Verkapselung von Zellen und Gewebe auf eine Weise, die den Durchtritt von Antikörpern durch die Membran verhindert, aber den Durchtritt von Nährstoffen, die für den Zellmetabolismus essentiell sind, ermöglicht, liegt die bevorzugte Ausgangsgröße des Monomers im Bereich zwischen 10 000 Dalton und 18 500 Dalton, wobei die bevorzugteste Größe bei ungefähr 18 500 Dalton liegt. Kleinere Makromere führen zu Polymermembranen höherer Dichte mit kleineren Poren.

Dicke und Konformation der Polymerschicht

[0085] Die Membrandicke beeinflusst verschiedene Parameter, einschließlich der Selektivität bezüglich der Permeabilität, der Steifheit und der Größe der Membran. Die Dicke kann über die Auswahl der Reaktionskomponenten und/oder der Reaktionsbedingungen variiert werden. Beispielsweise kann die Makromerkonzentration von wenigen Prozent bis zu 100% variiert werden, und zwar in Abhängigkeit vom Makromer. Ähnlich führen intensivere Belichtungen und längere Belichtungen zu dickeren Filmen, als es weniger intensive oder kürzere Belichtungen tun. Es können auch Beschleuniger in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt werden, um die Dicke zu steuern. Zum Beispiel kann N-Vinylpyrrolidinon als Beschleuniger zugesetzt werden, wobei höhere Konzentrationen zu dickeren Schichten führen als niedrigere Konzentrationen, wenn alle anderen Bedingungen gleich bleiben. Die Konzentrationen von N-Vinylpyrrolidinon können, um ein Beispiel zu nennen, im Bereich von 0 bis 0,5% liegen.

[0086] Beim Verfahren der Grenzflächenpolymerisaton kann die Dauer der Polymerisation variiert werden, um die Dicke der gebildeten Polymermembran einzustellen. Diese Korrelation zwischen der Membrandicke und der Dauer der Bestrahlung besteht, weil der Photoinitiator mit konstanter Geschwindigkeit diffundiert, wobei die Diffusion ein kontinuierlich ablaufender Prozess ist. Je länger demnach die Bestrahlung dauert, desto mehr Photoinitiator initiiert die Polymerisation in der Makromermischung, desto mehr Makromer polymerisiert und desto dicker wird die resultierende Membran. Weitere Faktoren, die die Membrandicke beeinflussen, sind die Zahl der reaktiven Gruppen pro Makromer und die Konzentration an Beschleunigern in der Makromerlösung. Diese Technik ermöglicht die Erzeugung sehr dünner Membranen, da der Photoinitiator zuerst in einer sehr dünnen Schicht auf der Oberfläche des biologischen Materials vorliegt und die Polymerisation nur dort erfolgt, wo der Photoinitiator vorhanden ist.

[0087] Beim Verfahren der Suspensionspolymerisation wird eine etwas dickere Membran gebildet als mit dem Verfahren der Grenzflächenpolymerisation, da beim Suspensionsverfahren die Polymerisation in der gesamten Makromerlösung erfolgt. Die Dicke der mittels des Suspensionsverfahrens erzeugten Membranen wird zum Teil durch die Viskosität der Makromerlösung, die Konzentration des Makromers in dieser Lösung, die fluide mechanische Umgebung der Suspension sowie oberflächenaktive Agenzien in der Suspension bestimmt. Diese Membranen variieren in ihrer Dicke zwischen 50 und 300 Mikrometer.

Nicht-biologische Oberflächen

[0088] Die Makromerlösung und der Initiator können auch auf eine nicht-biologische Oberfläche aufgetragen werden, die in Kontakt mit einer biologischen Umgebung gebracht werden soll. Zu derartigen Oberflächen gehören beispielsweise Gefäßtransplantate, Kontaktlinsen, im Auge befindliche Linsen, Ultrafiltrationsmembra-

nen und Behälter für biologische Materialien.

[0089] Es ist im allgemeinen schwierig, eine gute Adhäsion zwischen Polymeren mit stark unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften zu erzielen. Das Konzept einer Oberfläche aus einem sich physikalisch interpenetierenden Netzwerk wurde von Desai und Hubbel (N.P. Desai et al. (1992)) vorgelegt. Dieser Ansatz zur Inkorporation einer vollständigen Beschichtung aus einem Polymer in die Oberfläche eines anderen Polymers mit deutlich anderen Eigenschaften beinhaltete das Quellen der Oberfläche des Polymers, das modifiziert werden sollte (Basispolymer), in einem gemeinsamen Lösemittel oder einem Quelllösemittel für das Basispolymer und für das Polymer, das inkorporiert werden sollte (eindringendes Polymer). Das eindringende Polymer diffundierte in die Oberfläche des Basispolymers. Diese Grenzfläche wurde über ein schnelles Ausfällen oder eine Entquellung der Oberfläche durch das Transferieren des Basispolymers in ein Bad aus einem Nicht-Lösemittel stabilisiert. Das führte zu einem Festhalten des eingedrungenen Polymers in der Matrix des Basispolymers an dessen Oberfläche in Form einer Struktur, die eine Oberfläche aus einem sich physikalisch interpenetierenden Netzwerk genannt wurde.

[0090] Dieser Ansatz kann durch das Photopolymerisieren des eindringenden Polymers auf der Oberfläche des Basispolymers im gequollenen Zustand weiter verbessert werden. Das führt zu einer Stabilität, die gegenüber derjenigen des vorhergehenden Ansatzes stark verbessert ist, und zur Verbesserung der biologischen Reaktionen auf diese Materialien. Das eindringende Agens kann chemisch so modifiziert sein, dass er ein Präpolymer-Makromer ist, d.h. im Stande ist, selbst polymerisiert zu werden. Diese Polymerisation kann thermisch oder durch eine Exposition gegen sichtbares oder ultraviolettes Licht oder Infrarotlicht, gegen Gammastrahlen oder durch Bestrahlung mit einem Elektronenstrahl oder eine Exposition gegen Plasmabedingungen initiiert werden. Im Falle der relativ unspezifischen Reaktion auf Gammastrahlen oder eine Bestrahlung mit einem Elektronenstrahl kann es sein, dass eine chemische Inkorporation besonders reaktiver Stellen nicht erforderlich ist.

[0091] Polyethylenglycol (PEG) ist ein besonders nützliches eindringendes Polymer für biomedizinische Anwendungen, bei denen das Fehlen einer Zelladhäsion gewünscht ist. Die früheren Arbeiten hatten ein optimales Funktionieren bei einem Molekulargewicht von 18 500 Dalton, ohne eine chemische Vernetzung, gezeigt. PEG-Präpolymere können leicht durch eine Acrylierung der Hydroxygruppen an ihren Enden oder an anderer Stelle innerhalb der Kette gebildet werden. Diese Präpolymere können leicht polymerisiert werden. Eine photoinitiierte Polymerisation dieser Präpolymere ist besonders bequem und schnell. Es gibt verschiedene, durch sichtbares Licht initiierte und durch ultraviolettes Licht initiierte Reaktionen, die über die Absorption von Licht durch spezifisch photochemisch reaktive Farbstoffe initiiert werden. Der gleiche Ansatz kann für andere wasserlösliche Polymere eingesetzt werden, beispielsweise Poly(N-vinylpyrrolidinon), Poly(N-isopropylacrylamid), Poly(ethyloxazolin) und viele andere.

Verfahren zur Herstellung von Polymermaterialien

[0092] Polymere Objekte werden mittels Standardverfahren, die Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt sind, in eine gewünschte Form gebracht, wobei die Makromerlösung, die vorzugsweise einen Katalysator und einen Initiator enthält, geformt und dann polymerisiert wird. Zum Beispiel können Platten über das Giessen auf eine flache Oberfläche geformt werden, und runde Scheiben können über das Giessen in Behälter mit der Form runder Scheiben erhalten werden. Zylinder und Röhren können über eine Extrusion gebildet werden. Kugeln können mittels Emulsionsöl, über eine Coextrusion mit Öl oder über eine Coextrusion mit Luft, einem anderen Gas oder mit Dampf gebildet werden. Das Makromer wird dann Bedingungen zur Initiation der Polymerisation, wie einer Bestrahlung mit Licht, ausgesetzt. Eine derartige Bestrahlung kann anschließend an die Formgebungsschritte oder, wenn es gewünscht wird, gleichzeitig mit ihnen erfolgen.

[0093] Das Makromer kann auch unter Bezugnahme auf eine interne oder externe Stützstruktur ausgeformt werden. Zu internen Stützstrukturen gehören siebartige Netzwerke aus stabilen oder abbaubaren Polymeren oder nicht-toxischen Metallen. Zu externen Strukturen gehört beispielsweise das Giessen des Gels in das Innere eines Zylinders, so dass die innere Oberfläche des Zylinders mit dem Gel, das die biologischen Materialien enthält, ausgekleidet ist.

Verfahren zur Oberflächenbeschichtung

[0094] Diese Materialien können für die Behandlung makrokapsulärer Oberflächen eingesetzt werden, beispielsweise derjenigen, die für eine Ultrafiltration, Hämodialyse und eine nichtmikroverkapselte Immunisolierung von tierischem Gewebe verwendet werden. Die Mikrokapsel ist in diesem Falle üblicherweise mikroporös,

mit einem Ausschlussmolekulargewicht von unter 70 000 Dalton. Sie kann in Form einer Hohlfaser, eines spiralförmigen Bauteils, eines flachen Bogens oder in einer anderen Konfiguration vorliegen. Die Oberfläche einer derartigen Mikrokapsel kann mittels eines Polymers wie PEG modifiziert werden, um eine nichtverderbliche, nicht-thrombogene und nicht-zelladhäsive Oberfläche zu erzeugen. Die Beschichtung dient zur Verbesserung der Biokompatibilität und zur Bereitstellung einer zusätzlichen Immunprotektion. Zu Materialien, die auf diese Weise modifiziert werden können, gehören Polysulfone, Zellulosemembranen, Polycarbonate, Polyamide, Polyimide, Polybenzimidazole, Nylons, Poly(acrylnitril-co-vinylchlorid)-Copolymere, Polyurethane, Polystyrol, Poly(styrol-co-acrylnitrile), Poly(vinylchlorid) und Poly(ethylenterephthalat).

[0095] Es können verschiedene Verfahren zur Bildung biokompatibler Überzüge eingesetzt werden, und zwar in Abhängigkeit von der physikalischen und der chemischen Natur der Oberfläche. Hydrophile Oberflächen können durch das Auftragen einer dünnen Schicht (von z.B. 50 bis 300 Mikrometer Dicke) aus einer polymerisierbaren Lösung, wie von PEG-Diacrylat, die geeignete Mengen an Farbstoff und Amin enthält, beschichtet werden. Hydrophobe Oberflächen können zuerst durch die Behandlung mittels einer Gasplasmaentladung hydrophil gemacht werden, und die resultierende Oberfläche kann dann ganz ähnlich beschichtet werden, oder sie können ganz einfach vor oder während der Behandlung mit der PEG-Diacrylatlösung mit einem Tensid behandelt werden. Zum Beispiel könnte eine hydrophobe Polystyroloberfläche zuerst mittels einer Exposition gegen ein O_2-Plasma oder ein N_2-Plasma behandelt werden. Das führt dazu, dass die Oberfläche durch die Erzeugung sauerstoffhaltiger bzw. stickstoffhaltiger Oberflächenspezies hydrophiler gemacht wird. Diese Spezies könnten weiter durch das Umsetzen mit einer Substanz wie Acryloylchlorid behandelt werden, die im Stande ist, oberflächlich gebundene, gegenüber freien Radikalen empfindliche Spezies zu erzeugen. Alternativ könnte eine hydrophobe Polystyroloberfläche zuerst mit einem Tensid behandelt werden, wie einem Poly(ethylenoxid)-Poly(propylenoxid)-Blockcopolymer, das anschließend acryliert werden könnte, wenn es gewünscht wird. Derartige Behandlungen würden zu einer verbesserten Adhäsion zwischen den hydrophilen Überzugsschichten und dem hydrophoben Material, das behandelt wird, führen.

Behandlung von texturierten Materialien und Hydrogelen

[0096] Die Oberfläche von Materialien, die ein gewisses Ausmaß an Oberflächentextur zeigen, wie gewebtes Dacron, Dacronvelour und expandierte Poly(tetrafluorethylen)-Membranen (ePTFE-Membranen), kann mit dem Hydrogel behandelt werden. Texturierte und makroporöse Oberflächen ermöglichen eine stärkere Adhäsion des PEG-Gels an die Oberfläche des Materials, was die Beschichtung relativ hydrophober Materialien, wie PTFE und Poly(ethylenterephthalat) (PET), ermöglicht.

[0097] Implantierbare Materialien, wie enzymatische oder ionensensitive Elektroden, die ein Hydrogel (beispielsweise Poly(HEMA), vernetzten Poly(vinylalkohol) und Poly(vinylpyrrolidinon)) auf ihrer Oberfläche tragen, werden mit dem stärker biokompatiblen PEO-Gel auf eine Weise beschichtet, die der Technik der Farbstoffadsorption und Polymerisation ähnlich ist, die für die Mikrokügelchen aus Alginat-PLL in den folgenden Beispielen eingesetzt wird.

Behandlung dichter Materialien

[0098] Gelbeschichtungen können auf die Oberflächen dichter (z.B. nicht-texturierter, nichtgelförmiger) Materialien, wie von Polymeren, einschließlich von PET, PTFE, Polycarbonaten, Polyamiden, Polysulfonen, Polyurethanen, Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol, Glas und Keramik, aufgetragen werden. Hydrophobe Oberflächen werden zunächst mittels einer Gasplasmaentladung oder mit einem Tensid behandelt, um die Oberfläche hydrophil zu machen. Das stellt eine bessere Adhäsion der Gelbeschichtung an die Oberfläche sicher. Alternativ können Kopplungsagenzien zur Erhöhung der Adhäsion verbessert werden, wie Fachleuten auf dem Gebiet der Polymersynthese und der Oberflächenmodifizierung ohne weiteres klar sein dürfte.

Dünne, oberflächlich polymerisierte Beschichtungen in Blutgefässen und auf anderen Geweben

[0099] Die oben beschriebene Methodik kann auch dazu verwendet werden, sehr dünne Filme aus nicht-abbaubaren Polymerbeschichtungen auf Blutgefässen zu photopolymerisieren, um die Wechselwirkung von Blutplättchen mit der Gefäßwand zu verändern und um Therapeutika, wie Enzyme und andere Proteine, Polysaccharide wie Hyaluronsäure, Nukleinsäuren wie Antisense-Nukleinsäuren und Ribozyme sowie andere organische und anorganische Arzneimittel, mittels der oben beschriebenen Verfahren zuzuführen.

[0100] Die unmittelbare Wirkung der Polymerisation des Polymers im Inneren von Blutgefässen ist die Verminderung der Thrombogenität der Oberfläche eines verletzten Blutgefässes. Das lässt sich gut zur Verbesse-

rung der Ergebnisse der Ballon-Angioplastie über eine Verminderung der Thrombogenität des Gefäßes und eine Verminderung der Häufigkeit von Schäden, die durch die Ballon-Dilatation erzeugt werden, einsetzen. Eine weitere Wirkung dieser Modifikation kann eine Verminderung einer Hyperplasie von glatten Muskelzellen sein. Das wird aus zwei Gründen erwartet. Erstens enthalten Blutplättchen einen potenten Wachstumsfaktor, den Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), von dem angenommen wird, dass er in die Hyperplasie nach einer Angioplastie verwickelt ist. Die Unterbrechung der Zufuhr von PDGF stellt selbst einen pharmakologischen Eingriff dar, und zwar insofern als ein „Wirkstoff", der durch die Blutplättchen zugeführt worden wäre, daran gehindert wird, zugeführt zu werden. Eine Thrombose führt zur Erzeugung von Thrombin, das ein bekanntes Mitogen für glatte Muskelzellen ist. Die Unterbrechung der Bildung von Thrombin und seiner Zufuhr zur Gefäßwand stellt ebenfalls einen pharmakologischen Eingriff dar. Außerdem liegen weitere Wachstumsfaktoren im Plasma gelöst vor, von denen bekannt ist, dass sie Mitogene für glatte Muskelzellen sind. Die Gelschicht stellt eine bezüglich der Permeabilität selektive Barriere auf der Oberfläche des Gewebes dar, und somit wird von der Gelschicht erwartet, dass sie eine Hyperplasie nach einer Angioplastie vermindert. Weiterhin kann das Gel durch einen Schutz des Gefäßes vor einer Exposition gegen Vasokonstriktoren wie Thrombin Vasospasmen vermindern, und es kann die Häufigkeit eines erneuten akuten Verschlusses vermindern.

[0101] Die Beschränkung der Polymerisation auf eine Grenzfläche ist ein sehr wichtiger Vorteil. Durch Krankheiten induzierte Schäden im Inneren eines Blutgefässes haben eine äußerst unregelmäßige Form. Deshalb ist es sehr schwierig, ein vorgeformtes Objekt wie einen Ballon zur Herstellung einer Form zu verwenden, die das polymerisierende Material direkt an das Blutgefäss angrenzend enthalten soll.

[0102] Es gibt weitere andere Organe, bei denen man die Wechselwirkung von Zellen mit Geweben kontrollieren muss, oder bei denen man ähnliche Barrieren über eine Massenpolymerisation oder eine Grenzflächenpolymerisation erzeugen muss. Diese Methodik ist genauso auf andere Organe sowie auf die Verkapselung spezifischer Zelltypen oder biologisch aktiver Materialien, wie Enzymen, für z.B. die Behandlung verschiedener metabolischer Defekte oder Erkrankungen anwendbar, wie es unten beschrieben wird,.

(i) Verkapselung von Neurotransmitter-freisetzenden Zellen

[0103] Die Paralysis agitans, häufiger Parkinson-Krankheit genannt, ist durch einen Mangel des Neurotransmitters Dopamin im Striatum des Gehirns gekennzeichnet. Dopaminsekretierende Zellen, wie Zellen des ventralen Mesencephalons, von neuroblastoiden Zelllinien oder aus dem Nebennierenmark, können mittels der hier beschriebenen Verfahren und Materialien verkapselt werden. Zellen, einschließlich gentechnologisch veränderter Zellen, die einen Vorläufer eines Neurotransmitters, einen Agonisten, ein Derivat oder ein Mimetikum eines bestimmten Neurotransmitters oder Analoge sekretieren, können ebenfalls verkapselt werden.

(ii) Verkapselung von Hämoglobin für synthetische Erythrozyten

[0104] Hämoglobin in seiner freien Form kann in PEG-Gelen verkapselt und über eine Auswahl der PEG-Kettenlänge und der Dichte der Vernetzung, die eine Diffusion verhindert, zurück gehalten werden. Die Diffusion von Hämoglobin aus den Gelen kann weiter durch die Verwendung von Polyhämoglobin, das eine vernetzte Form von Hämoglobin ist, verhindert werden. Das Polyhämoglobinmolekül ist zu groß, als dass es aus dem PEG-Gel diffundieren könnte. Es kann eine geeignete Verkapselung von entweder nativem oder vernetztem Hämoglobin zur Herstellung von synthetischen Erythrozyten verwendet werden. Das Einschließen von Hämoglobin in kleinen Kügelchen mit einem Durchmesser von weniger als 5 Mikrometer aus diesen äußerst biokompatiblen Materialien würde zu verlängerten Zirkulationszeiten, im Vergleich zu denjenigen von vernetztem Hämoglobin oder in Liposomen verkapseltem Hämoglobin, führen.

(iii) Einschluss von Enzymen für eine Korrektur von Metabolismusstörungen und für die Chemotherapie

[0105] Es gibt viele Erkrankungen und Defekte, die aus einem Enzymmangel resultieren. Zum Beispiel verursacht der angeborene Mangel am Enzym Katalase die Akatalasämie. Eine Immobilisierung von Katalase in PEG-Gelnetzwerken könnte ein Verfahren für einen Enzymersatz zur Behandlung dieser Krankheit bereit stellen. Ein Einschluss von Glucosidase könnte auf ähnliche Weise für die Behandlung der Gaucher-Krankheit nützlich sein. PEG-Gele in Form von Mikrokügelchen, die Urease einschließen, könnte in extrakorporalem Blut zur Umwandlung von Harnstoff in Ammoniak eingesetzt werden. Enzyme wie Asparaginase können Aminosäuren abbauen, die von Tumorzellen benötigt werden. Die Immunogenität dieser Enzyme verhindert ihren direkten Einsatz in der Chemotherapie. Der Einschluss solcher Enzyme in immunprotektiven PEG-Gelen kann jedoch eine erfolgreiche Chemotherapie unterstützen. Es kann eine geeignete Formulierung, entweder für eine langsame Freisetzung oder keine Freisetzung des Enzyms, konstruiert werden.

(iv) Mikroverkapselung von Zellen für die Untersuchung von Arzneimitteln gegen das humane AIDS-Virus in vivo

[0106] HIV-infizierte oder nicht-infizierte humane T-lymphoblastoide Zellen können in PEG-Gelen verkapselt werden, wie es oben für andere Zellen beschrieben wurde. Diese Mikrokapseln können in ein Tier, das kein Mensch ist, implantiert und dann mit den zu testenden Arzneimitteln behandelt werden. Nach der Behandlung können die Mikrokapseln wiedergewonnen werden, und die verkapselten Zellen können bezüglich ihrer Vitalität und ihrer funktionellen Normalität untersucht werden. Das Überleben infizierter T-Zellen zeigt eine erfolgreiche Wirkung des Arzneimittels an. Eine fehlende Biokompatibilität ist ein dokumentiertes Problem bei diesem Ansatz zur Bewertung von Arzneimitteln, aber die hier beschriebenen, äußerst biokompatiblen Gele sollten dieses Problem lösen.

(v) Polymerisation stützender Beschichtungen in Blutgefässen und anderen Gewebehohlräumen

[0107] So wie sehr dünne intravaskuläre Beschichtungen in Blutgefäßen polymerisiert werden können, können auch dickere Schichten aus stützenden Gelen in Gefäßen polymerisiert werden. Diese können dazu verwendet werden, einen plötzlichen Wiederverschluss zu vermindern, getrennte Gefäßwände voneinander fern zu halten, Schutz vor einem Vasospasmus bereit zu stellen oder eine Hyperplasie glatter Muskelzellen zu vermindern. Diese Gele können über eine Massenpolymerisation oder eine Grenzflächenpolymerisation erzeugt werden, und je dicker das Material und je höher die Vernetzungsdichte des Materials ist, desto stabiler ist die Struktur im Inneren der Gefäßwand. Dieses Verfahren könnte innerhalb vieler Organe des Körpers durchgeführt werden.

[0108] Die folgenden Beispiele werden gebracht, um bevorzugte Ausführungsformen und Einsatzmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung zu beschreiben, und sie sind nicht so gemeint, dass sie die Erfindung einschränken sollen, es sei denn, es wird in den hier beigefügten Ansprüchen etwas anderes festgestellt. Insgesamt veranschaulichen die Beispiele repräsentative Formen des besten Verfahrens zur Implementierung der Erfindung nach dem derzeitigen Verständnis.

Beispiel 1: Synthese von PEG-6K-Diacrylat

[0109] PEG-Acrylate mit Molekulargewichten von 400 Dalton und 1 000 Dalton sind im Handel bei Sartomer bzw. Dajac Inc. erhältlich. Es wurden 20 g PEG-6K-Diol in 200 ml Dichlormethan in einem 250-ml-Rundkolben gelöst. Der Kolben wurde auf 0°C gekühlt, und es wurden 1,44 ml Triethylamin und 1,3 ml Acryloylchlorid unter konstantem Rühren unter einer Atmosphäre aus trockenem Stickstoff zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde dann auf Raumtemperatur gebracht und 12 Stunden unter einer Stickstoffatmosphäre gerührt. Sie wurde dann filtriert, und das Filtrat wurde durch den Zusatz eines großen Überschusses an Hexan gefällt. Das rohe Monomer wurde durch Auflösen in Dichlormethan und Ausfällen in Hexan gereinigt. Ausbeute 60%.

Beispiel 2: Synthese von PEG-18,5K-Tetraacrylat

[0110] 30 g eines wasserlöslichen Tetrahydroxy-PEG (Molekulargewicht 18 500) (PEG 18,5 K) wurden bei Polysciences Inc. gekauft.

[0111] Das PEG wurde durch Auflösen in Benzol und Abdestillieren des Wasser-Benzol-Azeotrops getrocknet. 59 g des PEG 18,5 K wurden in 300 ml Benzol in einem 500 ml Kolben gelöst. Dazu wurden 3,6 ml Triethylamin und 2,2 ml Acryloylchlorid unter einer Stickstoffatmosphäre gegeben, und die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden lang unter Rückfluss erhitzt. Sie wurde dann abgekühlt und über Nacht gerührt. Das Triethylaminhydrochlorid wurde durch Filtrieren abgetrennt, und das Copolymer wurde aus dem Filtrat durch Ausfällen in einem großen Überschuss Hexan gewonnen. Das Polymer wurde durch Auflösen in Methylenchlorid und erneutes Fällen in Hexan weiter gereinigt. Das Polymer wurde bei 50°C im Vakuum 1 Tag lang getrocknet. Ausbeute 68%.

Beispiel 3: Beschichtung von Insel-haltigen Mikrokügelchen aus Alginat-PLL durch Oberflächen-Farbstoffadsorption

[0112] Das Verfahren der Mikrokapsel-Grenzflächenpolymerisation wurde zur Bildung von Membranen um Mikrokapseln aus Alginat-PLL, die Inseln enthielten, verwendet. Koazervierte Alginat-PLL-Mikrokügelchen, die jeweils eine oder zwei menschliche Insel(n) aus dem Pankreas enthielten, wurden in einer Lösung von 1,1 % $CaCl_2$ suspendiert, und überschüssige Lösung wurde von ihnen abgesaugt, um einen dichten Pfropfen aus Mi-

krokügelchen zu erhalten. Es wurde eine Lösung von Ethyleosin (0,04% Gew./Vol.) in einer 1,1%igen $CaCl_2$-Lösung hergestellt. Diese Lösung wurde mittels eines Filters von 0,45 µm filtersterilisiert. Der Pfropfen aus den Mikrokügelchen wurde 2 min in 10 ml der Eosinlösung suspendiert, um ihnen die Aufnahme des Farbstoffes zu ermöglichen. Die Mikrokügelchen wurden dann viermal mit frischem 1,1%igem $CaCl_2$ gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. 2 ml einer Lösung (23% Gew./Vol.) von PEG-18,5K-Tetraacrylat, die 100 µl einer 3,5%igen (Gew./Vol.) Lösung von Triethanolamin in mit Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES) gepufferter Saline enthielt, wurde zu 0,5 ml dieser Mikrokügelchen gegeben. Die Mikrokügelchen wurden dem Licht eines Argonionenlasers 30 Sekunden lang unter regelmäßigem Rühren ausgesetzt. Die Suspension der Mikrokügelchen wurde während dieses Zeitraums gleichmäßig mit dem Licht gescannt. Die Mikrokügelchen wurden dann mit Kalziumlösung gewaschen, und der Prozess wurde wiederholt, um die Beschichtung weiter zu stabilisieren.

[0113] Mikrokügelchen aus Alginat/PLL, die Inseln enthalten, die mittels dieser Technik beschichtet wurden, sind in der Fig. 2b gezeigt.

[0114] Es wurde ein statischer Glucosestimulationstest (SGS) mit Inseln durchgeführt, die in den mit dem PEG-Gel beschichteten Mikrokügelchen verkapselt waren. Daten bezüglich der Insulinsekretion als Reaktion auf diesen Stimulus sind in der Tabelle 1 gezeigt. Von den Inseln wurde mittels einer Färbung mit Dithizon gezeigt, dass sie vital sind.

[0115] Die Daten des SGS-Testes bestätigen die Vitalität und die Funktionalität der Inseln.

TABELLE 1: Funktion verkapselter Inselzellen (SGS)

	Glucosekonzentration (mg%)		
	initial		danach
	60	300	60
	Insulin / Insel / Stunde (µU/ml)*		
Diffusionsüberzug-Verfahren	1,0	10,04 ± 3,56	2,54 ± 0,76
Mineralölüberzug-Verfahren	1,0	10,23 ± 3,28	1,02±0,78
Freie Inseln (Kontrolle)	1,0	3,74 ± 1,4	1,9 ± 0,17

* Die Werte sind Mittelwerte ± S.D., und alle sind auf den Ausgangswert von 60 mg% normalisiert; nach der Exposition gegen 300 mg% Glucose wurden die Inseln erneut der Ausgangsdosis ausgesetzt.

[0116] Die PEG-Diacrylat-Makromere können genauso wie das PEG-Tetraacrylat-Makromer, das in diesem Beispiel beschrieben wurde, polymerisiert werden.

Beispiel 4: Beschichtung von Insel-haltigen Mikrokügelchen aus Alginat-PLL Verfahren der Suspensionspolymerisation

[0117] Dieses Verfahren nützt die hydrophile Natur der PEG-Monomere aus. Es wurden 2 ml der Mikrokügelchen aus Alginat/PLL, die jeweils eine oder zwei humane Pankreas-Insel(n) enthielten, mit einer Lösung des PEG-Tetraacrylat-Monomers (Molekulargewicht des PEG 18,5 Kilodalton, 23%ige Lösung in Saline) in einem transparenten Zentrifugenröhrchen von 50 ml gemischt. Es wurden Triethanolamin (0,1 M) und 0,5 mM Ethyleosin mit der Makromerlösung gemischt. Die überschüssige Makromerlösung wurde abgegossen, es wurden 20 ml Mineralöl zu dem Röhrchen gegeben, und die Reaktionsmischung wurde gründlich 5 Minuten lang gemischt. Silikonöl funktioniert in dieser Synthese genauso gut, aber seine Eigenschaften als Adjuvans können schlechter sein, wenn es zu irgend einem Übertrag kommt. Es kann jede beliebige andere, nicht mit Wasser mischbare Flüssigkeit als die „Öl"-Phase verwendet werden. Akzeptable Konzentrationen des Triethanolamins liegen im Bereich von ungefähr 1 mM bis ungefähr 100 mM. Akzeptable Konzentrationen des Ethyleosins lie-

gen im Bereich von ungefähr 0,01 mM bis über 10 mM.

[0118] Die Kügelchen waren aufgrund des dünnen Überzugs aus der Lösung aus Makromer und Farbstoff leicht rot, und sie wurden 20 – 50 s mit einem Argonionenlaser (Energie 50 – 500 mW) bestrahlt. Das Bleichen der (roten) Farbe des Ethyleosins deutet auf das Ende der Reaktion hin. Die Kügelchen wurden dann vom Mineralöl abgetrennt und mehrfach mit einer Salinelösung gewaschen. Die gesamte Prozedur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

[0119] Eine schematische Darstellung des Prozesses der Beschichtung der Makrokügelchen in Öl ist in der Fig. 3 gezeigt. Kapseln aus Alginat/Polylysin sind in Natriumcitrat bei pH 12 löslich. Wenn diese beschichteten Mikrokügelchen bei pH 12 mit Natriumcitrat in Kontakt kommen, dann löst sich das innere Koazervat aus Alginat/Polylysin auf, und man kann immer noch eine polymere Membran aus PEG sehen (Gele aus vernetztem PEG sind in allen Lösemitteln, einschließlich von Wasser und Natriumcitrat von pH 12 im wesentlichen unlöslich). Die nicht beschichteten Kontroll-Mikrokügelchen lösen sich in der gleichen Lösung vollständig und schnell auf.

[0120] Es wurde eine statische Glucoseprovokation mit den Inseln wie im Beispiel 3 durchgeführt. Die Daten sind ebenfalls in der Tabelle 1 gezeigt. Die Inseln waren vital und funktional.

Beispiel 5: Verkapselung von Langerhansschen Inseln

[0121] Dieses Beispiel setzt die direkte Grenzflächenpolymerisation ein. Langerhanssche Inseln, die aus einem menschlichen Pankreas isoliert worden waren, wurden in Makromergelen aus PEG-Tetraacrylat verkapselt. 500 Inseln, die in RPMI-1640-Medium, das 10% fötales Rinderserum enthielt, suspendiert waren, wurden durch Zentrifugieren bei 100 g für 3 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml einer 23%igen (Gew./Vol.) Lösung des PEG-18,5K-Tetraacrylat-Makromers in HEPES-gepufferter Saline resuspendiert. 5 µl einer Ethyleosin-Lösung in Vinylpyrrolidon (in einer Konzentration von 0,5%) wurden zusammen mit 100 µl einer 5 M Lösung von Triethanolamin in Saline dieser Lösung zugesetzt. 20 ml eines Mineralöls wurden dann zu dem Röhrchen gegeben, das kräftig gerührt wurde, um eine Dispersion von Tröpfchen von 200 – 500 µm Größe zu erzeugen. Diese Dispersion wurde dann 30 s einem Argonionenlaser mit einer Energie von 250 mW und einer Emissionswellenlänge von 514 nm ausgesetzt. Das Mineralöl wurde dann abgetrennt, indem man die Mikrokügelchen absitzen ließ, und die resultierenden Mikrokügelchen wurden zweimal mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS), einmal mit Hexan und dreimal mit Medium gewaschen.

[0122] Die Fig. 4 zeigt Langerhanssche Inseln, die in einem Gel aus PEG-Tetraacrylat verkapselt sind. Die Vitalität der Inseln wurde über eine Färbung mit Acridinorange und Propidiumiodid sowie durch eine Färbung mit Dithizon verifiziert. Zur Testung der funktionellen Normalität wurde ein SGS-Test mit diesen Inseln durchgeführt. Die Reaktion der verkapselten Inseln wurde mit derjenigen der freien Inseln verglichen, die über den gleichen Zeitraum in Kultur gehalten wurden. Alle Inseln wurden eine Woche lang in Kultur gehalten, ehe der SGS-Test durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Man kann sehen, dass die verkapselten Inseln signifikant ($p<0,05$) höhere Mengen an Insulin sekretierten als die freien Inseln. Der Prozess der Verkapselung im PEG-Tetraacrylat-Gel beeinträchtigte die Funktion der Inseln nicht und half diesen sogar, ihre Funktion in Kultur besser zu bewahren, als wenn sie nicht verkapselt worden wären.

TABELLE 2: Sekretion von Insulin durch Inselzellen

	Insulinsekretion der Inseln		
	Glucosekonzentration (mg%)		
	60	300	60
	Insulin / Insel / Stunde (µU/ml)*		
freie Inseln	1,0	3,74 ± 1,40	1,9 ± 0,17
verkapselte Inseln	1,0	20,81 ± 9,36	2,0 ± 0,76

* Die Werte sind Mittelwerte ± S.D., normalisiert auf den basalen Ausgangswert bei 60 mg% Glucose.

Beispiel 6: Mikroverkapselung tierischer Zellen

[0123] Es wurden PEG-Diacrylate mit unterschiedlichem Molekulargewicht über eine Reaktion von Acryloylchlorid mit PEG wie in Beispiel 1 hergestellt. Eine 20–30%ige Lösung des Makromers wurde mit einer Zellsuspension und dem Initiationssystem aus Ethyleosin und Triethanolamin gemischt, ehe es durch eine Coextrusionsapparatur mit einem Luftstromeinrichtung, die in der Fig. 5 gezeigt ist, Laserlicht ausgesetzt wurde. Die Mikrokügelchen wurden über einen Luftzerstäubungsprozess hergestellt, bei dem ein Strom des Makromers durch einen ringförmigen Luftstrom zerstäubt wurde. Die Geschwindigkeit des verwendeten Luftstroms betrug 1 600 cm^3/min, und die Geschwindigkeit des Makromerstromes betrug 0,5 ml/min. Man ließ die Tröpfchen in eine Petrischale mit Mineralöl fallen, und dann wurden sie jeweils ungefähr 0,15 s Laserlicht ausgesetzt, um die Mikrokügelchen zu polymerisieren und sie unlöslich in Wasser zu machen. Die Mikrokügelchen wurden vom Öl abgetrennt und gründlich mit PBS-Puffer gewaschen, um nicht-umgesetztes Makromer und restlichen Initiator zu entfernen. Die Größe und die Form der Mikrokügelchen hing von der Extrusionsgeschwindigkeit (0,05 bis 0,1 ml/min) und dem Durchmesser der extrudierenden Kapillare (18 Gauge bis 25 Gauge) ab. Die Polymerisationszeiten hingen von der Konzentration des Initiators ab (der Konzentration des Ethyleosins (5 µM bis 0,5 mM), der Konzentration des Vinylpyrrolidons (0,0% bis 0,1%), der Konzentration des Triethanolamins (5 bis 100 mM), der Laserenergie (10 mW bis 1 W) und der Konzentration des Makromers (über 10% Gew./Vol.).

[0124] Ein PEG-Diacrylat-Makromer mit dem Molekulargewicht 400 Dalton wurde als eine 30%ige Lösung in PBS verwendet, die 0,1 M Triethanolamin als Cokatalysator und 0,5 mM Ethyleosin als Photoinitiator enthielt. Kügelchen, die mittels dieses Verfahrens erhalten wurden, sind in der Fig. 6 gezeigt. Die Polymerisationen wurden bei physiologischem pH in Gegenwart von Luft durchgeführt. Das ist wichtig, da Radikalpolymerisationen durch die Gegenwart von Sauerstoff beeinflusst werden können und die Acrylatpolymerisation trotzdem noch schnell genug ist, um wirkungsvoll ablaufen zu können.

[0125] Der Prozess funktioniert auch bei niedrigeren Temperaturen. Für die Verkapselung von Zellen wurde eine 23%ige Lösung von PEG-Diacrylat unter Initiations- und Polymerisationsbedingungen, wie sie in der Luftzerstäubungstechnik eingesetzt wurden, verwendet. Die Zellvitalität nach der Verkapselung wurde mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstestes kontrolliert. Es wurde gefunden, dass menschliche Vorhautfibroblasten (HFF), Chinese-Hamster-Ovary-Zellen (CHO-K1) und eine Betazell-Insulom-Linie (RiN5F) nach der Verkapselung zu über 95% vital waren. Es kann ein breiter Bereich an PEG-Diacrylat-Konzentrationen von über 10% genauso wirkungsvoll eingesetzt werden wie PEG-Tetraacrylat-Makromere.

Beispiel 7: Beschichtung von Mikrokügelchen aus Alginat-PLL, die tierische Zellen enthalten, sowie individueller Zellen mittels der Oberflächenfarbstoffadsorption

[0126] Koazervierte Mikrokügelchen aus Alginat-PLL, die tierische Zellen enthielten, wurden in einer Lösung von 1,1% $CaCl_2$ suspendiert, und überschüssige Lösung wurde von ihnen abgesaugt, um einen dichten Pfropfen aus Mikrokügelchen zu erhalten. Der Pfropfen aus den Mikrokügelchen wurde 2 min in 10 ml der Eosinlösung suspendiert, um ihnen die Aufnahme des Farbstoffes zu ermöglichen. 2 ml einer Lösung (23% Gew./Vol.)

von PEG-18,5K-Tetraacrylat, die 100 µl einer 3,5%igen (Gew./Vol.) Lösung von Triethanolamin in HEPESgepufferter Saline enthielt, wurde zu 0,5 ml dieser Mikrokügelchen gegeben. Die Mikrokügelchen wurden dem Licht eines Argonionenlasers 30 Sekunden lang unter regelmäßigem Rühren ausgesetzt. Die Suspension der Mikrokügelchen wurde während dieses Zeitraums gleichmäßig mit dem Licht gescannt. Die Mikrokügelchen wurden dann mit Kalziumlösung gewaschen, und der Prozess wurde wiederholt, um eine stabile Beschichtung zu erhalten.

[0127] Um das Überleben der Zellen nach dem Beschichtungsprozess zu verifizieren wurden Zellen in Suspension ohne die Mikrokapsel aus Alginat/PLL ähnlichen Polymerisationsbedingungen ausgesetzt. 1 ml der Zellen der lymphoblastischen Leukämie (RAJI) (5×10^5 Zellen) wurde 3 min bei 300 g zentrifugiert. Es wurde 1 ml einer 0,04%igen filtersterilisierten Lösung von Ethyleosin in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) zugegeben, und das Pellet wurde resuspendiert. Die Zellen wurden dem Farbstoff 1 min lang ausgesetzt, zweimal mit PBS gewaschen und dann abzentrifugiert. 10 µl Triethanolaminlösung (0,1 M) wurden zum Pellet gegeben, und das Röhrchen wurde gemischt, um die Zellen zu resuspendieren. Dann wurden 0,5 ml des PEG-18,5K-Tetraacrylat-Makromers in diese Suspension eingemischt, und die resultierende Mischung wurde 45 s einem Argonionenlaser ausgesetzt (514 nm, 50 mW). Die Zellen wurden dann zweimal mit 10 ml Saline und einmal mit Medium (RPMI 1640 mit 10% FKS und 1 % Antibiotika und Antimykotica) gewaschen. Es wurde beobachtet, dass sich eine dünne Membran aus PEG-Tetraacrylat-Gel um jede einzelne Zelle bildete.

[0128] Es wurde mittels des Trypanblau-Ausschlusstestes kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitalität zwischen der Kontrollpopulation (93% vital) und den behandelten Zellen (95% vital) gesehen. Es wurde ein Test auf die Vitalität und die Funktion der Zellen durchgeführt, indem der MTT-Formazan-Test an die RAJI-Zellen adaptiert wurde. Dieser Test zeigte ein Überleben von über 90% an. Ähnliche Tests wurden mit zwei anderen Modellzelllinien durchgeführt. Chinese-Hamster-Ovary-Zellen (CHO-K1) zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) bezüglich der metabolischen Aktivität im MTT-Formazan-Test. 3T3-Mausfibroblasten zeigen ebenfalls keine signifikante Verminderung ($p>0,50$) der metabolischen Aktivität.

Beispiel 8: Beschichtung von Mikrokügelchen aus Alginat-PLL, die tierische Zellen enthalten

Verfahren der Suspensionspolymerisation

[0129] Unter Einsatz des im Beispiel 4 beschriebenen Verfahrens wurden RAJI-Zellen, die in Mikrokügelchen aus Alginat-PLL verkapselt waren, mit einer polymeren Membran aus PEG-18,5K-Tetraacrylat beschichtet. Die Vitalität dieser Zellen wurde mittels des Trypanblau-Ausschlusstestes geprüft, und es zeigte sich, dass mehr als 95% vital waren.

Beispiel 9: Beschichtung einzelner Langerhansscher Inseln mittels der Oberflächenfarbstoffadsorption

[0130] Unter Einsatz des im Beispiel 7 beschriebenen Verfahrens wurde Ethyleosin an die Oberflächen von Inseln adsorbiert, es wurde eine Lösung des PEG-Makromers mit Triethanolamin den Farbstoff-beschichteten Zellen zugegeben, und die Zellen wurden dem Lichte eines Argonionenlasers ausgesetzt, um eine dicke polymere Membran aus PEG auf der Oberfläche der Inseln zu bilden. Die Vitalität der Inseln wurde anhand des Fehlens einer Anfärbung mit Propidiumiodid demonstriert.

Beispiel 10: Biokompatibilität des PEG auf Mikrokügelchen

[0131] Eine In-vivo-Untersuchung des Ausmaßes der Entzündungsreaktion auf Mikrokügelchen, die in den Beispielen 7 und 8 hergestellt worden waren, wurde über eine Implantation in die Bauchfellhöhle von Mäusen durchgeführt. Ungefähr 0,5 ml der Mikrokügelchen wurden in 5 ml steriler, mit HEPES gepufferter Saline suspendiert. 2,5 ml dieser Suspension wurden in die Bauchfellhöhle männlicher weißer ICR-Swiss-Mäuse injiziert. Die Mikrokügelchen wurden nach 4 Tagen über ein Lavage der Bauchfellhöhle mit 5 ml einer Lösung von 10 U Heparin/ml in PBS wiedergewonnen. Das Ausmaß des Zellwachstums auf den Mikrokügelchen wurde visuell unter einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die Zahl der nicht angehefteten Zellen, die in der gewonnenen Lavageflüssigkeit vorhanden waren, wurde mittels eines Coulter-Counters gezählt.

[0132] Die **Fig. 7a** zeigt eine Fotografie von Mikrokügelchen aus Alginat-Poly-L-lysin, die nach 4 Tagen wiedergewonnen wurden, während die **Fig. 7b** ähnliche Kügelchen zeigt, die vor der Implantation mit einem PEG-Gel mittels der Farbstoffdiffusionsmethode beschichtet worden waren. Wie erwartet, waren die doppelschichtigen Alginat-Polylysin-Kapseln, die keine äußere Alginatschicht enthielten, aufgrund der stark zelladhäsiven Natur der PLL-Oberfläche vollständig mit Zellen bedeckt, während die mit PEG beschichteten Mikrokü-

gelchen praktisch frei von angehefteten Zellen waren. Die nahezu vollständige Bedeckung des Alginat-Poly-L-lysins war erwartet worden, da Polylysin Aminogruppen auf der Oberfläche trägt, und positiv geladene Amine der Oberfläche können mit Proteoglycanen der Zelloberfläche in Wechselwirkung treten und das Zellwachstum unterstützen (Reuveny et al., (1983) Biotechnol. Bioeng. 25: 469-480). Die Fotografien in der **Fig. 7b** zeigen deutlich, dass die hoch geladene und zelladhäsive Oberfläche von PLL mit einer stabilen Schicht des PEG-Gels bedeckt ist. Die Integrität des Gels war offenbar nicht beeinträchtigt.

[0133] Die nicht-zelladhäsive Tendenz dieser Mikrokügelchen wurde anhand des prozentualen Anteils der Gesamtfläche der Mikrokügelchen beurteilt, der durch ein Überwachsen von Zellen bedeckt war. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

TABELLE 3: Bedeckung der Mikrokügelchen durch auf diesen gewachsene Zellen nach einer intraperitonealen Implantation für 4 Tage

Zusammensetzung des PEG-Gels	% Bedeckung mit Zellen
18,5 K	<1
18,5 K 90% : 0,4 K 10%	<1
18,5 K 50% : 0,4 K 50%	<1
35 K 90% : 0,4 K 10%	5–7
35 K 50% : 0,4 K 50%	<1
Alginat-Poly-L-lysin	60–80

[0134] Eine Zunahme der Zellzahl ist eine Folge der Aktivierung residenter Makrophagen, die chemische Faktoren wie Interleukine sekretieren und nicht-residente Makrophagen dazu bringen, zur Implantationsstelle zu wandern. Die Faktoren ziehen auch Fibroblasten an, die für die Collagensynthese verantwortlich sind. Die Abhängigkeit der Zellzahlen von der chemischen Zusammensetzung des Überzuges ist in der **Fig. 8**(a-f) gezeigt. Aus der Figur geht hervor, dass alle PEG-beschichteten Kügelchen wesentlich reduzierte Zellzahlen aufweisen. Das steht in Übereinstimmung damit, dass der PEG-Überzug im allgemeinen keine Reizung der Bauchfellhöhle verursacht.

[0135] Allerdings hat die PEG-Zusammensetzung einen Einfluss auf die Biokompatibilität, und zunehmende Molekulargewichte sind mit einer Verminderung der Zellzahlen assoziiert. Das könnte darauf beruhen, dass die Gele, die aus Oligomeren mit höherem Molekulargewicht hergestellt wurden, aufgrund der höheren Kettenlängen ein stärkeres Potenzial bezüglich einer sterischen Abstoßung zeigen.

Beispiel 11: Permeabilität von PEG-Gelen

[0136] Es wurden 20 mg von Rinderserumalbumin, humanem IgG oder humanem Fibrinogen in 2 ml einer 23%igen (Gew./Vol.) Lösung von oligomerem PEG-18,5K-Tetraacrylat in PBS gelöst.

[0137] Diese Lösung wurde laserpolymerisiert, um ein Gel von 2 cm × 2 cm × 0,5 cm Größe zu erzeugen. Die Diffusion des Rinderserumalbumins, des humanen IgG und des humanen Fibrinogens (Molekulargewichte 66 Kilodalton, 150 Kilodalton bzw. 350 Kilodalton) durch die Fläche dieser Gele von 2 cm × 2 cm wurde mittels eines Reagens zur Erfassung der Gesamtproteinmenge (Biorad) verfolgt. Ein typisches Freisetzungsprofil für ein PEG-18,5K-Gel ist in der **Fig.** 9 gezeigt. Dieses Gel ermöglichte einen langsamen Transport von Albumin, aber es ermöglichte keine Diffusion von IgG und Fibrinogen. Das zeigt, dass diese Gele als immunprotektive Barrieren verwendet werden können. Das ist eine grundlegende Anforderung an ein Material für eine erfolgreiche Mikroverkapselung von tierischem Gewebe.

[0138] Es wurde gefunden, dass das Freisetzungsprofil eine Funktion der Dichte der Vernetzung und des Molekulargewichtes des Polyethylenglycol-Segments des Monomers ist. Die **Fig. 10** zeigt die Freisetzung von Rinderserumalbumin (BSA) durch Gele, die aus 23%igen Lösungen von PEO-Diacrylaten und Tetraacrylaten von 0,4 K bzw. 18,5 K hergestellt wurden. Es ist offensichtlich, dass das 18,5K-Gel für Albumin frei permeabel war, während das 0,4K-Gel die Diffusion von Albumin beschränkte. Die Freisetzung beliebiger Substanzen aus diesen Gelen hängt von der Vernetzungsdichte des Netzwerkes ab und auch von der Beweglichkeit der PEG-Segmente im Netzwerk. Diese Wirkung hing auch von der Funktionalität des Makromers ab. Zum Beispiel war die Permeabilität eines Gels aus PEG-18,5K-Tetraacrylat geringer als diejenige eines ansonsten ähnlichen Gels aus PEG-20K-Diacrylat.

Beispiel 12: Behandlung von Silikongummi zur Bildung einer Schicht aus einem PEG-Gel zur Verbesserung der Biokompatibilität

[0139] Stücke von 2 × 2 cm aus Silikongummi medizinischer Reinheit wurden 1 Stunde lang in Benzol eingeweicht, das 23% 0,4 K PEG-Diacrylat und 0,5% 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon enthielt. Der gequollene Gummi wurde 15 min mit einer Lampe für langwelliges UV-Licht (365 nm) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die Probe in Benzol gespült und getrocknet. Die Luftkontaktwinkel des Silikongummis unter Wasser wurden vor und nach der Behandlung gemessen. Der verringerte Kontaktwinkel von 50° nach der Behandlung im Vergleich zum Ausgangskontaktwinkel von 63° für unbehandelten Silikongummi spiegelt eine erhöhte Hydrophilie aufgrund der Anwesenheit des PEG-Gels auf der Gummioberfläche wieder.

[0140] Diese Technik zeigt, dass eine Makromerpolymerisation dazu verwendet werden kann, eine Polymeroberfläche so zu modifizieren, dass die Biokompatibilität verbessert wird. Zum Beispiel kann ein Katheter aus Polyurethan mittels dieses Verfahrens behandelt werden, um eine implantierbare Vorrichtung zu erhalten, die mit PEG beschichtet ist. Das PEG war fest auf der Oberfläche des Polyurethan-Katheters verankert, da man das Makromer während der Einweichphase vor der Photopolymerisation in die Oberfläche des Katheters eindringen ließ (bis zu einer Tiefe von 1 – 2 µm). Bei der Bestrahlung kommt es zu einem interpenetrierenden Netzwerk aus PEG und Polyurethan. Das PEG wurde dadurch untrennbar mit dem Polyurethan verbunden.

Beispiel 13: Polymerisationsgeschwindigkeit

[0141] Es wurde die Kinetik einer typischen Reaktion bestimmt, um die Schnelligkeit der Gelbildung bei der Laser-initiierten Polymerisationen multifunktioneller Acrylmonomere zu zeigen. Trimethylolpropyltriacrylat, das 5×10^{-4} M Ethyleosin als Photoinitiator in 10 µmol N-Vinylpyrrolidon pro ml der Makromermischung und 0,1 M Triethanolamin als Cokatalysator enthielt, wurde mit einem Argonionenlaser von 500 mW (Wellenlänge 514 nm, Energie $3{,}05 \times 10^5$ W/m^2, Strahldurchmesser 1 mm, durchschnittlicher Durchmesser des erzeugten Gels 1 mm) bestrahlt. Eine grafische Darstellung der Länge des Gel-Spikes, der durch das Eindringen des Laserstrahls in das Gel der Laserbestrahlung gebildet wurde, in Abhängigkeit von der Zeit ist in der **Fig. 11a** gezeigt. Die als Ergebnis des Eindringens des Laserlichts in das Makromer gebildeten Spikes kann man in der **Fig. 11b** sehen.

[0142] Es wurden 100 µl einer 23%igen (Gew./Gew.) Lösung verschiedener Makromere in HEPES-gepufferter Saline, die 3 µl einer Initiatorlösung (300 mg/ml 2,2-Dimethoxy-2-phenoxyacetophenon in N-Vinylpyrrolidon) enthielten, auf ein Deckgläschen aus Glas gegeben und mit einer Lampe für langwelliges UV-Licht niedriger Intensität (LWUV) (Black-Ray, Modell 3 – 100A, mit Strahler). Die Zeiten, die für den Ablauf der Gelbildung benötigt wurde, wurden registriert und sind in der Tabelle 4 wiedergegeben. Diese Zeiten liegen typischerweise im Bereich von 10 Sekunden.

TABELLE 4: Gelbildungszeiten des bestrahlten Polymers

Polymergröße	Gelierzeit (s) (Mittelwert ± S.D.)
0,4 K	6,9 ± 0,5
1 K	21,3 ± 2,4
6K	14,2 ± 0,5
10 K	8,3 ± 0,2
18,5 K	6,9 ± 0,1
20 K	9,0 ± 0,4

[0143] Zeiträume von ungefähr 10 – 100 ms reichen aus, um ein Tröpfchen von 300 µm Durchmesser, eine typische Gelgröße, die in der Mikroverkapselungstechnologie eingesetzt wird, zu gelieren. Diese schnelle Gelbildung kann, wenn sie zusammen mit geeignet gewählten Makromeren eingesetzt wird, zum Einschluss lebender Zellen in einem dreidimensionalen, kovalent verbundenen Polymernetzwerk führen. Monochromatisches Laserlicht wird von den Zellen nicht absorbiert, es sei denn, es ist ein geeignetes Chromophor vorhanden, und es wird angenommen, dass es unschädlich ist, wenn die Wellenlänge über ungefähr 400 nm liegt. Eine Exposition gegen langwelliges ultraviolettes Licht, mit einer Wellenlänge von über 360 nm, ist bei den in der Praxis eingesetzten Intensitäten und Zeiträumen unschädlich.

[0144] Die Polymerisationsgeschwindigkeit des Makromers hängt von der Makromerkonzentration, der Initiatorkonzentration und der Funktionalität des Makromers, z. B. der Difunktionalität eines PEG-Diacrylats oder

der Tetrafunktionalität eines PEG-Tetraacrylats, sowie vom Ausmaß der Acrylierung des Materials ab.

Beispiel 14: Wechselwirkungendes PEG-Gels

[0145] Die Biokompatibilität mit HFF-Zellen (human foreskin fibroblasts, menschlichen Vorhautfibroblasten) wurde wie folgt demonstriert. HFF-Zellen wurden auf Gelen aus PEG-18,5K-Tetraacrylat in einer Dichte von 18 000 Zellen/cm^2 in Dulbeccos Modikikation von Eagles Medium, das 10% fötales Kälberserum enthielt, ausgesät. Die Gele wurden dann bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 4 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Gele mit PBS gewaschen, um alle nicht angehefteten Zellen zu entfernen, und dann unter einem Phasenkontrastmikroskop bei einer Vergrößerung von 200 × betrachtet.

[0146] Die **Fig. 12a** zeigt das Wachstum dieser Zellen auf einem typischen PEG-Gel im Vergleich zu dem auf einer Glasoberfläche (**Fig. 12b**). Es wurde gefunden, dass die Zahl der auf der Geloberfläche angehefteten Zellen/cm^2 bei 510 ± 170 lag, im Vergleich zu 13 200 ± 3 910 für eine als Kontrolle dienende Glasoberfläche. Die Zellen auf diesen Gelen sahen abgerundet aus und zeigten nicht ihre normale ausgebreitete Morphologie, was deutlich darauf hinwies, dass diese Gele die Anheftung von Zellen nicht förderten.

[0147] Die Biokompatibilität auf Mikrokügelchen wurde wie folgt demonstriert. Die **Fig. 13** zeigt eine Fotografie von Mikrokügelchen, die aus Mäusen wie im Beispiel 10 explantiert wurden; nach 4 Tagen sieht man nur eine sehr geringe fibröse Überwachsung. Die Widerstandsfähigkeit der PEG-Ketten gegenüber einer Proteinadsorption und somit einem Zellwachstum ist gut dokumentiert. Die Tabelle 5 fasst das Ausmaß des Überwachsens der Zellen zusammen, das man auf diesen Mikrokügelchen aus Gelen aus verschiedenen PEG-Diacrylaten nach einer viertägigen intraperitonealen Implantation sieht.

Tabelle 5: Ausmaß der Überwachsung von Gelen mit Zellen

PEG-Diacrylat der Gele (Molekulargewicht, Dalton)	Ausmaß der Überwachsung mit Zellen
400	5 – 10%
1 000	15 – 25%
5 000	3 – 5%
6 000	2 – 15%
10 000	10 – 20%
18 500	4 – 10%

Beispiel 15: Charakterisierung und mechanische Analyse von PEG-Gelen

[0148] Es wurden 10 µl einer Initiatorlösung, die 30 mg/ml an 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in Vinyl-2-pyrrolidon enthielt, pro ml zu 23%igen (Gew./Vol.) Lösungen von PEG-Diacrylaten (0,4 K, 6 K, 10 K) und PEG-Tetraacrylaten (18,5 K) gegeben. Die Lösung des den Initiator enthaltenden Makromers wurde in eine Form von 4,0 × 1,0 × 0,5 cm gegeben und ungefähr 10 Sekunden einer Lampe für langwelliges ultraviolettes Licht (365 nm) ausgesetzt, um die Gelbildung zu induzieren. Man ließ die Proben in Phosphat-gepufferter Saline (pH 7,4) eine Woche äquilibrieren, ehe die Analyse durchgeführt wurde.

[0149] Eine Reihe von „Hundeknochen"-Proben (Proben, die aus einer Platte in Form eines Hundeknochens geschnitten worden waren, mit breiten Bereichen an beiden Enden und einem schmaleren langen Bereich in der Mitte) wurde für Tests der Reißfestigkeit geschnitten. Die Dicke der Proben war durch die Dicke der Probe, von der sie ausgeschnitten wurden, definiert.

[0150] Diese Dicken lagen im Bereich zwischen ungefähr 0,5 mm bis 1,75 mm. Die Proben waren 20 mm lang und im Bereich des schmalen „Halses" 2 mm breit. Die Spannungs-Dehnungs-Tests wurden bei kontrollierter Länge mit einer Geschwindigkeit von 4% pro Sekunde durchgeführt. Nach jedem Test wurde die Querschnittsfläche bestimmt. Die Tabelle 6 zeigt die Daten zur Reissfestigkeit. Man sieht, dass die Makromere mit niedrigerem Molekulargewicht im allgemeinen zu stabileren Gelen führen, die weniger dehnbar sind als diejenigen, die aus den Makromeren mit höherem Molekulargewicht hergestellt wurden. Man sieht, dass sich das Gel aus PEG-18,5K-Tetraacrylat in dieser Reihe abnormal verhält, was aus der Multifunktionalität des Makromers und der entsprechenden höheren Vernetzungsdichte des resultierenden Gels resultiert. Dieser Typ einer Verstärkungswirkung könnte ganz ähnlich mit Makromeren erhalten werden, die vier andere, gegenüber freien Radikalen empfindliche Gruppen als Acrylatgruppen aufweisen.

Tabelle 6: Tests der Gelstabilität

	Molekulargewicht des PEG-Acrylat-Vorläufers			
	0,4 K	6 K	10 K	18,5 K
Spannung (kPa)*	168 ± 51	98 ± 15	33 ± 7	115 ± 56
% Dehnung*	8 ± 3	71 ± 13	110 ± 9	40 ± 15
Steigung*	22 ± 5	1,32 ± 0,31	0,27 ± 0,04	2,67 ± 0,55

* Die Werte sind Mittelwerte ± S.D.

[0151] Für die Kriechversuche wurden acht Proben von ungefähr 0,2 × 0,4 × 2 cm geladen, wobei sie in einer Salinelösung untergetaucht waren. Sie wurden 1 Stunde lang mit einer konstanten, einmaligen, vorher festgelegten Belastung und mit einer kleinen Erholungsbelastung 10 min lang getestet. Es wurden Gele in dieser Studie eingesetzt, die aus PEG-Diacrylaten mit Molekulargewichten von 1 K, 6 K und 10 K und aus PEG-Tetraacrylaten von 18,5 K hergestellt worden waren. Der Test mit der 10K-Probe wurde aufgrund eines Begrenzungsfehlers abgebrochen (die Probe dehnte sich über die Wanderungsstrecke des Laderahmens). Die 1K-Probe wurde mit einer Belastung von 10 g und einer Erholungsbelastung von 0,2 g getestet. Die 6K-Probe wurde mit einer Belastung von 13 g und einer Erholungsbelastung von 0,5 g getestet. Die 18,5K-Probe wurde mit einer Belastung von 13 g und einer Erholungsbelastung von 0,2 g getestet. Die Wahl der Belastungen für diese Proben führte zu klassischen Kriechkurven mit primären und sekundären Bereichen. Die Kriechspuren für die 1K-, 6K- und 18,5K-Probe finden sich in den **Fig.** 14a–c.

Beispiel 16: Wassergehalt der PEG-Gele

[0152] Es wurden Lösungen verschiedener Makromere wie oben beschrieben hergestellt. Gele in Form runder Scheiben wurden mittels einer Form hergestellt. Es wurden 400 µl Lösung für jede Scheibe verwendet. Die Lösungen wurden 2 min bestrahlt, um eine gründliche Gelbildung sicher zu stellen. Die zu runden Scheiben geformten Gele wurden entnommen und bei 60°C 2 Tage im Vakuum getrocknet. Die Scheiben wurden gewogen (G1) und dann 1 Tag lang mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die Scheiben wurden erneut getrocknet und gewogen (G2). Der Gelanteil wurde als G2/G1 berechnet. Die Daten finden sich in der Tabelle 7.

[0153] Nach der Extraktion wurden die runden 6 Stunden lang mit HBS äquilibriert und gewogen (G3), nachdem überschüssiges Wasser sorgfältig abgewischt worden war. Der gesamte Wassergehalt wurde als (G3–G2) × 100/G3 berechnet. Die Daten für die Wassergehalte der Gele sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 7: Daten zum Wassergehalt der Gele

Polymercode	% gesamtes Wasser	% Gelgehalt
0,4 K	-	99,8 ± 1,9
1 K	79,8 ± 2,1	94,5 ± 2,0
6 K	95,2 ± 2,5	69,4 ± 0,6
10 K	91,4 ± 1,6	96,9 ± 1,5
18,5 K	91,4 ± 0,9	80,3 ± 0,9
20 K	94,4 ± 0,6	85,0 ± 0,4

Beispiel 17: Mechanische Stabilität von PEG-Gelen nach der Implantation

[0154] PEG-Diacrylat (10 K) und PEG-Tetraacrylat (Molekulargewicht 18,5 K) wurden, wie in Beispiel 15 beschrieben, in Hundeknochen-artige Formen gegossen. Eine Lösung von 23% (Gew./Gew.) PEG-Diacrylat oder

-Tetraacrylat in steriler HEPES-gepufferter Saline (HBS) (0,9% NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4), die 900 ppm 2,2-Dimethoxy-2-phenoxyacetophenon als Initiator enthielt, wurde in eine Aluminiumform gegossen und 1 min lang mit einer LWUV-Lampe (Black ray) bestrahlt. Die Anfangsgewichte dieser Proben wurden erhalten, nachdem diese Gele in einem Ofen bis zu einem konstanten Gewicht getrocknet worden waren. Die Proben wurden in einem Soxhlet-Extraktor 36 Stunden mit Methylenchlorid extrahiert, um möglicherweise vorhandenes, nicht umgesetztes Präpolymer aus der Gelmatrix vor der Testung auszulaugen(Sol-Laugung). Der Extraktionsprozess wurde fortgesetzt, bis die getrockneten Gele ein konstantes Gewicht hatten.

[0155] Männliche weiße ICR-Swiss-Mäuse, 6–8 Wochen alt (Sprague-Dawley), wurden mittels einer intraperitonealen Injektion von Natriumpentobarbital betäubt. Der Unterleibsbereich der Maus wurde rasiert und mit Betadin behandelt. Es wurde ein Einschnitt von 10 – 15 mm Länge längs der ventralen Mittellinie vorgenommen. Die Polymerprobe, die vollständig in steriler PBS (Phosphat-gepufferter Saline) oder HEPES-gepufferter Saline (für Kalzifizierungsstudien) hydriert worden war, wurde durch den Einschnitt eingeführt und über dem Mesenterium, entfernt vom Ort der Wunde, placiert. Die Wand der Bauchhöhle wurde mit einer Steppstich-Naht (4,0-Seide, Ethicon) geschlossen. Die Haut wurde mit Klammern aus rostfreiem Stahl geschlossen, und es wurde ein topisches Antibiotikum (Furacin) auf den Schnitt aufgetragen. Drei Tiere wurden für jeden Zeitpunkt verwendet. Es wurde eine Hundeknochen-förmige Probe pro Maus implantiert und am Ende der 1. Woche, nach 3 Wochen, nach 6 Wochen und nach 8 Wochen explantiert. Die explantierten Gele wurden zweimal in HBS gespült und dann mit 0,3 mg/ml Pronase (Calbiochem) behandelt, um alle möglicherweise anhaftenden Zellen sowie Gewebe zu entfernen. Die Proben wurden dann bis zu einem konstanten Gewicht im Ofen getrocknet, extrahiert und wie zuvor erwähnt erneut gequollen.

[0156] Zugspannungs-Dehnungs-Tests wurden sowohl mit Kontrollen (nicht-implantierten) und den explantierten Hundeknochen in einer kleinen horizontalen, Instron-artigen Vorrichtung durchgeführt. Die Vorrichtung ist eine Aluminiumplattform, die aus zwei Klammern besteht, die flach auf einem Holzbrett zwischen zwei parallelen Aluminiumführungen montiert sind. Die obere Klammer ist stationär, während die untere Klammer bewegt werden kann. Die Reibungsoberfläche der sich bewegenden Klammer und auch diejenige der Plattform sind mit Aluminium-gestütztem Teflon (Cole-Parmer) beschichtet, um den Reibungswiderstand zu minimieren. Die sich bewegende Klammer ist an einer Vorrichtung befestigt, die eine sich allmählich steigernde Belastung ausüben kann. Der gesamte Aufbau ist horizontal unter einem Präpariermikroskop (Reichert) angeordnet, und die Dehnung der Probe wird mittels einer Videokamera verfolgt. Das Bild der Kamera wird von einem Bildverarbeitungssystem (Argus-10, Hamamatsu) verarbeitet und auf einen Monitor geschickt. Nach dem Reißen wird die gerissene Oberfläche quer geschnitten, und es wird die Fläche gemessen. Die Belastung beim Reißen wird durch diese Querschnittsfläche geteilt, um die Reißfestrigkeit zu ermitteln. Die Tabelle 8 führt die Spannung beim Reißen der Hydrogele aus PEG-Tetraacrylat (18,5 K) auf, die zu verschiedenen Zeitpunkten explantiert worden waren. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Reißfestigkeit in Abhängigkeit von der Zeit. Somit sind die Gele offenbar über den maximalen Zeitraum der Implantation in Mäuse gegenüber einem biologischen Abbau in vivo stabil.

TABELLE 8: Widerstandsfähigkeit von Polymerimplantaten gegenüber einem Abbau

IMPLANTATIONS-DAUER	SPANNUNG (kPa) (Mittelwert ± Fehler*)	DURCHSCHN. DEHNUNG (Mittelwert ± Fehler*)
1 Woche	52,8 ± 16,7	0,32 ± 0,19
3 Wochen	36,7 ± 10,6	0,37 ± 0,17
6 Wochen	73,3 ± 34,9	0,42 ± 0,26
8 Wochen	34,1#	0,30#
KONTROLLE	44,9 ± 5,3	0,22 ± 0,22

* Fehler basierend auf Vertrauensbereich von 90%

\# eine Probe

Beispiel 18: Verfolgung der Kalzifizierung von PEG-Gelen

[0157] Hydrogele aus PEG-Tetraacrylat (Molekulargewicht 18,5 K) in Form runder Scheiben wurden für Zeit-

räume von 1 Woche, 3 Wochen, 6 Wochen oder 8 Wochen intraperitoneal Mäusen implantiert, wie es oben beschrieben wurde,. Die explantierten Gele wurden zweimal mit HBS gespült und mit Pronase (Calbiochem) behandelt, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die Proben wurden dann in HBS äquilibriert, um freies Ca^{++} aus der Gelmatrix heraus diffundieren zu lassen. Die Gele wurden dann in einem Ofen (Blue-M) bis zu einem konstanten Gewicht getrocknet und in Schiffchen aus Aluminiumoxid (COORS, widerstandsfähig gegenüber hohen Temperaturen) gegeben. Sie wurden in einem Ofen bei 700°C wenigstens 18 Stunden lang verbrannt. Die Schiffchen wurden bezüglich einer vollständigen Verbrennung untersucht, und wenn noch etwas restliches Material oder Trümmer vorhanden warfen), dann wurden sie für weitere 12 Stunden geglüht. Anschließend wurden die Schiffchen mit 2 ml 0,5 M HCl gefüllt, um Ca^{++}-Salze und andere Mineralien in der Probe zu lösen. Diese Lösung wurde filtriert und mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AA) bezüglich des Kalziumgehaltes untersucht.

[0158] Die Kalzifizierungsdaten der Implantate aus dem PEG-Tetraacrylat (Molekulargewicht 18,5 K) sind in der Tabelle 9 angegeben. Es wurde bis zu einer Implantationsdauer in Mäuse von 8 Wochen keine signifikante Zunahme der Kalzifizierung beobachtet.

TABELLE 9: Kalzifizierungsdaten für Gelimplantate aus PEG-Tetraacrylat (Molekulargewicht 18,5 K)

ZEIT (Tage)	KALZIFIZIERUNG (Mittelwert ± Fehler*) (mg Kalzium/g Gel-Trockengewicht)
7	2,33 ± 0,20
21	0,88 ± 0,009
42	1, 08 ± 0,30
56	1,17 ± 0,26

* Fehler auf der Basis des 90%-Vertrauensbereiches

Beispiel 19: Verwendung von PEG-Gelen als Klebstoff zur Wiederverbindung durchtrennter Nerven

[0159] Es wurde eine Formulierung von PEG-Tetraacrylat (10%, 18,5 K) als Klebstoff zur Stabilisierung der nahtlosen Verbindung der Enden der durchschnittenen Ischiasnerven der Ratte verwendet. Die Ratten standen während der sterilen chirurgischen Eingriffe unter einer Pentobarbital-Narkose. Der Ischiasnerv wurde von der Seite her durch das Wegbiegen der Köpfe des Biceps femoralis auf Höhe des mittleren Schenkels frei gelegt. Der Ischiasnerv wurde über eine Strecke von ungefähr 1 cm gelockert und mit einer Iridektomie-Schere ungefähr 3 mm proximal zur Schienbein-Wadenbein-Bifurkation durchtrennt. Die Lücke zwischen den Enden der durchtrennten Nerven betrug 2 – 3 mm. Die Wunde wurde mit Saline gespült und sanft ausgetupft, um überschüssige Saline zu entfernen. Es wurde eine sterile Lösung von nicht-polymerisiertem PEG-Tetraacrylat in die Wunde eingebracht. Mittels einer feinen Pinzette für das Halten der Adventitia oder des Perineuriums wurden die Nervenenden aneinander gefügt, die Makromerlösung, die 2,2-Dimethoxy-2-phenoxyacetophenon als Photoinitiator enthielt, wurde auf die Nervenenden aufgetragen, und die Wunde wurde ungefähr 10 s langwelligem UV-Licht (365 nm) ausgesetzt, um den Klebstoff zu polymerisieren. Die Pinzette wurde sanft weggezogen. Es wurde darauf geachtet zu vermeiden, dass die Makromerlösung zwischen die beiden Nervenstümpfe floss. Als Alternative wurde die Verbindung der Nervenstümpfe vor der Beleuchtung abgeschirmt, z.B. mit einer Metallfolie, um eine Gelbildung der Makromerlösung zwischen den Stümpfen zu verhindern; die verbleibende Makromerlösung wurde dann einfach abgewaschen.

[0160] Bei einem alternativen Ansatz können beide Enden des durchtrennten Nervens mit einem Paar Pinzetten zusammengehalten werden. Die Spitzen der Pinzetten werden leicht mit Petrolatum beschichtet, um eine Reaktion mit dem Klebstoff zu verhindern.

[0161] Der polymerisierte Klebstoff dient zur Verkapselung der Wunde und zur Anheftung des Nerven auf dem darunter liegenden Muskel. Die Anastomose der Nervenenden widersteht einer sanften Bewegung der Verbindung, was ein gewisses Ausmaß an Stabilisierung anzeigt. Der Muskel und die Haut wurden mit Nähten geschlossen. Eine erneute Untersuchung nach einem Monat zeigt, dass die getrennten Nerven trotz der ungehinderten Aktivität der Tiere verbunden blieben.

Beispiel 20: Chirurgischer Klebstoff

[0162] Es wurden Muskellappen aus dem Unterleib weiblicher weißer Neuseeland-Kaninchen geschnitten und zu Streifen von 1 cm × 5 cm zugeschnitten. Die Lappen waren ungefähr 0,5 bis 0,8 cm dick. Die Verbindung der Lappen, 1 cm × 1 cm, wurde mit Hilfe von zwei derartigen Lappen hergestellt. Es wurden zwei ver-

schiedene Makromerzusammensetzungen aus PEO-Di- und -Tetraacrylat, 0,4K (Di-) und 18,5K (Tetra-), verglichen. Die 0,4K-Zusammensetzung war eine visköse Flüssigkeit und wurde ohne weitere Verdünnung verwendet. Die 18,5K-Zusammensetzung wurde als eine 23%ige (Gew./Gew.) Lösung in HBS verwendet. 125 µl einer Ethyleosinlösung in N-Vinylpyrrolidon (20 mg/ml) wurden zusammen mit 50 µl Triethanolamin zu jedem ml der Klebstofflösung gegeben. 100 µl der Klebstofflösung wurden auf jeden der einander überlappenden Lappen aufgetragen. Die Verbindung der Lappen wurde dann durch ein Scannen mit einem 2-W-Argonionenlaser für 30 s von jeder Seite bestrahlt. Die Festigkeit der resultierenden Verbindungen wurde über das Bestimmen der Kraft gemessen, die für das Scheren der Verbindung benötigt wurde. Das eine Ende der Verbindung wurde festgeklammert, und es wurde eine zunehmende Belastung auf das andere Ende ausgeübt, wobei die Verbindung waagerecht gehalten wurde, bis sie riss. Es wurden vier Verbindungen für jede Zusammensetzung getestet. Die 0,4K-Verbindungen hatten eine Festigkeit von 12,0 ± 6,9 kPa (Mittelwert ± S.D.), während die 18,5K-Verbindungen eine Festigkeit von 2,7 ± 0,5 kPa hatten. Es ist wichtig anzumerken, dass es möglich war, eine Photopolymerisation und eine annehmbare Festigkeit der Verbindung zu erzielen, obwohl das Gewebe 6 – 8 mm dick war. Eine spektralphotometrische Abschätzung unter Verwendung von Licht von 514 nm zeigte eine Transmission von unter 1 % durch dieses Muskelgewebe.

Beispiel 21: Modifizierung von Polyvinylalkohol

[0163] 2 g Polyvinylalkohol (Molekulargewicht 100 000 – 110 000) wurden in 20 ml heißem DMSO gelöst. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, und es wurden 0,2 ml Triethylamin und 0,2 ml Acryloylchlorid unter heftigem Rühren unter einer Argonatmosphäre zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden lang auf 70°C erhitzt und abgekühlt. Das Polymer wurde in Aceton ausgefällt, in heißem Wasser wieder gelöst und erneut in Aceton ausgefällt. Schließlich wurde es im Vakuum 12 Stunden lang bei 60°C getrocknet. Eine 5–10%ige (Gew./Vol.) Lösung dieses Polymers in PBS wurde mit dem UV-Photoinitiator gemischt und unter Verwendung von langwelligem UV-Licht polymerisiert, um Mikrokügelchen von 200 – 1 000 µm Größe herzustellen.

[0164] Diese Mikrokügelchen waren stabil gegenüber einem Autoklavieren in Wasser, was anzeigt, dass das Gel kovalent vernetzt ist. Das Gel ist extrem elastisch. Dieses Makromer, PVA-Multiacrylat, kann zur Erhöhung der Vernetzungsdichte in Gelen aus PEG-Diacrylat verwendet werden, was zu entsprechenden Veränderungen hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften und der Permeabilität führt. Dieser Ansatz könnte mit einer beliebigen Zahl wasserlöslicher Polymere, die chemisch mit photopolymerisierbaren Gruppen modifiziert sind, verfolgt werden, z.B. mit wasserlöslichen Polymeren, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die besteht aus Polyvinylpyrrolidon, Polyethyloxazolin, Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Copolymeren, Polysacchariden wie Dextran, Alginat, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Heparin, Heparinsulfat, Heparansulfat, Guargummi, Gellangummi, Xanthangummi, Carrageenangummi sowie Proteinen wie Albumin, Collagen und Gelatine.

Beispiel 22: Verwendung alternativer photopolymerisierbarer Gruppen

[0165] Es können viele photopolymerisierbare Gruppen verwendet werden, um eine Gelbildung zu ermöglichen. Zur Veranschaulichung einer typischen alternativen Synthese wird im Folgenden eine Synthese von PEG-1K-Urethanmethacrylat beschrieben:

[0166] Es wurden 10 g PEG-1K-Diol in einem Rundkolben von 250 ml in 150 ml Benzol gelöst. Es wurden langsam 3,38 g 2-Isocyanatoethylmethacrylat und 20 µl Dibutylzinndilaurat in den Kolben gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Rückfluss 6 Stunden gekocht, abgekühlt und in 1 000 ml Hexan gegossen. Das Präzipitat wurde dann abfiltriert und im Vakuum bei 60°C 24 Stunden getrocknet. In diesem Falle war eine über freie Radikale polymerisierbare Methacrylatgruppe über eine Urethanbindung am Polymer befestigt statt über eine Esterbindung, wie sie z.B. erhalten wird, wenn es mit Aryloxylchlorid umgesetzt wird.

Beispiel 23: Bildung von Mikrokapseln aus Alginat-PLL-Alginat mit photopolymerisierbaren Polykationen

[0167] Mikrokapseln aus Alginat-Polylysin-Alginat werden über das Adsorbieren oder Koazervieren eines Polykations wie Polylysin (PLL) auf einem gelierten Mikrokügelchen aus Alginat hergestellt. Die resultierende Membran wird über Wechselwirkungen zwischen Ladungen zusammengehalten und hat somit eine begrenzte Stabilität. Um diese Stabilität zu erhöhen, kann das Polykation z.B. über die Einführung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung photopolymerisierbar gemacht werden. Dies kann zur Erhöhung der Stabilität der Membran ohne weitere Prozesse oder für eine Reaktion mit beispielsweise photopolymerisierbarem PEG zur Verbesserung der Biokompatibilität eingesetzt werden.

[0168] Es wurden, um die Synthese eines derartigen photopolymerisierbaren Polykations zu veranschaulichen, 1 g Polyallylaminhydrochlorid in ein Becherglas von 100 ml eingewogen und in 10 ml destilliertem Wasser (DW) gelöst. Der pH der Polymerlösung wurde mittels 0,2 M Natriumhydroxidlösung auf 7 eingestellt. Das Polymer wurde dann durch die Ausfällung in einem großen Überschuss Aceton abgetrennt. Es wurde dann erneut in 10 ml DW aufgelöst, und die Lösung wurde in einen Rundkolben von 50 ml gegeben. Es wurden langsam 0,2 ml Glycidylmethacrylat in das Reaktionsgefäß gegeben, und die Reaktionsmischung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde in 200 ml Aceton gegossen, und das Präzipitat wurde durch Filtration abgetrennt und im Vakuum getrocknet. Dieses Makromer ist für die photochemische Stabilisierung eines Alginat-PLL-Alginats nützlich, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit einer zweiten polymerisierbaren Spezies, wie eines PEG-Diacrylats.

[0169] Zusätzlich zur Verwendung bei der Verkapselung von Zellen in Materialien wie Alginat könnten derartige photopolymerisierbare Polykationen als ein Primer oder Kopplungsagens zur Erhöhung der Polymeradhäsion an Zellen, Zellaggregaten, Geweben und synthetischen Materialien nützlich sein, und zwar aufgrund einer Adsorption des photopolymerisierbaren Polymers, das an das photopolymerisierbare PEG-Gel bindet.

Beispiel 24: Verkapselung von Hämoglobin für synthetische Erythrozyten

[0170] Hämoglobin kann in seiner freien Form in PEG-Gelen verkapselt werden und durch die Auswahl einer PEG-Kettenlänge und einer Vernetzungsdichte, die eine Diffusion verhindern, zurück gehalten werden. Die Diffusion von Hämoglobin aus den Gelen kann weiter durch die Verwendung von Polyhämoglobin, das eine vernetzte Form von Hämoglobin ist, verhindert werden. Das Polyhämoglobinmolekül ist zu groß, als dass es aus dem PEG-Gel diffundieren könnte. Eine geeignete Verkapselung von entweder nativem oder vernetztem Hämoglobin kann für die Herstellung synthetischer Erythrozyten eingesetzt werden. Das Einschließen von Hämoglobin in kleinen Kugeln von weniger als 5 µm aus diesen äußerst biokompatiblen Materialien sollte zu verbesserten Zirkulationszeiten im Vergleich zu vernetztem Hämoglobin oder in Liposomen verkapseltem Hämoglobin führen.

[0171] Hämoglobin in PBS wird mit dem Präpolymer in der folgenden Formulierung gemischt:

Hämoglobin in der gewünschten Menge	
PEG-DA (MG 10 000)	35%
PEG-DA (MG 1 000)	5%
PBS	60%

und 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in einer Menge von 1,6% der obigen Lösung.

[0172] Diese Lösung wird in einem Verhältnis von 1 Teil Hämoglobin/Präpolymerlösung zu 5 Teilen Mineralöl in Mineralöl gegeben und schnell mit einem motorisierten Mischer zur Bildung eine Emulsion gemischt, die dann mit langwelligem ultraviolettem Licht (360 nm) 5 min belichtet wird, um das PEG-Präpolymer unter Bildung eines Gels zu vernetzen. Das Molekulargewicht des Präpolymers kann so gewählt werden, dass es eine Diffusion des Hämoglobins aus dem Gel verhindert, wobei niedrigere Molekulargewichte des PEG zu einer geringeren Diffusion führen. PEG-DA mit einem Molekulargewicht von 100 000, das außerdem mit PEG-DA mit einem Molekulargewicht von 1 000 vernetzt ist, sollte die geeignete Selektivität bezüglich der Permeabilität besitzen, um eine Diffusion des Hämoglobins zu begrenzen, und es sollte die geeignete Biokompatibilität aufweisen, um im Blutstrom zirkulieren zu können.

Beispiel 25: Einschluss von Enzymen für die Korrektur metabolischer Erkrankungen und für die Chemotherapie

[0173] Der angeborene Mangel des Enzyms Katalase verursacht die Akatalasämie. Die Immobilisierung von Katalase in Netzwerken aus einem PEG-Gel könnte ein Verfahren eines Enzymersatzes zur Behandlung dieser Krankheit bereit stellen. Der Einschluss von Glucosidase kann ganz ähnlich für die Behandlung der Gaucher-Krankheit nützlich sein. PEG-Gele in Form von Mikrokügelchen, die Urease einschließen, kann in extrakorporalem Blut zur Umwandlung von Harnstoff in Ammoniak eingesetzt werden. Enzyme wie Asparaginase können Aminosäuren abbauen, die von Tumorzellen benötigt werden. Die Immunogenität dieser Enzyme verhindert den direkten Einsatz in der Chemotherapie. Der Einschluss solcher Enzyme in PEG kann jedoch eine erfolgreiche Chemotherapie unterstützen. Es kann eine geeignete Formulierung für entweder eine langsame Freisetzung oder gar keine Freisetzung des Enzyms entwickelt werden.

[0174] Katalase in PBS wird mit dem Präpolymer in der folgenden Formulierung gemischt:

Katalase in der gewünschten Menge	
PEG-DA (MG 10 000)	35%
PEG-DA (MG 1 000)	5%
PBS	60%

und 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in einer Menge von 1,6% der obigen Lösung.

[0175] Diese Lösung wird in einem Verhältnis von 1 Teil Katalase/Präpolymerlösung zu 5 Teilen Mineralöl in Mineralöl gegeben und schnell mit einem motorisierten Mischer gerührt, um eine Emulsion zu bilden. Diese Emulsion wird mit langwelligem ultraviolettem Licht (360 nm) 5 min belichtet, um das PEG-Präpolymer unter Bildung eines Gels zu vernetzen. Das Molekulargewicht des Präpolymers kann so ausgewählt werden, dass es die Diffusion der Katalase aus dem Gel verhindert, wobei kleinere Molekulargewichte des PEG-DA zu einer geringeren Diffusion führen.

[0176] PEG-DA mit einem MG von 10 000, das ferner mit PEG-DA mit einem MG von 1 000 vernetzt ist, sollte die geeignete Selektivität bezüglich der Permeabilität aufweisen, um die Diffusion der Katalase zu einzuschränken, und es sollte die geeignete Selektivität bezüglich der Permeabilität aufweisen, um die Diffusion von Wasserstoffperoxid zu der im Gel eingeschlossenen Katalase zu erlauben, um die enzymatische Entfernung des Wasserstoffperoxids aus dem Blutstrom zu ermöglichen. Weiterhin sollte es die geeignete Biokompatibilität aufweisen, um im Blutstrom zirkulieren zu können.

[0177] Auf diese Weise wird das Gel zur kontrollierten Aufnahme eines biologisch aktiven Agens im Körper verwendet. Das aktive Agens (Enzym) ist groß und wird im Gel zurück gehalten, und das Agens, auf das es einwirkt (Substrat), ist klein und kann in das enzymreiche Kompartiment diffundieren. Das aktive Agens wird jedoch am Verlassen des Körpers oder des gewünschten Körperkompartiments gehindert, da es nicht aus dem Gelkompartiment diffundieren kann.

Beispiel 26: Mikroverkapselung von Zellen zur Untersuchung von Arzneimitteln gegen das humane AIDS-Virus in vivo

[0178] HIV-infizierte oder nicht-infizierte humane lymphoblastoide T-Zellen können in PEG-Gelen, wie es für andere Zellen oben beschrieben wurde, verkapselt werden. Diese Mikrokapseln können in ein Tier, das kein Mensch ist, implantiert werden, um ein Testsystem für Arzneimittel gegen HIV bereit zu stellen, und dann mit den zu testenden Arzneimitteln, wie AZT oder DDI, behandelt werden. Nach der Behandlung können die Mikrokapseln wiedergewonnen werden, und die verkapselten Zellen können bezüglich ihrer Vitalität und funktionellen Normalität mittels eines Testes mit Fluoresceindiacetat / Ethidiumbromid zur Unterscheidung lebender und toter Zellen untersucht werden. Das Überleben der infizierten Zellen zeigt die erfolgreiche Wirkung des Arzneimittels an. Das Fehlen einer Biokompatibilität ist ein dokumentiertes Problem bei diesem Ansatz zur Untersuchung von Arzneimitteln, aber es kann durch die Verwendung der hier beschriebenen Gele überwunden werden.

Patentansprüche

1. Nicht-zytotoxisches Verfahren zur Verkapselung, Versiegelung, Füllung oder Stützung eines biologischen Materials oder zur Herstellung eines biokompatiblen Trägermaterials, wobei das Verfahren umfasst:
a) Bereitstellen einer Makromermischung durch das Mischen
(i) eines synthetischen, polymeren, wasserlöslichen, biokompatiblen Makromers, das wenigstens zwei über freie Radikale polymerisierbare Substituenten aufweist, wobei das Makromer nicht-toxisch ist und ein Molekulargewicht von wenigstens 400 hat; und
(ii) eines nicht-toxischen Initiators einer über freie Radikale verlaufenden Polymerisation, der aus einem durch sichtbares Licht aktivierbaren und einem durch langwelliges ultraviolettes Licht aktivierbaren Initiator ausgewählt ist;
b) Beschichten eines biologischen Materials oder eines Trägermaterials in vitro mit der Makromermischung, wobei das biologische Material aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Säugetierzellen, subzellulären Organellen, subzellulären Komponenten und Aggregaten von Säugetierzellen besteht, und das Trägermaterial ausgewählt ist aus Mikrokapseln, gewebten Matrices, porösen Matrices und prothetischen Implantaten; und
c) Exponieren des beschichteten biologischen Materials oder des beschichteten Trägermaterials gegen sichtbares oder langwelliges ultraviolettes Licht, um eine Polymerisation der Makromere zu bewirken, wodurch ein

Polymergel mit einem Polymerisationsgrad von über 10 gebildet wird.

2. Nicht-zytotoxisches Verfahren zur Verkapselung, Versiegelung, Füllung oder Stützung eines biologischen Materials oder zur Herstellung eines biokompatiblen Trägermaterials, wobei das Verfahren umfasst:
a) Inkontaktbringen eines biologischen Materials mit einer Lösung eines nichttoxischen Initiators einer über freie Radikale verlaufenden Polymerisation, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Initiatoren besteht, die durch sichtbares oder langwelliges ultraviolettes Licht aktivierbar sind, um die Bindung des Initiators an das biologische Material zu ermöglichen;
b) Entfernen des nicht gebundenen Initiators durch Waschen oder Verdünnen;
c) Inkontaktbringen des biologischen Materials in vitro mit einem wasserlöslichen, nicht-toxischen biokompatiblen Makromer, das wenigstens zwei über freie Radikale polymerisierbare Substituenten aufweist, wobei das Makromer ein Molekulargewicht von wenigstens 400 hat; und
d) Exponieren des biologischen Materials gegen ein Agens, das den genannten Initiator aktiviert, um eine Polymerisation der Makromere zu bewirken, wodurch ein Polymergel mit einem Polymerisationsgrad von über 10 gebildet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das biologische Material aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Säugetierzellen, subzellulären Organellen, subzellulären Komponenten und Aggregaten von Säugetierzellen besteht.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die über freie Radikale polymerisierbaren Substituenten Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppel- oder -Dreifachbindungen enthalten.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Initiator zusammen mit einem nichttoxischen Katalysator verwendet wird.

6. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei das wasserlösliche Makromer aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Poly(ethylenglycol), Poly(ethylenoxid), Poly(vinylalkohol), Poly(vinylpyrrolidon), Poly(ethyloxazolin) oder einem Block- oder Random-Copolymer davon, das zwei oder mehr über freie Radikale polymerisierbare Substituenten aufweist.

7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das wasserlösliche Makromer aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Poly(aminosäuren), Polysacchariden, Proteinen oder einem Block- oder Random-Copolymer davon, das zwei oder mehr über freie Radikale polymerisierbare Substituenten aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Polysaccharid aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Alginat, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dextran, Dextransulfat, Heparin, Heparinsulfat, Heparansulfat, Chitosan, Gellangummi, Xanthangummi, Guargummi und κ-Carrageenan.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Gelatine, Collagen, Albumin, Zein und Elastin besteht.

10. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gel aus Makromeren hergestellt wird, die ein durch Acrylat terminiertes Poly(ethylenglycol) umfassen.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 zur Verkapselung eines biologisch aktiven Moleküls, wobei das biologisch aktive Molekül aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Peptiden, Polysacchariden, Nucleinsäuren, organischen Arzneimitteln und anorganischen Arzneimitteln besteht.

12. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Initiator der Polymerisation aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus einem Eosinfarbstoff, einem substituierten Eosinfarbstoff, Eosin Y, Ethyleosin, Riboflavin, Acetophenon, einem substituierten Acetophenon, einem Fluoresceinfarbstoff, einem substituierten Fluoresceinfarbstoff, Kampferchinon, Bengalrosa, Methylengrün, Methylenblau, Acridinorange, Erythrosin, Phloximin, Thionin, Xanthinfarbstoffen und Thioxanthinfarbstoffen.

13. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Katalysator ein Amin ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Amin aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Triethanolamin, Triethylamin, Ethanolamin, N-Methyldiethanolamin, N,N-Dimethylbenzylamin, Dibenzylamin, N-Benzylethanolamin, N-Isopropylbenzylamin, Tetramethylethylendiamin, Lysin, Ornithin, Histidin und Arginin.

15. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Polymerisation durch Licht mit einer Wellenlänge zwischen 320 nm und 800 nm initiiert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Licht eine Wellenlänge von 514 nm oder 365 nm hat.

17. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der nicht gebundene Initiator durch eine Verdünnung mit der Makromerlösung entfernt wird, so dass die Polymerisation nur an der Oberfläche der Säugetierzelle, der subzellulären Organelle, der subzellulären Komponente oder des Aggregats von Säugetierzellen erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Makromerlösung geformt und dann polymerisiert wird.

19. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Gel eine Stützstruktur enthält.

20. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer so ausgewählt und die Polymerisation so gesteuert wird, dass die gewünschte Permeabilität um das verkapselte biologische Material oder den biokompatiblen Träger herum erzeugt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Makromer auf die Oberfläche eines dreidimensionalen Gegenstandes geschichtet wird und die beschichtete Oberfläche zur Initiation der Polymerisation des Makromers mit Licht bestrahlt wird.

22. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein photopolymerisierbares Polykation an das biologische Material oder den Träger, das bzw. der verkapselt wird, voradsorbiert wird, um die Haftung des Gels auf dem biologischen Material oder Träger zu erhöhen.

23. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das biologische Material aus primären Säugetierzellen oder etablierten Säugetier-Zelllinien, subzellulären Organellen und subzellulären Komponenten, die keine Organellen sind, ausgewählt ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die Zelllinie ausgewählt ist aus Inselzellen des Pankreas, menschlichen Vorhautfibroblasten, Chinese-Hamster-Ovary-Zellen, Zellen von Beta-Zell-Insulinomen, lymphoblastoiden leukämischen Zellen, 3T3-Mausfibroblasten, Dopamin-sekretierenden Zellen des ventralen Mesencephalons, neuroblastoiden Zellen, Zellen des Nebennierenmarks und T-Zellen.

25. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das biologische Material zuerst in einer Mikrokapsel verkapselt wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Mikrokapsel ionisch koagulierbare oder thermisch koagulierbare Polymere umfasst, die für das verkapselte Material nicht toxisch sind.

27. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Makromerlösung einen Beschleuniger zur Erhöhung der Polymerisationsgeschwindigkeit aufweist.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Beschleuniger ein kleines Molekül umfasst, das eine Allyl-, Vinyl- oder Acrylatgruppe enthält.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei der Beschleuniger aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus N-Vinylpyrrolidinon, 2-Vinylpyridin, 1-Vinylimidazol, 9-Vinylcarbazol, Acrylsäure und 2-Allyl-2-methyl-1,3-cyclopentandion.

30. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Makromermischung eine wässrige Lösung ist.

31. Biologisches Material oder biokompatibles Trägermaterial, das durch ein Verfahren nach Anspruch 1 erhältlich ist, oder ein biologisches Material, das durch ein Verfahren nach Anspruch 2 erhältlich ist, für eine Verwendung in der Medizin.

32. Verwendung eines biologischen Materials oder biokompatiblen Trägermaterials, das durch ein Verfahren nach Anspruch 1 erhältlich ist, oder eines biologischen Materials, das durch ein Verfahren nach Anspruch 2 erhältlich ist, bei der Herstellung eines Medikaments zum Einsatz bei der Behandlung metabolischer Defekte oder Erkrankungen.

33. Verwendung einer Makromermischung, wie sie in einem beliebigen der Ansprüche 1, 2, 4 bis 16, 18 bis 20, 22 und 27 bis 30 beansprucht wird, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung metabolischer Defekte oder Erkrankungen.

34. Verwendung einer Makromermischung, wie sie in einem beliebigen der Ansprüche 1, 2, 4 bis 16, 18 bis 20, 22 und 27 bis 30 beansprucht wird, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung als Klebstoff, als Gewebestütze oder als Füllung, oder als Sperre zur Verhinderung der Wechselwirkung zwischen einer Zelle oder einem Gewebe mit einer anderen Zelle oder einem anderen Gewebe.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

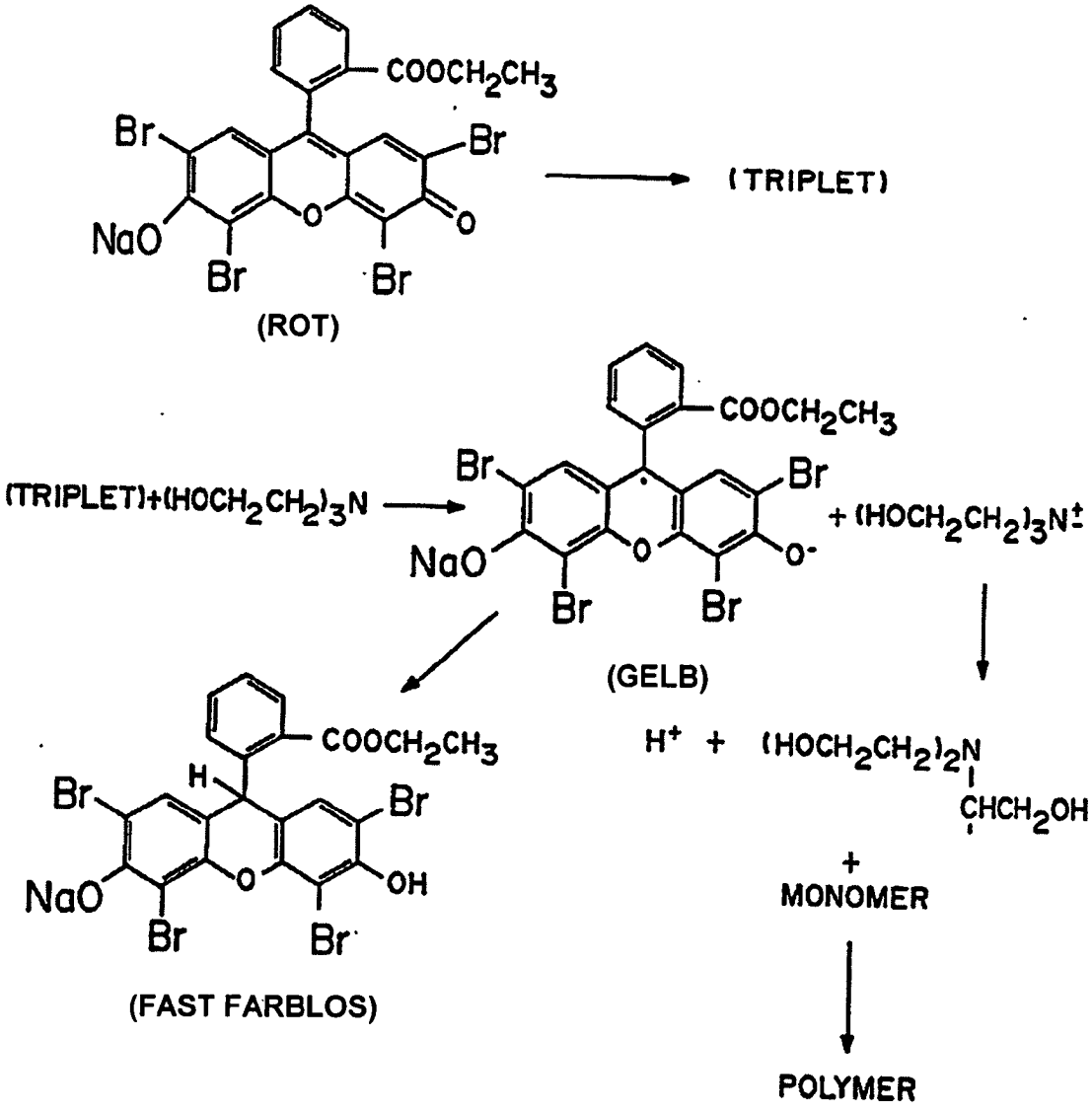


FIG. 1

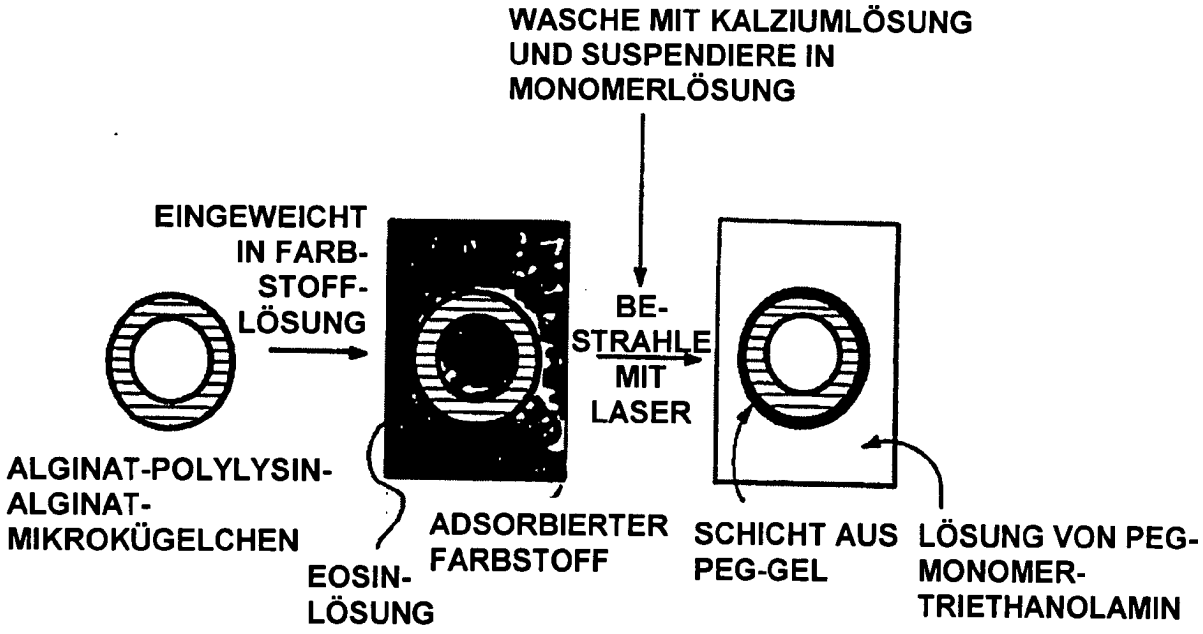

WASCHE MIT KALZIUMLÖSUNG
UND SUSPENDIERE IN
MONOMERLÖSUNG
EINGEWEICHT
IN FARB-
STOFF-
LÖSUNG
BE-
STRAHLE
MIT
LASER
ALGINAT-POLYLYSIN-
ALGINAT-
MIKROKÜGELCHEN
EOSIN-
LÖSUNG
ADSORBIERTER
FARBSTOFF
SCHICHT AUS
PEG-GEL
LÖSUNG VON PEG-
MONOMER-
TRIETHANOLAMIN

FIG. 2a

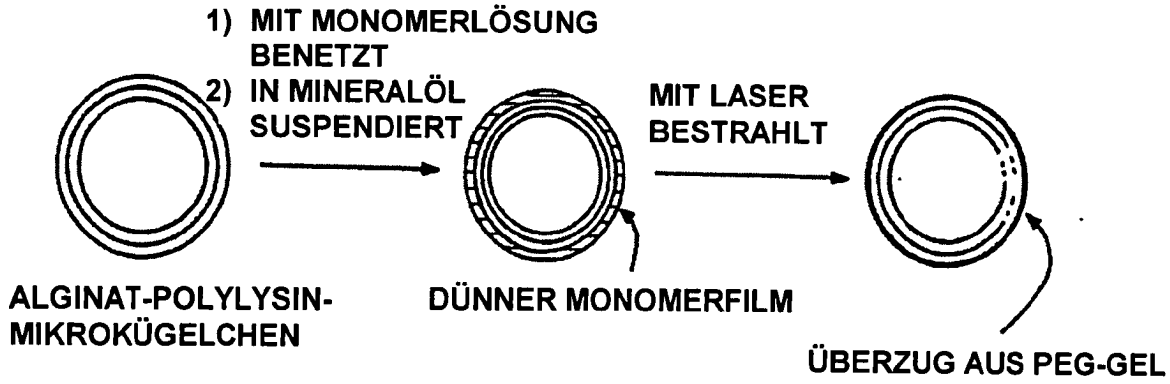

1) MIT MONOMERLÖSUNG
BENETZT
2) IN MINERALÖL
SUSPENDIERT
MIT LASER
BESTRAHLT
ALGINAT-POLYLYSIN-
MIKROKÜGELCHEN
DÜNNER MONOMERFILM
ÜBERZUG AUS PEG-GEL

FIG. 3

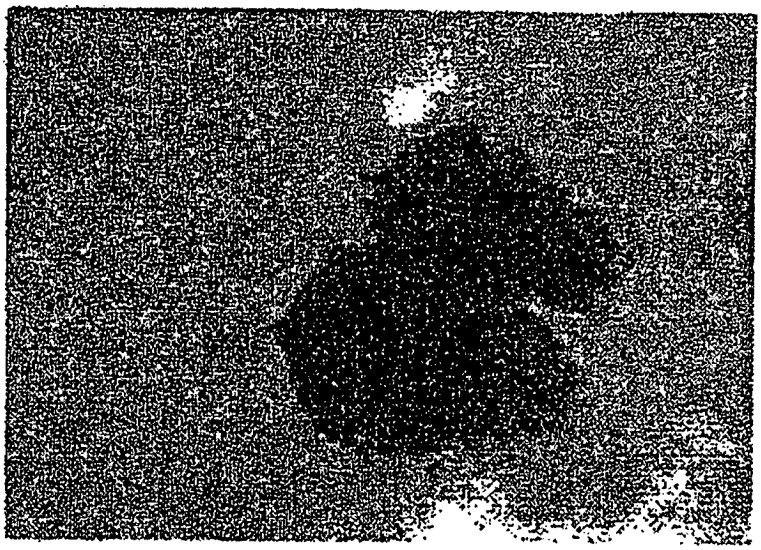


FIG. 4

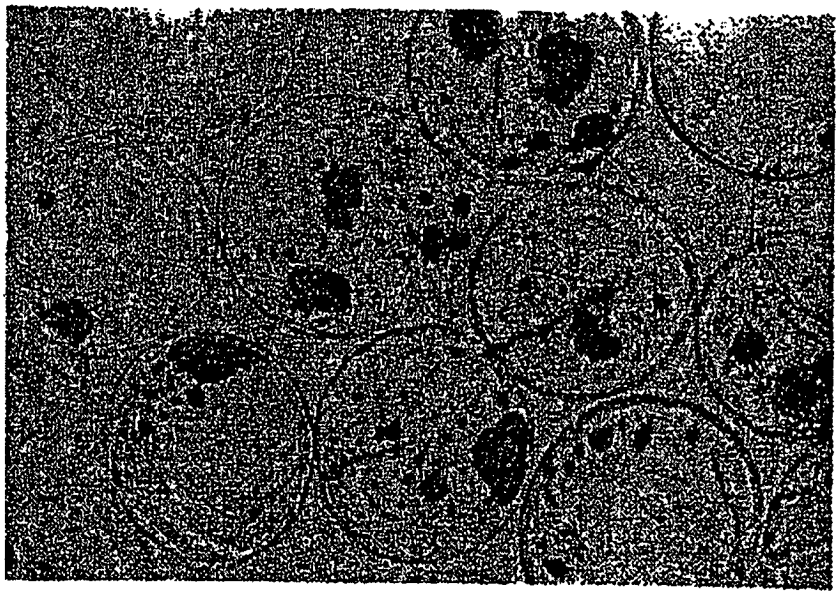


FIG. 2b

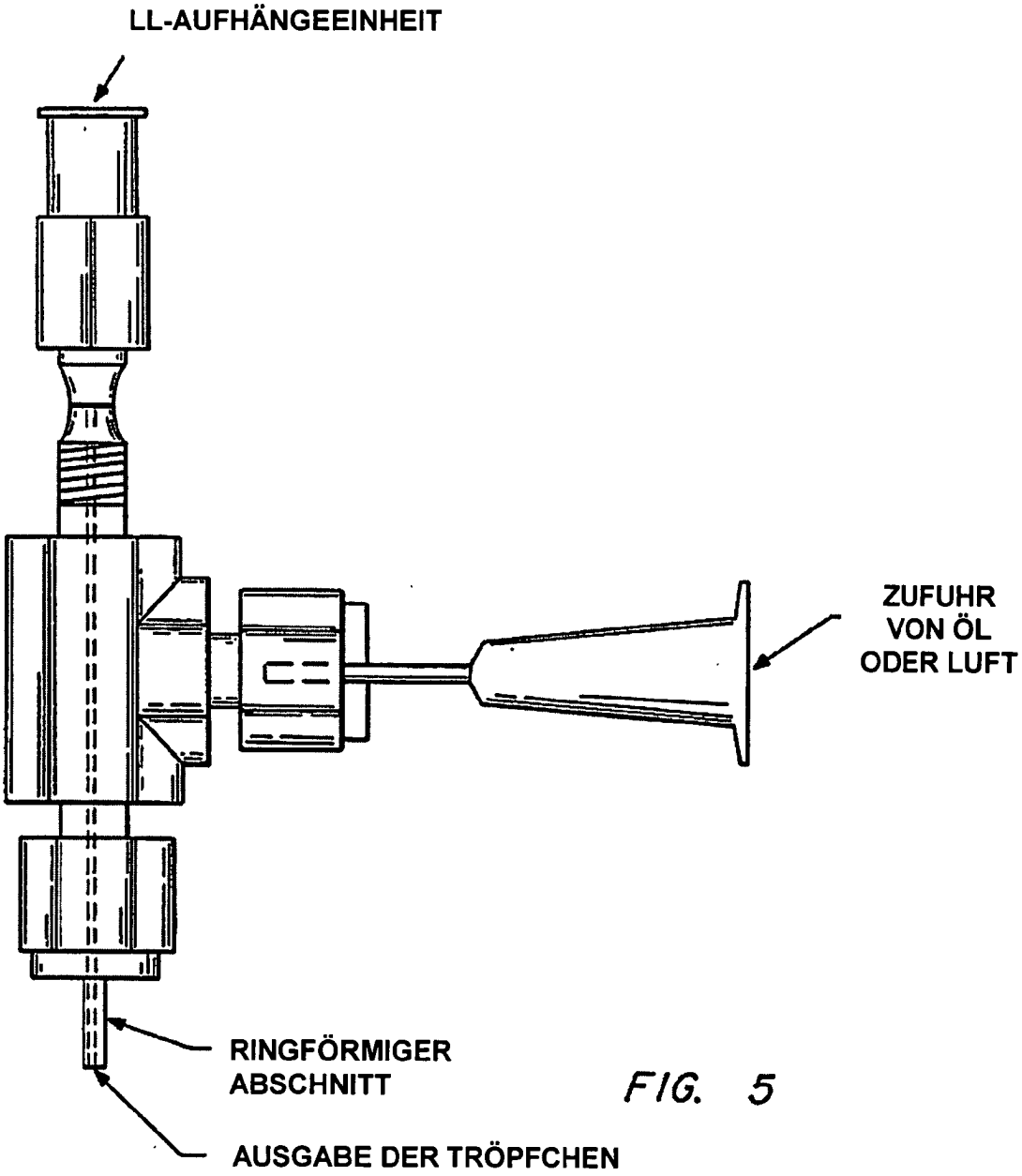

LL-AUFHÄNGEEINHEIT
ZUFUHR VON ÖL ODER LUFT
RINGFÖRMIGER ABSCHNITT
AUSGABE DER TRÖPFCHEN

FIG. 5

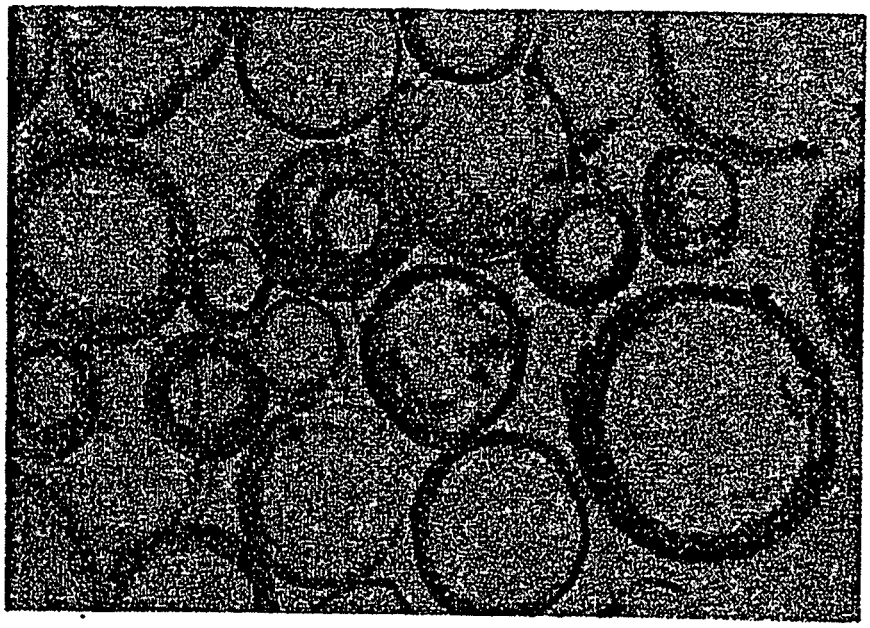


FIG. 6

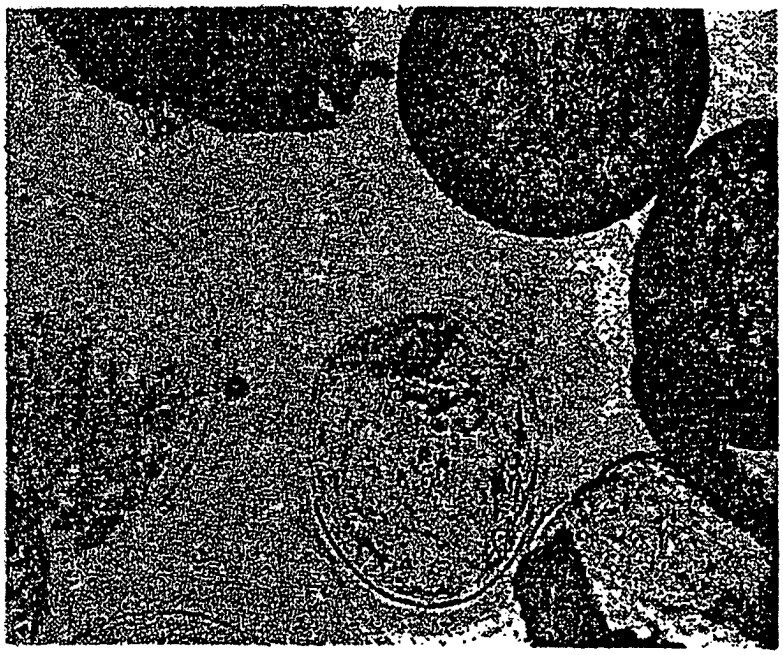


FIG. 7a



FIG. 7b

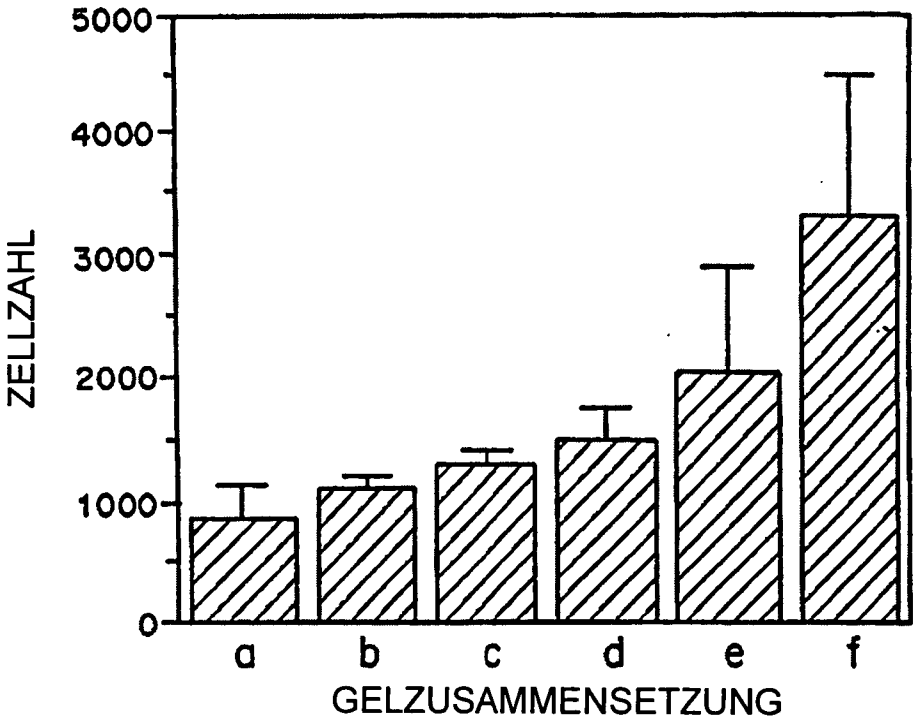
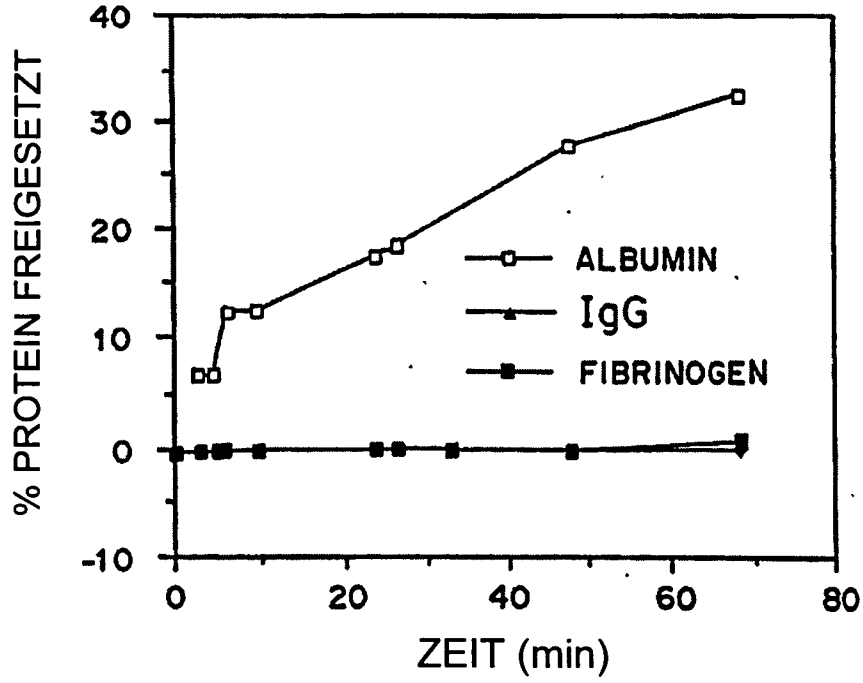

5000
4000
3000
2000
1000
0
ZELLZAHL
a
b
c
d
e
f
GELZUSAMMENSETZUNG

FIG. 8


40
30
20
10
0
-10
% PROTEIN FREIGESETZT
ALBUMIN
IgG
FIBRINOGEN
0
20
40
60
80
ZEIT (min)

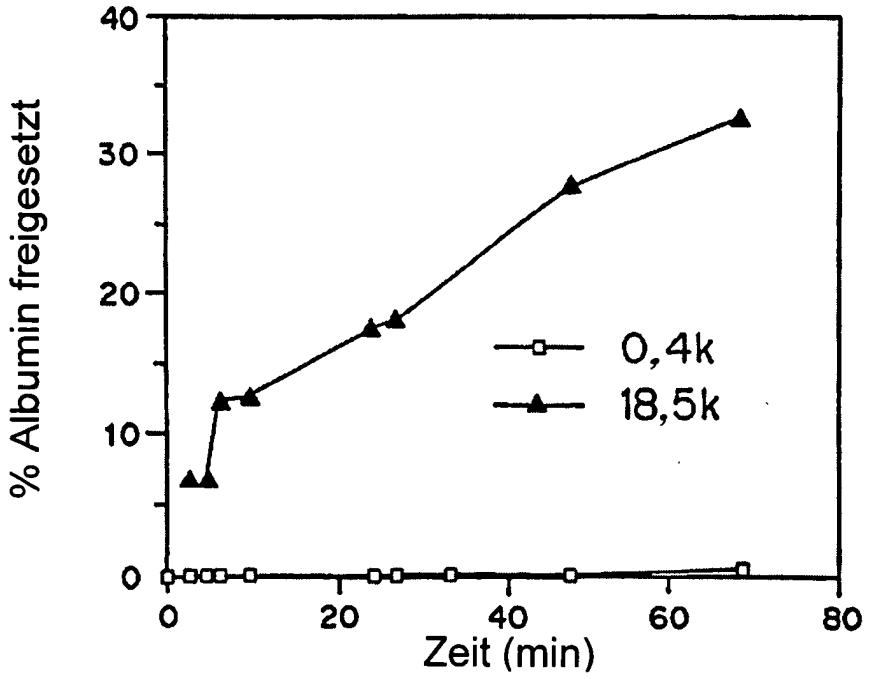
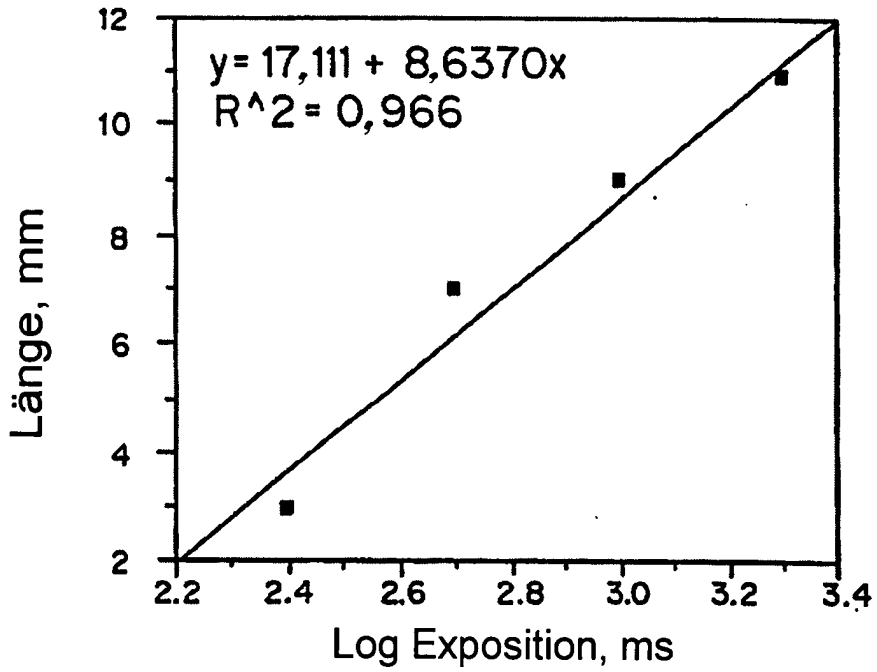

% Albumin freigesetzt
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
Zeit (min)
0,4k
18,5k

FIG. 10


Länge, mm
12
10
8
6
4
2
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
3.2
3.4
Log Exposition, ms
y= 17,111 + 8,6370x
R^2= 0,966

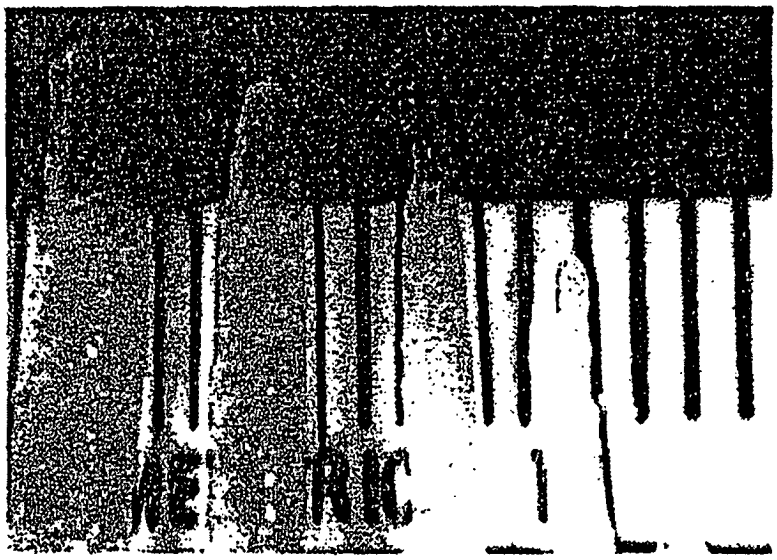


FIG. 11b

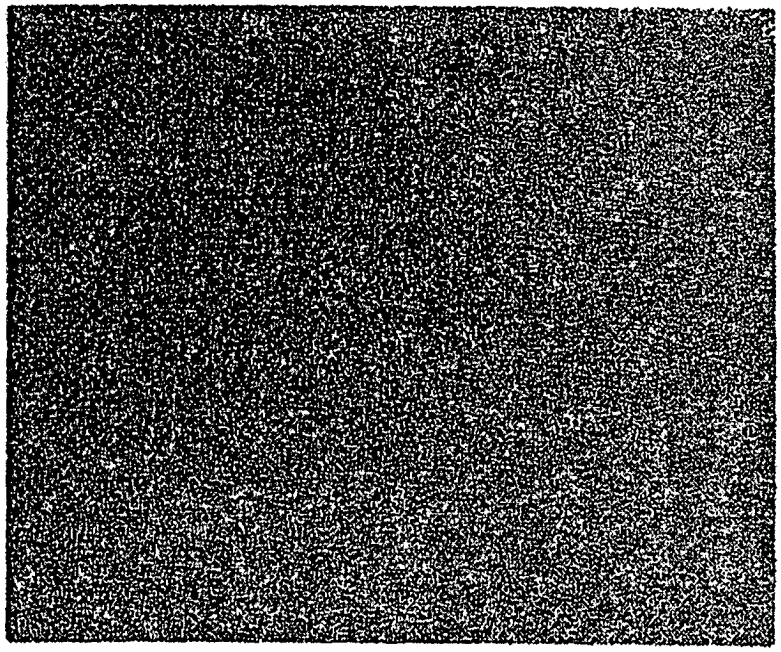


FIG. 12a



FIG. 12b

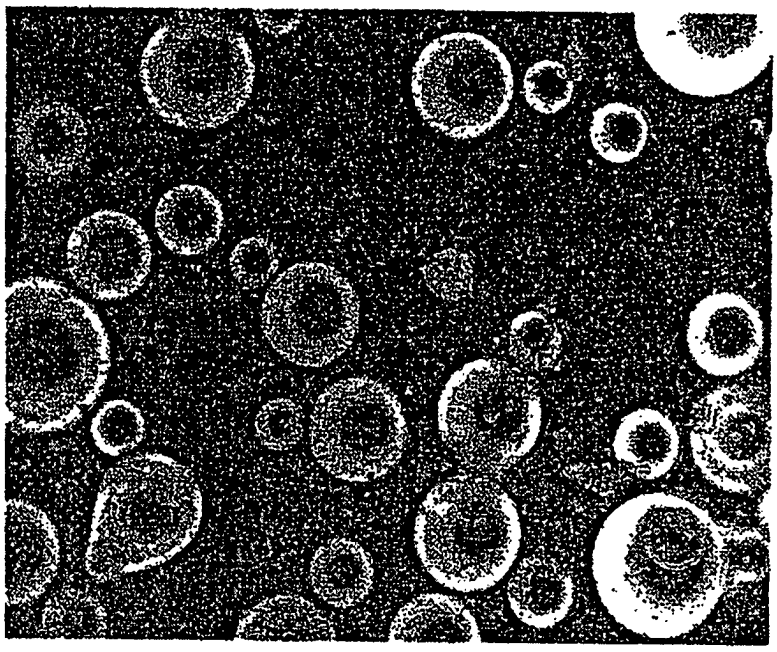


FIG. 13