

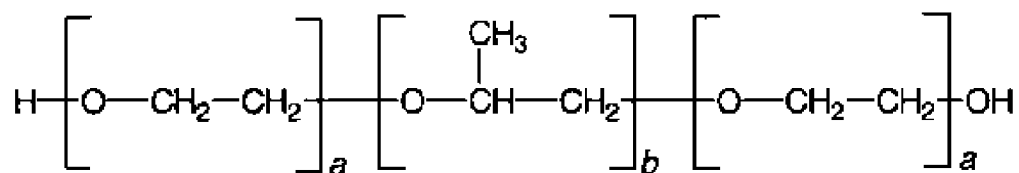
Kettenverlängerte Poloxamere, daraus gebildete thermoreversible Hydrogele mit biologischen Materialien, und medizinische Anwendungen derselben

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft kettenverlängerte Poloxamere. Insbesondere betrifft die Erfindung aus diesen kettenverlängerten Poloxameren hergestellte thermoreversible Hydrogele. Darüberhinaus betrifft die Erfindung thermoreversible Hydrogele mit biologischen Materialien und ein Verfahren zu deren Herstellung, Applikationssysteme für pharmazeutische Anwendungen, ein Verfahren zur Herstellung von kettenverlängerten Poloxameren, sowie ein In-vitro-Verfahren zur Bildung einer Zusammensetzung auf einer Oberfläche.

Hintergrund der Erfindung

Unter dem Begriff "Poloxamer" versteht man eine Klasse Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymeren (erstmal erwähnt in US 3,740,421), die auch bekannt sind unter dem Handelsnamen "Pluronic®" bzw. "Lutrol®" (Markenzeichen der BASF SE). Hierbei handelt es sich um Blockcopolymere aus hydrophilen Polyethylenglykol-Außenblöcken und hydrophoberen Polypropylenglykol-Innenblöcken, d.h. Poly(ethylenoxid)-poly(propylenoxid)-poly(ethylenoxid)-triblockcopolymere, die allgemein durch die folgende Struktur zusammengefasst werden können:



Diese Blockcopolymere bilden im Wasser durch Phasentrennung Sole bzw. Gele:

Die Polyethylenglykolblöcke lösen sich im Wasser, während die Polypropylenglykolblöcke sich aneinander lagern. Diesen Vorgang nennt man Mizellbildung. Wäh-

rend bei tieferer Temperatur (Solzustand) die Mizellen relativ ungeordnet vorliegen, bildet sich bei Erhöhung der Temperatur eine Ordnung dieser Mizellen aus, die zum Erstarren der Flüssigkeit führt (Gelzustand) (vgl. Alexandridis P., Holzwarth J.F., Hatton T.A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*. 1994;27(9):2414–25). Daher werden solche Gele auch thermoreversible Hydrogele genannt.

Hydrogele auf Basis von Poloxameren sind seit längerem bekannt (vgl. Neville J., Swafford W.B.: Pluronics as a suppository base. *Am. J. Pharm. Sci. Support. Public Health*. 1960;132:301-303). Darüberhinaus wurde ein kettenverlängertes Polymer aus Poloxamer 407 (Pluronic® F 127) und Hexamethyldiisocyanat (HMDI) beschrieben (vgl. Jiang J., Malal R., Li C., Lin M.Y., Colby R.H., Gersappe D., Rafailovich M.H., Sokolov J.C., Cohn D.: Rheology of Thermoreversible Hydrogels from Multiblock Associating Copolymers. *Macromolecules* 2008;41:3646-3652).

Da Poloxamere biologisch inert sind, wurden sie bald als Suppositorien für Pharmaka und mit dem Aufkommen der regenerativen Medizin auch als Zellträger eingesetzt (vgl. Kamil S.H., Eavey R.D., Vacanti M.P., Vacanti C.A., Hartnick C.: Tissue-engineered cartilage as a graft source for laryngotracheal reconstruction - A pig model. *Arch. Otolaryngol*. 2004;130(9):1048-1051).

Der besondere Vorteil dieser Hydrogele liegt im beschriebenen thermosensitiven Verhalten. Dadurch ist eine minimalinvasive Applikation inkorporierter Zellen denkbar. Letztere können im flüssigen Zustand einfach eingebracht werden. Nach Implantation kommt es durch die Änderung der Temperatur zum Gelieren, wodurch die Zellen am gewünschten Ort gehalten werden (vgl. Cohn D., Lando G., Sosnik A., Garty S., Levi A.: PEO-PPO-PEO-based poly(ether ester urethane)s as degradable reverse thermo-responsive multiblock copolymers. *Biomaterials* 2006;27(9):1718-1727; Nguyen M.K., Lee D.S. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromol. Biosci*. 2010;10(6):563-579).

Die Verwendung thermoreversibler Hydrogele ist z.B. bei der Behandlung von Verbrennungen vorteilhaft. Das Hydrogel ermöglicht die transdermale oder lokale Abgabe eines Wirkstoffs und erhält einen hohen Feuchtigkeitsgrad an der Hautober-

fläche aufrecht. Dies verhindert eine Austrocknung. Darüberhinaus haftet das Hydrogel in beträchtlichem Maße am geschädigten Gewebe und weist eine gewisse Elastizität auf, wodurch eine Ablösung des Hydrogels vermieden und gleichzeitig aus der Wunde austretendes Sekret absorbiert wird. Allgemein fördern Hydrogele die Heilung, da sie an der Wundstelle schnell in den Gelzustand übergehen und Feuchtigkeit in der Wunde erhalten.

Während die meisten Poloxamere bei geringen Polymerkonzentrationen nur Gele mit schlechten mechanischen Eigenschaften ausbilden, kommt es bei kettenverlängerten Poloxameren zu einer höheren Stabilität der Gele. Erste Versuche zur Kettenverlängerung wurden mit Acrylsäureestern (Acrylaten) durchgeführt. Dadurch werden Einheiten mit C=C-Doppelbindungen an das Poloxamer geknüpft. Im Anschluss wurden chemische Additionsreaktionen durchgeführt, so dass mehrere Poloxamereinheiten verbunden werden konnten. Derivate der Acrylsäure sind physiologisch nicht unbedenklich. Wenn die Kettenverlängerung durch Diisocyanate durchgeführt wird, werden die einzelnen Poloxamere durch Urethaneinheiten verknüpft. Polyurethane werden aufgrund ihrer Gewebeverträglichkeit seit geraumer Zeit als medizinische Implantate genutzt. Nachteilig war bisher auch die mangelnde biologische Erkennbarkeit des Materials für die Zellen, die bisher nicht in der Lage waren, an dem Material zu adhären.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, kettenverlängerte Hydrogele ausgehend von Poloxameren bereitzustellen, die die im Stand der Technik bekannten Nachteile nicht aufweisen, und für medizinische Applikationen geeignet sind. Darüberhinaus liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, thermoreversible Hydrogele bereitzustellen, die zur Freisetzung eines biologisch aktiven Mittels bzw. eines Wirkstoffs fähig sind. Daneben liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, thermoreversible Hydrogele, die biologisches Material und lebende Zellen enthalten, wobei die Zellen an dem biologischen Material adhären, und therapeutische Anwendungen dafür zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassung der Erfindung

Die obige Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung des kettenverlängerten Poloxamers gemäss den Ansprüchen 1 bis 8, dem thermoreversiblen Hydrogel gemäss den Ansprüchen 9 bis 21, des Applikationssystems gemäss Ansprüchen 22 bis 24, der medizinische Verwendung des thermoreversiblen Hydrogels gemäss den Ansprüchen 25 bis 34, sowie dem *In-vitro*-Verfahren gemäss Ansprüchen 35 und 36.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1a bis 1e zeigen die physikalischen Eigenschaften von thermoreversiblen Hydrogelen, die aus mit Diisocyanaten kettenverlängerten Poloxameren hergestellt wurden, wobei mit Hexamethyldiisocyanat kettenverlängertes Poloxamer 403 bzw. Pluronic P 123 (PMT001), mit Butandiisocyanat kettenverlängertes Poloxamer 403 (PMT002; BDI-Hydrogel) und mit Methylenbiscyclohexyldiisocyanat kettenverlängertes Poloxamer 403 (PMT003) untersucht wurden. Diese Messungen wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes im Labor von Prof. Dr. W. Frieß am Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

In **Fig. 1a** ist dabei die relative Trübung gegen die Polymerkonzentration in Gew.-% aufgetragen, in **Fig. 1b** der mittlere Lagermodul gegen die Temperatur, in **Fig. 1c** der mittlere Eindringwiderstand gegen die Temperatur, in **Fig. 1d** die Festigkeit der Gele gegen die Temperatur, und in **Fig. 1e** der mittlere freigesetzte Anteil für ein Protein als biologisches Material gegen die Zeit.

Fig. 2a und 2b zeigen Aufnahmen, die das Zellüberleben bei unterschiedlichen Polymerkonzentrationen (2,5%, 5% und 10%) des thermoreversiblen Hydrogels aus mit Butandiisocyanat kettenverlängertem Poloxamer 403, im Folgenden auch als "BDI-Hydrogel" bezeichnet, veranschaulichen. Unterschiedliche Polymerkonzentrationen wurden dabei zunächst stündlich (in Fig. 1a die Reihen "0h" bis "5h"), dann täglich (in Fig. 2b die Reihen "1d", "2d" und "3d") und schliesslich noch nach einer Woche (in Fig. 2b die Reihe "7d") mittels "Live/Dead-Assay" untersucht.

Fig. 3 zeigt die Zellmorphologie in einem thermoreversiblen BDI-Hydrogel der Erfindung mit 10%, 20% bzw. ohne Kollagen, jeweils nach 1, 2, 3 und 7 Tagen. Der Maßstab beträgt 200 µm; alle Bilder wurden bei gleicher Vergrößerung aufgenommen.

Fig. 4 zeigt Mikroskopaufnahmen, die das Zellüberleben von eGFP-SCP1s nach 7 Tagen im thermoreversiblen BDI-Hydrogel der vorliegenden Erfindung mit bzw. ohne Kollagen I, veranschaulichen (MW ± SD, r=3, n=3). Kruskal-Wallis-Statistik mit multiplem Vergleichstest nach Dunn lieferte signifikante Unterschiede zwischen dem thermoreversiblen Hydrogel der Erfindung ohne (A) bzw. mit Kollagen I (B und C). Dabei ist $\alpha=0.05$, *p < 0.05, sowie **p < 0.01. Beispielhafte Mikroskopbilder (am Boden, Vergrößerung 10x) nach Anfärben mit Propidiumiodid (PI); der Maßstab beträgt 200 µm.

Fig. 5 zeigt eGFP-SCP1s-Zellen nach 7 Tagen im thermoreversiblen BDI-Hydrogel der vorliegenden Erfindung (in der Abbildung als "BDI-hydrogel" bezeichnet) mit bzw. ohne 20 % Kollagen I, visualisiert mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Die Aufnahmen wurden mit einer Vergrößerung von 10x (Maßstab: 200 µm; Aufnahmen A) bzw. 63x (Maßstab: 50 µm; Aufnahmen B) vorgenommen.

Fig. 6a zeigt die Sauerstoffsättigung (A) bzw. das Zellüberleben (B) nach 24 h Kultur in Spritzen in BDI-Hydrogel mit CaO₂, "Kontrolle" steht für BDI-hydrogel ohne CaO₂ (MW±SD, r=3, n=1).

Fig. 6b zeigt die Sauerstoffsättigung (A) und Zellüberleben (B) nach 24 h Kultur in Spritzen in BDI-Hydrogel mit 0.25 mg/ml CaO₂ und verschiedenen Katalase-Konzentrationen (MW±SD, r=3, n=1).

Fig. 6c zeigt Sauerstoffsättigung (A) und Zellüberleben (B) nach 72 h Kultur in Spritzen in BDI-Hydrogel mit 0.5 mg/ml CaO₂ und 100 U/ml Katalase oder BDI-Hydrogel bei Konzentrationen von 0,25 mg/ml CaO₂ und 100 U/ml Katalase, (MW±SD, r=3, n=1).

Genaue Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung stellt kettenverlängerte Poloxamere bereit, die aus Poloxameren unter Einsatz von Diisocyanaten hergestellt werden. Diese kettenverlängerten Poloxamere können zu thermoreversiblen Hydrogelen umgesetzt werden, die in verschiedenster Weise auf medizinischem Gebiet verwendet werden können.

Für die Erfindung geeignete Poloxamere, die später zu thermoreversiblen Hydrogelen umgesetzt werden können, sind allgemein diejenigen, bei denen das Molekulargewicht des Poloxamers P mehr als 4000 Da beträgt. Bevorzugt beträgt das Molekulargewicht des Polypropylenblocks mehr als 2350 Da. In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt der Anteil an Polyethylenoxideinheiten im oben genannten Poloxamer bzw. den oben genannten Poloxameren 20% bis 80%, stärker bevorzugt 20% bis 70%, und besonders bevorzugt 20% bis 60%. Insbesondere geeignet für die vorliegende Erfindung ist ein kettenverlängertes Poloxamer P*, hergestellt durch Umsetzung mindestens eines Poloxamers P mit einem Diisocyanat, bestehend aus zwei Polyoxyethylenblöcken PEG und einem Polyoxypropylenblock PPG, wobei das Molekulargewicht des Polypropylenoxid-Blocks von P grösser ist als 2350 Da. Handelt es sich um mehr als ein Poloxamer, z.B. zwei verschiedene Poloxamere P und P', so erfüllt jedes Poloxamer die obigen Erfordernisse.

Im Besonderen wird zum Erhalt des erfindungsgemässen kettenverlängerten Poloxamers in den vorgenannten Fällen bei einem Molekulargewicht des Poloxamers P von mindestens 11.000 Da und einem Anteil an Polyethylenoxid in P von mehr als 60% ein zusätzliches, vom vorgenannten Poloxamer verschiedenes Poloxamer verwendet. Zu den Poloxameren mit einem Molekulargewicht von 11.000 Da und einem Anteil an Polyethylenoxid von mehr als 60% zählt zum Beispiel Poloxamer 407 (Pluronic® F 127). In der vorliegenden Erfindung wird daher im Fall der Verwendung von Poloxamer 407 bevorzugt mindestens ein weiteres, von Poloxamer 407 unterschiedliches Poloxamer in Kombination verwendet.

In einer anderen Ausführungsform ist bei einem Molekulargewicht des oben genannten Poloxamers P von mindestens 11.000 Da und einem Anteil an Polyethylenoxid in P von mehr als 60% das Diisocyanat ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Diisocyanaten der Formel $O=C=N-(CH_2)_n-N=C=O$ mit $n = 4, 5$ oder $n > 6$, Isophoron-

diisocyanat, Methylendi(4,4'-isocyanato)cyclohexan (H₁₂-MDI), Lysindiisocyanat und aromatischen Diisocyanaten, bevorzugt Diphenylmethandiisocyanat (MDI). In einer bevorzugten Ausführungsform wird, falls Poloxamer 407 verwendet wird, dieses ggf. mit weiteren Poloxameren kombiniert und mit einem Diisocyanat, das aus den vor-

5 genannten ausgewählt wird, kettenverlängert.

Bevorzugt werden mindestens drei Wiederholungseinheiten mindestens eines Poloxamers P umgesetzt.

Die Poloxamereinheiten werden mit einem Diisocyanat zur Kettenverlängerung umgesetzt. Während aromatische Diisocyanate für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden können, die allgemein im vorliegenden Gebiet aufgrund ihrer hohen Reaktivität bevorzugt werden, besteht ein Nachteil darin, dass sie zu cancerogenen Diaminen abgebaut werden können. Dagegen würde ein entsprechender Abbau bei aliphatischen Diisocyanaten beispielsweise zu Diaminen wie Putrescin oder Kadaverin führen, die in geringem Masse in den Stoffwechselprozessen des Körpers vorkommen.

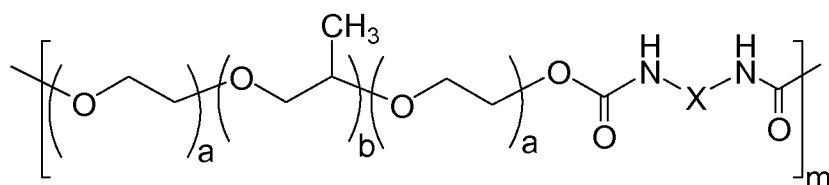
10 Zudem sind die aliphatische Verbindungen auch beständig gegen andere Abbaureaktionen, weshalb sie in technischen Anwendungen eingesetzt werden, wenn Vergilbung o.ä. vermieden werden soll. Daher werden aliphatische und insbesondere lineare Diisocyanate erfindungsgemäss bevorzugt.

Die kommerziell verfügbaren Poloxamere (Pluronic[®] bzw. Lutrol[®]) unterscheiden sich im Verhältnis von Ethylenoxid- bzw. Polyethylenglykol- (PEG-)Einheiten a und Polypropylenoxid- bzw. (PPG-)Einheiten b, sowie in der Länge der Blöcke. Dies führt zu unterschiedlichem Verhalten in Wasser.

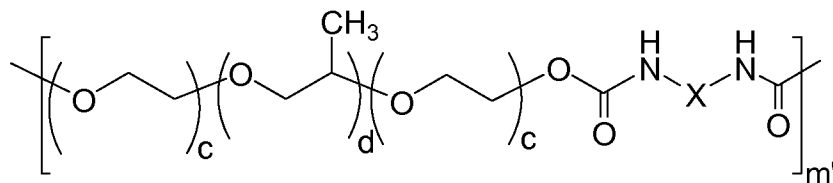
20

Falls ein Poloxamer wie oben beschrieben mit einem Diisocyanat umgesetzt wird, so enthält, insbesondere wenn es sich um ein einzelnes Poloxamer als Ausgangsmaterial handelt, das kettenverlängerte Poloxamer P* der vorliegenden Erfindung die folgende Struktureinheit:

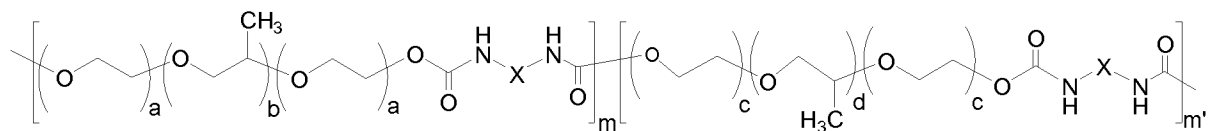
25



worin a und b jeweils ganze Zahlen zwischen 1 und 110 sind, und $m \geq 3$ ist; a bezeichnet die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(ethylenoxid)blocks PEG, und b bezeichnet die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(propylenoxid)blocks PPG; hergestellt aus einem Diisocyanat die Formel $O=C=N-X-N=C=O$, wobei X der aliphatische oder aromatische Rest des Diisocyanats ist. Handelt es sich um zwei verschiedene Poloxamere (P und P') als Ausgangsmaterial, so besitzt das kettenverlängerte Poloxamer P* auch Struktureinheiten der Formel



und/oder der Formel



wobei a, b, m sowie X wie oben definiert sind, c die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(ethylenoxid)blocks PEG, und d die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(propylenoxid)blocks PPG jeweils im zweiten Poloxamer P' bezeichnet, wobei c und d jeweils ganze Zahlen zwischen 1 und 110 sind, und $m' \geq 3$ ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das bzw. sind die kettenverlängerte(n) Poloxamer(e) P ausgewählt aus einem bzw. mehreren der Poloxamere 272, 278, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403 und 407 (Handelsbezeichnungen: Pluronic® bzw. Lutrol® L 92, F 98, L101, P 103, P 104, P 105, F 108, L 121, L 122, P 123 sowie F 127). Das Poloxamer 407 wird bevorzugt in Kombination mit einem oder mehreren anderen Poloxamer(en) eingesetzt. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform wird Poloxamer 407 entweder in Kombination mit weiteren Poloxameren, oder auch allein mit linearen Diisocyanaten der Formel $O=C=N-(CH_2)_n-N=C=O$ mit $n = 4, 5$ oder $n > 6$ umgesetzt, oder mit aliphatischen Diisocyanaten wie Isophorondiisocyanat, Methylendi(4,4'-isocyanato)cyclohexan (H_{12} -MDI) bzw. Lysindiisocyanat, oder aromatischen Diisocyanaten, bevorzugt Diphenylmethandiisocyanat (MDI).

Die Poloxamere der vorliegenden Erfindung können allgemein flüssig, pastenartig oder fest sein. Beispielsweise sind unter gewöhnlichen Bedingungen die Poloxamere 272, 331, 401 und 402 (bzw. die mit "L" bezeichneten Pluronic-Typen) flüssig, die Poloxamere 333, 334, 335 und 403 (bzw. die mit "P" bezeichneten Pluronic-Typen) pastenförmig, und die Poloxamere 278, 668 und 407 (bzw. die mit "F" bezeichneten Pluronic-Typen) fest.

Besonders bevorzugt sind gemäss der Erfindung thermoreversible Hydrogele auf Basis von Poloxamer 403, 407 und 338.

Bislang ist hauptsächlich Poloxamer 407 bzw. "Pluronic® F 127" (entsprechend der obigen allgemeinen Formel mit $a=100$, $b=65$; d.h. $[\text{PEG}]_{65}[\text{PPG}]_{100}[\text{PEG}]_{65}$) in Hydrogelen für medizinische und pharmazeutische Zwecken eingesetzt worden.

Erfindungsgemäss können auch mehrere Poloxamere P zu einem kettenverlängerten Poloxamer P* miteinander kombiniert werden. Bevorzugt sind hierbei kettenverlängerte Poloxamere P* aus zwei oder drei verschiedenen Poloxameren.

Erfindungsgemäss können die kettenverlängerten Poloxamere P* zu thermoreversiblen Hydrogelen umgesetzt werden. Das thermoreversible Hydrogel der vorliegenden Erfindung ist bevorzugt ein thermoreversibles Hydrogel, das

(a) das oben genannte kettenverlängerte Poloxamer P* sowie

(b) ein biologisches Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem antibiotischen, antimikrobiellen oder antimykotischen Wirkstoff, Proteinen, Glukosaminoglykanen, Lysozym und einer Polyaminosäure umfasst.

Das thermoreversible Hydrogel der vorliegenden Erfindung ist erhältlich durch

(a) Bildung des oben genannten kettenverlängerten Poloxamers P*, und

(b) Mischen des kettenverlängerten Poloxamers mit einem biologischen Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem antibiotischen, antimikrobiellen oder antimykotischen Wirkstoff, Proteinen, Glukosaminoglykanen, Lysozym und einer Polyaminosäure.

Als Diisocyanate werden aromatische und aliphatische, insbesondere lineare Diisocyanate, die sich als Kettenverlängerungsmittel als besonders vorteilhaft erwiesen haben, bevorzugt.

- Wie eingangs erwähnt, ist gemäss dem Stand der Technik die mangelnde biologische Erkennbarkeit des Materials für die Zellen nachteilig, da letztere bisher nicht in der Lage waren, an dem Material zu adhären. Die Erfindung basiert insbesondere auf der beispielhaften Idee, das auf einem kettenverlängertem Poloxamer basierende Hydrogel mit Kollagen als einem biologischen Material zu versetzen, und der Entdeckung der überraschend vorteilhaften Eigenschaften des daraus hergestellten thermoreversiblen Hydrogels. Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform kann dazu z.B. fein gemahlenes oder lösliches Kollagen als biologisches Material verwendet werden. In Laborversuchen zeigte sich, dass die Zellen in einem gewissen Toleranzbereich eine ausgebreitete Zellmorphologie aufweisen, was auf eine Adhärenz an Kollagen schliessen lässt.
- Erfindungsgemäss wurde gefunden, dass z.B. auch aus dem relativ hydrophoben Poloxamer 403 (Pluronic® P 123) in geringen Konzentrationen vielseitig einsetzbare thermoreversible Hydrogele mit entsprechenden physikalischen Eigenschaften hergestellt werden können, besonders wenn diese, wie oben beschrieben, mit linearen bzw. aliphatischen Diisocyanaten kettenverlängert werden. Diese Hydrogele haben sich als Applikationssystem für Zellen und hochmolekulare Proteine besonders bewährt. Die Hydrogele gemäss der vorliegenden Erfindung zeigen stark verbesserte Eigenschaften gegenüber Hydrogelen, die auf bekannten kettenverlängerten Poloxameren basieren. So liegt ein besonderer Vorteil der thermoreversiblen Hydrogele auf Basis von Poloxamer 403 gegenüber denen auf Basis von ausschliesslich Poloxamer 407 (Pluronic® F 127) darin, dass sie *in vivo* länger beständig sind.

Um ein längeres Zellüberleben und eine biologische Funktionalität der integrierten Zellen zu erhalten, werden erfindungsgemäss die Hydrogele mit biologischem Material modifiziert. Dadurch erhalten die Zellen Adhäsionspunkte, an denen sie mittels Integrinbindung adhären können. Eine solche Adhäsion ist für die Aktivität der Zellen Voraussetzung (vgl. Popov C., Radic T., Haasters F., Prall W.C., Aszodi A., Gullberg D. et al.: Integrins alpha2beta1 and alpha11beta1 regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. Cell Death Dis. 2011; 2: e186).

Erfindungsgemäss geeignete biologische Materialien sind ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem antibiotischen, antimikrobiellen oder antimykotischen Wirkstoff, Proteinen, Glukosaminoglykanen, Lysozym und einer Polyaminosäure. Der antibiotische, antimikrobielle oder antimykotische Wirkstoff ist bevorzugt ausgewählt aus β -Lactam-Antibiotika, Tetracyclinen, Aminoglykosiden, Makroliden, Virustatika, Allylaminen, antimykotisch wirksamen Antibiotika, Imidazolen und Derivaten davon. Die Polyaminosäure ist bevorzugt ausgewählt aus natürlichen und synthetischen Polyaminosäuren.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das biologische Material ausgewählt aus der Klasse der Proteine.

Erfindungsgemäss wird das Protein bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung hemmenden oder stimulierenden Protein; oder aus der Gruppe, bestehend aus Fibrin, Gelatine, Kollagenen, und knochenmorphogenen Proteinen (BMP). Das Protein kann auch ein Wachstumsfaktor sein, und ist bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor (IGF), Transforming growth factor (TGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GMCSF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Interleukin-1B (IL-1B), Interleukin-8 (IL-8), Nervenwachstumsfaktor (NGF), und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin und koloniestimulierenden Faktoren wie G-CSF.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das biologische Material ausgewählt aus β -Lactam-Antibiotika, Tetracyclinen, Aminoglykosiden, Makroliden, Virustatika, Allylaminen, antimykotisch wirksamen Antibiotika, Imidazolen, sowie Derivaten davon, Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), TGF- β -(transforming growth factor beta)-Superfamilie, bevorzugt BMP (bone morphogenetic protein)- und GDF (growth differentiation factor)-Familien, stärker bevorzugt BMP2, BMP7 und GDF-5.

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das biologische Material aus löslichem Kollagen, fein gemahlenem Kollagen, Gelatine, menschlichem Blut, tierischem Blut, Komponenten menschlichen oder tierischen Blutes.

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das biologische Material aus Kollagen Typ I, II oder III.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das biologische Material bzw. Protein ein Hormon oder Enzym, stärker bevorzugt Follistatin oder Myostatin.

- 5 Das Protein kann auch ein Immunoglobulin oder ein Antikörper sein, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, IgY, und IgW.

Darüberhinaus kann, falls das biologische Material ein Glukosaminoglykan ist, Hyaluronan (Hyaluronsäure) verwendet werden.

- 10 Das thermoreversible Hydrogel der vorliegenden Erfindung kann auch lebende Zellen umfassen.

- Die vorgenannten Zellen sind bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus mononukleären Zellen, insbesondere mesenchymalen Stammzellen, Vorläuferzellen und daraus differenzierten Zellen wie Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten, Epithelzellen, Myoblasten, Tendozyten, oder mononukleären hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und daraus differenzierten Zellen wie z.B. Immunzellen, oder multinukleären Zellen wie Riesenzellen, Makrophagen und Osteoklasten.
- 15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Zellen genetisch modifiziert oder werden im Gel modifiziert.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform kann das thermoreversible Hydrogel auch einen Tracer enthalten. Hierbei sind Tracer aus radioaktiven Substanzen, die mittels PET oder SPECT sichtbar gemacht werden können, bevorzugt. Beispiele für solche Tracer sind Radioisotope wie Tritium, ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{111}In und ^{123}I .

- 25 Überraschend wurde nun gefunden, dass bei den thermoreversiblen Hydrogelen der Erfindung aufgrund der Verbindung mit biologischem Material

- eine ausgebreitete Zellmorphologie inkorporierter Zellen entsteht, die auf die Ausbildung von Integrinbindungen am biologischen Material (z.B. Kollagen) schliessen lässt, und gleichzeitig
- die mechanischen vorteilhaften Eigenschaften des thermoreversiblen Hydrogels kaum verändert werden.

Das thermoreversiblen Hydrogel der vorliegenden Erfindung ermöglicht eine vielseitigen Einsatz auf medizinischem Gebiet. Demgemäss stellt die vorliegende Erfindung ein thermoreversibles Hydrogel zur medizinischen Verwendung bereit, wobei die medizinische Verwendung Arzneimittelabgabe oder eine biomedizinische Anwendung ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung ein Applikationssystem bereit, welches das oben genannte thermoreversible Hydrogel umfasst. In dieser Ausführungsform umfasst das vorgenannte Applikationssystem bevorzugt auch ein therapeutisches Mittel, das Zell-/Gewebewachstum stimuliert oder hemmt oder Zellen abtötet.

Eine Vielzahl therapeutischer Mittel kann unter Verwendung der thermoreversiblen Hydrogele der vorliegenden Erfindung zugeführt werden. Beispiele umfassen die für das biologische Material oben genannten Mittel, sowie allgemein synthetische anorganische und organische Verbindungen, Proteine und Peptide, Polysaccharide und andere Zucker, Lipide, Ganglioside und Nucleinsäuresequenzen mit therapeutischen, prophylaktischen oder diagnostischen Aktivitäten. Nucleinsäuresequenzen umfassen Gene, Antisense-Moleküle, die an komplementäre DNA unter Hemmung der Transkription binden, und Ribozyme. Die einzuarbeitenden therapeutischen Mittel können eine Vielzahl biologischer Aktivitäten aufweisen, beispielsweise vasoaktive Mittel, neuroaktive Mittel, Hormone, Antikoagulantien, Immunmodulatoren, cytotoxische Mittel, Antibiotika, antivirale Mittel, Antisense-Mittel, Antigene und Antikörper. Proteine, die Antikörper oder Antigene umfassen, Anticaline oder ähnliche künstliche Proteine, die zur Bindung von Antigenen befähigt sind, können ebenfalls zugeführt werden. Proteine sind derart definiert, dass sie aus 100 Aminosäureresten oder mehr bestehen; Peptide sind weniger als 100 Aminosäurereste. Falls nicht anders angegeben, bezeichnet der Ausdruck Protein sowohl Protein als auch Peptide. Beispiele

umfassen Insulin, Parathormon, Parathormonfragmente, Irisin, Myostatin, Follistatin und andere Hormone.

Spezielle therapeutische Mittel umfassen Antibiotika, antivirale Mittel, sowohl steroidale als auch nicht-steroidale entzündungshemmende Mittel, Antineoplastika, Antispasmodika einschliesslich Kanalblockern, Modulatoren von Zelle/extrazelluläre Matrix-Interaktionen, die Zellwachstumsinhibitoren und Antiadhäsionsmoleküle umfassen, Enzyme und Enzyminhibitoren, Antikoagulantien und/oder Antithrombosedmittel, Wachstumsfaktoren, DNA, RNA, Inhibitoren der DNA-, RNA- oder Proteinsynthese, die Migration, Proliferation und/oder das Wachstum von Zellen modulierende Verbindungen, Vasodilationsmittel und andere Arzneimittel, die üblicherweise zur Behandlung von Gewebeläsionen verwendet werden. Spezielle Beispiele für diese Verbindungen umfassen Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitoren, Prostacyclin, Heparin, Salicylate, Nitrate, Calciumkanalblocker, Streptokinase, Urokinase, Gewebeplasminogenaktivator (TPA) und anisoylierten Plasminogenaktivator (TPA) und anisoylierten Plasminogen-Streptokinase-Aktivatorkomplex (APSAC), Colchicin und Alkylierungsmittel und Aptomere. Spezielle Beispiele für Modulatoren von Zellinteraktionen umfassen Interleukine, Plättchenwachstumsfaktor, sauren und basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Transformationswachstumsfaktor β ; (TFG β), epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), insulinähnlichen Wachstumsfaktor und Antikörper hierfür. Spezielle Beispiele für Nucleinsäuren umfassen Gene und cDNAs mit Codierung für Proteine, Expressionsvektoren, Antisense- und andere Oligonucleotide, wie Ribozyme, die zur Regulierung oder Verhinderung einer Genexpression verwendet werden können. Spezielle Beispiele für andere biologisch aktive Mittel umfassen modifizierte Komponenten der extrazellulären Matrix oder deren Rezeptoren und Lipid- und Cholesterinsequestrierungsmittel.

Beispiele für Proteine als therapeutische Mittel umfassen ferner Cytokine, wie Interferone und Interleukine, Proteine und koloniestimulierende Faktoren. Kohlehydrate als therapeutische Mittel umfassen Sialyl Lewis^x, für das gezeigt wurde, dass es an Rezeptoren für Selectine unter Hemmung einer Entzündung bindet. Ein "zuführbares Wachstumsfaktoräquivalent" (abgekürzt DGFE), ein Wachstumsfaktor für eine Zelle oder ein Gewebe, kann verwendet werden, der breit derart konstruiert ist, dass er Wachstumsfaktoren, Cytokine, Interferone, Interleukine, Proteine, koloniestimulierende Faktoren, Gibberelline, Auxine und Vitamine umfasst; ferner Peptidfragmente

oder andere aktive Fragmente der obigen umfasst; und ferner Vektoren, d.h. Nucleinsäurekonstrukte mit der Fähigkeit zur Synthese derartiger Faktoren in den Zielzellen, ob durch Transformation oder transiente Expression, umfasst; und ferner Effektoren umfasst, die die Synthese derartiger Faktoren im Gewebe stimulieren oder unterdrücken, wobei diese natürliche Signalmoleküle, Antisense- und Dreifachhelixnucleinsäuren und dgl. umfassen. Beispiele für DGFes sind vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Endothelzellenwachstumsfaktor (ECGF), basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), Knochenwachstumsprotein (BMP) und Plättchenwachstumsfaktor (PDGF) und DNAs mit Codierung derselben. Beispiele für Gerinnselauflösungsmittel sind Gewebeplasminogenaktivator, Streptokinase, Urokinase und Heparin.

Als therapeutische Mittel können auch Arzneimittel mit antioxidierender Aktivität (d.h., die aktiven Sauerstoff zerstören oder dessen Bildung verhindern) können in dem thermoreversiblen Hydrogel der vorliegenden Erfindung bereitgestellt werden, die beispielsweise bei der Verhinderung von Adhäsionen verwendbar sind. Beispiele umfassen Superoxiddismutase oder andere Proteinarzneimittel umfassen Katalasen, Peroxidasen und allgemeine Oxidasen oder oxidative Enzyme, wie Cytochrom P450, Glutathionperoxidase und andere native oder denaturierte Hämoproteine.

Als therapeutische Mittel können auch Säugerstressreaktionsproteine oder Hitzeschockproteine, wie Hitzeschockprotein 70 (hsp 70) und hsp 90 oder die Stimuli, die die Expression von Stressreaktionsproteinen oder Hitzeschockprotein hemmen oder verringern, beispielsweise Flavonoide, in dem Hydrogel bereitgestellt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das vorgenannte Applikationssystem aus dem thermoreversiblen Hydrogel der vorliegenden Erfindung des Weiteren eine sauerstofffreisetzende Substanz. Die sauerstofffreisetzende Substanz liegt dabei bevorzugt in Kombination mit Enzymen vor. Beispiele für das Enzym umfassen Superoxiddismutase, Katalasen, Peroxidasen und allgemeine Oxidasen oder oxidative Enzyme wie Cytochrom P450, Glutathionperoxidase und andere native oder denaturierte Hämoproteine.

Ein Applikationssystem der vorliegenden Erfindung mit sauerstofffreisetzenden Stoffen wird in Beispiel 8 unten erläutert.

Ziel des Zusatzes von sauerstofffreisetzenden Stoffen zum Gel ist es, das Absterben der Zellen aus Sauerstoffmangel in grösseren Konstrukten zu verhindern, bis sich neue Blutgefäße gebildet haben, welche die Zellen versorgen können. Die Versorgung über Diffusion funktioniert maximal über wenige Millimeter. Wenn ausschließ-

5 lich Peroxide und Zellen ins thermoreversible Hydrogel der Erfindung gegeben werden, sterben die Zellen durch die Wirkung von gebildetem Wasserstoffperoxid. Wird jedoch ein peroxidabbauendes Enzym wie z. B. Katalase zugegeben, kann der Zelltod verhindert werden.

Die vorliegende Erfindung stellt darüberhinaus das oben genannte thermoreversible

10 Hydrogel zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines medizinischen Zustands bereit, wobei das Medikament zur Applikation einer wässrigen Lösung des thermoreversiblen Hydrogels auf Gewebe *in vivo* dient.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die vorgenannte wässrige Lösung eine Lösung oder Suspension eines biologisch aktiven Materials.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform ist der vorgenannte medizinische Zustand eine Verbrennung oder Abtragung der Haut.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist der vorgenannte medizinische Zustand ein durch einen chirurgischen Eingriff gestörtes Gewebe. In einer bevorzug-

20 ten Ausführungsform ist der vorgenannte chirurgische Eingriff eine Vertebro- oder Kyphoplastie.

Die Applikation des thermoreversiblen Hydrogels der vorliegenden Erfindung kann auch mit bekannten Techniken wie Laparoskopie und Endoskopie erfolgen. Es können auch bekannte Kathetersysteme, wie sie z. B. in den US-Patenten 5,328,471 oder 5,213,580 beschrieben sind, angewendet werden.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform wird die vorgenannte medizinische Verwendung dadurch charakterisiert, dass der chirurgische Eingriff durch die Kanüle eines Trokars durchgeführt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird bei der vorgenannten medizinischen Verwendung das thermoreversible Hydrogel in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger auf Gewebe appliziert. Beispielhafte Träger sind Kochsalzlösung oder phosphatgepufferte Kochsalzlösung.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform wird bei der vorgenannten medizinischen Verwendung das thermoreversible Hydrogel in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger zur parenteralen Verabreichung bereitgestellt.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform befindet sich bei der vorgenannten medizinischen Verwendung das thermoreversible Hydrogel auf einer Oberfläche eines biologischen Gewebes, oder auf einer Oberfläche einer medizinischen Vorrichtung. Darüberhinaus kann sich das thermoreversible Hydrogel zwischen gegenüberliegenden Oberflächen befinden, wodurch eine Tendenz zum Haften der Oberflächen aneinander erzeugt wird.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform ist bei der vorgenannten medizinischen Verwendung das biologische Gewebe ein Organ. In der vorgenannten Ausführungsform wird bei der vorgenannten medizinischen Verwendung das Organ bevorzugt ausgewählt aus Haut, einem viszeralem Organ, Gewebe des muskuloskelettalen Apparates, bevorzugt Knochen, Knorpel, Bindegewebe, bevorzugt Sehnen, und Fettgewebe.

20 Schliesslich stellt die vorliegende Erfindung ein *In-vitro*-Verfahren zur Bildung einer Zusammensetzung auf einer Oberfläche bereit, das die Applikation einer wässrigen Lösung des oben genannten thermoreversiblen Hydrogels, von Gemischen derselben, oder des oben genannten medizinischen Applikationssystems auf die Oberfläche umfasst.

25 Bevorzugt umfasst das *In-vitro*-Verfahren die Applikation einer wässrigen Lösung des oben genannten, lebende Zellen enthaltenden thermoreversiblen Hydrogels.

Weiter bevorzugt wird das *In-vitro*-Verfahren unter Verwendung der vorgenannten Applikationssysteme, insbesondere einem Applikationssystem, das lebende Zellen und eine sauerstofffreisetzende Substanz und ein Enzym umfasst, durchgeführt. Be-

vorzugt wird als sauerstofffreisetzende Substanz dabei Calciumperoxid verwendet. Als Enzym wird z. B. Katalase bevorzugt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des vorgenannten In-vitro-Verfahrens ist das thermoreversible Hydrogel der Erfindung hergestellt aus Poloxamer 403 (Pluronic® P 123).

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Herstellung und Eigenschaften der kettenverlängerten Poloxamere bzw. der daraus erhaltenen thermoreversiblen Hydrogele gemäss der vorliegenden Erfindung.

Beispiele

10 Beispiel 1: Herstellung von mit Hexamethyldiisocyanat kettenverlängertem Poloxamer

In einen Glaskolben mit Rückflusskühler werden 17,4 g Poloxamer 403 (Pluronic® P 123; 3 mmol) auf 80 g mit trockenem Toluol aufgefüllt. Man rührt mit Magnetrührfisch bei ca. 45°C, bis eine klare Lösung vorliegt. 20 mL Toluol werden abdestilliert, um
15 Wasserspuren zu entfernen. Anschliessend gibt man jeweils mit einer Spritze 0,49 g Hexamethyldiisocyanat (HDI, 2,92 mmol) und eine Lösung von 120 µL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in 2 mL Toluol zu. Die Temperatur wird auf 55°C erhöht. Nach 2 Std. entfernt man das Toluol am Rotationsverdampfer. Anschliessend trocknet man bei 45°C (Wasserbad) am Feinvakuum bis zur Gewichts-
20 Konstanz.

Beispiel 2: Herstellung von mit Butandiisocyanat kettenverlängertem Poloxamer

In einen Glaskolben mit Rückflusskühler werden 17,4 g Poloxamer 403 (3 mmol) auf 80 g mit trockenem Toluol aufgefüllt. Man rührt mit Magnetrührfisch bei ca. 45°C, bis
25 eine klare Lösung vorliegt. 20 mL Toluol werden abdestilliert, um Wasserspuren zu entfernen. Anschliessend gibt man jeweils mit einer Spritze 0,373 g Butandiisocyanat (BDI, 2,92 mmol) und eine Lösung von 120 µL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in 2 mL Toluol zu. Die Temperatur wird auf 55°C erhöht. Nach 2 Std. entfernt

man das Toluol am Rotationsverdampfer. Anschliessend trocknet man bei 45°C (Wasserbad) am Feinvakuum bis zur Gewichtskonstanz.

Beispiel 3: Herstellung von mit Methyldiphenyldiisocyanat kettenverlängertem Poloxamer

- 5 In einen Glaskolben mit Rückflusskühler werden 17,4 g Poloxamer 403 (3 mmol) eingewogen. Es werden 63 g trockenes Toluol zugegeben. Man rührt bei 45°C rotieren, bis eine klare Lösung vorliegt. 20 mL Toluol werden abdestilliert, um Wasserspuren zu entfernen. Anschliessend gibt man mit jeweils einer Spritze 0,738 g Diphenylmethandiisocyanat (MDI, 2,92 mmol) und eine Lösung von 120 µL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in 2 mL Toluol zu. Die Temperatur wird wieder auf 45°C erhöht. Nach 2 Std. entfernt man das Toluol am Rotationsverdampfer. Anschliessend trocknet man bei 45°C (Wasserbad) am Feinvakuum bis zur Gewichtskonstanz.

Beispiel 4: Herstellung von mit Hexamethyldiisocyanat kettenverlängertem Poloxamer aus drei verschiedenen Poloxameren

- In einen Glaskolben mit Rückflusskühler werden 11,6 g Poloxamer 403 (Pluronic® P-123, 2 mmol), 12,5 g Poloxamer 407 (Pluronic® F-127; 1 mmol) und 14,6 g Poloxamer 338 (Pluronic® F-108, 1 mmol) eingewogen und auf 90 g mit trockenem Toluol aufgefüllt. Man rührt mit Magnetrührfisch bei ca. 45°C, bis eine klare Lösung vorliegt.
- 20 20 mL Toluol werden abdestilliert, um Wasserspuren zu entfernen. Anschliessend gibt man jeweils mit einer Spritze 0,665 g Hexamethyldiisocyanat (HMDI, 3,95 mmol) und eine Lösung von 120 mL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in 5 mL Toluol zu. Die Temperatur wird auf 55°C erhöht. Nach 2 Std. entfernt man das Toluol am Rotationsverdampfer. Anschliessend trocknet man bei 45°C (Wasserbad)
- 25 am Feinvakuum bis zur Gewichtskonstanz. Es wird ein relativ festes Polymer erhalten, das sich bei Temperaturen unter 10°C gut in Wasser löst.

Bereits eine 10%ige Lösung des so erhaltenen Polymers erstarrt beim Erwärmen auf 35°C und ergibt ein transparentes Gel.

Das in Beispiel 4 erhaltene kettenverlängerte Poloxamer aus drei verschiedenen Poloxameren besitzt gegenüber einem kettenverlängerten Poloxamer, das ausschliesslich aus Poloxamer 403 (Pluronic® P 123) hergestellt ist, den Vorteil, dass es transparent ist und bei geringen Konzentrationen erstarrt. Gegenüber einem kettenverlängerten Poloxamer, das ausschliesslich aus Poloxamer 407 (Pluronic® F 127) hergestellt ist, ist hervorzuheben, dass sich das neue Material auch nach mehreren Tagen bei 37°C nicht in überstehendem Kulturmedium löst.

Beispiel 5: Eigenschaften der thermoreversiblen Hydrogele aus kettenverlängerten Poloxameren

Die Materialien zeigen im Temperaturbereich zwischen 15° und 35°C zwei charakteristische Veränderungen. Beim Erwärmen von 4°C an erfolgt zwischen 15° und 20°C zunächst eine Trübung der bis dahin transparenten Flüssigkeiten (Sol). In Fig. 1a ist hier das Verhalten eines thermoreversiblen Hydrogels aus 10% eines mit Hexamethyldiisocyanat kettenverlängerten Poloxamers 403 wiedergegeben.

Dann steigt zwischen 22° und 35°C die Viskosität um mehrere Grössenordnungen an. Als Beispiele zeigt Fig. 1b jeweils 10%ige Lösungen von mit Hexamethyldiisocyanat kettenverlängerten Poloxamer 403 (gekennzeichnet als PMT001), mit Butandiisocyanat kettenverlängerten Poloxamer 403 (PMT002) und mit Methylenbiscyclohexyldiisocyanat kettenverlängerten Poloxamer 403 (PMT003). Letzteres hat weniger Wiederholungseinheiten.

Fig. 1c zeigt für dieselben thermoreversiblen Hydrogele PMT001 bis PMT003, dass der Eindringwiderstand einen ähnlichen Verlauf mit einem klaren Maximum zwischen 30° und 35°C besitzt.

Fig. 1d zeigt, dass mit steigender Konzentration erwartungsgemäss die Festigkeit der Gele (25%) zunimmt.

Fig. 1e zeigt, dass sich die Gele zur gleichmässigen Proteinfreisetzung über mehrere Wochen eignen. Bei der gezeigten Messung wurde mit Hexamethyldiisocyanat kettenverlängertes Poloxamer 403 bei Konzentrationen von 20% bzw. 25% verwendet.

Beispiel 6: Effekt der Gelkonzentration

Die gewünschte Menge des kettenverlängerten Poloxamers (Polymers) wird unter sterilen Bedingungen eingewogen und mit der entsprechenden Menge an Zellkulturmedium versetzt. Beides wird in einer Spritze bei 4°C über einige Tage gelagert und immer wieder gerührt. Dabei bildet sich eine homogene Lösung, die bei ca. 25 bis 30°C geliert. Bei ca. 15°C werden 100.000 immortalisierte Stammzellen pro Milliliter zugefügt. Die Zellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, die Zellen werden in ein Falcontube zu einem Pellet zentrifugiert und dann in die Mischung gegeben. Unterschiedliche Polymerkonzentrationen (2,5%, 5% und 10%) werden zunächst stündlich, dann täglich und schliesslich noch nach einer Woche mittels "Live/dead-Assay" untersucht. Es werden sowohl an der Unterseite als auch im Inneren der Probe mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dabei ist das Zellüberleben bei 10% Polymerkonzentration etwas geringer als bei den niedrigeren Konzentrationen. Andererseits ist die Festigkeit des Gels deutlich höher.

Die Ergebnisse sind in Fig. 2 und 3 dargestellt.

Beispiel 7: Effekt des biologischen Materials am Beispiel von Kollagen

Um die hohe biologische Aktivität des thermoreversiblen Gels mit biologischem Material zu demonstrieren wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, bei denen 100.000 immortalisierte Stammzellen pro Milliliter mit verschiedenen Konzentrationen (0%, 10% und 20%) von löslichem Kollagen in einem 10%igen Hydrogel der Erfindung kultiviert wurden. Die Kultur erfolgt bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid und 95% Luft. Die Vitalität wurde über 7 Tage mittels "Live/Dead-Assay" ermittelt. Zudem wurde die Zellmorphologie mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 und Fig. 5 dargestellt.

1. Eine 10%ige Lösung des Polymers aus mit 1,4-Butandiisocyanat kettenverlängertem Poloxamer 403 (vgl. Beispiel 2) in Zellkulturmedium wird wie oben beschrieben hergestellt. 100.000 eGFP-SCP1-Zellen werden in 1 mL dieser Lösung suspendiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt, die Zellen werden in ein Falcontube zu einem Pellet zentrifugiert und dann in das Gel überführt. Nach 1, 2, 3 und 7 Tagen werden die Proben un-

tersucht. Das Zellenüberleben (vgl. Fig. 4 links) ist mit 45% nach 7 Tagen akzeptabel, doch zeigen die Zellen eine runde Morphologie, was nicht auf eine verstärkte Adhärenz der Zellen schliessen lässt, da auf letzteres nur bei ausgebreiteter Zellmorphologie der Fall geschlossen werden kann.

- 5 2. Es wird wie oben verfahren, allerdings werden 10% lösliches Kollagen aus Rattenschwänzen ("Coll Type I-rat tail", Merck) zur Lösung hinzugefügt (vgl. Fig. 4 Mitte). Hier ist das Zellüberleben mit ca. 70% nach 7 Tagen beträchtlich. Schon nach 3 Tagen zeigt sich die typische gestreckte Morphologie der Zellen.
- 10 3. Es wird verfahren wie unter 2., nur dass diesmal 20% Kollagen in die Mischung eingebracht werden (vgl. Fig. 4 rechts). Das Zellüberleben ist mit 80% hervorragend. Die Zellen zeigen eine noch ausgeprägter längliche Morphologie.

Fig. 4 zeigt die zugehörigen Mikroskopaufnahmen, die das Zellüberleben von eGFP-SCP1s nach 7 Tagen im thermoreversiblen Hydrogel der vorliegenden Erfindung mit bzw. ohne Kollagen I, veranschaulichen. Es werden signifikante Unterschiede zwischen thermoreversiblen Hydrogel der Erfindung ohne bzw. mit Kollagen I sichtbar. Beispielhafte Mikroskopbilder am Boden (Vergrößerung 10x) nach Anfärben mit Propidiumiodid; der Maßstab (Maßstrich) beträgt 200 µm.

20 Fig. 5 zeigt eGFP-SCP1s-Zellen nach 7 Tagen im thermoreversiblen Hydrogel (in der Abbildung als "BDI-hydrogel" bezeichnet) mit bzw. ohne 20 % Kollagen I, visualisiert mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Die Aufnahmen wurden mit einer Vergrößerung von 10x (linke Seite) bzw. 63x (rechte Seite) vorgenommen.

Beispiel 8: Effekt von Sauerstoff auf das Zellüberleben im Applikationssystem

- 25 a) Applikationssystem mit unterschiedlichen Konzentrationen an sauerstofffreisetzender Substanz (CaO₂) ohne Enzym

hTERT-immortalisierte humane mesenchymale Stammzellen wurden in Spritzen mit thermoreversiblen Hydrogel, das aus Poloxamer 403 und Butandiisocyanat erhalten wurde (d.h. "BDI-Hydrogel") bei Konzentrationen von 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml

sowie 0,1 mg/ml Calciumperoxid (CaO_2) kultiviert, und die Sauerstoffsättigung wurde in stündlichem Abstand bestimmt. Im Anschluss wurden mittels Vitalitätsassays die Zellüberlebensraten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6a gezeigt.

- 5 b) Applikationssystem mit sauerstofffreisetzender Substanz (CaO_2) und unterschiedlichen Konzentrationen an Enzym

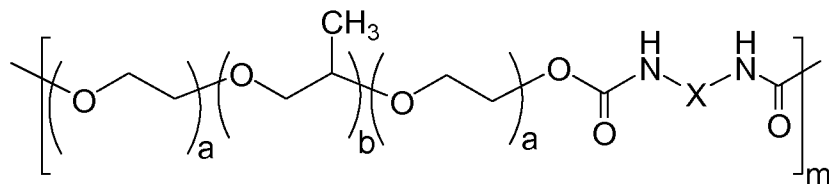
Beispiel 8a) wurde wiederholt, jedoch wurden als Enzym 100 U/ml bzw. 200 U/ml, bzw. keine Katalase (Kontrolle) hinzugefügt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6b gezeigt, woraus ersichtlich wird, dass sich Katalase-Konzentration von 100 U/ml bzw. 200 U/ml sich vorteilhaft auf das Zellüberleben auswirken.

- 10 c) Applikationssystem unterschiedlichen Konzentrationen an sauerstofffreisetzender Substanz bei konstanter Enzymkonzentration

- 15 Analog Beispiel 8b) wurde die Sauerstoffsättigung (A) und Zellüberleben (B) nach 72 h Kultur in Spritzen in BDI-Hydrogel mit 0.5 mg/ml CaO_2 und 100 U/ml Katalase bzw. BDI-Hydrogel mit 0,25 mg/ml CaO_2 und 100 U/ml Katalase gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 6c gezeigt, woraus ersichtlich wird, dass bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml CaO_2 und einer Katalase-Konzentration von 100 U/ml selbst nach 72 Stunden das Zellüberleben mit einem Wert von ca. 70% gegenüber der mit "BDI-Hydrogel" bezeichneten Kontrolle verbessert ist.

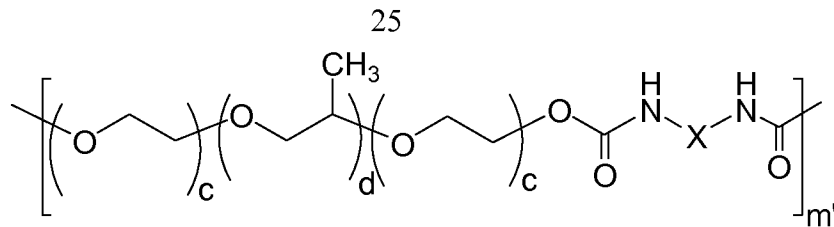
Patentansprüche

1. Kettenverlängertes Poloxamer P*, hergestellt durch Umsetzung von mindestens einem Poloxamer P, wobei jedes Poloxamer zwei Poly(oxyethylen)blöcke PEG und einen Poly(oxypropylen)block PPG umfaßt und das Molekulargewicht des Poly(oxypropylen)blocks von P größer ist als 2350 Da, mit einem Diisocyanat, mit der Maßgabe, daß bei einem Molekulargewicht Mw des Poloxamers P von 11.000 oder mehr und einem Anteil an Polyethylenoxid in P von mehr als 60% mindestens zwei verschiedene Poloxamere umgesetzt werden.
2. Kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß Anspruch 1, wobei zwei verschiedene Poloxamere umgesetzt werden.
3. Kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß Anspruch 1, wobei drei verschiedene Poloxamere umgesetzt werden.
4. Kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß Anspruch 1, wobei das kettenverlängerte Poloxamer Struktureinheiten der folgenden Formel besitzt:

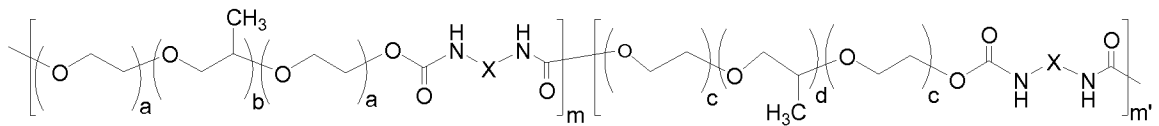


worin a und b jeweils ganze Zahlen zwischen 1 und 110 sind und $m \geq 3$ ist; a bezeichnet die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(oxyethylen)blocks PEG, und b bezeichnet die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(oxypropylen)blocks PPG; wobei das Diisocyanat die Formel $\text{O}=\text{C}=\text{N}-\text{X}-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ besitzt, und wobei X der aliphatische oder aromatische Rest des Diisocyanats ist;

und bei Verwendung von zwei verschiedenen Poloxameren P und P' das kettenverlängerte Poloxamer zusätzlich Struktureinheiten der Formel



und/oder der Formel



- 5 besitzt, wobei a, b, m sowie X wie oben definiert sind, und c die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(ethylenoxid)blocks PEG, und d die Anzahl Wiederholungseinheiten des Poly(propylenoxid)blocks PPG jeweils im zweiten Poloxamer P' bezeichnet, wobei c und d jeweils ganze Zahlen zwischen 1 und 110 sind, und $m' \geq 3$ ist.
- 10 5. Kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Diisocyanat ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus aliphatischen Diisocyanaten und aromatischen Diisocyanaten.
- 15 6. Kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß Anspruch 5, wobei das Diisocyanat ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus linearen Diisocyanaten $O=C=N-(CH_2)_n-N=C=O$, wobei $n = 4$ bis 12 ist, Butandiiisocyanat, Hexamethyldiisocyanat, Isophorondiisocyanat, Methylenbiscyclohexyldiisocyanat (H_{12} -MDI), Lysindiisocyanat (LDI), und Diphenylmethandiisocyanat (MDI).
- 20 7. Kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß Anspruch 1 bis 6, wobei das bzw. die Poloxamere aus den Poloxameren 272, 333, 334, 335, 402, 403 und 407 ausgewählt ist bzw. sind.
- 25 8. Kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, gebildet durch Umsetzung des Poloxamers mit 0,8 bis 1,2 Äquivalenten Diisocyanat bei einer Temperatur von 40°C bis 60°C in Anwesenheit eines geeigneten Katalysators für die Bildung von Polyurethanen.

9. Thermoreversibles Hydrogel, umfassend
- (a) ein kettenverlängertes Poloxamer P* gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 sowie
 - (b) ein biologisches Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem antibiotischen, antimikrobiellen oder antimykotischen Wirkstoff, Proteinen, Glukosaminoglykanen, Lysozym und einer natürlichen oder synthetischen Polyaminosäure.
10. Thermoreversibles Hydrogel, hergestellt durch
- (a) Bildung eines kettenverlängerten Poloxamers P* gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, und
 - (b) Mischen des kettenverlängerten Poloxamers mit einem biologischen Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem antibiotischen, antimikrobiellen oder antimykotischen Wirkstoff, Proteinen, Glukosaminoglykanen, Lysozym und einer natürlichen oder synthetischen Polyaminosäure.
11. Thermoreversibles Hydrogel gemäß einem der Ansprüche 9 oder 10, wobei P aus den Poloxameren gemäß Anspruch 7 ausgewählt ist.
12. Thermoreversibles Hydrogel gemäß Anspruch 10 oder 11, des weiteren umfassend lebende Zellen.
13. Thermoreversibles Hydrogel gemäß Anspruch 12, wobei die lebenden Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus mononukleären Zellen, mesenchymalen Stammzellen, deren Vorläuferzellen und daraus differenzierten Zellen, Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten, Epithelzellen, Myoblasten, Tendozyten, mononukleären hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und daraus differenzierten Zellen, Immunzellen, multinukleären Zellen; Riesenzellen, Makrophagen, und Osteoklasten.
14. Thermoreversibles Hydrogel gemäß Anspruch 12, wobei die Zellen genetisch modifiziert sind oder im Gel modifiziert werden.
15. Thermoreversibles Hydrogel gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14, wobei das biologische Material eine synthetische Polyaminosäure oder ein antibiotischer,

antimikrobieller oder antimykotischer Wirkstoff, und/oder ein das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung hemmendes oder stimulierendes Protein ist; und/oder wobei

das biologische Material ein Protein ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Fibrin, Gelatine, Kollagenen, und knochenmorphogenen Proteinen (BMP); und/oder wobei

das Protein ein Wachstumsfaktor ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor (IGF), Transforming growth factor (TGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GMCSF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Interleukin-1B (IL-1B), Interleukin-8 (IL-8), Nervenwachstumsfaktor (NGF), und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin und koloniestimulierenden Faktoren wie G-CSF; und/oder wobei

das Protein ein Hormon oder Enzym ist, bevorzugt Follistatin oder Myostatin; und/oder

wobei das biologische Material Erythropoietin, G-CSF, Follistatin oder Myostatin ist; und/oder

wobei das Protein ein Antikörper oder ein Immunoglobulin ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, IgY, und IgW; oder

wobei das Glukosaminoglykan Hyaluronan ist.

16. Thermoreversibles Hydrogel gemäß Anspruch 14, wobei das biologische Material ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus

β -Lactam-Antibiotika, Tetracyclinen, Aminoglykosiden, Makroliden, Virustatika, Allylaminen, antimykotisch wirksamen Antibiotika, Imidazolen und -derivaten, Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), TGF- β -(transforming growth factor beta)-Superfamilie, bevorzugt BMP (bone morphogenetic protein)- und GDF (growth differentiation factor)-Familien, stärker bevorzugt BMP2, BMP7 und GDF-5, löslichem Kollagen, fein gemahlenem Kollagen, Gelatine, menschlichem Blut, tierischem Blut, Komponenten menschlichen oder tierischen Blutes, und Kollagen Typ I, II oder III.

17. Thermoreversibles Hydrogel gemäß einem der Ansprüche 9 bis 16, wobei das kettenverlängerte Poloxamer hergestellt wird unter Verwendung eines linearen aliphatischen oder eines cyclischen, aliphatischen Diisocyanats.
- 5 18. Thermoreversibles Hydrogel gemäß einem der Ansprüche 9 bis 16, wobei das Hydrogel zusätzlich einen Tracer enthält.
19. Thermoreversibles Hydrogel gemäß einem der Ansprüche 9 bis 17, wobei der Tracer ausgewählt ist aus radioaktiven Substanzen, die mittels PET oder SPECT sichtbar gemacht werden können.
- 10 20. Thermoreversibles Hydrogel gemäß einem der Ansprüche 9 bis 18 zur medizinischen Verwendung.
21. Thermoreversibles Hydrogel zur medizinischen Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei die medizinische Verwendung Arzneimittelabgabe oder eine biomedizinische Anwendung ist.
- 15 22. Applikationssystem, umfassend das thermoreversible Hydrogel gemäß einem der Ansprüche 9 bis 20.
23. Applikationssystem gemäß Anspruch 22, des Weiteren umfassend ein therapeutisches Mittel, das Zell-/Gewebewachstum stimuliert oder hemmt oder Zellen abtötet.
- 20 24. Applikationssystem gemäß Anspruch 22 oder 23, das des Weiteren eine sauerstofffreisetzende Substanz oder eine sauerstofffreisetzende Substanz in Kombination mit Enzymen umfaßt.
- 25 25. Verwendung des thermoreversiblen Hydrogels gemäß einem der Ansprüche 9 bis 20 bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung eines medizinischen Zustands, wobei das Medikament zur Applikation einer wässrigen Lösung des thermoreversiblen Hydrogels auf Gewebe *in vivo* dient.

26. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei die wässrige Lösung eine Lösung oder Suspension eines biologisch aktiven Materials umfasst.
27. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei der medizinische Zustand eine Verbrennung oder Abtragung der Haut ist.
- 5 28. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei der medizinische Zustand ein durch einen chirurgischen Eingriff gestörtes Gewebe ist.
29. Verwendung gemäß Anspruch 28, wobei der chirurgische Eingriff eine Vertebro- oder Kyphoplastie ist.
- 10 30. Verwendung gemäß Anspruch 28 oder 29, wobei der chirurgische Eingriff durch die Kanüle eines Trokars durchgeführt wird.
31. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei das thermoreversible Hydrogel in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger auf Gewebe appliziert wird.
32. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei das thermoreversible Hydrogel in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger zur parenteralen Verabreichung bereitgestellt wird.
- 15 33. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei sich das thermoreversible Hydrogel auf einer Oberfläche eines biologischen Gewebes befindet; oder wobei sich das thermoreversible Hydrogel auf einer Oberfläche einer medizinischen Vorrichtung befindet; oder
- 20 wobei sich das thermoreversible Hydrogel zwischen gegenüberliegenden Oberflächen befindet, wodurch die Tendenz des Haftens der Oberflächen besteht.
34. Verwendung gemäß Anspruch 33, wobei das biologische Gewebe ein Organ ist, und/oder
- 25 wobei das Organ ausgewählt ist aus Haut, einem viszeralem Organ, einem Gewebe des muskuloskelettalen Apparates, bevorzugt Knochen, Knorpel, Bindegewebe, bevorzugt Sehnen, und Fettgewebe.

35. In-vitro-Verfahren zur Bildung einer Zusammensetzung auf einer Oberfläche, das die Applikation einer wässrigen Lösung eines thermoreversiblen Hydrogels gemäß Anspruch 9 bis 21, von Gemischen davon, oder des medizinischen Applikationssystems gemäß Anspruch 22, 23 oder 24 auf die Oberfläche umfasst.
- 5 36. In-vitro-Verfahren gemäß Anspruch 35, wobei das Verfahren die Applikation einer wässrigen Lösung eines lebende Zellen enthaltenden thermoreversiblen Hydrogels gemäß Anspruch 13 umfaßt; und/oder
wobei das Applikationssystem gemäß Anspruch 24 verwendet wird und das Enzym Katalase ist, und/oder
- 10 wobei das thermoreversible Hydrogel hergestellt ist aus mit Butandiisocyanat kettenverlängertem Poloxamer 403, und/oder die sauerstofffreisetzende Substanz CaO_2 ist.