



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **312036**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 08 F 290/06, 296/06, C 08 G 18/50

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19974583	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.03.27, PCT/EP96/01340
(22) Inng. dag	1997.10.03	(85) Videreføringsdag	1997.10.03
(24) Løpedag	1996.03.27	(30) Prioritet	1995.04.04, AU. 2160/95
(41) Alm. tilgj.	1997.11.26		1995.05.17, AU. 3025/95
(45) Meddelt dato	2002.03.04		

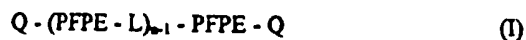
(71) Patenthaver	Novartis AG, CH-4002 Basel, CH Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Limestone Avenue, Campbell, ACT 2612, AU
(72) Oppfinner	Gordon Francis Meijs, Murrumbena, Vic, AU Bronwyn Glenice Laycock, Heidelberg Heights, Vic, AU Madeleine Clare Griffiths, Wairoonga, NSW, AU Edith Cheong, Burwood East, Vic, AU John Gerard Steele, North Rocks, NSW, AU Graham Johnson, Peakhurst, NSW, AU
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Anvendelse av en polymer som et cellevekstsubstrat**

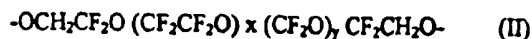
(56) Anførte publikasjoner US 4818801, US 4440918, EP B 379462

(57) Sammendrag

Det blir beskrevet cellevekstsubstratpolymerer som omfatter en makromonomer med formel I:



hvor n er minst 1,0; hver PFPE kan være like eller forskjellige og er en perfluorinert polyeter med formel II:



hvor CF_2CF_2O og CF_2O -enhetene kan være tilfeldig distribuert eller distribuert som blokker gjennom kjeden og hvor x og y kan være like eller forskjellige slik at molekylvekten til perfluoropolyeteren er i området fra 242 til 4.000, L er en difunksjonell sammenbindende gruppe; og Q ved hver ende av makromonomeren er lik eller forskjellig og er en polymeriserbar gruppe. Cellevekstsubstratpolymerene kan bli benyttet i produksjonen av korneale implantater.

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av en polymer som et cellevekstsubstrat.

Det er en omfattende lære i litteraturen om interaksjonen av vevsceller med overflater av syntetiske polymermaterialer som er ment for anvendelse i implantater. Mye av
5 denne læren stammer fra forskning som har vært målrettet mot utforming av polymer-overflater som vil støtte den meget tette og effektive festingen av vevsceller til den polymere overflate. Slike polymeroverflater er ment for visse krevende implantat-anvendelser slik som vevskontaktoverflater av perkutane aksessanordninger. En annen
10 slik applikasjon vil være anvendelsen av den luminale overflate til vaskulære innpodninger med liten diameter, hvor det er ment at endotelialeceller vil dekke den polymere overflate. Ved disse anvendelsene er tett binding av cellene til overflaten av den syntetiske polymeren nødvendig for at implantatet skal være effektivt.

I disse tidligere studiene har det blitt demonstrert at vevsceller, slik som endoteliale
15 celler og fibroblaster, ikke henger effektivt på overflater av hydrofobe polymerer (for eksempel polymeroverflater med en sittende luft-vann-kontaktvinkel på omkring 90 grader eller høyere). Det er omfattende tidligere lære som sier at for effektiv initiell festing av vevsceller må overflaten av en hydrofob polymer være kjemisk modifisert for å være noe fuktbar (for eksempel med en sittende luft-vann-kontaktvinkel i området fra
20 80 til 40 grader). Den biokjemiske mekanismen for den initielle festingen av vevsceller til slike "fuktbare" polymer er også utsatt for studie og cellefesting har også blitt vist å være avhengig av adsorpsjonen på polymeroverflaten av glykoproteiner som inneholder cellefestingseter. Slike glykoproteiner omfatter fibronectin, som er funnet i serum og den ekstracellulære vevsmatriksen, og vitronectin som er funnet i serum. Den kjente
25 teknikk lærer derfor at for den effektive festingen av vevsceller til en syntetisk polymer-overflate må polymeren ha en overflatekemi som er "fuktbar" og som effektivt adsorberer visse glykoproteiner til hvilke vevscellene kan binde. I andre implante applikasjoner, slik som implantater som skal plasseres i bindevev, er celledensiteten lav og den tette bindingen av celler trenger ikke være nødvendig for at implantatet skal være
30 effektivt, hydrofobe polymerer kan være akseptable. For visse implantater, slik som intraokulære linser eller blæreerstatninger, er cellefesting klart ufordelaktig.

Det er generelt antatt at adhesjon av celler til syntetiske hydrofobe polymersubstrater krever at overflatekjemien eller topografien til den syntetiske polymeren blir spesifikt
35 modifisert for å lette adhesjonen og veksten av celler. Glødeutladning, plasmapolymisering og bestrålingspoding er noen få teknikker som er kjent for slik polymer-modifikasjon. Det er også blitt beskrevet at cellefesting til overflater av syntetiske

hydrofobe polymerer alternativt kan bli stimulert ved adsorpsjon eller kovalent festing på polymeroverflaten av en eller flere celleadhesive molekyler eller fragmenter derav, slik som fibronectin, vitronectin, kollagen eller lignende.

- 5 Inntil nå har praksis i implantering av kunstige kornea for å erstatning av kornealt vev (dvs. stromalt vev) omfattet kirurgiske teknikker ved å gjøre et snitt over kornea, så skjære en dyp lomme bak epitellet for å fjerne skadet kornea; erstatningskornea blir ført ned i lommen og snittet lukket ved søm. I dette tilfellet var cellevekst på implantatet ikke nødvendig, eller nødvendigvis ønskelig. En nylig foreslått prosedyre
- 10 for korreksjon av brytningsfeil er implantering av en linse i det korneale epitel. Implantering av slike intraepiteliske linser vil typisk bli utført ved å fjerne de korneale epitele cellelagene av kornea ved skraping, så plassering av den syntetiske linsen direkte på og i nær kontakt med det korneale vev. Den syntetiske linsen vil bli holdt på plass i perioden umiddelbart etter dets plassering ved:

15

- (i) materialkarakteristikken til den syntetiske linsen som tillater festing til det underliggende vev, eller
- (ii) ved anvendelse av en bioforenelig lim, eller
- (iii) ved søm.

20

- For at et slikt intraepitelt implantat skal være effektivt er det kritisk at overflaten og utformingen av implantatet støtter både den initielle dekkingen av den fremre overflate av linsen ved kornealt epitel vev og den påfølgende vedvarende og effektive adhesjonen av dette epitelvevet. Mens et intrastomalt implantat ikke vil være forventet
- 25 å kreve tett celleadhesjon vil et intraepitelt implantat kreve tett og grundig dekking med korneale epitele celler og vev, slik at den normale funksjon til det korneale epitel ved dannelse av en barriere mot det ytre miljø og sikre at et substrat for tårefilmen kan opptre. Fra den tidligere teknikk vil det være forventet at for å tilfredsstille dette kravet vil hydrofobe polymerer kreve enten kjemisk overflatemodifikasjon for å generere en
- 30 fuktbar overflate eller ellers behandling med et glykoprotein som fremmer festing av celler, eller et fragment derav.

- US patentene 4,440,918 og 4,818,801 beskriver anvendelsen av telekjeliske perfluorinerte polyetermonomerer og sammensetninger for fremstilling av kontaktlinser og
- 35 andre oftalmiske anordninger ved forbedret oksygenpermeabilitet og tilsmussingsmotstand. US 4,440,918 og US 4,818,801 er prinsipielt rettet mot kontaktlinser hvor avsetning av proteiner eller andre kroppsbestanddeler resulterer i redusert syn og hvor

cellevekst kan bli ansett ødeleggende for anvendelsen av de telekjeliske perfluorinerte polyeeterne som kontaktlinser eller andre oftalmiske anordninger, slik som intraokulare linser. Disse materialene har også blitt foreslått på andre anvendelser slik som korneale implantater tatt inn i øyet for korreksjon av synsproblemer. Slike nå kjente implantater
 5 inkludert intraokulare linser og innsettingen av en linse i den korneale stroma, spesielt i den bakre del av den korneale stroma. I slike tilfeller vil bioforeneligheten av polymeren være avhengig av permeabiliteten til implantatet overfor næringsmidler og molekyler med liten molekylvekt og implantatet vil være resistent for tilsmussing. For et intrastromalt implantat, er tett celleadhesjon ikke forventet eller kjent å være
 10 nødvendig for at implantatet skal være effektivt.

Nå tilgjengelige bioforenelige polymerer for anvendelse som cellevekstsubstrater har et antall ulemper, slik som tilsmussing med proteinholdige, karbohydrater og andre materialer, dårlig biostabilitet slik at polymeren brytes ned når den blir benyttet i
 15 implantatsituasjonen og kostnadene forbundet med ytterligere prosesseringstrinn slik som overflatemodifisering for å muliggjøre at den syntetiske polymeren støtter adhesjonen og vekst av celler da humane celler generelt viser liten tendens til å vokse jevnt på overflaten av artikler fremstilt av polymermaterialer.

20 Det er nå funnet at telekjeliske perfluorinerte polyeterpolymerer muliggjør adhesjon og vekst av celler uten behov for ytterligere prosesseringstrinn. Slike polymerer er spesielt nyttige for anvendelse som korneale implantater av typen som krever epitelisering. Følgelig er det ved foreliggende oppfinnelse funnet en anvendelse av en polymer som et cellevekstsubstrat der polymeren omfatter en makromonomer ved formel I:

25



hvor n er minst 1,0;

hver PFPE kan være like eller forskjellige og er en perfluorinert polyeter med formel II:

30



hvor CF_2CF_2O og CF_2O -enhetene kan være tilfeldig distribuert eller distribuert som blokker gjennom kjeden og hvor x og y kan være like eller forskjellige slik at molekyl-
 35 vekten til perfluoropolyeteren er i området fra 242 til 4.000;
 L er en difunksjonell sammenbindende gruppe; og

Q ved hver ende av makromonomeren er like eller forskjellige og er en polymeriserbar gruppe.

Fortrinnsvis er n i området fra 1 til 5, mer foretrukket i området 1 til 4.

5

Q er en polymeriserbar gruppe som fortrinnsvis inneholder en etylenisk umettet del som kan gå inn i en polymeriseringsreaksjon. De polymeriserbare gruppene Q ved hver ende av makromonomeren kan være like eller forskjellige. Fortrinnsvis er Q en gruppe med formel A:

10



hvor P_1 er en friradikalpolymeriserbar gruppe;

Y er -CONHCOO-, -CONHCONH-, -OCONHCO-, -NHCONHCO-, -NHCO-, -CONH-
15 , -NHCONH-, -COO-, -OCO-, -NHCOO- eller -OCONH-;

m og p er uavhengig av hverandre 0 eller 1;

R' er et divalent radikal av en organisk forbindelse med opp til 20 karbonatomer;

X_1 er -NHCO-, -CONH-, -NHCONH-, -COO-, -OCO-, -NHCOO- eller -OCONH-.

20 En friradikal polymeriserbar gruppe P_1 er for eksempel alkenyl, alkenylaryl eller alkenylarylenalkenyl som har opp til 20 karbonatomer. Eksempler på alkenyl er vinyl, allyl, 1-propen-2-yl, 1-buten-2-, -3- og -4-yl, 2-buten-3-yl og isomerer av pentenyl, heksenyl, oktenyl, desenyyl og undesenyyl. Eksempler på alkenylaryl er vinylfenyl, vinylnaftyl eller allylphenyl. Et eksempel på alkenylarylenalkyl er o-, m-, eller p-
25 vinylbenzyl.

P_1 er fortrinnsvis alkenyl eller alkenylaryl som har opp til 12 karbonatomer, spesielt foretrukket alkenyl med opp til 8 karbonatomer spesielt alkenyl med opp til 4 karbonatomer.

30

Y er fortrinnsvis -COO-, -OCO-, -NHCONH-, -NHCOO-, -OCONH-, NHCO- eller -CONH-, spesielt foretrukket -COO-, -OCO-, -NHCO-, eller -CONH- og spesielt -COO- eller -OCO-.

35

X_1 er fortrinnsvis -NHCONH-, -NHCOO- eller -OCONH-, spesielt foretrukket -NHCOO- eller -OCONH-.

I en foretrukket utførelsesform er indeksen m og p ikke samtidig 0. Dersom p er 0 er m fortrinnsvis 1.

R' er fortrinnsvis alkyl, aryl, en mettet bivalent sykloalifatisk gruppe med 6 til 20 karbonatomer, arylalkyl, alkylaryl, alkylaryalkyl eller arylalkyl-aryl.

Fortrinnsvis er R' et divalent radikal med opp til 12 karbonatomer, spesielt foretrukket et divalent radikal med opp til 8 karbonatomer. En foretrukket utførelsesform er R' ytterligere alkyl eller aryl med opp til 12 karbonatomer. En spesielt foretrukket utførelsesform av R' er lavere alkyl, spesielt lavere alkyl med opp til 4 karbonatomer.

Det er spesielt foretrukket at Q er valgt blant gruppen omfattende akryloyl, metakryloyl, styryl, akrylamid, akrylamidalkyl, uretanmetakrylat, eller et hvilket som helst substituert derivat derav. Mest foretrukket er Q en forbindelse med formel A hvor P₁ er alkenyl med opp til 4 karboner, Y er -COO-, R' er alkyl med opp til 4 karbonatomer, X₁ er -NHCOO-, og m og p er hver en.

Passende substituent kan være valgt blant: alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, halo, haloalkyl, haloalkenyl, haloalanyl, halorayl, hydroksy, alkoksy, alkenyloksy, aryloksy, haloalkoksy, haloalkenyloksy, haloaryloksy, amino, alkylamino, alkenylamino, alkylamino, arylamino, asyl, aroyl, alkenylasyl, arylasyl, asylamino, alkylsulfonyloksy, arylsulfonyloksy, heterosykl, heterosykloksy, heterosyklamino, haloheterosykl, alkoksylkarbonyl, alkyltio, alkylsulfonyl, aryltio, arylsulfonyl, aminosulfonyl, dialkylamino og dialkylsulfonyl, med opp til 10 karbonatomer.

Den sammenbindende gruppen L kan være en hvilken som helst difunksjonell gruppe som er i stand til å reagere med hydroksyl. Passende forløpere for L er α,ω -dipoksider, α,ω -diisocyanater, α,ω -diisotiocyanater, α,ω -diasylhalider, α,ω -ditioasylhaider, α,ω -dikarboksylysyler, α,ω -ditiokarboksylysyler, α,ω -dianhydrid, α,ω -dilaktoner, α,ω -alkylestere, α,ω -dihalider, α,ω -dialkyletere, α,ω -dihydroksymetylaminer. Det er foretrukket at den sammenbindende gruppen er en bivalent rest (-C(O)-NH-R-NH-C(O)-) av et diisocyanat hvor R er et divalent organisk radikal med opp til 20 karbonatomer.

Det divalente radikalet R er for eksempel alkylen, arylen, alkylenarylen, arylenalkylen eller arylenalkylenarylen med opp til 20 karbonatomer, en mettet bivalent cykloalifatisk gruppe med 6 til 20 karbonatomer eller cykloalkylenalylencykloalkylen med 7 til 20 karbonatomer.

5

I en foretrukket utførelsesform er R alkylen, arylen, alkylenarylen, arylenalkylen eller arylenalkylenarylen med opp til 14 karbonatomer eller en mettet bivalent cykloalifatisk gruppe med 6 til 14 karbonatomer. I en spesielt foretrukket utførelsesform er R alkylen eller arylen med opp til 12 karbonatomer eller en mettet bivalent cykloalifatisk gruppe

10 med 6 til 14 karbonatomer.

I en foretrukket utførelsesform er R alkylen eller arylen med opp til 10 karbonatomer eller en mettet bivalent cykloalifatisk gruppe med 6 til 10 karbonatomer.

15 I en spesielt foretrukket betydning er R et radikal avledet av et diisocyanat, for eksempel fra heksan 1,6-diisocyanat, 2,2,4-trimetylheksan, 1,6-diisocyanat, tetrametylen diisocyanat, fenylen, 1,4-diisocyanat, toluen 2,4-diisocyanat, toluen 2,6-diisocyanat, m- eller p-tetrametylxylen diisocyanat, isoforon diisocyanat eller cykloheksan 1,4-diisocyanat.

20

Aryl er et karbocyklisk aromatisk radikal som er ikke substituert eller substituert fortrinnsvis med lavere alkyl eller lavere alkoksy. Eksempler er fenyl, tolyl, xylyl, metoksyfenyl, t-butoksy-fenyl, naftyl og fenantryl.

25 Arylen er fortrinnsvis fenylen eller naftylen som er ikke substituert eller substituert med lavere alkyl eller lavere alkoksy, spesielt 1,3-fenylen, 1,4-fenylen eller metyl- 1,4-fenylen, 1,5-naftylen eller 1,8-naftylen.

En mettet bivalent cykloalifatisk er fortrinnsvis cykloalkylen, for eksempel cykloheksylen eller cykloheksylen (lavere alkylen), for eksempel cykloheksylenmetylen, som er ikke substituert eller substituert med en eller flere lavere alkylgrupper, for eksempel metylgrupper, for eksempel trimetylcykloheksylenmetylen, for eksempel det divalente isoforonradikalet.

35 For foreliggende oppfinnelsesformål betyr uttrykket "lavere" i sammenheng med radikaler og forbindelser, hvis ikke annet er definert, spesielt radikaler eller forbindelser med opp til 8 karbonatomer, foretrukket med opp til 4 karbonatomer.

Lavere alkyl har spesielt opp til 8 karbonatomer, foretrukket opp til 4 karbonatomer, og er for eksempel, metyl, etyl, propyl, butyl, tert-butyl, pentyl, heksyl eller isoheksyl.

- 5 Alkylen har opp til 12 karbonatomer og kan være rettkjedet eller forgrenet. Passende eksempler er desylen, oktylen, heksylen, pentylen, butylen, propylen, etylen, metylen, 2-propylen, 2-butylen, 3-pentylen, og lignende.

- 10 Lavere alkylen har opp til 8 karbonatomer og spesielt foretrukket opp til 4 karbonatomer. Spesielt foretrukne betydninger for lavere alkylen er propylen, etylen og metylen.

- 15 Arylenenheten i alkylenarylen eller arylenalkylen er fortrinnsvis fenylene, ikke substituert eller substituert med lavere alkyl eller alkoksy og alkyleneheten deri er fortrinnsvis lavere alkylen slik som metylen eller etylen, spesielt metylen. Disse radikalene er derfor fortrinnsvis fenylene-metylen eller metylene-fenylene.

- 20 Lavere alkoksy har spesielt opp til 8 karbonatomer, foretrukket opp til 4 karbonatomer og er for eksempel metoksy, etoksy, propoksy, butoksy, tert-butoksy eller heksyloksy.

Arylenalkylenarylen er fortrinnsvis fenylene (lavere alkylen) fenylene med opp til 8, spesielt med opp til 4 karbonatomer, i alkyleneheten, for eksempel fenylene-etylene-fenylene eller fenylene-metylene-fenylene.

- 25 Noen eksempler på foretrukne diisocyanater fra hvilke bivalente rester er avledet omfatter trimetylheksametylendiisocyanat (TMHMDI), isoforon diisocyanat (IPDI), metylendifenyl diisocyanat (MDI) og 1,6-heksametylen diisocyanat (HMDI).

- 30 Fortrinnsvis er x i formel II i området fra 0 til 20, mer foretrukket i området fra 8 til 12, og y er i området fra 0 til 25, mer foretrukket i området fra 10 til 14.

En foretrukket makromonomer er en i hvilken n er i området fra 1 til 4, L er en bivalent rest avledet av trimetylheksametylen diisocyanat (TMHMDI) og Q er resten avledet av isocyanatetyl-metakrylat.

- 35 En foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er rettet mot anvendelsen av en cellevekstsubstrat-polymer omfattende en polymerisert makromonomer med formel IV:



(Formel IV)

5

hvor PFPE er en perfluorinert polyeter med formel II som heri definert, hvor x er i området fra 8 til 10 og y er i området fra 10 til 14, $n > 1,0$ og R er alkylen eller arylen med opp til 12 karbonatomer eller en mettet bivalent cykloalifatisk gruppe med 6 til 14 karbonatomer.

10

I en spesielt foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse benyttes en cellevekstsubstratpolymer omfattende en polymerisert makromonomer med formel III:



15

(Formel III)

hvor PFPE er en perfluorinert polyeter med formel II som heri definert, n er minst 1,0, R er trimetylheksametylenkomponenten av TMHMDI, og hvor x er i området fra 8 til 10 og y er i området fra 10 til 14.

20

Det er også funnet at til forskjell fra festingen av endoteliale celler og fibroblaster til syntetiske polymerer som beskrevet i kjent teknikk, er for de teleseliske perfluorinerte polyeterpolymerene den initielle festingen av korneale epitelceller ikke avhengig av adsorpsjon av glykoproteinenes fibronektin eller vitronektin fra kulturmediet. Funnene viser at de telekjeliske perfluorinerte polyeter polymerene direkte støtter adhesjon av korneal epitelceller.

25

Ifølge et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse anvendelse av cellevekstsubstratpolymeren beskrevet over som et materiale for festing og vekst av animalske celler in vitro.

30

I et ytterligere aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse anvendelse av cellevekstsubstratpolymeren beskrevet over som et materiale for festing av animalske celler in vivo.

35

Ifølge et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse anvendelse av cellevekst-substratpolymeren beskrevet over som ytterligere omfatter adsorberte eller koblede adhesive glykoproteiner som et materiale for festing og vekst av animalske celler. Fortrinnsvis er de adhesive glykoproteinene valgt blant gruppen omfattende fibronectin, vitronektin, kollagen, laminin og trombospodin.

Makromonomerer som anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli kopolymerisert eller homopolymerisert for å gi transparent polymer i nærvær av en passende initiator. Standardmetoder som er vel kjente i teknikken for utførelse av polymerisasjon kan bli benyttet, hvor fri radikal polymerisering er foretrukket. Fri radikal polymerisering kan enkelt bli utført ved bestråling (ved anvendelse av ultrafiolett lys) av monomere blandinger inneholdende en UV initiator slik som benzoin metyleter, i et passende kar eller beholder. Blandingen blir bestrålet i en tilstrekkelig tid for å muliggjøre polymerisering. Alternativt, kan termisk initiering ved anvendelse av en termisk initiator, slik som azobisisobutyronitril, bli benyttet.

Makromonomeren kan bli omdannet til polymer ren eller i nærvær av et eller flere oppløsningsmidler. Mens strukturen til makromonomeren har den mest signifikante effekt på den resulterende modul, har valget av oppløsningsmiddel og komonomer også en effekt. Nyttige oppløsningsmidler omfatter de valgt blant de følgende klasser: ester, alkoholer, etere og halogenerte oppløsningsmidler. Fluorinerte oppløsningsmidler er spesielt nyttige med deres anvendelse i kombinasjon med andre oppløsningsmidler (i forhold som varierer fra 1:9 til 9:1) fra klassene ovenfor er spesielt ønskelige. Oppløsningsmiddelkonsentrasjoner på mellom 0-70 vektprosent, spesielt 10-50 vektprosent i polymerisasjonsblandingen, er ønskelig. Foretrukne oppløsningsmidler omfatter acetater, spesielt isopropylacetat og tert-butylacetat, 2-(trifluormetyl)-2-propanol, klorfluoralkan, spesielt triklortrifluoretan og perfluorinerte alkaner, slik som perfluor, 1,3-dimetylcykloheksan og lignende.

Komonomerer omfattende en eller flere etyleniske umettede grupper som kan gå inn i en reaksjon for å danne en kopolymer kan bli innlemmet. Det er foretrukket at den etyleniske umettede gruppen er valgt blant gruppen omfattende akryloyl, metakryloyl, styryl, akrylamido, akrylamidoalkyl, uretanmetakrylat, eller substituerte derivater derav. Passende komonomerer omfatter fluor- og silikon-inneholdende alkylakrylater og hydrofile komonomerer som kan bli valgt av fagmannen fra et vidt område tilgjengelig materialer og blandinger derav.

En komonomer tilstede i den nye polymeren kan være hydrofil eller hydrofob eller en blanding derav. Passende komonomer er spesielt de som vanligvis blir benyttet i fremstilling av kontaktlinser og biomedisinsk materiale. En hydrofob komonomer er forstått å være en monomer som typisk gir en homopolymer som er uoppløselig i vann og kan

5 absorbere mindre enn 10 vektprosent vann. Analogt er en hydrofil komonomer en monomer som typisk gir en homopolymer som er oppløselig i vann eller kan absorbere minst 10 vektprosent vann.

Passende hydrofobe komonomerer er uten begrensning dertil, C₁-C₁₈alkyl og C₃-C₁₈cykloalkyl alkylater og metakrylater, C₃-C₁₈alkylakrylaamider og -metakrylamider, akrylonitril, metakrylonitril, vinyl C₁-C₁₈alkanoater, C₂-C₁₈alkener, C₂-C₁₈haloalkener, styrene, (lavere alkyl)styren, lavere alkyl vinyletere, C₂-C₁₀-perfluoralkyl akrylater og metakrylater og tilsvarende delvis fluorinerte akrylater og metakrylater, akryloksy- og metakryloksyalkylsiloksaner, N-vinylkarbazol, C₁-C₁₈alkylestere maleinsyre, fumarsyre,

15 itakonsyre, mesakonsyre og lignende.

Preferanser ble eksempelvis gitt til akrylonitril, C₁-C₄alkylestere av vinylisk umettede karboksylsyrer med 3 til 5 karbonatomer eller vinylester av karboksylsyre med opp til 5 karbonatomer.

Eksempler på passende hydrofobe komonomerer er metylakrylat, etylarkylat, propylakrylat, isopropylakrylat, cykloheksylakrylat, 2-etylheksylakrylat, metylmetakrylat, etylmetakrylat, propylmetakrylat, butylarkylat, vinylacetat, vinylpropionat, vinylbutyrat, vinylvalerat, styren, klorpren, vinylklorid, vinylidenklorid, akrylonitril, 1-buten,

25 butadien, metakrylonitril, vinyltoluen, vinyletyleter, perfluorheksyletyltiokarbonyl-aminoetylmetakrylat, isobornylmetakrylat, trifluoretylmetakrylat, heksafluorisopropylmetakrylat, heksafluorbutylmetakrylat, tris(trimetyl)silyloksysilylpropylmetakrylat, (heretter: trismetakrylat) tris(trimetyl)silyloksysilylpropylakrylat (heretter: trisakrylat), 3-metakryloksypropylenpentametyldisiloksan og bis(metakryloksypropyl)tetrametyldisiloksan.

30

Foretrukne eksempler på hydrofobe komonomerer er metylmetakrylat, trisakrylat, trismetakrylat og akrylonitril.

Passende hydrofile komonomerer er uten at dette er en uttømmende liste, hydroksylsubstituerte lavere alkylakrylater og metakrylater, akrylamid, metakrylamid, (lavere alkyl)-akrylamider og -metakrylamider, etoksylerede akrylater og metakrylater,

hydroksyl-substituerte (lavere alkyl)akrylamider og -metakrylamider, hydroksyl-substituerte lavere alkylvinyletere, natriumvinylsulfonat, natriumstyrensulfonat, 2-akrylamido-2-metylpropansulfonsyre, N-vinylpyrrole, N-vinyl-2-pyrrolidon, 2-vinylloxazolin, 2-vinyl-4,4'-dialkyloxazolin-5-on, 2- og 4-vinylpyridin, vinylliske

5 umettede karboksylsyre med totalt 3 til 5 karbonatomer, amino(lavere alkyl)- (hvor uttrykket "amino" også omfatter kvaternært ammonium), mono(lavere alkylamino)(lavere alkyl) og di(lavere alkylamino) (lavere alkyl) akrylater og metakrylater, allylalkohol og lignende. Preferanser ble eksempelvis gitt til N-vinyl-2-pyrrolidon, akrylamid, metakrylamid, hydroksyl-substituerte lavere alkylakrylater og

10 metakrylater, hydroksy-substituerte (lavere alkyl)akrylamider og -metakrylamider og vinylliske umettede karboksylsyre med totalt 3 til 5 karbonatomer.

Eksempler på passende hydrofile komonomerer er hydroksyletylmetakrylater (HEMA), hydroksyletylakrylat, hydroksypropylakrylat, trimetylammonium 2-hydroksypropyl-

15 metakrylathydroklorid (Blemer®Q, for eksempel fra Nippon Oil), dimetylaminoetylmetakrylat (DMAEMA), dimetylaminoetyl (met)akrylamid, akrylamid, metakrylamid, N,N-dimetylakrylamid (DMA), allylalkohol, vinylpyridin, glyserolmetakrylat, N-(1,1-dimetyl-3-oksobutyl)akrylamid, N-vinyl-2-pyrrolidon (NVP), akrylsyre, metakrylsyre og lignende.

20 Foretrukne hydrofile komonomerer er trimetylammonium, 2-hydroksypropylmetakrylat, hydroklorid, 2-hydroksyletylmetakrylat, dimetylaminoetylmetakrylat, trimetylammoniumhydroksypropylmetakrylathydroklorid, N,N-dimetylakrylamid og N-vinyl-2-pyrrolidon.

25 Spesielt foretrukne komonomerer omfatter dihydroperfluoralkylakrylater, slik som dihydroperfluoroktylakrylat og 1,1-dihydroperfluorbutylakrylat, trihydroperfluoralkylakrylater, tetrahydroperfluoralkylakrylater, tris(trimetylsilyloksy)propylmetakrylat og akrylat, og amine-inneholdende komonomere, slik som N,N-dimetyl-aminoetyl-

30 metakrylat, N,N-dimetylakrylamid og N,N-dimetylamino-etylakrylamid. De foretrukne tilsetningsområdet for individuelle komonomerer i formuleringen er fra 0 til 60 vektprosent og mest foretrukket fra 0 til 40 vektprosent av formuleringens deler. Blandinger av makromonomerer med formel I kan også bli benyttet for å fremstille passende kopolymerer med eller uten andre komonomerer.

35 Et polymert nettverk kan, hvis ønskelig, bli forsterket ved tilsetting av et tverrbindingsmiddel, for eksempel en polyumettet tverrbindende komonomer. I dette tilfellet blir

uttrykket tverrbindende polymer benyttet. Foreliggende oppfinnelse kan derfor anvende en tverrbundet polymer omfattende polymeriseringsproduktet av en makromer med formel I hvis ønskelig med minst en vinyllisk komonomer og minst en tverrbindende komonomer.

- 5 Eksmepler på typiske tverrbundne komonomerer er allyl(met)akrylat, lavere alkylene glykol-di(met)akrylat, poly(lavere alkylene)glykol di(met)akrylat, lavere alkylene-di(met)akrylat, divinyleter, divinylsulfon, di- og trivinyllenzen, trimetylolpropan tri(met)akrylat, pentaerytritoltetra(met)akrylat, bisfenol-A-di(met)akrylat, metylen-
10 bis(met)akrylamid, triallylfthalat og diallylfthalat.

Hvis det blir benyttet et tverrbindende komonomer er den benyttede mengden i området fra 0,05 til 20% av den forventede vekten av polymeren, fortrinnsvis er komonomeren i området fra 0,1 til 10% og mer foretrukket i området fra 0,1 til 2%.

- 15 Som eksempel, i fremstillingen av cellevekstmateriale og implantater av slike polymerer, blir den passende mengden polymeriserbare monomerer, oppløsningsmiddel (hvis nødvendig) og fotoinitiator blandet sammen for å danne en polymeriseringsblanding. Polymeriseringsblandingen blir så gjennomboblet med nitrogen og den
20 nødvendige mengden anbringes i en passende form. Formen blir lukket og klampt og sammensetningen plasseres i et bestrålingskabinett utstyrt med 365 nm UV-lamper. Bestrålingen blir utført i nødvendig tid og så blir halvparten i formen separert. Det polymeriserte materialet blir ekstrahert i et passende oppløsningsmiddel (for eksempel en isopropyl eller tert-butylacetat/fluorinert oppløsningsmiddelblanding). Oppløsnings-
25 middelet blir så utbyttet med en alkohol (for eksempel isopropylalkohol) og deretter med saltvann for å gi produktet.

- Makromonomeren kan bli polymerisert for å danne cellevekstsubstratpolymeren med andre tilsetningsstoffer slik som hjelpestoff eller vekstfaktorer inkludert fibronectin, vitronectin, kollagen, laminin og trombospodin.
30

Det vil være opplagt for fagmannen at polymeriseringen også kan bli utført på overflaten til et annet substrat eller i en støttende matriks slik at substratet vil bli belagt med perfluorpolyeeterpolymeren.

- 35 Cellevekstsubstratpolymeren som anvendes ifølge oppfinnelsen kan også bli benyttet for å fremstille porøse substrater. Porøsitet kan bli fremskaffet ved den iboende porøsiteten

til materialet. Alternativt kan porer bli introdusert i polymeren ved forskjellige prosedyrer slik som de beskrevet i WO 90/07575, WO 91/07687, US Patent nr. 5,244,799, US Patent nr. 5,238,613, US Patent nr. 4,799,931 og US Patent nr. 5,213,721, hvis innhold er innlemmet heri som referanse.

5

Med passende valg blir den resulterende cellevekstsubstratpolymeren optisk transparent, med en brytningsindeks som gir en god tilpasning med vandige media, vev og cellulært materiale. Som et resultat er polymeren ideell for anvendelse som en okular protese slik som et kornealt påleggingsselement eller implantat.

10

Polymeren som anvendes ifølge oppfinnelsen kan bli formet til andre nyttige cellevekstsubstrater ved anvendelse av konvensjonelle formings- og prosesseringsteknikker som er velkjente i teknikken.

15

Polymerene har egenskaper som gjør dem passende som materialer for festing og vekst av humane og animalske celler in vivo eller in vitro, medisinske implantater (slik som implanterbare semipermeable membranmaterialer, vevsimplantater i kosmetisk kirurgi, implantater inneholdende hormonutskillende celler slik som pankreatisk øyeceller, brystimplantater, kunstige ledd osv.), i kunstige organer.

20

Okulare proteser slik som korneal implantater, kan bli fremstilt ved polymerisering i former og eventuelt kan den resulterende polymeren bli fabrikert eller maskinert til den ønskede konformasjonen. Okulare proteser kan bli fremstilt ved andre metoder som er velkjent per se for fagmannen. Porøsitet kan bli sikret som beskrevet ovenfor.

25

Korneale implantater kan bli plassert ved hjelp av konvensjonelle kirurgiske teknikker under, inni eller gjennom det korneale epiteliske vev, eller i den korneale stroma eller andre vevslag i kornea. Slike implantater kan endre de optiske egenskapene til kornea (slik som å korrigere synsfeil) og/eller endre utseendet av øyet slik som pupillfarge. Et kornealt implantat kan omfatte en optisk akseregion som ved implantering dekker pupillen og sikrer visuelt klarsyn og en mindre transparent region som omgir periferien til den optiske akseregion. Alternativt kan implantatet ha samme visuelle klarsyn på tvers av dets dimensjon.

30

35

Det har nå blitt funnet at strømmen av høy molekylære vevsfluidkomponenter slik som proteiner og glykoproteiner (for eksempel vekstfaktorer, peptider og proteinhormoner, og proteiner som assosiert med transport av essensielle metaller) og lignende over et

kornealt implantat, dvs. mellom epitelcellen og stromale celler og selv de endoteliale lag og videre, er viktig for langtids opprettholdelse og levedyktighet av vev foran og bak det korneale implantatet. Foreliggende oppfinnelse vedrører således anvendelse av en cellevekstsubstratpolymer som definert over, for å danne et kornealt implantat for
5 anvendelse i kirurgisk implantering i eller på kornea til et pattedyr hvor nevnte implantat har en optisk akseregion med optiske karakteristikk som gir visuelt klarsyn derigjennom og en porøsitet tilstrekkelig for å tillate passasje derigjennom av vevsfluidkomponenter med molekylvekt større enn 10.000 dalton, for derved å gi en strøm av vevsfluid mellom celler foran implantatet og celler bak dette, hvor porøsiteten til den
10 optiske akseregionen er slik at den tillater gjennomstrømning av vevsfluidkomponenter mens den ekskluderer innvekst av okulært vev.

Fortrinnsvis er omplantatet belagt med én eller flere komponenter som fremmer veksten av vevet naboliggende til omplantatet og/eller celleadhesjon til implantatet. Porøsiteten i
15 implantatet gis foretrukket ved et flertall porer som har en størrelse som er tilstrekkelig for å tillate passasje gjennom implantatet av proteinvevsfluidkomponenter som har en molekylvekt større enn 10.000 dalton, men som ekskluderer innvekst av vev. Fortrinnsvis har flertallet av porene en diameter mellom 15 nanometer og 0,5 mikrometer.

20 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av en polymer med formel I som definert over, til fremstilling av et medisinsk implantat.

Det korneale implantatet blir fordelaktig preparert med en porøsitet som er tilstrekkelig for å tillate passasje derigjennom av vevsfluidkomponenter med en molekylvekt større
25 enn omkring 10.000 dalton for derved å sikre en strømning av vevsfluidkomponenter i tillegg til næringsmidler med liten molekylvekt (som glykose, fett og aminosyrer) og respiratoriske gasser mellom celler foran og bak implantatet.

Fortrinnsvis har et kornealt implantat en porøsitet tilstrekkelig for å tillate proteiner og
30 andre biologiske makromolekyler med en molekylvekt med opp til og større enn 10.000 dalton, slik som fra 10.000 til 1.000.000 daltons, men ikke tilstrekkelig for å tillate celler og således vevsinvasjon i den optiske akseregionen til det korneale innlegget. Hvor porøsiteten til implantatet blir fremskaffet ved porer, omfatter den optiske akseregionen et flertall porer hvis antall ikke er begrensende, men som er tilstrekkelig
35 for å gi en strømning av vevskomponenter mellom de bakre og fremre regioner av et implantat. Fortrinnsvis forårsaker ikke porene i den optiske akseregionen brytning av synlig lys til en grad som vil forårsake noen problem med hensyn til synskorreksjonen.

Det må forstås at uttrykket porer ikke gir noen geometriske begrensninger på naturen til porene som kan være av regulær eller irregulær morfologi. Det må også forstås at ikke alle porer trenger å ha samme diameter.

- 5 På utsiden av den optiske akseregionen kan det korneale implantatet ha den samme porøsiteten som den optiske akseregionen. Alternativt, kan denne regionen av implantatet som omgir periferien av den optiske akseregionen, som kan bli referert til som skjørtet, tillate en vekst av celler fra kornea for derved å assistere i festingen av implantatet til øyet.

10

Porøsiteten til skjørtet kan være en iboende egenskap til materialet fra hvilket skjørtet er dannet. I så henseende er det ønsket at skjørtet er dannet av det samme materialet som den optiske akseregionen og kan være integrert med den. I denne situasjonen kan porer med forskjellig diameter bli dannet i den optiske akseregionen og skjørtet. Alternativt
15 kan skjørtet være dannet av et forskjellig materiale fra den optiske akseregionen, hvis materiale har høyere porøsitet enn den optiske akseregionen og således tillate vevsinnvekst. Fortrinnsvis kan skjørtet omfatte en optisk transparent polymer, slik som den optiske akseregionen, men alternativt kan skjørtet omfatte et optisk ikke-transparent materiale eller være fremstilt av et porøst materiale som ikke er optisk transparent.

20

Gjennom denne beskrivelsen og kravene som følger vil ordet "omfatte" eller variasjoner som "omfatter" eller "omfattende" dersom sammenhengen ikke krever annet, bli forstått å omfatte inklusjon av et angitt element eller en gruppe elementer, men ikke eksklusjon av andre elementer eller grupper av elementer.

25

Foreliggende oppfinnelse blir videre beskrevet i de følgende ikke-begrensende eksempler. Dersom ikke annet er spesifisert er alle deler vektdeler. Temperaturer i grader Celsius. Molekylvekter til makromerer eller polymerer er tallgjennomsnittlig molekylvekt hvis ikke annet er spesifisert.

30

EKSMPEL 1:

- Et eksempel for å illustrere fremstillingen av makromonomeren med formel I ($n = 2,9$) hvor Q er resten avledet av isocyanatetyl-metakrylat, L er den bivalente resten avledet av trimetylheksametylen diisocyanat (TMHMDI), x er 10 og y er 14. Oppe i en 250 ml
35 flaske utstyrt med en rørestav blir det anbragt 100 g kommersielt tilgjengelig hydroksyterminert PFPE (tilgjengelig fra Minnesota Mining and Manufacturing Company, St. Paul, Minnesota som Experimental Product L-12875) med hydroksyltall 55,4. Til dette

ble det tilsatt 6,76 g destillert trimetylheksametylendiisocyanat. Flasken ble ristet kraftig i flere minutter og så ble 0,06 g dibutyltin dilaurat tilsatt. Etter at den var ristet i flere minutter ble blandingen omrørt over natten. En mild eksoterm reaksjon ble observert i løpet av den første halvtimen. Etter 16 timer ble infrarødt spektrum kjørt for å bekrefte fullstendig forbruk av isocyanatet. Til reaksjonsblandingen ble tilsatt 5,36 g friskt destillert isocyanatetyl-metakrylat. Flasken ble igjen kraftig ristet i flere minutter og blandingen ble omrørt over natten. Et infrarødt spektrum ble målt for å bekrefte forsvinningen av isocyanatet.

- 10 Denne prosedyren er en generell prosedyre og med justering av støkiometrien kan andre makromonomerer med formel I ($n > 1$), hvor Q er resten avledet av isocyanatetyl-metakrylat og L er den bivalente resten avledet av trimetylheksametylen diisocyanat (TMHMDI), bli fremstilt.

15 **EKSEMPEL 2:**

Proseduren angitt nedenfor blir benyttet for å evaluere cellefesting og vekst.

- Skiver med 6 mm i diameter ble skåret fra polymeren under evaluering og overført til sterile glass hver inneholdende 5 millimeter serumfritt DMEM/Ham'sF12 (forhold på 1:1, v/v) kulturmedium (SFM) og vasket i en periode på 3 uker ved bytting av SFM en gang i uken med ytterligere 5 mm friskt medium. Både de vaskede polymerene og den polymerkondisjonerte SFM ble lagret under sterile betingelser ved 4°C inntil det var behov for den.

25 Cellekultur:

- Bovine korneale epitele (BCEp)-celler av limbalopprinnelse mellom passering 2 til 6 ble benyttet for de forskjellige analysene. Kulturmediet er sammensatt av MEM/Ham'sF12 (1:1), tilsatt 20% (v/v) føtalt bovint serum (FBS), 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selensyre, 60 µg/ml penisillin og 100 µg/ml streptomycin. Celler ble inkubert ved 36°C i en fuktig atmosfære luft inneholdende 5% CO₂. Kulturmediet ble byttet hver annen dag. For noen av vekstanalysene ble FBS tømt for de celleadhesive serum glykoproteinene vitronektin og fibronektin benyttet parallelt med intakt FBS.

- Bovine korneale fibroblast (BCF)-celler ble dyrket ved fremgangsmåten ovenfor med det unntak at kulturmediet var tilsatt 10% (v/v) føtalt bovint serum. BCF-analysene ble utført ved fremgangsmåtene nedenfor hvor BCF erstatter BCEp-celler.

Korneal epitel cellevekstanalyse:

Vekstanalyse ble utført som følger: 4 replikater av hver 6 mm skive ble plassert i individuelle brønner på et 96-brønners vevskulturbrett og renset med 100 µl sterilt SFM. BCEp-celler ble så utsådd på prøvene med en densitet på $8,5 \times 10^3$ celler/brønn og dyrket i seks dager. Ekvivalente celler ble også utsådd på vevskultur polystyren (TCPS) brønner med en positiv kontrollreferanse overflate. Tidspunktreplikater ble fjernet og fiksert med formolsaltvann med passende tidsintervaller, så lagret ved 4°C til det var behov for denne. Fikserte celler ble så farvet med metylenblue og for både å visualisere og kvantifisere cellefesting. Cellefesting ble bestemt kolorimetrisk på en plateleser og absorbanse ble uttrykt som gjennomsnitt ($\pm$ sd) prosent av den funnet for celler på vevskulturpolystyrenen (TCPS).

Korneal epitel utvekstanalyse - eksplantant utvekstanalyse:

Seks millimeter diameters knapper av bovint kornealt vev fra hvilke endotelium og > 90% stroma hadde blitt fjernet, ble satt opp i duplikate prøver. Eksplantantene ble dyrket i fravær av serum i et kulturmedium inneholdende DMEM/Ham's F12 supplementert med ITS (5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selensyre), 1% (v/v) ikke-essensielle aminosyrer, 60 µg/ml penisillin og 100 µg/ml streptomycin. Utvekst blir målt i en periode på 8 dager, bytting av medium ved dag tre og dag seks, etter hvilket utvekstarealene ble målt ved bildeanalyse (Quantimet 570, Leica Cambridge). En bevegelsesindeks ble beregnet ved å dividere det endelige utbredelsesområdet i hvert eksplantant ved dets initielle vevsaral. Eksplantanter dyrket på vevskultur polystyren (TCPS) som er behandlet med korona utladning for å optimalisere cellefesting og vekst, ble benyttet som komparativ kontroll.

25

EKSEMPEL 3:

Den følgende sammensetningen ble plassert i en flat polypropylen form (0,5 mm tykk) og polymerisert i 16 timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper.

	Vektdeler
Makromonomer ifølge eksempel 1 (n=2,9)	80
Isopropylacetat	20
Benzoin metyleter	0,3

30

Etter fjerning av formen ble de resulterende flate skivene ekstrahert ved 37°C i PF5060 (et kommersielt tilgjengelig perfluorinert oppløsningsmiddel anskaffet fra Minnesota Mining and Manufacturing Company (3M) i tre timer, så plassert i isopropylacetat (IPAc) over natten, så i en 50/50 (v/v)-blanding av isopropylalkohol (IPA) i tre timer i fersk IPA i ytterligere tre timer. Skivene ble tørket over natten ved 30°C i en vakuum-ovn og filterpapir før det ble hydrert i saltvann i flere dager. Den sittende kontaktvinkelen til polymeren var 94°C. De hydrerte polymerskivene ble så undersøkt for korneal cellefesting og vekst som beskrevet i eksempel 2 og sammenlignet med vevskulturpolystyren som en positiv kontroll.

10

Etter syv dagers dyrking var det relative nivået for festing og vekst av BCEp-celler til polymerskivene $80 \pm 10,7\%$ av den på den positive kontrolloverflaten (vevskulturpolystyren (TCPS)) mens festingen på BCF var $72,3 \pm 8,8\%$ av den på TCPS.

15

Dette viser at polymeren har tilsvarende aktivitet som vevskulturpolystyren for fremming av cellefesting og vekst. Morfologien til cellene på polymeroverflaten var velspredde celler tilsvarende morfologi til cellene på vevskulturpolystyren (TCPS)-overflaten.

20 **EKSEMEPL 4:**

Den følgende sammensetningen blir plassert i en flat polypropylenform (0,5 mm tykk) og polymerisert i 16 timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper:

	Vektdeler
Makromonomer ifølge eksempel 1 (n=2,9)	60
Dihydroperfluoroktyl akrylat (DHPFOA)	5
N,N-dimetylaminoethylmetakrylat (DMAEMA)	20
Isopropyl acetat	20
Benzoin metyleter	0,3

25

Etter fjerning av formen blir de resulterende skivene ekstrahert ved romtemperatur i PF5060 (et kommersielt tilgjengelig perfluorinert oppløsningsmiddel anskaffet fra Minnesota Mining and Manufacturing Company (3M) i tre timer, så plassert i isopropylacetat (IPAc) over natten, så i en 50/50 (v/v) blanding av IPAc - isopropylalkohol (IPA)

30

i tre timer og så fersk IPA i ytterligere tre timer. Skivene blir så tørket over natten ved

30°C i en vakuumovn på filterpapir før den ble hydrert i saltvann i flere dager og så undersøkt for korneal cellefesting og vekst som beskrevet i eksempel 2 ved anvendelse av vevskulturpolystyren som en positiv kontroll. Denne polymeren viste god cellefesting, ekvivalent til den til kulturpolystyrenen ved dag én. Ved dag seks var det god
 5 cellevekst hvor antallet celler tilstede var omkring 80% av den på vevskulturpolystyrenen.

Polymerer ble også produsert ifølge prosedyren ovenfor hvor DHPFOA-innholdet var 10, 15 og 20 vektdeler, nå opprettholdes av relative proporsjoner av makromonomeren
 10 ifølge eksempel 1 (ved 60 vektdeler), DMAEMA (20 vektdeler) og IPAc (20 vektdeler).

EKSEMPEL 5:

Formuleringer i de følgende sammensetningene hvor N,N-dimetylamonoetylmetakrylat (DMAEMA)-innholdet varierte fra 0 til 20 vektprosent, ble plassert i flate polypropylen-
 15 former (0,5 mm tykk) og polymerisert i 16 timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper:

Polymer	Vektdeler makromonomer ifølge eksempel 1 (n=2,9)	Vektdeler N,N-dimetylaminoetylmetakrylat (DMAEMA)	Vektdeler iso-propylacetat	Vektdeler benzoin-metyleter
5,1	79	9	20	0,3
5,2	75	5	20	0,3
5,3	70	10	20	0,3
5,4	65	15	20	0,3
5,5	60	20	20	0,3

Etter fjerning av formen ble de resulterende flate skivene ekstrahert ved anvendelse av
 20 prosedyren ifølge eksempel 4 og så evaluert for bovin kornealepitelfesting som beskrevet i eksempel 2 ovenfor, ved anvendelse av bovine korneale eptelceller av perifer opprinnelse ved passasje 4 for festeanalyse.

Initiell cellefesting ble undersøkt etter 90 minutters inkuberingsperiode fulgt av en
 25 lengere 24 timers festing på den samme serie polymerer. Etter nitti minutters inkubering støttet alle testprøvene cellefesting. Celletall på 5% og 10% N,N-dimetylaminoetylmetakrylat (DMAEMA) polymerer var tilsvarende til de funnet på vevskultur polystyrenen (TCPS)-kontrolloverflate, mens 0 og 20% N,N-dimetyl-

aminoetylmetakrylat (DMAEMA) polymerer hadde svakt redusert, men meget signifikante positive nivåer av adhesjon. Cellene på testprøvene var generelt godt spredd, dessverre litt mindre velspredd sammenlignet med de på vevskulturpolystyrenen (TCPS)-overflate, hvor gruppen med 20% N,N-dimetylaminoetylmetakrylat (DMAEMA) viste den nærmeste morfologi til vevskulturpolystyrenensettet (TCPS). Distribusjon av celler en enhetlig over hele testpolymeroverflaten. Etter 24 timers inkubasjon forblir celler festet på alle test-overflatene og det relative antallet celler på alle testpolymerene ble funnet å være meget tilsvarende til de på vevskulturpolystyrenen (TCPS) referanseoverflaten. Den funne morfologien på prøvene med 10% N,N-dimetylamino etylmetakrylat (DMAEMA) er tilsvarende til de cellene på vevskulturpolystyrenen (TCPS) mens de på 5% N,N-dimetyl-etylmetakryla (DMAEMA) viste en mer enhetlig distribusjon enn 0% eller vevskulturpolystyrenen (TCPS). Celler på prøvene med 20% N,N-dimetylaminoetylmetakrylat (DMAEMA) syntes være bedre spredd enn 10% prøven, men generelt mer enn enhetlig distribusjon på tvers av overflaten, men 10% generelt støttende for cellefesting.

Totalt, syntes ratene av cellefesting tilsvarende til de funnet på vevskulturpolystyrenen (TCPS). Polymerene med 10 og 5% innhold av N,N-dimetylaminoetylmetakrylat (DMAEMA) var cellemorfologien sammenlignbar til den for bovine korneal epitelceller festet på vevskulturpolystyrenens (TCPS) overflate.

I en separat studie ble polymerskivene etter fjerning av formen ekstrahert som beskrevet i eksempel 3 og så undersøkt for bovin korneal epitelisk og fibroblast festing som beskrevet i eksempel 2 ovenfor. Resultatene etter syv dager vist i tabell A og indikerer at denne polymeren støtter festingen og veksten av bovine korneale epitelceller og bovine korneale stomale fibroblastere. Morfologien til cellen på polymeroverflaten er godt spredde celler, tilsvarende i morfologi til celler på vevskulturpolystyrenoverflaten.

TABELL A

Polymer	Antall BCEp-celler festet til TCPS ($\pm$ sd)	Antall BCF-celler festet i forhold til TCPS ($\pm$ sd)
TCPS	100,0 ($\pm$ 0,0)%	100,0 ($\pm$ 0,0)%
5,1	80,1 ($\pm$ 10,7)%	72,3 ($\pm$ 8,8)%
5,2	59,5 ($\pm$ 17,2)%	40,4 ($\pm$ 2,5)%

EKSEMPEL 6:

Polymerer fremstilt ifølge eksempel 3 og 4 blir testet for cellulær festing og vekst ifølge prosedyren i eksempel 2 ved anvendelse av intakt FBS eller FBS uttømt av det celleadhesive serum glykoproteiner, vitronektin og fibronektin. Som positiv kontroll-

5 referanse ble overflatecellevekst og festing analysert på vevskulturpolystyrenen.

Over en seks dagers kulturperiode støttet polymerene ifølge eksempel 3 og 4 over-

raskende festingen av veksten av BCEp-celler til en meget signifikant grad. Disse

resultatene var meget uventede fra resultatene oppnådd tidligere med andre celler, for

10 eksempel endoteliale celler og anvendelse av hydrofobe eller hydrofile polymer-

overflater hvor cellulær festing ikke skjer i noen merkbar grad. Denne festingen og

veksten av korneal epiteliske celler var ikke avhengig av adsorpsjonen på overflaten til

polymerene av hverken eksogent fibronektin eller eksogent fibronektin eller eksogent

vitronektin. Disse resultatene indikerer at overflatekjemien til polymeren passer for

15 festingen og veksten av korneal epiteliske celler med en mekanisme som omfatter

direkte binding av cellene til polymeroverflaten. Overflaten til de polymere materialene

kan også støtte festing av korneal epiteliske celler ved en mekanisme som omfatter

adsorpsjonen eller nærværet på polymeroverflaten av glykoproteiner som inneholder

bindings seter for celler, slik som fibronektin og vitronektin.

20

EKSEMPEL 7:

I eksemplene ovenfor er det vist at polymerene ifølge oppfinnelsen støtter festingen og

veksten av korneale celler og passer som biomaterialer for anvendelse i okulare

implantater. Det er imidlertid også funnet at ytelsen til polymerene i langtids celle-

25 vekstanalyser kan bli suboptimalisert hvir ikke polymerene blir adekvat behandlet for å

fjerne ekstraherbare stoffer. Dersom ekstraherbare stoffer ikke effektivt blir fjernet fra

polymerene så blir festingen og veksten av korneale epitele celler på polymerene

hemmet. Dette eksemplet demonstrerer passende ekstraksjonsmetoder.

30 En polymerformulering omfattende makromonomeren ifølge eksempel 1 ($n = 2,9$), (60

vektprosent), dihydrofluoroktylakrylat (20 vektprosent), initiator (benzoinmetyleter, 0,3

vektprosent) og oppløsningsmiddel (isopropylacetat, 20 vektprosent) blir støpt til 0,2

mm flate former og polymerisert under UV-bestråling (350 nm) i tre timer. Etter

herdingen var fullstendig ble de flate legemene fjernet fra formene og tørket over natten

35 på filterpapir i en vakuumovn ved 35°C. Med dette trinnet ble de polymere flate

legemene ekstrahert ved en av de følgende forskjellige ekstraksjonsprosedyrene ved

anvendelse av et volumoppløsningsmiddel for hvert ekstraksjonstrinn på 50 ml på 5 flate legemer.

Ekstraksjonsmetode 1:

- 5 De flate legemene ble ekstrahert og hydrert ved anvendelse av fremgangsmåte i eksempel 4 ovenfor. Omkring 5,03% av den opprinnelige vekten ble ekstrahert. Disse polymerene ble betegnet "Metode 1" i tabell 1.

Ekstraksjonsmetode 2:

- 10 De flate legemene ble ekstrahert ved romtemperatur i PF5060 i 6 timer, så plassert i isopropylacetat (IPAc) over natten, så i en 50/50 (v/v) blanding av IPAc/isopropylalkohol (IPA) i 3 timer og så i fersk IPA i ytterligere 3 timer. De flate legemene ble så tørket over natten i en vakuumovn på filterpapir før de ble hydrert i saltvann i flere dager. Omkring 5,20% av den opprinnelige vekten ble ekstrahert. Disse polymerene er
15 betegnet "Metode 2" i tabell 1.

Ekstraksjonsmetode 3:

- De flate legemene ble ekstrahert ved 37°C i PF5060 i 3 timer, så plassert i isopropylacetat (IPAc) over natten, så i en 50/50 (v/v) blanding av IPAc/isopropylalkohol (IPA) i
20 3 timer og så i fersk IPA i ytterligere 3 timer. De flate legemene ble så tørket over natten i en vakuumovn på filterpapir før de ble hydrert i saltvann i flere dager. Omkring 5,45% av den opprinnelige vekten var ekstrahert. Disse polymerene ble betegnet "Metode 3" i tabell 1.

25 *Ekstraksjonsmetode 4:*

- De flate legemene ble ekstrahert ved romtemperatur i PF 5060 i 3 timer, så plassert i diisopropyleter over natten fulgt av ekstrahering med IPAc over natten, så i en 50/50 (v/v) blanding av IPAc/isopropylalkohol (IPA) i 3 timer og så i fersk IPA i ytterligere 3 timer. Alle disse ekstraksjonstrinnene ble utført ved romtemperatur. De flate legemene
30 ble så tørket over natten i en vakuumovn på filterpapir før de ble hydrert i saltvann i flere dager. Omkring 5,00% av den opprinnelige vekten ble ekstrahert. Disse polymerene er betegnet "Metode 4" i tabell 1.

Cellekultur og vekstanalyse:

- 35 De polymere flate legemene ekstrahert i en av metodene ovenfor ble overført til McCartney-flasker inneholdende fosfatbufferet saltvann, pH 7,4 (PBS) og autoklavert i 20 minutter ved 121°C og 105 kPa. Skiver på 6 mm i diameter ble så skåret fra de

- autoklaverte materialene med en steril dermapunsj og replikater plassert i individuelle brønner i et 96-brønners vevskulturbrett. Bovine korneale epitele celler ble så utsådd i hver brønn ved 5×10^4 celler/ml og dyrket i en periode på 4 dager. Antallet vedheftede celler på de ekstraherte prøvene ble bestemt kolorimetrisk og uttrykt som gjennom-
- 5 snittlig prosent ($\pm$ standard avvik) av gjennomsnittsantallet celler festet til en kontroll-vevskultur polystyrenen (TCPS) overflate i tabell 1.

TABELL 1: Effekt av ekstraksjonsmetode.

Ekstraksjonsmetode	Antall celler festet i forhold til TCPS% ($\pm$ standardavvik)
Metode 1	118,7 ($\pm$ 4,8)
Metode 2	121,9 ($\pm$ 1,2)
Metode 3	134,3 ($\pm$ 9,7)
Metode 4	103,3 ($\pm$ 6,2)
TCPS Standard	100 ($\pm$ 6,1)

10

Tabell 1 viser at polymerene ekstrahert ved en av disse ekstraksjonsmetodene (Metode 1 - 4) støtter festingen og veksten av korneal epitele celler under en fire dagers kulturperiode ved et nivå som ekvivalent til eller svakt bedre enn den til vevskulturpolystyrenens (TCPS) overflate som er den positive kontrollen. Hver av disse fire

15 ekstraksjonsmetodene fjernet med suksess sytotoksiske komponenter som kan lekke ut fra kopolymeren. Vekstnivået av bovine korneale epitelceller på polymeren etter ekstraksjon ved disse metodene er ved et nivå funnet på polymerprøver som har blitt ekstrahert over en tre ukers periode med serumfritt kulturmedium.

20

EKSEMPEL 8 ("Z 1,0"):

En makromonomer med formel 1 ($n = 1$) ble fremskaffet fra Minnesota Mining and Manufacturing Company, St Paul, Minnesota, USA som eksperimentelt produkt L-9629. Den følgende sammensetningen ble plassert i en flat polypropylen form (0,5 mm tykk) og polymerisert i 16 timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper.

25

	Vektdeler
Makromonomer med formel 1 ($n = 1$)	80
Isopropylacetat	20
Benzoin metyleter	0,3

- Etter fjerning av formen ble de polymere skivene ekstrahert som beskrevet i eksempel 3 ovenfor for å gi en klar polymer med en sittende kontaktvinkel på 125° og ble så undersøkt for festing av bovine korneale epitelceller og fibroblaster som beskrevet i
- 5 eksempel 2 i forhold til vevskulturpolystyrenen. Resultatene er vist i tabell 2 og indikerer at polymeren støtter festingen av veksten av korneal epitelceller og korneale stromale fibroblaster. Morfologien til cellene på polymeroverflaten er av velspredd celler, tilsvarende morfologien til cellene på vevskulturpolystyrenoverflaten. Tabell 3 viser at den relative evnen til polymeren å støtte utveksten av kornealt vev fra et knapp
- 10 kornealt vev sammenlignet med den positive kontroll vevskulturpolystyrenen. Eksplantant vekstanalyse ble utført i en kulturperiode på 8 dager. Tabellen viser at denne polymeren støtter migreringen av kornealt epitel vev inn på polymeren.

TABELL 2: Cellefestingsstudier

15

Eksempel	Polymernavn	Antall celler festet i forhold til TCPS% ($\pm$ std.avvik)	
		BCEp	BCF
	TCPS	100.0 ($\pm$ 2.0)	100.0 ($\pm$ 0.3)
Eksempel 8	Z 1.0	96.5 ($\pm$ 1.0)	63.6 ($\pm$ 4.0)
Eksempel 9	Z 2.0	66.3 ($\pm$ 2.0)	69.4 ($\pm$ 0.6)
Eksempel 3	Z 2.9	95.9 ($\pm$ 4.0)	92.6 ($\pm$ 2.3)
Eksempel 10	Z 4.0	71.8 ($\pm$ 6.1)	4.6 ($\pm$ 1.5)
Eksempel 11	Z 1.2	77.1 ($\pm$ 6.9)	-
Eksempel 12	Z 1.3	64.9 ($\pm$ 6.1)	-

TABELL 3: Utvektsstudier:

Eksempel	Polymernavn	Migreringsindeks ($\pm$ std.avvik.)
	TCPS	4,6 ($\pm$ 0,1)
Eksempel 8	Z 1,0	2,8 ($\pm$ 0,6)
Eksempel 9	Z 2,0	3,2 ($\pm$ 0,6)
Eksempel 3	Z 2,9	4,1 ($\pm$ 0,6)
Eksempel 10	Z 4,0	2,7 ($\pm$ 0,3)
Eksempel 11	Z 1,2	5,7 ($\pm$ 0,3)
Eksempel 12	Z 1,3	6,3 ($\pm$ 0,3)

EKSEMPEL 9 (“Z 2,0”):

En makromonomer med formel 1 ($n = 2$) ble preparert ved anvendelse av den generelle prosedyren beskrevet i eksempel 1. Den følgende sammensetning ble plassert i en flat polypropylen form (0,5 mm tykk) og polymerisert i 16 timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper:

	Vektdeler
Makromonomer med formel 1 ($n = 2$)	80
Isopropylacetat	20
Benzoinmetyleter	0,3

Etter fjerning fra formene ble polymerskivene ekstrahert som beskrevet i eksempel 3 for å gi en klar polymer med en sittende kontaktvinkel på 109° og så undersøkt for festing av bovine korneal epitelceller og fibroblaster som beskrevet i eksempel 2 ovenfor. Resultatene er angitt i tabell 2 og indikerer at denne polymeren støtter festingen og veksten av korneal epitelceller og korneal stromale fibroblaster. Morfologien til cellene på polymeroverflaten er til velspredd celler tilsvarende morfologien til cellene på

vevskulturpolystyrenoverflaten. Tabell 3 viser at den relative evnen til polymeren til å støtte utveksten av kornealt vev fra et knapp kornealt vev sammenlignet med den positive kontrollvevskulturpolystyrenen. Ekplantantvekstanalysen ble utført i en kulturperiode på 8 dager. Tabellen viser at denne polymeren støtter migreringen ut på polymeren av kornealt epitelt vev.

EKSEMPEL 10 (“Z 4.0”):

En makromonomer med formel 1 ($n = 4$) ble preparert ved anvendelse av den generelle prosedyren beskrevet i eksempel 1. Den følgende sammensetning ble plassert i en flat polypropylen form (0,5 mm tykk) og polymerisert i 16 timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper:

	Vektdeler
Makromonomer med formel 1 ($n = 4$)	80
Isopropylacetat	20
Benzoinmetyleter	0,3

Etter fjerning fra formene ble polymerskivene ekstrahert som beskrevet i eksempel 3 for å gi en klar polymer med en sittende kontaktvinkel på 116° og så undersøkt for festing av bovine korneal epitelceller og fibroblaster som beskrevet i eksempel 2 ovenfor.

Resultatene er angitt i tabell 2 og indikerer at denne polymeren støtter festingen og

- 5 veksten av korneal epitelceller og korneal stromale fibroblaster. Morfologien til cellene på polymeroverflaten er til velspredde celler tilsvarende morfologien til cellene på vevskulturpolystyrenoverflaten. Tabell 3 viser at den relative evnen til polymeren til å støtte utveksten av kornealt vev fra et knapp kornealt vev sammenlignet med den positive kontrollvevskulturpolystyrenen. Ekplantantvekstanalysen ble utført i en
- 10 kulturperiode på 8 dager. Tabellen viser at denne polymeren støtter migreringen ut på polymeren av kornealt epitel vev.

EKSEMPEL 11 ("Z 1.2"):

Fremstilling av mikroporøse polymerskiver:

15

De porøse polymerskivene blir syntetisert ved ultrafiolett (UV) radikale initiert polymerisering av de termodynamiske stabile, transparente, homogene blandinger inneholdende en makromonomer med formel I ($n = 1$) og isopropanol. Makromonomer med formel I ($n = 1$) ble fremskaffet fra Minnesota Mining and Manufacturing

20 Company, St. Paul, Minnesota, Usa som eksperimentelt produkt L-9629. (L-9629 er en perfluoropolyeter som er endekappet med to polymeriserbare metakrylatfunksjonaliteter og har en molekylvekt på omkring 2000). Den følgende sammensetningen ble benyttet for å fremstille disse skivene:

	Vektdeler
Makromonomer med formel 1 ($n = 1$)	54
Isopropanol	43
Zonyl FS-300 (Du Pont)	2,25
Darocur 1173 (Ciba-Geigy)	0,15

25

Makromonomeren, oppløsningsmiddelet og det overflateaktive middelet ble overført til et glass med skrukork utstyrt med en PTFE-belagt magnetisk rørestav. Glasset ble så plassert på en magnetrøreplate i 10 minutter for å tillate grundig blanding av de tre komponentene. Den frie radikale initiatoren Darocur 1173 ble så tilsatt og blandingen

30 fortsatt i ytterligere 5 minutter. Den resulterende blandingen ble plassert under nitrogen i flate polypropylenformer (0,2 mm tykke) og polymerisert i 3 timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper.

- Etter polymeriseringen var fullstendig ble de resulterende polymerflateskivene tatt ut av formene og ekstrahert i isopropanol over natten (ved anvendelse av 60 ml oppløsningsmiddel for hver 10 skiver). Oppløsningsmiddelet ble så dekantert av og erstattet av isopropylacetat. Etter henstand ved 37°C i 4 timer ble oppløsningsmiddelet erstattet av PF 5060. Etter ytterligere 4 timer ved 37°C ble PF5060 dekantert av og skivene ble satt ved romtemperatur inntil overskudd av PF5060 var avdampet. Skivene ble så lagret i etanol.
- 10 Ved denne prosedyren ble polymeren ifølge eksemplet oppnådd i mikroporøs form som flater skiver. Den "hydrerte" vanninnholdet (vektprosent) av de resulterende porøse skivene ble bestemt ved å sammenligne de hydrerte og dehydrerte vekten til skivene. Skivene ble tørket over natten i en vakuumovn ved 37°C og veid. Hydreringen ble oppnådd via en gradert oppløsningsmiddelutbyttingsprosess fra etanol, 75% etanol-
- 15 vann, 50% etanol-vann, 25% etanol-vann og til sist vann. Skivene var omkring 5 minutter i hver oppløsning. De hydrerte skivene ble så plassert på fint lofritt tørkepapir for å tørke av overskudd av overflatefuktighet og ble til sist veid som den hydrerte vekten. Vanninnholdet til de hydrerte skivene bestemt ved denne prosedyren var 52%. Permeabiliteten til skivene overfor glukose (molekylvekt = 181), inulin (molekylvekt =
- 20 5.500) og albumin (molekylvekt = 67.000) ble bestemt å være:

	Permeabilitet cm/s
Glukose	$2,1 \times 10^{-4}$
Inulin	$8,3 \times 10^{-5}$
Albumin	$1,4 \times 10^{-5}$

- Permeabiliteten til de perfluorinerte skivene ble målt med referanse til permeabiliteten til glukose, inulin og albumin gjennom Nuclepore 50 nm og Poretics 25 nm pr. porediameter skiver, porøsiteten til hvilke PCT/EP94/03680 er passende til et kunstig kornealt innlegg.
- 25

	Permeabilitet cm/s		
	Glukose	Inulin	Albumin
Nuclepore 50 nm	$4,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-5}$
Poretics 25 nm	$4,6 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$0,6 \times 10^{-6}$

Dette viser at polymeren ifølge eksemplet har en porøsitet som ligger mellom Nucleopore og Poretics-membranene og således har passende porøsitet for å gi en adekvat gjennomstrømming av næringsstoffer og proteiner med høy molekylvekt for et kornealt innlegg.

5

Den porøse polymeren blir undersøkt for festing av bovine korneale epitelceller og fibroblaster som beskrevet i eksempel 2. Resultatene er vist i tabell 2 og indikerer at polymeren støtter festing og vekst av korneal epitelceller og korneale stromale fibroblaster. Morfologien til cellene på polymeroverflaten er den til velspredd celler,

10

tilsvarende morfologien til cellene på vevskulturpolystyrenoverflaten. Tabell 3 viser at den relative evnen til polymeren til å støtte utveksten av kornealt vev fra et knapp korneal vev, sammenlignet med vevskulturpolystyrenet som positiv kontroll.

Eksplantant vekstanalysen ble utført i en periode på 8 dager. Tabellen viser at denne polymeren støtter migreringen av kornealt epitel vev inn på polymeren og er overlegen

15

den til vevskulturpolystyren for dette formålet.

EKSEMPEL 12 (Z 1,3"):

Polymeren fra eksempel 8 ble fremstilt i en annen mikroporøs skiveform. Den følgende blandingen ble støpt i 7 x 10 polypropylenmembranformer og polymerisert i tre timer

20

over bredt spekter UV-lamper ved anvendelse av en identisk protokoll som den i eksempel 11.

	Vektdeler
Makromonomer med formel I (n = 1)	70
Isopropanol	35
Darocur 1173 (Ciba-Geigy)	0,19

Ved anvendelse av metoden angitt i eksempel 11 ble vanninnholdet bestemt å være

25

33%. Permeabiliteten var som følger:

	Permeabilitet cm/s
Glukose	$9,18 \times 10^{-5}$
Inulin	$3,21 \times 10^{-5}$
Albumin	$0,86 \times 10^{-5}$

Den porøse polymeren ble undersøkt for festing av bovin korneal epitelcelle og fibroblaster som beskrevet i eksempel 2. Resultatene er vist i tabell 2 og indikerer at denne polymeren støtter festingen og veksten av korneale epitelceller og korneale stromale fibroblaster. Morfologien til celleoverflaten var den til velspredde celler, tilsvarende morfologien til cellene på vevskulturpolystyrenoverflaten. Tabell 3 viser at den relative evnen til polymeren å støtte utveksten av kornealt vev fra et knapp kornealt vev, sammenlignet med vevskulturpolystyren som positiv kontroll. Eksplantante vekstanalyser ble utført i en kulturperiode på 8 dager. Tabellen viser at denne polymeren støtter migreringen av kornealt epitel vev ut på polymeren og er overlegen vevskulturpolystyren for dette formål.

EKSEMPEL 13 ("Z 1,1"):

Polymeren ifølge eksempel 8 ble fremskaffet på en alternativ mikroporøs skiveform. Den følgende blandingen ble støpt i 7 x 10 polypropylenmembranformer og polymerisert i tre timer over et bredt spekter UV-lamper ved anvendelse av en identisk protokoll til den i eksempel 11.

	Vektdeler
Makromonomer med formel I (n = 1)	40
Isopropanol	40
Zonyl FS-300 (Du Pont)	12
Darocur 1173 (Ciba-Geigy)	0,31

Ved anvendelse av metoden angitt i eksempel 11 ble vanninnholdet bestemt å være 52%. Permeabiliteten var:

	Permeabilitet cm/s
Glukose	$1,2 \times 10^{-4}$
Inulin	$4,5 \times 10^{-5}$
Albumin	$0,8 \times 10^{-5}$

Denne porøse polymeren ble evaluert for dens evne til å støtte korneal vevsutvekst på øyet. Spesifikke mål var å undersøke ytelsen til lentikules med hensyn på støtte av den initielle festingen, overveksten og motstandskraften til adhesjonen til korneale epitelceller in vivo. Lentikuli ble fremstilt ved kutting av polymeren i for eksempel 8 (0,2 mm tykk) med en trepan med 4 mm diameter.

Fremgangsmåter for implantering og klinisk observasjon:

Fremgangsmåtene og utførelsen av studien beskrevet i den følgende teksten er godkjent av Animal Ethics Committee of the University of New South Wales. Fem voksne katter

5 fra 2 til 4 år gamle ble benyttet i disse studiene. Alle kattene var fri for okulære eller systemiske sykdommer. Basislinjemålinger av korneal integritet, inkludert spaltelampe-evaluering og måling av korneal tykkelse med et ultrasonisk pakometer (VIDA 55) ble utført. Før implantering fikk alle dyrene de niktiterende membranene fjernet fra begge øynene. Et øye fra hver katt ble valgt tilfeldig for implantering. Kirurgi ble utført

10 minimum to uker etter fjerning av de niktiterende membranene ved den følgende protokoll. Katten ble bedøvd ved anvendelse av 15 til 20 mg/kg kroppsvekt ketamin og 0,5 til 1 mg/kg kroppsvekt Xylazin intramuskulært til en dybde på trinn 3 - plan 2. Den sentrale kornea ble merket med en 4 mm diameter trepan (satt til 20 μ m dybde). Eiptel i det merkede området ble fjernet ved skraping med et fiberblad. En 2 mm diameter

15 trepan (satt til 100 - 150 μ m) ble benyttet for å utføre en sirkulær keratotomi i den sentrale kornea. En 2 mm vid ringformet stromal lomme med retning mot limbus, ble preparert med basis til keratotomien med en korneal dissektor med skarp egg. Den overliggende delen av lommen ble forlenget mot den overliggende limbus med ytterligere 3 mm slik at den fremre kanten av lommen var omkring 3 mm fra lommemunnen. Et buet snitt med 5 mm lengde ved lommedybden ble gjort langs den fremre kanten av lommen med et fiberblad. Lentikulen ble plassert i den stromale lommen gjennom dette snittet ved anvendelse av en flat spatel. Snittet ble så lukket med 4 til 5 avbrutte suturer med 10-0 nylontråd. Sofradex (0,5% Framycetin Sulphate og 0,5% Dexamethason Sodium) øyedråper ble administrert topikalt til det opererte øyet etter

25 kirurgi. Postoperativ pleie omfattet topikal administrasjon av steroider og antibiotika til det opererte øyet (Sofradex øyedråper påført 3 ganger daglig, pluss 0,5% Chloromycetin salve påført om natten) i to uker. Dette regimet ble redusert til en gang hver dag for resten av observasjonsperioden. Suturene ble fjernet 5 uker etter kirurgi.

30 Den kliniske observasjonen av de implanterte øynene var som følger. De opererte øynene ble undersøkt med spaltelampe hvor både den generelle tilsynekomsten og fluorskeinfarving ble undersøkt. Epitelvekst over overflaten til lentikulen ble kvantifisert ved anvendelse av et graderingssystem (beskrevet nedenfor). Alvoret av postoperative komplikasjoner (hvis noen) og integriteten til implantatet ble også

35 undersøkt. Alle dyrene ble undersøkt i omkring 9 uker. Etter 63-68 dager ble dyrene terminert og både det implanterte og kontrolløyet ble undersøkt histologisk (se nedenfor for histologiske teknikker). NB: Dersom noen alvorlige komplikasjoner slik som

korneale sårdannelser, inflammasjon eller anterior stromal smelting med fremstikking av lentikulen blitt observert ville dyrene blitt terminert umiddelbart ved anvendelse av dødelig overdose av natriumpentobarbiton; imidlertid støtte ingen av dyrene i testen på slike komplikasjoner.

5

Klinisk scoresystem benyttet for gradering av vevsrespons overfor implanterte lentikuli:

Parameter: Intet epitel dekker den lentikule overflaten: Score = 0

10 Parameter: Epitelet dekker 25% av den lentikule overflaten: Score = 1

Parameter: Epitelet dekker 50% av den lentikule overflaten: Score = 2

Parameter: Epitelet dekker 75% av den lentikule overflaten: Score = 3

Parameter: Epitelet dekker 100% av den lentikule overflaten: Score = 4

Parameter: Full tykkelse epitel dekker 100% av den lentikule overflaten: Score = 5.

15 Denne metoden ble benyttet for den kliniske evalueringen.

Implantater kirurgisk plassert i 5 katter ble observert klinisk i en periode på 63-68 dager.

I alle tilfellene ble overvekst av kornealt epitelt vev observert å starte innen de tre første

3 dagene etter kirurgi og fullstendig dekking av implantatet med epitel ble observert

20 etter 5 til 18 dager (gjennomsnittsverdi 10 dager). Selv om det ble sett noe tap av epiteldekking etter den initielle dekkingen, grodde epitelvevet igjen og dekkingen ble gjenopnådd. Tabell 5 beskriver de kliniske egenskapene til epiteldekkingen.

TABELL 5: Kliniske egenskaper ved epitelvekst og komplikasjoner.

Katt	Observasjonsperiode (Dager)	Dager til initiell vekst av epitel	Dager for full dekking av epitel	Dager til epiteltap/gjenvekst (lokalisering)	Kliniske score ved terminering	Komplikasjoner (Startdag)
A	64	1	18	16/18 (flest områder) 29/32 (sentral) 33/36 (sentral) 49/54 (nasal) 55/- (sentral)	3	Anterior stromal smelting (12)
B	63	1	5	26/28 (sentral) 32/36 (superior) 63/-(sentral)	3,7	Anterior stromal smelting (54)
C	63	1	6	12/14 (sentral) 48/49 (sentral)	5	Anterior stromal smelting (24) Vaskularisering (52)
D	65	2	12	55/59 (inferior)	1	Anterior stromal smelting (4)
E	68	3	11	42/47 (sentral)	4,5	Anterior stromal smelting (9)

5 *Fremgangsmåter for immunohistologisk evaluering av implantater:*

Immunohistokjemisk evaluering av frosne seksjoner av kornealt vev ble utført i den følgende prosedyre. Ferskt utskårne korneaer ble holdt i kald PBS og trimmet for å gi limbus-til-limbusstriper på tvers av kornea. Vev for frosne seksjoner ble benyttet ikke-fiksert for å preservere antigenetene. Stripene av kornea ble innpakket i Tissue Teck

- 10 OCT (Miles, USA) og snapfrosset på en metallstav med karbondioksydgass (CIG, Australia). Frosne transverse seksjoner ble skåret ved 7-8 µm ved anvendelse av en kryostat (SLEE, UK) ved -20°. Seksjoner ble oppsamlet på krom-alum gelatinbelagte glassmikroskopobjektglass, tørket ved 37°C og så individuelt pakket inn i folie og lagret ved -70°C. Før anvendelse ble seksjoner bragt til romtemperatur i 15 minutter, åpnet og
- 15 tørket ved 37°C i 5 minutter. Seksjoner ble inkubert i 60 minutter ved romtemperatur i en oppløsning av 2% (w/v) bovint serum albumin (BSA, Fraksjon V fra Boehringer-Mannheim, Tyskland) i PBS for å redusere ikke-spesifikk binding. Etter blokkering ble

seksjoner dekket med det utvalgte primærantistoffet (se tabell 4) med en fortykning på 1/100 i 1% (w/v) BSA og ble så vugget forsiktig i 3 minutter ved romtemperatur, med en ytterligere inkubering i 30 minutter ved 37°C. Etter tre rensinger i PBS ble seksjoner dekket med et passende fluorskein-isotiocyanat-konjugert sekundært antistoff (se tabell 4) og vugget forsiktig i 30 minutter ved romtemperatur fulgt av 30 minutter inkubering ved 37°C. Seksjoner ble beskyttet for lys under denne inkuberingen. Etter tre rensinger i PBS og endelig rensing i dobbeldestillert vann, ble seksjoner montert i glyserol/PBS og ble undersøkt samme dag som farvingen. Negative kontroller ble rutinemessig utført med hver eksperimentell kjøring som involverer en antistoff-farving. Disse ble frem-

10 skaffet ved inkubering av tilsvarende seksjoner av kornealt vev med 1/100 fortykning av preimmunserum (for å tilpasse artene i hvilke det primær antistoffet er fremskaffet) istedet for det primær antistoffet fulgt av det fluoriserende sekundær antistoffet som ble benyttet i testseksjonene. Alle seksjonene ble undersøkt ved bruk av et Nikon diafot mikroskop utstyrt med en argon laserkilde (MRC-500 fra BioRad Laboratories, USA).

15 Dette gir tofase/fluorescent bilder som ble fotografert ved anvendelse av transparent farvefilm.

TABELL 4: Primær og sekundær antistoff benyttet i immunosytokjemi.

For å identifisere	Benyttet primært antistoff	Benyttet sekundært antistoff
Epitelt vev	AE5 mot cytokeratin 3 (ICN # 69-143)	Kanin anti-mus IgG FITC* (Dakopatts #F-232)
Adhesjonskompleks komponenter	Bulluos pemphigoid antiserum (Gave fra sykehus)	Kanin anti-menneske IgG FITC* (Dakopatts #F-202)

20 * FITC = fluorskein isotiocyanatkonjugert

Den korneale epitele vevsdekkingen av et av implantatene ble evaluert med immuno-

histokjemisk farving for epitelisk cytokeratiner og for nærværet av komponenter av

adehsjons komplekser. Vevsdekkingen på den fremre overflaten av implantatet ble

25 bekreftet å være epitelisk ved positiv immunofarving med AE5 antiserum. Videre, ble

basal cellene av den epiteliske dekingen av implantatet vist å ha positiv immuno-

farving med Bullus-serum, noe som indikerer nærvær av komponenter av adhesjons-

komplekset. Adhesjonskomplekser er kjent å være involvert i adhesjon av det korneale

epiteliske vev til den underliggende stroma og dette resultatet indikerer at det korneale

30 epiteliske vev foran implantatet har en analog ekspresjon av disse adhesjonsfremmende

komponentene.

Disse resultatene viser at den makroporøse form av materialet ifølge oppfinnelsen støtter den initielle festingen og utveksten av kornealt epitelisk vev til å dekke et kornealt pålagt implantat. Materialet muliggjør at utviklingen av en dekning av kornealt vev skjer i løpet av flere dager etter implantering. Videre, kan materialet støtte

5 utviklingen av en funksjonell korneal epitelvevsdekking, hvor vevsdekningen har en organisert struktur tilsvarende stratifisering som har blitt sett i normalt kornealt epitel såvel som ekspresjon i det basale epitelcellelaget av komponenter av adhesjons-kompleksstrukturer.

10 **EKSEMPEL 14 ("Z 1,4"):**

En videre mikroporøs form av polymeren ifølge eksempel 8 ble fremskaffet ved polymerisering av den følgende blandingen ved fremgangsmåte ifølge eksempel 11.

	Vektdeler
Makromonomer med formel I (n = 1)	85
Isopropanol	25
Darocur 1173 (Ciba-Geigy)	0,30

- 15 Ved anvendelsen av metoden angitt i eksempel 11 ble vanninnholdet bestemt å være 15%. Permeabiliteten var:

	Permeabilitet cm/s
Glukose	$1,3 \times 10^{-5}$
Inulin	$0,4 \times 10^{-5}$
Albumin	$9,0 \times 10^{-8}$

EKSEMPEL 14:

- 20 Polymerene fra eksempel 11, 12, 13 og 14 ble belagt med kollagen ved anvendelse av metoder tilsvarende til de kjent i teknikken. Materialene ble så evaluert for deres evne til å støtte vevsutvekst fra korneale epitel vevsknapper. De ikke-belagte materialene ble også undersøkt.
- 25 Materialenes evne til å støtte utvekst av kornealt epitelt vev ble bestemt ved metodene beskrevet i eksempel 2. Tabell 6 viser at materialene støtter utvekst av kornealt epitelt vev i en ekvivalentgrad som polymeren ifølge eksempel 8. Videre støttet også

materialene utvekst av kornealt epitelt vev når polymeren var forhåndsbelagt med kollagenbelegging.

TABELL 6

5

Eksempel	Polymernavn	Migreringsindeks ($\pm$ std.avvik)
	TCPS	7,3 ($\pm$ 1,1)
Eksempel 13	Z 1,1	4,3 ($\pm$ 0,6)
	Z 1,1 + kollagen	4,5 ($\pm$ 0,2)
Eksempel 11	Z 1,2	4,1 ($\pm$ 0,2)
	Z 1,2 + kollagen	5,7 ($\pm$ 1,7)
Eksempel 12	Z 1,3	5,1 ($\pm$ 0,7)
	Z 1,3 + kollagen	6,0 ($\pm$ 0,0)
Eksempel 14	Z 1,4	5,2 ($\pm$ 0,9)
	Z 1,4 + kollagen	7,8 ($\pm$ 0,4)
Eksempel 8	Z 1,0	4,1 ($\pm$ 0,6)

EKSEMPEL 16:

Dette eksemplet illustrerer prepareringen av en makromonomer med formel I ($n = 1,0$)

- 10 hvor Q er resten avledet fra metakryloylklorid, x er 10 og y er 14. Den hydroksyl-terminerte PFPE ($n = 1,0$) 107 g, ble plassert i en skilletrakt og vasket med 20 ml petroleumsprit. PFPE-fraksjonen ble overført til en rundbunnet flaske utstyrt med en magnetrørestav og tørket over natten under vakuum (0,1 mm Hg) ved 105°C.

- 15 Ved avkjøling ble 20,02 g (9,9 mmol) av PFPE plassert i en trehalset rundbunnet flaske utstyrt med en magnetrørestav, dryppetrakt, nitrogeninnløp og gassgjennomobler. PFPE ble fortynnet med 3,06 g (30,1 mmol) trietylamin (Aldrich) og 20 ml triklortri-fluoretan (TCTFE) mens 3,06 g (29,3 mmol) metakryloylklorid (Aldrich) ble fortynnet med 20 ml TCTFE og så plassert i dryppetrakten. Metakryloylkloridet ble sakte tilsatt
20 dråpevis til PFPE-blandingen under omrøringen ved romtemperatur. Straks tilsetningen var fullstendig fikk reaksjonen fortsette over natten ved romtemperatur under en nitrogenatmosfære.

- Trietylaminhydrokloridsaltet ble filtrert fra. Oppløsningen inneholdende markomonomeren ble plassert i en skilletrakt og vasket med 30 ml vann, så tørket over magnesium-
- 25

sulfat. Den tørkede oppløsningen ble filtrert og oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk for å gi PFPE dimetakrylatet som en klar, svakt gulfarvet olje. Opp-løsningen ble lagret i fryseren og filtrert før anvendelse.

5 **EKSEMPEL 17:**

Den følgende sammensetningen ble plassert i flate polypropylenformer (0,2 mm tykke) og polymerisert i tre timer under bestråling fra 365 nm UV-lamper.

	Vektdeler
Makromonomer fra eksempel 16	32
Isopropylacetat	8
EGDMA (Etylen glykoldimetakrylat)	0,7
Darocur 1173 (Ciba-Geigy)	0,1

- 10 Etter fjerning av formen ble de resulterende flate skivene ekstrahert ved anvendelse av prosedyren i eksempel 3. De polymere skivene ble så undersøkt for festing av bovine korneale epitelceller ifølge prosedyren i eksempel 2 og viste en tilsvarende celledensitet og morfologi som polymeren ifølge eksempel 3, når undersøkt under identiske betingelser. Dette viser at polymeren støtter cellevekst.

15

Fagmannen vil forstå at oppfinnelsen beskrevet heri kan utsettes for variasjoner og modifikasjoner andre enn de spesifikt beskrevet heri. Det må også forstås at oppfinnelsen omfatter alle slike variasjoner og modifikasjoner som faller innenfor dens ånd og ramme. Oppfinnelsen omfatter også alle trinnene, trekkene, sammensetningene og forbindelsene referert til eller indikert i denne beskrivelsen, individuelt eller samlet og i en hvilken som helst eller alle kombinasjoner av to eller flere av de nevnte trekk eller trinn.

20

P a t e n t k r a v

1.

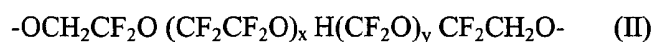
Anvendesle av en polymer som et celleveksts substrat, der polymeren omfatter en
5 makromonomer med formel I:



hvor n er minst 1,0;

10

hver PFPE kan være like eller forskjellige og er en perfluorinert polyeter med formel II:



15 hvor CF_2CF_2O og CF_2O -enhetene kan være tilfeldig distribuert eller distribuert som
blokker gjennom kjeden og hvor x og y kan være like eller forskjellige slik at
molekylvekten til perfluoropolyeteren er i området fra 242 til 4.000,

L er en difunksjonell sammenbindende gruppe; og

Q ved hver ende av makromonomeren er lik eller forskjellig og er en polymeriserbar

20 gruppe.

2.

Anvendelse av en polymer ifølge krav 1, der n er i området fra 1 til 5.

25 3.

Anvendelse av en polymer ifølge krav 1 eller 2, der n er i området fra 2 til 4.

4.

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, der

30 Q er en polymeriserbar gruppe som omfatter en etylenisk umettet del.

5.

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, der

Q er valgt fra gruppen omfattende akryloyl, metakryloyl, styryl, akrylamido,

35 akrylamidoalkyl, urtanmetakrylat, eller et hvilket som helst substituert derivat derav.

6.

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, der L er en bivalent rest ($-C(O)-NH-R-NH-C(O)-$) av et diisocyanat, hvor R er et divalent organisk radikal med opptil 20 karbonatomer.

5

7.

Anvendelse av en polymer ifølge krav 6, der den bivalente resten avledet fra et diisocyanat valgt fra gruppen omfattende trimetylheksametylen-diisocyanat (TMHMDI), isoforon diisocyanat (IPDI), metylendifenyl diisocyanat (MDI) og 1,6-heksametylen-diisocyanat (HMDI).

10

8.

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, der x er i området fra 0 til 20.

15

9.

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, der x er i området fra 8 til 12.

20

10.

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, der y er i området fra 0 til 25.

11.

25

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, der y er i området fra 10 til 14.

12.

Anvendelse av en polymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, der n er i området fra 2 til 5, L er en bivalent av resten avledet fra trimetylheksametylen diisocyanat (TMHMDI) og Q er resten avledet av isocyanatetyl-metakrylat.

30

13.

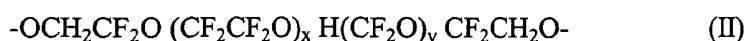
Anvendelse av en polymer ifølge krav 1, der makromonomeren har formel III:

35



(III)

- 5 hvor PFPE er en perfluorinert polyeter med formel II



- 10 hvor $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{O}$ og CF_2O enhetene kan være tilfeldig distribuert eller distribuert som blokker gjennom kjeden, n er minst 1,0, R er trimetylheksametylenkomponenten av TMHMDI, og hvor x er i området fra 8 til 10 og y er i området fra 10 til 14.

14.

- 15 Anvendelse av en cellevekstsubstratpolymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, som et materiale for festing og vekst av animalske celler in vitro.

15.

- 20 Anvendelse av en cellevekstsubstratpolymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, som et materiale for festing og vekst av animalske celler in vivo.

16.

- 25 Anvendelse av en cellevekstsubstratpolymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 som ytterligere omfatter absorbert eller koblede adhesiv glykoproteiner, som et materiale for festing og vekst av animalske celler.

17.

- Anvendelse ifølge krav 16, der nevnte adhesiv glykoproteiner er valgt blant gruppen omfattende fibronectin, vitronectin, kollagen, laminin og trombospondin.

18.

- 30 Anvendelse av en cellevekstsubstratpolymer ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13 for å danne et kornealt implantat for anvendelse i kirurgisk implantering i eller på kornea til et pattedyr hvor nevnte implantat har en optisk akseregion med optiske karakteristikk som gir visuelt klarsyn derigjennom og en porøsitet tilstrekkelig for å tillate passasje derigjennom av vevsfluidkomponenter med molekylvekt større enn 10.000 dalton, for derved å gi en strøm av vevsfluid mellom celler foran implantatet og celler bak dette, hvor porøsiteten til den optiske akseregionen er slik at den tillater

gjennomstrømning av vevsfluid-komponenter mens den ekskluderer innvekst av okulart vev.

19.

- 5 Anvendelse ifølge krav 18, der implantatet er belagt med en eller flere komponenter som fremmer veksten av vevet naboliggende til implantatet og/eller celleadhesjon til implantatet.

20.

- 10 Anvendelse ifølge krav 18 eller 19, der porøsiteten i implantatet er gitt ved et flertall porer som har en størrelse som er tilstrekkelig for å tillate passasje gjennom implantatet av proteinvevsfluidkomponenter som har en molekylvekt større enn 10.000 dalton, men som ekskluderer innvekst av vev.

- 15 21.

Anvendelse ifølge krav 20, der flertallet av porene har en diameter mellom 15 nanometer og 0,5 mikrometer.

22.

- 20 Anvendelse av polymeren ifølge formel I, som definert i krav 1, til fremstilling av et medisinsk implantat.