

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. Januar 2009 (22.01.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2009/010194 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

*C08G 61/08* (2006.01)      *C12N 5/00* (2006.01)  
*C08G 61/12* (2006.01)      *A61L 27/56* (2006.01)  
*C08J 9/14* (2006.01)      *A61L 27/58* (2006.01)  
*C08J 9/28* (2006.01)

(81) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*):

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/005419

(22) Internationales Anmeldedatum:  
3. Juli 2008 (03.07.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2007 033 078.4      13. Juli 2007 (13.07.2007)      DE

(84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): INSTITUT FÜR OBERFLÄCHENMODIFIZIERUNG E.V. [DE/DE]; Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig (DE).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BUCHMEISER, Michael, R. [DE/DE]; Stünz-Mölkauer-Weg 10, 04318 Leipzig (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(74) Anwalt: MÜLLER, Volkmar; Manfred Köhler und Kollegen, Kohlgartenstrasse 33-35, 04315 Leipzig (DE).



WO 2009/010194 A1

(54) Title: POLYMER SCAFFOLD MATERIAL FOR CULTIVATING CELLS

(54) Bezeichnung: POLYMERES TRÄGERMATERIAL FÜR DIE KULTIVIERUNG VON ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a polymer scaffold material for cultivating cells, which is especially used in regenerative medicine or in tissue engineering.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein polymeres Trägermaterial für die Kultivierung von Zellen, welches insbesondere in der Regenerativmedizin bzw. im Tissue Engineering Anwendung findet.

## BESCHREIBUNG

Polymeres Trägermaterial für die Kultivierung von Zellen

Die Erfindung betrifft ein polymeres Trägermaterial für die Kultivierung von Zellen,  
5 welches insbesondere in der Regenerativmedizin bzw. im Tissue Engineering  
Anwendung findet.

Tissue Engineering beschäftigt sich mit der Entwicklung von künstlichem Gewebe oder  
von Organen, welche die Funktionen von beschädigtem oder krankem Gewebe oder  
10 Organen aufrechterhalten oder wiederherstellen. Ziel ist dabei die Herstellung neuer  
funktioneller Gewebe durch gesunde, lebende Zellen. Diese Zellen können  
verschiedenen Ursprungs sein. Primäre Zellen (autogen, allogene oder xenogene) werden  
aus frischem Gewebe präpariert und unmodifiziert weiter verarbeitet. Autogene Zellen  
stammen vom selben Organismus, allogene Zellen von einem anderen Individuum  
15 derselben Art, während xenogene Zellen aus einer anderen Spezies gewonnen werden.  
Als Quelle dient sowohl adultes, fetales als auch neonatales Gewebe.

Neben den primären Zellen können auch Zelllinien und gentechnisch veränderte Zellen  
verwendet werden. Diese müssen in der Regel vor der Ansiedelung auf den  
20 entsprechenden Matrizes gezielt in ihren Eigenschaften verändert werden. Die Zellen  
werden dann in einer Matrix, natürlichen oder synthetischen Ursprungs, oder einer  
Mischung beider, kultiviert.

Als Matrixmaterial bzw. Trägermaterial werden gegenwärtig implantierbare, natürliche  
25 oder synthetische Polymere, beispielsweise (Bulk-) Polymere oder Biomaterialien  
verwendet.

Bei implantierbaren Materialien unterscheidet man zusätzlich geschlossene Systeme,  
z.B. implantierbare Mikrokapseln, und offene Systeme, z. B. gewebe und nicht  
30 gewebe poröse Matrizes verschiedener Formen.

Unter dem Begriff porös bzw. Porosität werden dabei in diesem Zusammenhang und im Sinne der Erfindung miteinander verbundene und nicht verbundene Intra- und/oder Interpartikel Hohlräume bzw. Inter- und/oder Intrafaser Hohlräume bzw. generell Hohlräume in den für die o. a. Anwendungen verwendeten (Bulk-) Polymeren  
5 verstanden. Solche Hohlräume sind für Anwendungen im Bereich des Tissue Engineering von großer Bedeutung und müssen in der Regel groß genug (d. h. in der Regel  $>100 \mu\text{m}$ ) sein, um das Einwachsen von Blutgefäßen zu erlauben.

Heutzutage finden Zellträger Systeme, basierend auf entsprechenden Trägermaterialien,  
10 Anwendung in der Herstellung von künstlichem Hautersatz bis hin zum Ersatz von Teilorganen. Zum Ersatz ganzer Organe mittels Tissue Engineering muss jedoch die künstliche Imitation weitgehend an das natürliche Gewebe angepasst sein. Dies erfordert die Durchführung von *in vitro*-Untersuchungen. Weiterhin sind Knochenrekonstruktionen und die Wiederherstellung von Weichgeweben zu nennen.  
15 Somit ist es notwendig, für all diese spezifischen Anwendungen spezielle Trägersysteme, auch *Scaffolds* genannt, zu Verfügung zu stellen. Die künstliche Matrix muss dabei dem natürlichen Gewebe in Struktur und Eigenschaften so ähnlich wie möglich sein. Gelingt dies, vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit, dass die in diesem Trägersystem befindlichen Zellen vom natürlichen Gewebe integriert und nicht  
20 abgestoßen werden.

Diese „Akzeptanz“ des künstlichen Gewebes durch das natürliche wird auch mit dem Begriff „biokompatibel“ umschrieben.

Eine große Bedeutung bei diesem Integrationsprozess spielen dabei naturgemäß das Trägermaterial selbst bzw. dessen Struktur.

25 Ein beträchtlicher Teil der derzeit existierenden Materialien für die o. a. Anwendungen beruht u. a. auf Poly(milchsäure) = Poly(lactid). Ungeachtet der exzellenten Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit dieses Materials neigt es zum so genannten „*bulk* Abbau“, einem nach einiger Zeit nach Implantation in den Körper auftretenden schlagartigen Abbau großer Teile des Materials, was zu massiven Reizungen und  
30 Entzündungen im betroffenen Gewebsbereich bei *in vivo* Anwendungen führen kann.

Aus dem Stand der Technik sind mehrere Materialien für die Herstellung von Trägermaterialien (Scaffolds) bzw. deren Herstellung bekannt, z. B.:

- Lösungsmittel-Gießen mit PartikelAuswaschung:

Diese Methode ist am besten bekannt für die Herstellung von *Scaffolds* für die Knochenregeneration. Dabei werden wasserlösliche Partikel, wie Zucker oder Natriumchlorid der Polymerlösung zugegeben. Die Dispersionslösung wird in eine Form gegossen um eine 3-dimensionale Struktur zu produzieren. Die Porosität resultiert grundlegend aus der selektiven Auslösung der Partikel aus dem Polymer/Salz-Komposit. Dabei sind die Porosität und die Porengröße über die Menge und die Größe der Salzpartikel kontrollierbar. Als Polymere werden u. a. Stärke-basierte oder andere natürliche Polymere eingesetzt.

- Schmelz-basierte Techniken (Spritzguss oder Extrusion mit Blähmitteln):

Diese Methode wird bisher meist nicht allein genutzt, sondern normalerweise in Kombination mit porogenen System oder zum Vorformen des finalen Materials verwendet. Dabei werden Polymere mit Blähmittel gemischt. Die Blähmittel werden in Abhängigkeit der Abbautemperatur und der Nicht-Toxizität auserwählt. Die poröse Struktur entsteht, da die Blähmittel sich bei der Extrusion oder Spritzguss abbauen und dabei Gase freisetzen. Bei dieser Methode lässt sich die Porengröße sehr schlecht kontrollieren. Der Vorteil ist jedoch, dass das Spritzgussverfahren sehr reproduzierbar ist und die Entwicklung einer sehr komplexen 3D-Struktur ermöglicht. Bei dieser Methode werden Stärke-basierte Polymere (oder andere natürliche Polymere) oder bioabbaubare Polymer, wie Polylactid, Polyglykolsäure oder Polycaprolacton verwendet, die mittels Schmelztechnik verarbeitet werden können.

- Gefriertrocknung:

Bei dieser Methode wird die Phasenseparation ausgenutzt. Hier wird das Basisprinzip der thermisch induzierten Phasenseparation ausgenutzt, die auftritt, wenn die Temperatur einer homologen Polymerlösung, die in eine Form gebracht wurde, erniedrigt wird. Wenn das phasenseparierte System stabilisiert ist, kann die lösungsmittelreiche Phase durch verminderten Druck abgezogen werden. Resultierend

erhält man den Polymerschaum. Unter anderem kann man Chitosan Flocken oder andere natürliche oder bioabbaubare Polymere verwenden. Im Falle von Komposit als Trägermaterialien können auch Biofüllstoffe zugegeben werden.

- 5 Ein generelles Problem aller existierenden Trägermaterialien liegt weiterhin in den beträchtlichen Limitationen in der Herstellung 3-dimensionaler Strukturen. Diese können bis dato nur mit erheblichem Aufwand, z. B. mittels *ink jet* Printing, Spritzguss oder anderer Verfahren (s. u.) aus löslichen Polymeren hergestellt werden. Speziell die Generierung poröser Strukturen mit Poren im Bereich von einigen 10 bis 100  $\mu\text{m}$  stellt  
10 dabei ein beträchtliches technologisches Problem in der industriellen Produktion dar.

- Aufgabe der Erfindung ist es, ein Trägermaterial bereit zu stellen, welches es gewährleistet die Probleme des *bulk* Abbaus durch Verwendung geeigneter (vernetzter), bioabbaubarer Polymere zu umgehen. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, ein  
15 Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches die einfache und schnelle Generierung 3-dimensionaler, monolithischer, poröser Strukturen beliebiger Form für Anwendungen in der Regenerativmedizin bzw. im Tissue Engineering erlaubt.

- Die Aufgabe der Erfindung bezüglich eines solchen Trägermaterials wird dabei durch  
20 die Merkmale des Anspruches 1 gelöst.

Erfindungswesentlich ist, dass das erfindungsgemäße poröse Trägermaterial zumindest auf monolithischen, vernetzten, biokompatiblen und bioabbaubaren polymeren Materialien basiert.

- 25 Die Erfindung hat monolithische, vernetzte, poröse, biokompatible und bioabbaubare polymere Materialien, insbesondere hergestellt mittels Ring öffnender Metathesepolymerisation (ROMP) bzw. radikalischer Polymerisation als Trägermaterialien (*Scaffolds*) für die Regenerativmedizin bzw. das Tissue Engineering, zum Inhalt.

- 30 Die radikalische Polymerisation kann dabei mittels thermischer oder photochemischer Initiatoren oder aber auch Initiator frei, z. B. mittels Elektronenstrahl Härtung oder

mittels  $\gamma$ -Strahlung ausgelöst werden. Die Struktur der Matrix ist dabei porös.

Die Unteransprüche 2 bis 6 zeigen vorteilhafte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Trägermaterials auf, ohne diese abschließend zu beschreiben.

5

Vorzugsweise aber nicht ausschließlich wird eine bi- oder multimodale Porenverteilung angestrebt.

Vorzugsweise werden solche Monomere und Vernetzer verwendet, welche  
10 biokompatibel bzw. bioabbaubar sind.

Vorzugsweise aber nicht ausschließlich werden zyklische, ungesättigte Ester und Amide, substituierte Norbornene, Norbornadiene, Cyclooctene, Acrylate und Methacrylate verwendet.

15

Weiterhin wird die Aufgabe der Erfindung durch ein Verfahren zur Herstellung eines polymeren Trägermaterials für die Kultivierung von Zellen gemäß den Merkmalen der Ansprüche 7 sowie alternativ gemäß den Merkmalen der Ansprüche 10, 11 und 12 gelöst.

20

Die Unteransprüche 8 bis 9 sowie 13 bis 14 zeigen vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahren auf, ohne diese abschließend zu beschreiben.

„Monolithisch“ im Sinne der Erfindung bedeutet, dass im Zuge der Polymersynthese  
25 ein vernetztes, poröses polymeres Netzwerk, aus einem Stück bestehend, erzeugt wird.

„Biokompatibel“ im Sinne der Erfindung bedeutet, dass kein negativer Einfluss auf Zellen in Umgebung des Materials besteht, ihre Anwendung führt zu keiner klinisch relevanten Reaktion des Körpers.

30

„Bioabbaubar“ im Sinne der Erfindung bedeutet, dass ein Material im menschlichen Körper zu nicht-toxischen Produkten abgebaut und vom Körper ausgeschieden bzw. metabolisiert werden kann.

- 5 Im Folgenden sind besonders günstige Ausführungsformen der Erfindung exemplarisch aufgezeigt, ohne die Erfindung damit zu begrenzen.

## Experimentelles

### A.1 Allgemeines

- 10 Die für das Tissue Engineering verwendeten monolithischen Strukturen, welche als Trägermaterial (Scaffolds) dienten, wurden mit Hilfe der Ring öffnenden Metathesepolymerisation (ROMP) bzw. mittels radikalischer Polymerisation hergestellt.
- Für die ROMP wurden Norborn-2-en (NBE) als Monomer und ein Gemisch aus
- 15 Pentaglyceroltris(7-oxanorborn-5-en-2-ylcarboxylat) und Pentaglycerolbis(7-oxanorborn-5-en-2-ylcarboxylat)acrylat (3:1) als Vernetzer (V) verwendet. Alternativ können auch Cycloocten, substituierte Cyclooctene, 1,4,4a,5,8,8a-Hexahydro-1,4,5,8-*exo-endo*-dimethanonaphtalin oder Tris(cyclooct-4-enyl-1-oxy)methylsilan, siehe M. R. Buchmeiser, Polymer 2007, 48, 2187, verwendet werden. Das porogene System wurde
- 20 aus 2-Propanol (Makroporogen) und Toluol (Mikroporogen) gebildet, grundsätzlich sind jedoch auch andere Porogensysteme möglich. Als Initiator diente  $\text{RuCl}_2(\text{Pyridin})_2(\text{IMesH}_2)(\text{CHC}_6\text{H}_5)$  ( $\text{IMesH}_2=1,3$ -Dimesityl-4,5-tetrahydroimidazolin-2-yliden). Wo zweckmäßig, wurde Pyridin zur Regulierung der Polymerisation eingesetzt.

25

- $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren wurden mit einem Bruker Spectrospin 250 bei 250 bzw. 62 MHz und 25°C aufgenommen. GC-MS-Messungen wurden an einem GCMS QP5050 (Shimadzu), mit einer SPB-5 fused silica Säule (30m x 25 µm Filmdicke) bei einem
- 30 Säulenfluss von 1.0 mL/min, durchgeführt. Alle ATR-Infrarot-Messungen wurden an einem Vector 22 (Bruker), ausgestattet mit einer Golden Gate, durchgeführt. Für jede

Probe wurden 32 Scans gemessen. Zur Datenanalyse wurde die Bruker Opus 5.5 US Software verwendet. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden teils mit einem *JSM-6600* (Jeol, Japan) und teils mit dem *ULTRA 55* (Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Die Proben für das

5 Rasterelektronenmikroskop von Jeol wurden in Vorfeld mit einer Goldschicht bedampft. Die Proben, welche mit dem *ULTRA 55* abgebildet wurden, waren unbehandelt. Zur Erstellung der Fotos wurde eine Digitalkamera *CAMEDIA C-4000 ZOOM* von Olympus (Deutschland) benutzt. Für die Größenausschlusschromatographie wurden ein *L-4500 UV Detektor* (Merck) und eine *L-6200A HPLC Pumpe* (Merck) mit

10 manueller Probeninjektion genutzt. Zur Datenerfassung und Auswertung kam die Chromatography Data Station Software *D-7000 HPLC System Manager* zum Einsatz. Die inverse Größenausschlusschromatographie diente als Charakterisierungsmethode des Monolithen und wurde mit Chloroform als Laufmittel durchgeführt. Dabei wurden die Standards, mit einer Konzentration von 0.25 mg/mL Chloroform, per Hand injiziert.

15 Die Menge an injizierten Standards betrug 10 µL je Messung. Die Durchflussrate betrug dabei 0.57 mL/ min. Die ICP-OES Messungen wurden an einem *CIROS System* (Spectro A.I., Kleve) durchgeführt. Die Mikrowellenaufschlüsse wurden mittels einem *MLS 1200 mega* Mikrowellengerät (MSL GmbH, Deutschland) bewerkstelligt. Zyklus: Aufheizen in 9 Minuten von 20 auf 180°C bei 700 W, 12 Minuten bei konstanter

20 Temperatur bei 180°C und Abkühlung von 180°C auf 20°C in 90 Minuten. Die Messung des Rutheniumgehalts wurde bei den Wellenlängen  $\lambda=267.876$  nm und  $\lambda=240.272$  nm durchgeführt. Zum Vergleich wurden zwei Lösungen mit den Rutheniumkonzentrationen 0.5 mg/L und 1 mg/L angefertigt. Mit dem *pH-Meter 766 Calimatic* (Knick) wurden, nach entsprechender Kalibrierung, pH-Werte bei

25 Temperaturen zwischen 26°C und 29°C gemessen. Für die Sterilisation wurden der Autoklav *Variomag S* (H+P Labortechnik AG) mit Vorvakuum genutzt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem *Axiovert 25* (Zeiss), ausgestattet mit einer Kamera *AxiocamMR5* fotografiert. Zur Auswertung der Bilder und zur Zellzählung wurde die dazugehörige Software *Axiovision Rel.4.5* verwendet.



## A.2 Reagenzien und Standards

Alle Reaktionen mit luft- bzw. hydrolyseempfindlichen Substanzen wurden mit Hilfe der Schlenktechnik unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre in einer Schutzgasbox (LabMaster, Braun, Germany) durchgeführt.  $[\text{RuCl}_2(\text{PCy}_3)(\text{IMesH}_2)(\text{CHPh})]$  (PCy<sub>3</sub>=Tricyclohexylphosphin), Phosphat-Pufferlösung (pH ~ 7.2) und Natriumazid wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Furan (99+%, Sigma-Aldrich), wurde vor der Benutzung nochmals destilliert. Dimethylsulfoxid (DMSO) (≥ 99%), Toluol (reinst) wurden von Merck (Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Ethylvinylether (EVE) (~99%), Bicyclo[2.2.1]hept-2-en (Norborn-2-en, NBE) (≥ 95%), 2-Propanol und Acrylsäurechlorid (≥ 96%) wurden von Fluka, Kaliumhydroxid 85-, Pyridin (99,5%), Dichlormethan (DCM) (p.a.), Ethanol (99,8%), Chloroform (99%) wurden von der KMF Laborchemie Handels-GmbH (Deutschland) bezogen. Triethylamin (Merck), 2-Propanol, Pyridin und Chloroform wurden über CaH<sub>2</sub> getrocknet. Tetrahydrofuran (THF) (99%) wurde bei AppliChem (Darmstadt, Deutschland), 1,1,1-Tris(hydroxymethyl)ethan (≥ 97%) bei Acros (Belgien), Diethylether bei Sasol, 5-(Bicycloheptenyl)trichlorosilan bei ABCR (Deutschland) und Aceton bei VWR (Deutschland) bestellt und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Polystyrol (PS) Standards mit den Molekularmassen (M<sub>w</sub>): 1180, 17200, 23800, 75000, 1260000, 3150000 und  $1 \times 10^7$  g/mol wurden von Polymer Standards Service (PSS, Pittsburg, PA, USA), die Standards mit den Molekularmassen: 4000, 30000, 200000 und 400000 g/mol von Pressure Chemical (Pittsburg, USA) bezogen.

25

## A.3 Synthesen

A.3.1 Synthese der Vernetzer (V1=Pentaglyceroltris(7-oxanorborn-5-en-2-ylcarboxylat) und Pentaglycerolbis(7-oxanorborn-5-en-2-ylcarboxyl)acrylat, 3:1)

30

1,1,1-Tris(hydroxymethyl)ethan (1.91 g; 0.016 mol) wurde in trockenem Dichlormethan suspendiert und mit Triethylamin (5.77 g; 0.057 mol) versetzt. Anschließend wurde die Lösung auf  $-35^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Danach wurde *endo/exo*-7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carbonsäurechlorid (7.58 g; 0.0478 mol) zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur 3 Tage gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde das Produkt unter Argonatmosphäre in 50 mL Diethylether gelöst und 30 min gerührt. Die Etherlösung wurde abfiltriert und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde Natriumsulfat zur organischen Phase zugegeben und erneut filtriert. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und das Produkt, ein dunkelgelbes Öl, wurde unter Vakuum 1 Stunde lang getrocknet. Das Produkt repräsentierte eine Mischung aus Pentaglyceroltris(7-oxanornborn-5-en-2-ylcarboxylat) und Pentaglycerolbis(7-oxanornborn-5-en-2-ylcarboxyl)acrylat (3:1).

Ausbeute: 6.61 g (85.3%);  $M=486.26$  g/mol; FTIR (ATR mode): 2958 (s), 1723 (s), 1633 (m), 1407 (m), 1273 (m), 1165 (s), 1016 (s) and 703 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.07 (m, 3H, **CH**<sub>3</sub>), 2.16-2.46 (m), 3.16 (m, 1H, **CH**), 4.12 (m, 2H), 5.03 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, **CH**), 5.06 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H, **CH**), 5.16 (s, 1H, **CH**), 5.88 (d,  $J = 7.3$ , 1H, **CH**), 6.14 (m, 1H), 6.38 (m, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 173.7, 172.0, 165.9, 137.3, 134.7, 132.6, 131.6, 128.0, 81.0, 79.0, 78.1, 66.3, 66.0, 42.9, 38.8, 29.3, 28.6, 17.4.

#### 20 A.3.2 Herstellung der monolithisch strukturierten *Scaffolds* mittels ROMP

Zwei verschiedene Lösungen A und B wurden hergestellt und auf eine Polymerisationstemperatur von  $0^{\circ}\text{C}$  gekühlt.

Lösung A bestand aus dem Monomer, dem Vernetzer und dem Makroporogen (z. B. 2-Propanol);

Lösung B beinhaltete den Initiator im Mikroporogen (z. B. Toluol) und ggf. Pyridin als Moderator.

Lösung A und B wurden vereint und für einige Sekunden gerührt. Die verschiedenen Zusammensetzungen der Polymerisationslösungen sind in Tabelle 1 angegeben. Die Polymerisationsmischung wurde in die zu befüllende Vorrichtung gegossen, welche in

ihrer Form dem letztendlich zu generierenden Polymer entsprach. Die Lösung polymerisierte bei Raumtemperatur unter Luft innerhalb von 1 h aus. Anschließend wurde der Monolith mit einer Lösung bestehend aus THF, DMSO und Ethylvinylether, im Verhältnis 1:1:1 (32 Gew.-%; 40 Gew.-%; 28 Gew.-%), mehrmals gespült bzw. 5 extrahiert, um den Katalysator und überschüssiges Monomer zu entfernen. Zum Schluss wurde der Monolith mit Methanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Die relevanten physico-chemischen Parameter wurden mittels inverser Größenausschlusschromatographie bestimmt. Sie ergaben z.B. für Monolith 6 eine Zwischenkornporosität ( $\epsilon_z$ ) von 77%, eine Microglobulporosität ( $\epsilon_p$ ) von 7%, eine 10 Gesamtporosität ( $\epsilon_t$ ) von 84%, einen mittleren Porendurchmesser ( $\Phi_m$ ) von 1080 Å und ein spezifisches Porenvolumen ( $V_{p,s}$ ) von 604  $\mu\text{L/g}$ . Aus diesen Werten wurde eine spezifische Oberfläche von 22  $\text{m}^2/\text{g}$  ermittelt. Die monolithische Struktur wies dabei eine durchschnittliche Zwischenkornporengröße von 100–200  $\mu\text{m}$  auf.

#### 15 **Tabelle 1:**

Zusammensetzung der mittels ROMP hergestellten Monolithen. NBE=Norborn-2-ene, COE=Cycloocten, V1=Pentaglyceroltris(7-oxanorborn-5-en-2-ylcarboxylat) und Pentaglycerolbis(7-oxanorborn-5-en-2-ylcarboxylat)acrylat (3:1), V2=DMN-H6, V3=Tris(cyclooct-4-enyl-1-oxy)methylsilan, V4=Di(cyclooct-4-en-1-yl)maleat, 20 M=Mischung aus 6,7-Dihydro-2(5*H*)-oxepinon und 6,7-Dihydro-2(3*H*)-oxepinon (ca. 1:1), 2-PrOH=2-Propanol, dabei <sup>1)</sup> Gew.-Teile.

Monolith	V1 <sup>1)</sup>	NBE <sup>1)</sup>	2-PrOH <sup>1)</sup>	Toluol <sup>1)</sup>	Initiator <sup>1)</sup>	Pyridin <sup>1)</sup>
1	20	20	40	20	0.42	0
2	20	20	40	20	0.03	0.5
3	13,25	13,25	60	13,5	0.04	0.0055
4	20	20	40	20	0.03	0.074
5	20	20	40	20	0.03	0.066
6	20	20	50	10	0.03	0.071

7	15	15	60	10	0.025	0.17
8	25	25	40	10	0.03	0.1
9	15	15	50	20	0.028	0.1
10	15	15	40	30	0.031	0.11
12	20	20	50	10	0.01	0.025
13	15	15	50	20	0.03	0.07
<b>Monolith</b>	<b>V2<sup>1)</sup></b>	<b>NBE<sup>1)</sup></b>	<b>2-PrOH<sup>1)</sup></b>	<b>Toluol<sup>1)</sup></b>	<b>Initiator<sup>1)</sup></b>	<b>Pyridin<sup>1)</sup></b>
14	22.5	22.5	42.5	12.5	0.4	-
15	15	35	40	10	0.2	-
<b>Monolith</b>	<b>V3<sup>1)</sup></b>	<b>COE<sup>1)</sup></b>	<b>2-PrOH<sup>1)</sup></b>	<b>Toluol<sup>1)</sup></b>	<b>Initiator<sup>1)</sup></b>	<b>Pyridin<sup>1)</sup></b>
16	35	5	40	10	0.2	-
17	20	20	50	10	0.2	-
18	20	20	50	10	0.2	-
19	22.5	22.5	42.5	12.5	0.2	-
20	25	25	40	10	0.2	-
21	30	30	30	10	0.2	-
22	10	30	50	10	0.2	-
23	20	30	40	10	0.2	-
24	15	35	40	10	0.2	-
25	25	35	30	10	0.2	-
26	20	20	50	10	0.2	-
27	22.5	22.5	42.5	12.2	0.2	-
28	25	25	40	10	0.2	-
<b>Monolith</b>	<b>V4<sup>1)</sup></b>	<b>M<sup>1)</sup></b>	<b>2-PrOH<sup>1)</sup></b>	<b>Toluol<sup>1)</sup></b>	<b>Initiator<sup>1)</sup></b>	<b>Pyridin<sup>1)</sup></b>
29	25	25	40	10	0.2	-
30	25	25	40	10	0.2	0.1

### A.3.3 Herstellung der monolithischen *Scaffolds* mittels radikalischer Polymerisation

- Die Herstellung monolithischer Systeme mittels thermisch induzierter freier radikalischer Polymerisation, Tetramethylpiperidyl-oxo- (TEMPO-) induzierter
- 5 Polymerisation oder photochemisch induzierter Polymerisation erfolgte in der jeweils zu befüllenden Vorrichtung analog zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren

(siehe M. R. Buchmeiser, Polymer 2007, 48, 2187). Die Elektronenstrahlhärtungen wurden an einem 10 MeV Linearbeschleuniger ELEKTRONIKA (Toriy Company, Moskau) durchgeführt. Der Beschleuniger wurde bei 50 Hz Wiederholungsrate und 4  $\mu$ s Pulslänge unter Verwendung eines Horns (Bestrahlungsbreite bis 40 cm, Frequenz 1 Hz) und einem beweglichen Tisch betreiben. Als Referenzdosis wurde die auf Graphit applizierte Dosis kalorimetrisch ohne weitere Korrektur ermittelt. Die Gesamtdosis wurde dabei in kleinen Schritten ( $\sim$ 3 kGy) stufenweise über einen Zeitraum von 15 Minuten appliziert um den Temperaturanstieg in der Lösung unter 50°C zu halten. Die Monolithe wurden abschließend zur Reinigung mit Chloroform für 4 Stunden und mit THF für 30 min jeweils bei einem Fluss von 0.2 mL/min gespült.

**Tabelle 2:**

Zusammensetzung der mittels radikalischer Polymerisation hergestellten Monolithen. EMA=Ethylmethacrylat, V5=Trimethylolpropantriacrylat. I1=Azobis(*i*-butyronitril), I2=TEMPO, 2-PrOH=2-Propanol, dabei <sup>1)</sup>T=76°C, <sup>2)</sup>T=125°C, <sup>3)</sup> Gew.-Teile.

Monolith	EMA <sup>3)</sup>	V5 <sup>3)</sup>	2-PrOH <sup>3)</sup>	1-Dodecanol <sup>3)</sup>	Toluol <sup>3)</sup>	Dosis [kGy]
31	15	15	30	30	10	22
32	20	20	25	25	10	22
33	22.5	22.5	22.5	22.5	10	22
34	25	25	20	20	10	22
35	15	15	30	30	10	35
Monolith	EMA <sup>2)</sup>	TMPTA <sup>2)</sup>	2-PrOH <sup>2)</sup>	1-Dodecanol <sup>2)</sup>	Toluol <sup>2)</sup>	I1 <sup>2)</sup>
36 <sup>1)</sup>	15	15	30	30	10	1
37 <sup>2)</sup>	15	15	-	60	10	1

## A.3.4. Herstellung monolithischer Strukturen auf Basis von Methylendoxolanen

*n*-Dodecanol wurde 24 h lang im Hochvakuum getrocknet. Der Vernetzer wurde über trockenem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert um mögliche Verunreinigung zu eliminieren, 2-Propanol wurde über CaH<sub>2</sub> getrocknet. Aufgrund der geringen Stabilität des Monomers an Luft

(wasser- und säureempfindlich) wurden die Polymerisationslösungen mittels Schlenktechnik hergestellt. Die dabei verwendeten Glasgefäße wurden vor der Verwendung ins Laugenbad gegeben, mit Wasser gespült und im Trockenschrank getrocknet. Die Herstellung erfolgte mittels Elektronenstrahlhärtung.

5

**Tabelle 3:**

Zusammensetzung der mittels radikalischer Polymerisation hergestellten Monolithen. EMA=Ethylmethacrylat, V5=Trimethylolpropantriacyrat. Monomer=2-Methylene-4-phenyl-1,3-dioxolan; 2-PrOH=2-Propanol, dabei <sup>1)</sup> Gew.-Teile. Dosis: 22 kGy.

10

#	V5 <sup>1)</sup>	Monomer <sup>1)</sup>	2-PrOH <sup>1)</sup>	n-Dodecanol <sup>1)</sup>	Toluol <sup>1)</sup>
38	15	15	30	35	5
39	15	15	15	45	10
40	20	10	10	49	11
41	21	10	30	30	10
42	24	5	29	31	11
43	20	10	31	30	10
44	20	10	40	21	10
45	20	10	30	35	6
46	20	10	25	25	20
47	23	11	54	0	12
48	15	7	38	19	21
49	15	7	44	23	11

## B. Medizinische Untersuchung an monolithischen Strukturen

## B.1 Humane Fettgewebsstromazellen

- 15 Die Fettgewebestromazellen wurden aus humanem Fettgewebe gewonnen, das bei Routineoperationen aus der Beckenregion entnommen wurde. Das Fettgewebe wurde steril zerteilt und mittels Kollagenaselösung (Kollagenase Typ II, Boehringer

Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) digestiert. Die Enzymaktivität wurde durch Medium mit Serumzusatz (Iscove's DMEM/HAM F12 1:1, supplementiert mit 10% NCS=neonatal calf serum, alles von Life Technologies, Paisley, Schottland) gestoppt. Die Suspension wurde durch ein 100 µm Nylonnetz gefiltert und zentrifugiert (300 g, 5 10 min). Die Kultivierung der Zellen im Pellet erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Inkubator. Das Kulturmedium (Iscove's DMEM/HAM F12 1:1, supplementiert mit 10% NCS) wurde jeden 2. Tag gewechselt und die Zellen im Verhältnis 1:4 passagiert. Die anschließende Besiedlung der Trägersubstanz (Beispiel s. Abb. 1, Anhang) erfolgte mit Zellen der dritten Passage. Die so kultivierten Zellen 10 besitzen Multipotentialität, sind somit in unterschiedliche mesenchymale Zellen differenzierbar. In durchflußzytometrischen Analysen waren derart kultivierte Zellen positiv für CD29 (β-1 integrin), CD44, CD73 (SH3, Ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy-1), CD 105 (Endoglin) and negativ für hämatopoetische Marker (CD31, CD34, CD45, CD133, CD166). Ihr Oberflächenmarkerprofil entsprach somit weitgehend dem 15 mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark. Die Zellen waren nach Kultivierung in entsprechenden Induktionsmedien sowohl in konventioneller zweidimensionaler Kultur als auch in dreidimensionalen Gewebeaggregaten adipogen, osteogen und glattmuskulär differenzierbar.

## 20 B.2 Erstellung der Wachstumskurve

Die Gassterilisation wurde mit Formalin bei 60°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben gewässert, um das Restformalin zu beseitigen. Die Besiedelung der Monolithscheiben wurde mit mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Diese wurden 25 in Iscove's Modified Dulbecco's Medium gemischt mit HAM-FIZ kultiviert. 16 Monolithen wurden in Medium gewässert und einzeln in die Wells einer 24-Multiwellplatte platziert. Die Besiedlung erfolgte mit 18.000 Zellen pro Well (10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>). Je drei Monolithen wurden nach 3, 6, 9 und 12 Tagen entnommen und zunächst die Vitalität mit einer Acridin-Orange Vitalfärbung (Sigma-Aldrich) gezeigt 30 (fotografische Dokumentation). Ethidiumbromid wurde als Farbstoff für abgestorbene Zellen verwendet. Danach erfolgte Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd und die

nochmalige Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Die Auszählung erfolgte unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Zählrasters (0.8 x 0.8 cm), welches in das Okular des Mikroskops eingesetzt wurde. Aus den Zellzahlen der 6 Felder pro Probe und den ausgezählten Monolithenscheiben wurde ein Mittelwert pro Entnahmezeitpunkt gebildet. Die Werte wurden gegen die Zeitachse aufgetragen. Die Zellen verblieben bei der Zählung auf dem Material. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abb. 2 dargestellt.

**Tabelle 4:**

10 Mittelwerte der Zellzählung.

Besiedlungsdauer	Zellzahl/cm <sup>2</sup>
eingesetzte Zellmenge am Starttag	10000
3 Tage	25000
6 Tage	26875
9 Tage	36250
12 Tage	38125

### B.3 Zelldifferenzierung auf der Trägestruktur (Monolith)

Die Sterilisation der Monolithproben im Autoklav erfolgte bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 1 bar über einen Zeitraum von 45 min. Die Gassterilisation wurde mit Formalin bei 60 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben zur Entfernung des Retformalins gewässert. Acht Monolithen wurden zunächst mit etwa 10<sup>8</sup> Fettgewebsstromazellen der 3. Passage besiedelt und über 10 Tage in rotierenden Kulturcontainern kultiviert. Danach erfolgte die adipogene Differenzierung der Zellen auf 4 Monolithen mittels Kultivierung in einem adipogenen Induktionsmedium (Isobutylmethylxanthin, IBMX 0.5 mM, Insulin 1.72 µM, zusätzliche Supplementierung von Biotin und Pantothenat). Dieses wurde nach drei Tagen durch ein IBMX-freies Erhaltungsmedium (Insulin 1.72 µM, zusätzliche Supplementierung von Biotin und Pantothenat) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) ersetzt und nach weiteren drei Tagen erneut für drei Tage verwendet. Die



Fettzellen wurden dafür mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die 4 weiteren Monolithenkulturen wurden durch Zugabe eines osteogenen Differenzierungsmediums ( $\beta$ -glycerolphosphat, Dexamethason und Vitamin D3, alle von Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) der knöchernen Differenzierung zugeführt. Nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Wochen wurde jeweils ein halber, mittig geteilter Monolith entnommen und in Paraformaldehyd 4% in PBS fixiert. Die Monolithen wurden in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte senkrecht zur Oberfläche angefertigt. Schnitte der adipogen differenzierten Kulturen wurden mittels HE gefärbt, in den osteogen differenzierten Kulturen erfolgte der Nachweis von Matrixmineralisationen mittels *von Kossa* Färbung. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ unter dem Lichtmikroskop und 20-facher Vergrößerung.

Fettzellen: 6 Wochen nach Beginn der Differenzierung hatten sich Adipozyten voll ausgebildet. Zellkern und das Zellplasma lagen weitgehend am Rand der Zellen. Die Zellen hatten eine Größe  $\leq 30 \mu\text{m}$  erreicht. Die Entwicklung war noch nicht abgeschlossen, aber doch schon sehr weit fortgeschritten. Abb. 3 (Anhang) visualisiert die gebildeten Fettzellen. Aus dem Mesenchym entwickeln sich auch Knochenvorläuferzellen die sich zu Knochen bildenden Zellen, wie Osteoblasten oder Osteozyten, differenzierten. Nach 6 Wochen war fast der gesamte mikroskopisch untersuchte Bereich gleichmäßig mit Kalziumeinlagerungen übersät. Abb. 4 zeigt die gebildeten Knochenzellen.

20

#### B.4 *In vitro* Inkubation

Es wurden 36 Monolithen hergestellt, wovon 12 Autoklav sterilisiert und 12 gassterilisiert wurden. Die restlichen 12 blieben als Referenz unbehandelt. Nachdem alle Proben gewogen waren, wurden sie in 30 mL Phosphatpuffer-Lösung in Wasser (pH~7.2) (mit 0,02 Gew.-% Natriumazid versetzt, um bakterielle Kontaminierung zu verhindern) gesetzt. Die verschlossenen Gläser wurden mit Parafilm<sup>®</sup> abgedichtet und in ein dunkles Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C platziert. Zu jedem Zeitpunkt (Entnahmezeitpunkte: 5., 10., 20., 30., 40., 50. und 60. Tag) wurden sechs Proben dem

30

Wasserbad und ebenso der Pufferlösung entnommen. Dies waren jeweils zwei unsterilisierte, zwei Autoklav sterilisierte und zwei gassterilisierte Proben. Sie wurden mit destilliertem Wasser abgespült, anschließend wurde das überschüssige Wasser vorsichtig von der Oberfläche entfernt. Jede Probe wurde erneut in nassem Zustand  
5 gewogen und anschließend in den Vakuumofen gestellt und bei 40 °C getrocknet. Die Proben wurden bis zur Gewichtskonstanz gewogen.

#### B.5 Vitalitätsbestimmung

- 10 Die Monolithen wurden vor der Anwendung gründlichst sterilisiert. Anschließend wurden die Zellen in einer *Laminar-Flow-Kapelle* auf die Monolithenscheiben in einem *24-well-plate* aufgebracht und die *wells* mit Nährmedium aufgefüllt. Dieses Nährmedium bestand aus einem Grundmedium, welches sich aus einem Puffersystem, Nährstoffen und Salzen zusammensetzte und speziellen Zusätzen, wie z.B.  
15 Wachstumsfaktoren und Serum. Das *24-well-plate* wurde dann in einen Inkubator gestellt und nach 3 Tagen mit dem Vitalfarbstoff Acridin-Orange angefärbt und unter dem Lichtmikroskop beobachtet.

20

#### B.6 Abbauverhalten

- Das Abbauverhalten wurde mittels pH- Messungen untersucht. Es wurden  
25 unsterilisierte, Autoklav sterilisierte und gassterilisierte Proben verwendet, da Wert auf den Vergleich der drei verschieden behandelten Materialien gelegt wurde. Um den Abbau zu charakterisieren, wurde der Masseverlust und in diesem Zusammenhang auch der Quellgrad bestimmt. Ebenso wurden auch Infrarotspektren der Materialien aufgenommen, der pH-Wert der Inkubationslösungen nach der Inkubation bestimmt,  
30 sowie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Der Biodegradationsversuch lief über 15 bzw. 30 Wochen. Es wurden jeweils zwei unsterile

Proben, zwei Autoklav sterilisierte Proben und zwei gassterile Proben inkubiert. Die Proben befanden sich über diesen Zeitraum in einem 37°C warmen, dunklen Wasserbad. Bei allen Probe konnte ein kontinuierlicher Abbau, jedoch kein „*bulk* Abbau“ festgestellt werden.

5

**Abb. 1**

Teil einer Monolithenprobe (Monolith 6), die zur Zellbesiedelung verwendet wurde. Die Partikelgröße liegt bei 1–2 µm.

10 **Abb. 2**

Graphische Darstellung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Besiedlungsdauer (Monolith 6).

**Abb. 3**

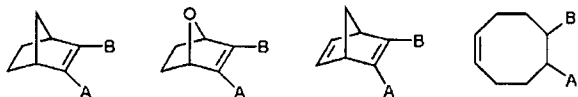
15 Adipogene Zellen auf Autoklav sterilisierten Monolithen nach 6 Wochen; L =Zettzelle mit Vakuole (Monolith 6).

**Abb. 4**

Ostipogene Zellen auf Autoklav sterilisierten Monolithen nach 6 Wochen (Monolith 6).

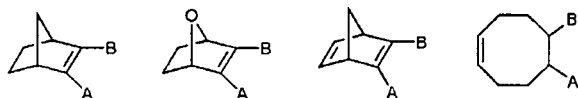
PATENTANSPRÜCHE

1. Polymeres poröses Trägermaterial für die Kultivierung von Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass dieses Trägermaterial zumindest aus monolithischen, vernetzten, biokompatiblen und bioabbaubaren polymeren Materialien besteht.
- 5 2. Trägermaterial gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die monolithischen, polymeren Materialien innerhalb einer Form gebenden Struktur angeordnet sind.
3. Trägermaterial gemäß der Ansprüche 1 und 2, für die Regenerativ Medizin und für das *Tissue Engineering*.
- 10 4. Trägermaterial gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für dessen Herstellung Norborn-2-ene, 7-Oxanorbornene, Norbornadiene oder Cyclooctene der allgemeinen Formel



- 15 verwendet werden, mit der Maßgabe, dass in obiger Formel A und B getrennt oder miteinander verbunden sein können und Wasserstoff, eine C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyloxy-, Aryl-, Aryloxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkenyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Arylkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylaryl-, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Arylalkenyl- oder eine Halogengruppe, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Hydroxyalkyl, (poly)-Hydroxyphenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Hydroxyalkylaryl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Aminoalkyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-mono- oder di-(C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl)aminoalkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Cyanoalkyl Cyanoaryl sowie
- 20 eine Carboxylat- C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylcarboxylat, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylcarboxyl bedeuten können. Des Weiteren können zwei oder mehrere Norborn-2-ene, 7-Oxanorbornene, Norbornadiene oder Cyclooctene miteinander über C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> Ether-, Ester-, oder Amidbrücken miteinander verbunden sein.

5. Trägermaterial gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für dessen Herstellung zyklische, einfach und mehrfach ungesättigte Ester und Amide verwendet werden.
6. Trägermaterial gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für dessen Herstellung  $C_1$ - $C_{18}$  acrylate,  $C_1$ - $C_{18}$  methacrylate,  $C_1$ - $C_{18}$  diacrylate,  $C_1$ - $C_{18}$  triacrylate,  $C_1$ - $C_{18}$  dimethacrylate,  $C_1$ - $C_{18}$  trimethacrylate eingesetzt werden.
7. Verfahren zur Herstellung von Trägermaterialien nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass deren Herstellung mittels Ring öffnender Metathesepolymerisation (ROMP) erfolgt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet dass für die Herstellung der monolithischen Strukturen Norborn-2-ene, 7-Oxanorbornene, Norbornadiene oder Cyclooctene der allgemeinen Formel



- 15 verwendet werden, mit der Maßgabe, dass in obiger Formel A und B getrennt oder miteinander verbunden sein können und Wasserstoff, eine  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyloxy-, Aryl-, Aryloxy,  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkenyl-,  $C_1$ - $C_{18}$ -Arylalkyl,  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkylaryl-,  $C_1$ - $C_{18}$ -Arylalkenyl- oder eine Halogengruppe,  $C_1$ - $C_{18}$ -Hydroxyalkyl, (poly)-Hydroxyphenyl,  $C_1$ - $C_{18}$ -Hydroxyalkylaryl,  $C_1$ - $C_{18}$ -Aminoalkyl, ( $C_1$ - $C_{18}$ )-mono- oder di-( $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl)aminoalkyl,  $C_1$ - $C_{18}$ -Cyanoalkyl Cyanoaryl sowie eine Carboxylat-  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkylcarboxylat,  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkylcarboxyl bedeuten können, wobei zwei oder mehrere Norborn-2-ene, 7-Oxanorbornene, Norbornadiene oder Cyclooctene miteinander über  $C_1$ - $C_{18}$  Ether-, Ester-, oder Amidbrücken miteinander verbindbar sind.
- 20
- 25 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass für die Herstellung der monolithischen Strukturen zyklische, einfach und mehrfach ungesättigte Ester und Amide verwendet werden.

10. Verfahren zur Herstellung von Trägermaterialien nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Herstellung mittels Elektronenstrahl induzierter freier radikalischer Polymerisation erfolgt.
- 5 11. Verfahren zur Herstellung von Trägermaterialien nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Herstellung mittels photochemisch induzierter freier radikalischer Polymerisation erfolgt.
12. Verfahren zur Herstellung von Trägermaterialien nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass dessen Herstellung mittels thermisch induzierter freier radikalischer Polymerisation erfolgt.
- 10 13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 10-12, dadurch gekennzeichnet, dass für die Herstellung der monolithischen Strukturen C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> acrylate, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> methacrylate, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> diacrylate, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> triacrylate, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> dimethacrylate, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> trimethacrylate eingesetzt werden.
- 15 14. Verwendung eines polymeres Trägermaterials für die Kultivierung von Zellen mit den Merkmalen zumindest eines der Ansprüche 1 bis 6, für die Regenerativ Medizin und für das *Tissue Engineering*.

Abbildung 1



Abbildung 1

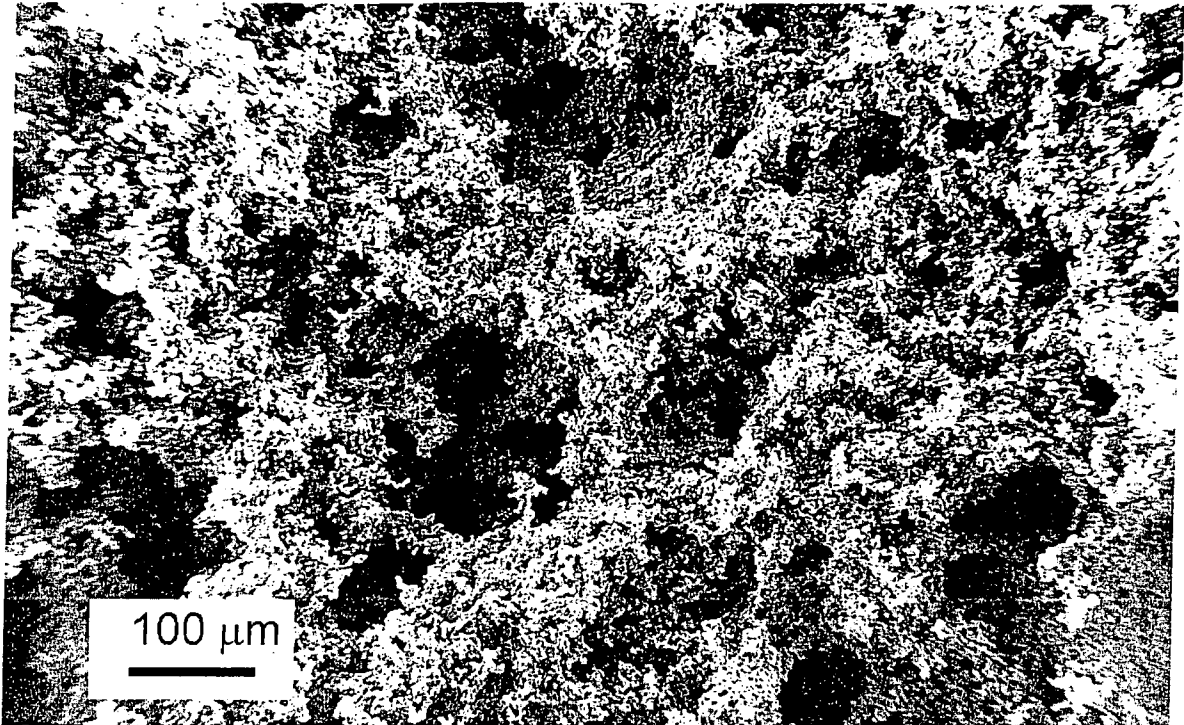


Abbildung 2

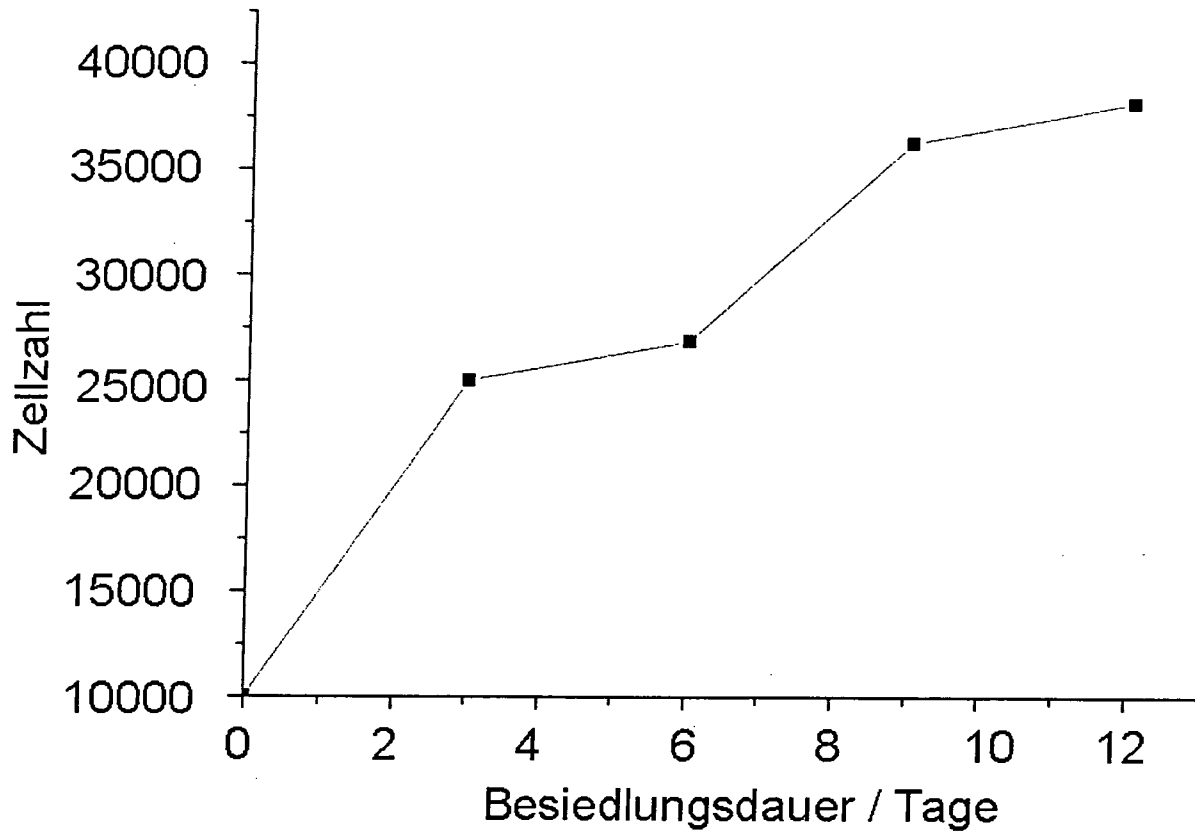




Abbildung 3

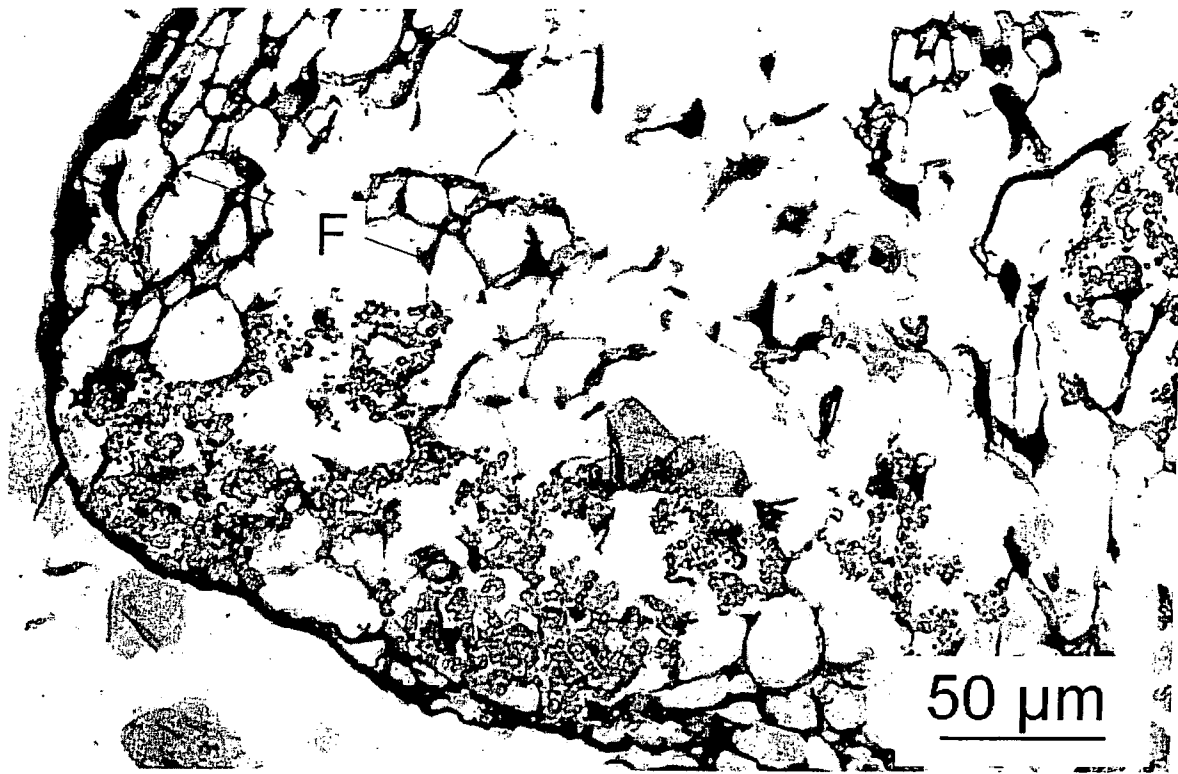
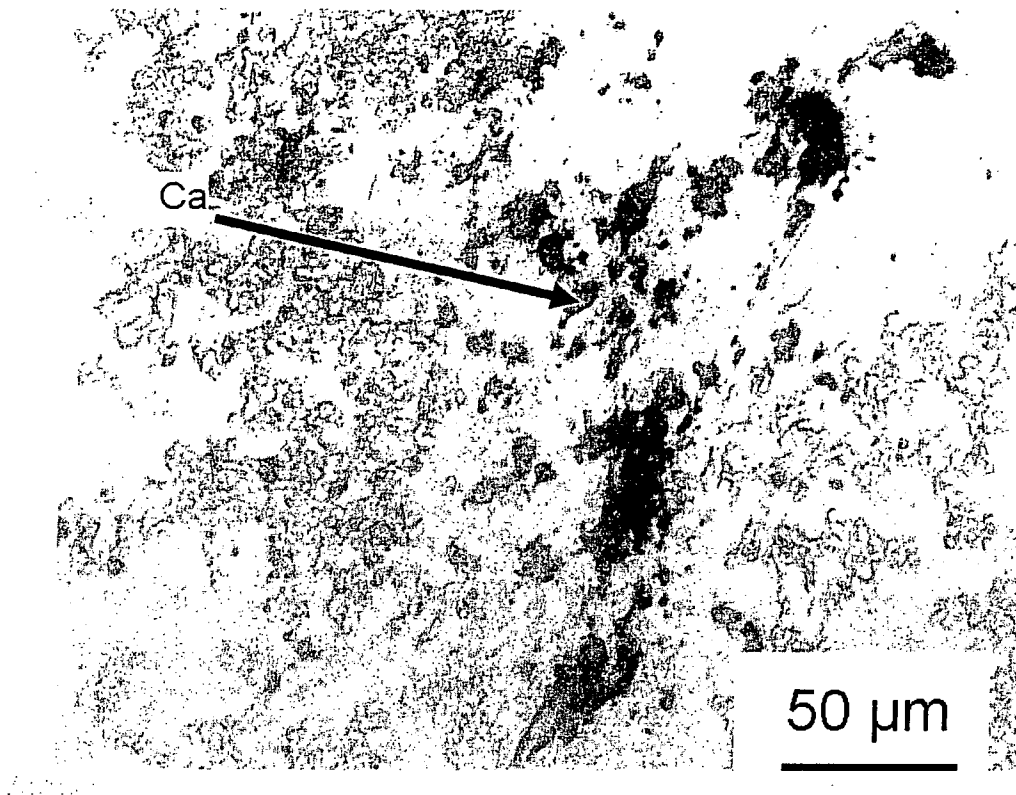


Abbildung 4



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2008/005419

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. C08G61/08 C08G61/12 C08J9/14 C08J9/28 C12N5/00  
 A61L27/56 A61L27/58

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

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A61L C08F C08G C08J C08L C09D C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
 EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 598 102 A (LEACH DOUGLAS R [US]) 1 July 1986 (1986-07-01) column 4, line 49 - column 5, line 21 examples 1-79	1-4,6-8
X	US 2007/026046 A1 (FOGG DERYN [CA] ET AL) 1 February 2007 (2007-02-01) abstract figures 1,6,9 paragraphs [0002], [0003], [0008] - [0021], [0029], [0034], [0049], [0055] - [0058], [0098] examples 1-5	1-4,7,8, 14
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  27 November 2008	Date of mailing of the international search report  12/12/2008
-----------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Meiners, Christian
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/005419

C(Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ENHOLM ET AL: "Photocurable hard and porous biomaterials from ROMP precursors cross-linked with diyl radicals" BIOORGANIC &amp; MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 15, no. 23, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 5262-5265, XP005149680 ISSN: 0960-894X abstract schemes 1-5</p>	1,4,7,8, 14
X	<p>HAMILTON J G ET AL: "The swelling characteristics of some hydrogels prepared by ring-opening metathesis polymerization" JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS. A, CHEMICAL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 133, no. 1-2, 13 July 1998 (1998-07-13), pages 83-91, XP004650145 ISSN: 1381-1169 the whole document</p>	1,4,7,8, 14
X	<p>WO 03/000766 A (SHASTRI VENKATRAM PRASAD [US]) 3 January 2003 (2003-01-03) paragraphs [0005], [0021], [0022], [0043], [0118], [0119], [0142]; figures 2,4,6,9 abstract</p>	1-3,6, 11-14
A	<p>abstract</p>	4,7,8
A	<p>WANG, Y; KIM, Y.M.; LANGER, R.: "In vivo degradation characteristics of poly(glycerol sebacate)" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, vol. 66A, no. 1, 10 June 2003 (2003-06-10), pages 192-197, XP002499126 abstract; figures 1-3</p>	1,4,7,8, 14
A	<p>SEEHERMAN H ET AL: "Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration" CYTOKINE AND GROWTH FACTOR REVIEWS, OXFORD, GB, vol. 16, no. 3, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 329-345, XP004964513 ISSN: 1359-6101 Abschnitt 3.3 abstract</p>	1,4,7,8, 14
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2008/005419

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BURKOTH, A.K.; BURDICK, J.; ANSETH, K.S.: "Surface and bulk modification to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 51, 2000, pages 352-359, XP002499127 figures 1-7	1-3,6, 11,13,14
A	abstract	4,7,8, 10,12
X	WO 2006/113984 A (RIMON THERAPEUTICS LTD [CA]; BUTLER MARK J [CA]; SEFTON MICHAEL VIVIAN) 2 November 2006 (2006-11-02) abstract paragraphs [0001] - [0010]; claims 1-6,8,10-13; examples 1-5	1-3,6, 10-14
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 10 August 2006 (2006-08-10), SANTOS ESTEVE, LAURA: "Method for fabrication of 3-D polymer scaffold for tissue regeneration" XP002505657 retrieved from STN Database accession no. 2006:790979 abstract -& WO 2006/082270 A1 (SPAIN) 10 August 2006 (2006-08-10) abstract page 4, line 8 - page 8, line 20	1-3,6, 10-14
X	WO 2006/026325 A (PATHAK CHANDRASHEKHAR P [US]; THIGLE SANJAY M [IN]) 9 March 2006 (2006-03-09) abstract paragraphs [0137], [0138]; claims 1,2; example 16	1-3,6, 10-14

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

**see supplemental sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

**1-3 (part), 4, 6, 7 (part), 8, 10-13, 14 (part)**

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:**

**1. Claims 1-3 (in part), 4, 7 (in part), 8, 14 (in part)**

**Polymer porous scaffold material according to claim 1, characterized in that norborn-2-ene, 7-oxanorbornene, norbornadiene or cyclooctenes of the general formula of claim 4 are used for its production. Furthermore, a method according to claim 7 in combination with the features of claim 8 is disclosed for the production thereof and the use of said scaffold material for cultivating cells for the regenerative medicine and for “tissue engineering” according to claim 14.**

---

**2. Claims 1-3 (in part), 5, 7 (in part), 9, 14 (in part)**

**Polymer porous scaffold material according to claim 1, characterized in that cyclical, mono- and polyunsaturated esters and amides are used for its production (subject matter of claim 5). Furthermore, a method according to claim 7 in combination with the features of claim 9 is disclosed for the production thereof and the use of said scaffold material for cultivating cells for the regenerative medicine and for “tissue engineering” according to claim 14.**

---

**3. Claims 1-3 (in part), 6, 10-13, 14 (in part)**

**Polymer porous scaffold material according to claim 1, characterized in that acrylates, as defined in claim 6, are used. Furthermore, a method according to claim 7 in combination with the features of claims 10-13 is disclosed for the production thereof and the use of said scaffold material for cultivating cells for the regenerative medicine and for “tissue engineering” according to claim 14.**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2008/005419
---------------------------------------------------

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4598102	A	01-07-1986	NONE	
US 2007026046	A1	01-02-2007	NONE	
WO 03000766	A	03-01-2003	US 2003050426 A1	13-03-2003
WO 2006113984	A	02-11-2006	CA 2603773 A1 EP 1877111 A1 US 2008206186 A1	02-11-2006 16-01-2008 28-08-2008
WO 2006082270	A1	10-08-2006	ES 2258396 A1	16-08-2006
WO 2006026325	A	09-03-2006	EP 1796693 A2	20-06-2007



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2008/005419

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 INV. C08G61/08 C08G61/12 C08J9/14 C08J9/28 C12N5/00  
 A61L27/56 A61L27/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**  
 Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 A61L C08F C08G C08J C08L C09D C12N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  
 EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 598 102 A (LEACH DOUGLAS R [US]) 1. Juli 1986 (1986-07-01) Spalte 4, Zeile 49 - Spalte 5, Zeile 21 Beispiele 1-79	1-4,6-8
X	US 2007/026046 A1 (FOGG DERYN [CA] ET AL) 1. Februar 2007 (2007-02-01) Zusammenfassung Abbildungen 1,6,9 Absätze [0002], [0003], [0008] - [0021], [0029], [0034], [0049], [0055] - [0058], [0098] Beispiele 1-5	1-4,7,8, 14
	----- -/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen  Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
27. November 2008	12/12/2008
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Meiners, Christian

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ENHOLM ET AL: "Photocurable hard and porous biomaterials from ROMP precursors cross-linked with diyl radicals" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, Bd. 15, Nr. 23, 1. Dezember 2005 (2005-12-01), Seiten 5262-5265, XP005149680 ISSN: 0960-894X Zusammenfassung schemes 1-5	1,4,7,8, 14
X	HAMILTON J G ET AL: "The swelling characteristics of some hydrogels prepared by ring-opening metathesis polymerization" JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS. A, CHEMICAL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 133, Nr. 1-2, 13. Juli 1998 (1998-07-13), Seiten 83-91, XP004650145 ISSN: 1381-1169 das ganze Dokument	1,4,7,8, 14
X	WO 03/000766 A (SHASTRI VENKATRAM PRASAD [US]) 3. Januar 2003 (2003-01-03) Absätze [0005], [0021], [0022], [0043], [0118], [0119], [0142]; Abbildungen 2,4,6,9	1-3,6, 11-14
A	Zusammenfassung	4,7,8
A	WANG, Y; KIM, Y.M.; LANGER, R.: "In vivo degradation characteristics of poly(glycerol sebacate)" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A, Bd. 66A, Nr. 1, 10. Juni 2003 (2003-06-10), Seiten 192-197, XP002499126 Zusammenfassung; Abbildungen 1-3	1,4,7,8, 14
A	SEEHERMAN H ET AL: "Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration" CYTOKINE AND GROWTH FACTOR REVIEWS, OXFORD, GB, Bd. 16, Nr. 3, 1. Juni 2005 (2005-06-01), Seiten 329-345, XP004964513 ISSN: 1359-6101 Abschnitt 3.3 Zusammenfassung	1,4,7,8, 14
	-/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BURKOTH, A.K.; BURDICK, J.; ANSETH, K.S.: "Surface and bulk modification to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Bd. 51, 2000, Seiten 352-359, XP002499127 Abbildungen 1-7	1-3,6, 11,13,14
A	Zusammenfassung	4,7,8, 10,12
X	WO 2006/113984 A (RIMON THERAPEUTICS LTD [CA]; BUTLER MARK J [CA]; SEFTON MICHAEL VIVIAN) 2. November 2006 (2006-11-02) Zusammenfassung Absätze [0001] - [0010]; Ansprüche 1-6,8,10-13; Beispiele 1-5	1-3,6, 10-14
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 10. August 2006 (2006-08-10), SANTOS ESTEVE, LAURA: "Method for fabrication of 3-D polymer scaffold for tissue regeneration" XP002505657 gefunden im STN Database accession no. 2006:790979 Zusammenfassung -& WO 2006/082270 A1 (SPAIN) 10. August 2006 (2006-08-10) Zusammenfassung Seite 4, Zeile 8 - Seite 8, Zeile 20	1-3,6, 10-14
X	WO 2006/026325 A (PATHAK CHANDRASHEKHAR P [US]; THIGLE SANJAY M [IN]) 9. März 2006 (2006-03-09) Zusammenfassung Absätze [0137], [0138]; Ansprüche 1,2; Beispiel 16	1-3,6, 10-14

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

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

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

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

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.  
1-3(Teil), 4, 6, 7(Teil), 8, 10-13, 14(Teil)
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-3(Teil),4,7(Teil),8,14(Teil)

Polymeres poröses Trägermaterial gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für dessen Herstellung Norborn-2-ene, 7-Oxanorbornene, Norbornadiene, oder Cyclooctene der allgemeinen Formel des Anspruchs 4 verwendet werden. Weiterhin ist ein Verfahren nach Anspruch 7 zu deren Herstellung in Kombination mit den Merkmalen des Anspruchs 8 umfasst und die Verwendung dieses Trägermaterials für die Kultivierung von Zellen für die Regenerativmedizin und für das 'Tissue Engineering' gemäß Anspruch 14.

2. Ansprüche: 1-3(Teil),5,7(Teil),9,14(Teil)

Polymeres poröses Trägermaterial gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für dessen Herstellung zyklische, einfach und mehrfach ungesättigte Ester und Amide verwendet werden (Gegenstand von Anspruch 5). Weiterhin ist ein Verfahren nach Anspruch 7 in Kombination mit den Merkmalen des Anspruchs 9 zu deren Herstellung umfasst und die Verwendung dieses Trägermaterials für die Kultivierung von Zellen für die Regenerativmedizin und für das 'Tissue Engineering' gemäß Anspruch 14.

3. Ansprüche: 1-3(Teil),6,10-13,14(Teil)

Polymeres poröses Trägermaterial gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für dessen Herstellung Acrylate wie definiert in Anspruch 6 eingesetzt werden. Weiterhin ist ein Verfahren nach Anspruch 7 in Kombination mit den Merkmalen der Ansprüche 10-13 zu deren Herstellung umfasst und die Verwendung dieses Trägermaterials für die Kultivierung von Zellen für die Regenerativmedizin und für das 'Tissue Engineering' gemäß Anspruch 14.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/005419

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4598102	A	01-07-1986	KEINE	
US 2007026046	A1	01-02-2007	KEINE	
WO 03000766	A	03-01-2003	US 2003050426 A1	13-03-2003
WO 2006113984	A	02-11-2006	CA 2603773 A1	02-11-2006
			EP 1877111 A1	16-01-2008
			US 2008206186 A1	28-08-2008
WO 2006082270	A1	10-08-2006	ES 2258396 A1	16-08-2006
WO 2006026325	A	09-03-2006	EP 1796693 A2	20-06-2007