



(10) **DE 10 2007 000 564 B4** 2016.11.17

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 000 564.6**

(22) Anmeldetag: **24.10.2007**

(43) Offenlegungstag: **30.04.2009**

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **17.11.2016**

(51) Int Cl.: **C07K 14/435 (2006.01)**

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden
e.V., 01069 Dresden, DE**

(74) Vertreter:
**Sperling, Fischer & Heyner Patentanwälte, 01277
Dresden, DE**

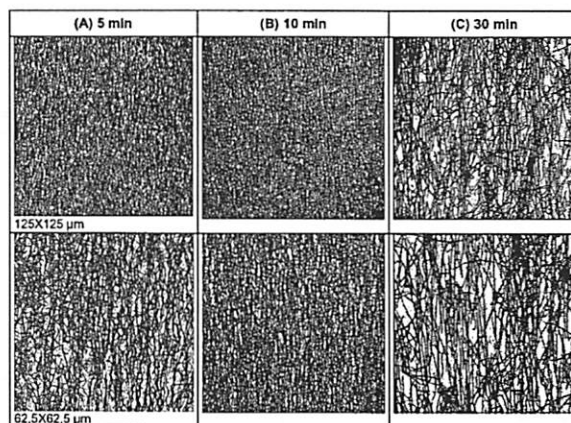
(72) Erfinder:
**Lanfer, Babette, 01099 Dresden, DE; Freudenberg,
Uwe, Dipl.-Ing. (FH), 01309 Dresden, DE;
Zimmermann, Ralf, Dr.-Ing., 01705 Freital, DE;
Werner, Carsten, Dr. rer. nat., 01219 Dresden, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:
DE 602 11 723 T2

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Beschichtung von Trägern mit Kollagenfibrillenmatrixes**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Beschichtung von Trägern mit Kollagenfibrillenmatrixes definierter Struktur und Morphologie aus strömenden Lösungen, bei dem

- die Kollagenlösung durch einen Mikrokanal bewegt wird, wobei der zu beschichtende Träger die Unterseite des Kanals bildet,
- die Fibrillen der Kollagenlösung durch die Scherwirkung der strömenden Flüssigkeit auf dem Probenträger ausgerichtet werden,
- die Steuerung von Struktur und Morphologie durch Variation von einem oder mehreren verschiedenen Parametern erfolgt, wobei die Gruppe der zu variierenden Parameter
 - die Substratmaterialien,
 - die oberflächenaktiven Beschichtungen auf den Substratmaterialien,
 - die Konzentration der Lösung,
 - die Fibrillierzeit und
 - die fluiddynamischen Randbedingungen im Abscheidungsprozess umfasst.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Kollagenfibrillenmatrices, die durch ein Verfahren zur Beschichtung von Trägern mit Kollagenfibrillenmatrices definierter Struktur aus strömenden Lösungen erhältlich sind, bei dem die Größe, Form und Ausrichtung der resultierenden Kollagenfibrillen sowie die Bedeckungsdichte der Träger mit Kollagen und die Struktur der Schichten gezielt durch Variation verschiedener Parameter gesteuert werden.

[0002] Die Erfindung ist angesiedelt im Gebiet der Biomaterialforschung, speziell geht es dabei um die Herstellung von biologischen Trägermaterialien als Gerüst (Scaffold) für Zellkulturanwendungen.

[0003] Kollagen stellt das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Faserprotein der extrazellulären Matrix dar. In einem Selbstassemblierungsprozess, der so genannten Fibrillogenese, lagern sich einzelne Kollagenmoleküle zu Kollagenfibrillen zusammen. Diese Kollagenfibrillen liegen in menschlichen und tierischen Geweben meist stark gerichtet vor. Beispielhaft sind Faserbündel in Muskel- bzw. Sehngewebe zu nennen. Hierbei erfüllt die Ausrichtung der Fibrillen spezielle strukturelle Funktionen. So wird beispielsweise die Belastungsfähigkeit dieser Gewebe durch die Ausrichtung signifikant erhöht.

[0004] Der Selbstassemblierungsprozess *in vitro* führt jedoch zu Fibrillensystemen, den so genannten Fibrillenmatrices, die eine willkürliche Anordnung der einzelnen Fibrillen aufweisen. Aus diesen Gründen können derartige Systeme nur begrenzt körperrelevante Funktionen nachbilden.

[0005] Im Stand der Technik sind mehrere Verfahren zur Ausrichtung von Kollagenfibrillen bekannt. Bei Guo und Kaufman, *Biomaterials* 28 (2007) 1105–1114, wurde gezeigt, dass mit Streptavidin/Amin/Carboxyl-beschichtete Magnetkugeln in einer gelierenden Kollagenlösung bei gleichzeitigem Einsatz eines externen Magnetfeldes eine parallele Orientierung der sich bildenden Kollagenfibrillen zur Folge hat. Diese Technik erfordert nur eine Kollagenlösung, Oberflächen-geänderte Magnetperlen, einen kleinen Magneten und einen Inkubator. Die Kollagengele werden mit Konfokalreflektionsmikroskopie abgebildet, wobei die Ausrichtungsstufe der Kollagenfibrillen unter Benutzung von Bildanalysetechniken quantitativ bestimmt wird, die die Bestimmung der Faserposition und der Winkelverteilung erlauben. Zahlreiche Experimente zeigen, dass mit Streptavidin bedeckte Magnetperlen zu den am meisten ausgerichteten Gelen führen. Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch insbesondere darin, dass die Ausrichtung der Kollagenfibrillen durch Einsatz der Magnetkugeln signifikante Eigenschaftsänderungen des Kollagens zur Folge hat, wodurch die resultierenden Kollagengele nicht länger im nativen Zustand sind. Somit sind sie für Zellexperimente nur bedingt einsetzbar.

[0006] Andere Verfahren haben zum Ziel, parallel orientierte Kollagenstrukturen direkt zu erzeugen, wobei diese Systeme meist als „Kollagenbänder“ in Form einer mononuklearen Schicht mit einer Schichtdicke von etwa 3 nm über der Substratfläche und einer Breite von bis zu 20 nm definiert werden können. Gemäß Jiang et al., *Journal of Structural Biology* 148 (2004) 268–278 und Jiang et al., *Microscopy Research and Technique* 64 (2004) 435–440, erfolgte die Ausrichtung bei diesem Ansatz durch gerichtetes Pipettieren von Kollagenlösung auf einer Glimmoberfläche. Wesentliche nachteilige Einschränkungen dieses Ansatzes bestehen einerseits in der Fibrillenform und -größe. Während der Durchmesser nativer Kollagenfibrillen 20 bis 500 nm beträgt, liegt der Bereich des Durchmessers der so erhaltenen Kollagenbänder nur zwischen 5 bis 20 nm. Andererseits wurden für diese Methode als Oberflächen ausschließlich Glimmoberflächen eingesetzt.

[0007] Der Einsatz von Fluidsystemen ist Gegenstand der Publikation von Lee et al. *Biomed Microdevices* 8 (2006), 35–41, die eine Methode zum Ausrichten von Kollagen Gelen offenbart. Durch kurzes Einströmen einer noch nicht fibrillierten, gekühlten Kollagenlösung in einen Mikroflussskanal und anschließendes Ruhen der Lösung bei Raumtemperatur wurden Kollagenmatrices erzeugt, bei denen die Mehrzahl der Fibrillen in Flussrichtung ausgerichtet ist. Die Qualität der Ausrichtung dieser Matrices ist bei dieser Methode jedoch noch unbefriedigend. Darüber hinaus ist die Anwendung der Methode lediglich auf Kanäle mit geringer Breite, das heißt maximal 30 µm beschränkt. Aufgrund dieser geringen Breite, die im Größenbereich des durchschnittlichen Zelldurchmessers (10 bis 30 µm) liegt, ist diese Methode für die Erzeugung von viel größeren, für die Zellkultur notwendigen Flächen nicht anwendbar.

[0008] Daher besteht die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe in der Bereitstellung von Kollagenmatrices für Zellkulturrexperimente, in denen Zell-Matrix-Interaktionen wie die Zellmigration und -adhäsion erforscht werden können und einem Verfahren zu deren Erzeugung. Durch das Verfahren soll die Variation der Fibrillenform, die Belegungsdichte der Kollagenfibrillen auf dem Substrat und der Ausrichtung der Fibrillen erreicht werden und die Kollagenmodelloberflächen auf diese Weise gezielt an native Gegebenheiten angepasst werden. Ein wesentlicher Teil der Aufgabe besteht demnach in der gezielten Steuerung der Morphologie und Ausrichtung

der Fibrillen an der Grenzfläche. Darüber hinaus sollen derartige Modelloberflächen auf verschiedenen Trägermaterialien präparierbar sein.

[0009] Die Lösung der Aufgabe der Erfindung besteht in Kollagenfibrillenmatrices, die aus einem Verfahren zur Beschichtung von Trägern mit Kollagenfibrillenmatrices definierter Struktur aus strömenden Lösungen erhältlich sind. Erfindungsgemäß werden die Größe, Form und Ausrichtung der resultierenden Kollagenfibrillen sowie die Bedeckungsdichte der Träger mit Kollagen und die Struktur der Schichten gezielt durch die Variation von einem oder mehreren verschiedenen Parametern gesteuert. Zu der Gruppe der zu variierenden Parameter zur Steuerung zählen:

- die Substratmaterialien,
- die oberflächenaktiven Beschichtungen auf den Substratmaterialien,
- die Konzentration der Lösung,
- die Fibrillierzeit und
- die fluiddynamischen Randbedingungen im Abscheideprozess.

[0010] Mithilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die in vitro Abscheidung von Kollagenfibrillen auf verschiedenen Materialgrenzflächen möglich.

[0011] Vorzugsweise wird die Kollagenlösung mittels einer Pumpe durch einen Mikrokanal gefördert, wobei der zu beschichtende Träger die Unterseite des Kanals bildet. Die Fibrillen der Kollagenlösung werden durch die Scherwirkung der strömenden Flüssigkeit auf dem Probeträger ausgerichtet. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Herstellung von Kollagenfibrillenmatrices, die durch das Einstellen von definierten Parametern in ihrer Morphologie kontrollierbar sind. Nach der Konzeption der Erfindung ist das Verfahren nicht allein auf den Effekt des Ausrichtens der Kollagenstrukturen beschränkt, sondern bietet vielmehr die Möglichkeit, in einer Kollagenstruktur verschiedene Matrices zu erzeugen und durch verschiedene Parameter, wie die Scherbedingungen, die Konzentration/Präparation der Lösung und die Substratauswahl, gezielt zu kontrollieren.

[0012] Die erfindungsgemäße Methode erlaubt die gezielte Variation der Fibrillenform/Morphologie und bietet damit die Möglichkeit, native Zustände durch die Erzeugung von Kollagenmodelloberflächen nachzustellen. Die im Stand der Technik erwähnten Methoden erzeugen im Gegensatz dazu unter anderem dazu stark artifizielle Kollagenmatrices. So unterscheiden sich die „Kollagenbändermatrices“ nach Jiang et al., *Microscopy Research and Technique* 64 (2004) 435–440, und die mit Magnetkugeln versetzten Kollagenmatrices nach Guo und Kaufman, *Biomaterials* 28 (2007) 1105–1114, hinsichtlich ihrer Struktur und Zusammensetzung erheblich von nativen Kollagenfibrillenmatrices. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber den bisher bekannten Verfahren besteht in der signifikant höheren Qualität der Ausrichtung. Während die im Stand der Technik erwähnten Methoden eine grobe Ausrichtung von Kollagengelen erzielen, lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einzelne Fibrillen gezielt auf einem vorzugsweise planaren Träger ausrichten.

[0013] In einer ersten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens findet die Fibrillogenese in der strömenden Lösung statt. Dazu wird vorzugsweise eine gekühlte Kollagenlösung aus einem Vorratsbehälter durch temperierte Schläuche gepumpt und gleichzeitig erwärmt. Dadurch kommt es zum Beginn des Assemblierungsprozesses. In einer vorteilhaften Ausführung beträgt die Temperatur der zunächst gekühlten Kollagenlösung 4°C, während die Schläuche auf 37°C temperiert werden. Die gebildeten Kollagenfibrillen werden im Anschluss durch das definierte Überströmen der Substratoberfläche im Mikrokanal abgeschieden und gleichzeitig ausgerichtet. Die Fibrillengröße korreliert mit der Fibrillierzeit und somit mit der Schlauchlänge und der Flussrate im System. Durch die Erhöhung der Kollagenkonzentration nimmt die Belegungsdichte an Kollagen zu.

[0014] In einer zweiten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine vorfibrillierte Kollagenlösung eingesetzt. Die Fibrillenlösung wird vor der Anwendung homogenisiert und zentrifugiert. Vorzugsweise wird sechs Minuten lang bei 1000 g (g = mittlere Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Durch diese Prozedur wird eine gleichmäßige Zusammensetzung der Lösung gewährleistet. Abweichend zu der oben genannten ersten Variante wird der Versuchsaufbau bei konstanter Temperatur im gesamten System betrieben. Alle anderen Verfahrensparameter wie die Scherrate und die Abmessungen des Kanals sind ebenfalls konstant. Mit dieser Variante können Matrices mit sehr hoher Orientierung in Flussrichtung erzielt werden.

[0015] Vorteilhafterweise wird die Ausrichtung der Kollagenfibrillen durch die Wahl der Flussrate gesteuert.

[0016] In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung erfolgt die Beeinflussung der Belegungsdichte durch die Wahl der oberflächenaktiven Beschichtung auf dem Substrat. Vorzugsweise wird dabei das Material für die oberflächenaktive Beschichtung mit Blick auf die hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften ausgewählt.

Die Möglichkeit, die Belegungsdichte mit Kollagen durch die Wahl des Substrats bzw. die oberflächenaktive Beschichtung zu steuern, bietet einen weiteren Vorteil gegenüber den bisherigen Verfahren, die mitunter ausschließlich auf ein Substrat limitiert sind, wie zum Beispiel – gemäß Jiang et al., Microscopy Research and Technique 64 (2004) 435–440 – auf Glimmer.

[0017] Vorzugsweise wird als Substratmaterial Glas verwendet. Als oberflächenaktive Beschichtung des Substratmaterials wird in einer Ausgestaltung der Erfindung ein hydrophober Polymerdünnfilm eingesetzt. Hierbei eignet sich insbesondere Poly(octadecen-alt-maleinsäure) (POMSA). In einer anderen Ausgestaltung der Erfindung wird das Substratmaterial mit einer oberflächenaktiven Beschichtung in Form eines hydrophilen Polymerdünnfilms versehen, vorzugsweise mit Poly(ethylen-alt-maleinsäure) (PEMSA).

[0018] In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung wird die resultierende Belegungsdichte durch die Einstellung der Lösungskonzentration beeinflusst. Als mögliche unterschiedliche Lösungskonzentrationen werden zum Beispiel 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml oder 0,8 mg/ml verwendet.

[0019] Der Kollagenfibrillenmatrixen werden durch die Adsorption auf vorzugsweise planare Träger aufgebracht.

[0020] In einer weiteren Ausführung der Erfindung wird durch die Scherrate die Belegungsdichte variiert. Außerdem kann durch die Wahl unterschiedlicher Scherraten die Ausrichtung der Fibrillen auf dem Träger variiert werden, während die Fibrillengröße durch die Wahl unterschiedlicher Fibrillierzeiten variiert wird.

[0021] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, einschließlich der oben beschriebenen Ausführungen, werden gerichtete Kollagenfibrillen in vitro nachgestellt. Diese Strukturen sind, als häufig vorkommende Strukturen der extrazellulären Matrix, für die Untersuchung von Zell-Matrix-Interaktionen wie Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung relevant.

[0022] Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen mit Bezugnahme auf die zugehörigen Zeichnungen. Es zeigen:

[0023] Fig. 1: aus 0,8 mg/l konzentrierter Kollagenlösung erhaltene Kollagenmatrixen bei Vorfibrillierzeiten von 5 min, 10 min und 30 min,

[0024] Fig. 2: aus 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,8 mg/ml konzentrierter Kollagenlösung erhaltene Kollagenmatrixen bei einer Vorfibrillierzeit von 5 min,

[0025] Fig. 3: aus vorfibrillierter Kollagenlösung erhaltene Kollagenmatrixen,

[0026] Fig. 4: den Einfluss des Substrats beziehungsweise der oberflächenaktiven Beschichtung auf die Belegungsdichte anhand eines Diagramms und

[0027] Fig. 5: die Ausrichtung von Kollagenfibrillen auf verschiedenen oberflächenaktiven Beschichtungen.

[0028] Die erfindungsgemäßen Kollagenfibrillenmatrixen wurden nach zwei verschiedenen Verfahrensvarianten erhalten.

Variante 1:

[0029] Eine gekühlte Kollagenlösung wird aus dem Vorratsbehälter durch temperierte Schläuche gepumpt und gleichzeitig erwärmt. Dadurch kommt es zum Beginn des Assemblierungsprozesses. Die gebildeten Kollagenfibrillen werden im Anschluss durch das definierte Überströmen der Substratoberfläche im Mikrokanal abgeschieden und gleichzeitig ausgerichtet. Die Fibrillengröße korreliert mit der Fibrillierzeit und somit mit der Schlauchlänge und der Flussrate im System. Durch die Erhöhung der Kollagenkonzentration nimmt die Belegungsdichte an Kollagen zu.

Variante 2:

[0030] Für Variante 2 kommt eine bereits ausfibrillierte Kollagenlösung zur Anwendung. Die Fibrillenlösung wird vor der Anwendung homogenisiert und zentrifugiert. Durch diese Prozedur wird eine gleichmäßige Zusammensetzung der Lösung gewährleistet. Abweichend zu Variante 1 wird der Versuchsaufbau bei konstanter

Temperatur im gesamten System betrieben. Alle anderen Verfahrensparameter wie die Scherrate und die Abmessungen des Kanals sind dabei ebenfalls konstant (siehe Tabelle 1). Mit dieser Variante können Matrices mit sehr hoher Orientierung in Flussrichtung erzielt werden.

[0031] Alle Kollagenmatrices wurden unter den Bedingungen nach Tabelle 1 erzeugt

Tabelle 1: Parameter für die Erzeugung von Kollagenmatrices

Maße Rechteckkanal:	Länge: 1 cm Breite: 1 mm Höhe: 200 µm
Volumenstrom:	0,011 ml/min
Scherrate:	220 s ⁻¹
Strömungsdauer durch Kanal	1 Stunde
verschiedene verwendete Substrate:	– gereinigte Glasprobenträger mit einem hydrophoben Polymerdünnfilm Poly(octadecen-alt-maleinsäure) (POMSA), – gereinigte Glasprobenträger mit einem hydrophilen Polymerdünnfilm Poly(ethylen-alt-maleinsäure) (PEMSA) – Glas

[0032] Die Fig. 1 zeigt Abbildungen von Kollagenmatrices, die mit anfangs bei 4°C gekühlter, 0,8 mg/ml konzentrierter Kollagenlösung nach Variante 1 auf einem gereinigten Glasprobenträger mit einem hydrophoben Polymerdünnfilm Poly(octadecen-alt-maleinsäure) (POMSA) erzeugt wurden. Die Fibrillen entstehen während des Strömens im Schlauch, der auf 37°C temperiert wurde. Die mittlere Verweildauer im Schlauch betrug bei den Versuchen zu den Abbildungen der ersten Spalte (A) zwei Minuten, bei den Versuchen zu den Abbildungen der zweiten Spalte (B) 10 min; bei den Versuchen zu den Abbildungen der dritten Spalte (C) 30 min. Im Anschluss daran erfolgte ein einstündiges Durchströmen des Kanals.

[0033] Die Fig. 2 zeigt Abbildungen von Kollagenmatrices, die mit anfangs bei 4°C gekühlter, (A) 0,2 mg/ml, (B) 0,4 mg/ml, (C) 0,8 mg/ml konzentrierter Kollagenlösung nach 5 min Vorströmen nach Variante 1 auf einem gereinigten Glasprobenträger mit einem hydrophoben Polymerdünnfilm Poly(octadecen-alt-maleinsäure) (POMSA) erzeugt wurden. Die Fibrillen entstehen während des Strömens im Schlauch, der auf 37°C temperiert wurde.

[0034] Die Fig. 3 beinhaltet Abbildungen, die Kollagenmatrices zeigen, welche jeweils mit einer nach Variante 2 vorfibrillierten Kollagenlösung auf einem gereinigten Glasprobenträger mit einem hydrophoben Polymerdünnfilm Poly(octadecen-alt-maleinsäure) (POMSA) erzeugt wurden. Die vorfibrillierte Kollagenlösung wurde homogenisiert und für 6 Minuten bei 1000 g (g = mittlere Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Die Abbildungen wurden entlang der Mittelachse des beschichteten Trägers aufgenommen.

[0035] Die Fig. 4 zeigt ein Diagramm, aus dem der Einfluss des Substrats beziehungsweise der oberflächenaktiven Beschichtung auf die Belegungsdichte an Kollagen hervorgeht. Als unterschiedliche Substrate wurden jeweils verwendet:

- gereinigte Glasprobenträger mit einem hydrophoben Polymerdünnfilm Poly(octadecen-alt-maleinsäure) (POMSA),
- gereinigte Glasprobenträger mit einem hydrophilen Polymerdünnfilm Poly(ethylen-alt-maleinsäure) (PEMSA) und
- Glas.

[0036] Die Fig. 4 verdeutlicht, dass mit der Erhöhung der Hydrophobizität der Substratoberfläche auch die resultierende Belegungsdichte an Kollagen steigt.

[0037] Die Fig. 5 zeigt die jeweilige Ausrichtung von Kollagenfibrillen am Eingang, der Mitte und dem Ausgang des Kanals auf den verschiedenen oberflächenaktiven Beschichtungen Poly(octadecen-alt-maleinsäure)

(POMSA), Poly(ethylen-alt-maleinsäure) (PEMSA) und Glas nach einem Verfahren nach Variante 2. Dabei entspricht die Ausrichtung mit dem Betrag 0° der Flussrichtung parallel zu den Kanalwänden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Beschichtung von Trägern mit Kollagenfibrillenmatrices definierter Struktur und Morphologie aus strömenden Lösungen, bei dem

- die Kollagenlösung durch einen Mikrokanal bewegt wird, wobei der zu beschichtende Träger die Unterseite des Kanals bildet,
- die Fibrillen der Kollagenlösung durch die Scherwirkung der strömenden Flüssigkeit auf dem Probenträger ausgerichtet werden,
- die Steuerung von Struktur und Morphologie durch Variation von einem oder mehreren verschiedenen Parametern erfolgt, wobei die Gruppe der zu variierenden Parameter
 - die Substratmaterialien,
 - die oberflächenaktiven Beschichtungen auf den Substratmaterialien,
 - die Konzentration der Lösung,
 - die Fibrillierzeit und
 - die fluiddynamischen Randbedingungen im Abscheideprozess umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein planarer Träger verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Substratmaterial Glas verwendet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass als oberflächenaktive Beschichtung des Substratmaterials ein hydrophober Polymerdünnsfilm eingesetzt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass als hydrophober Polymerdünnsfilm Poly(octadecen-alt-maleinsäure) (POMSA) verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass als oberflächenaktive Beschichtung des Substratmaterials ein hydrophiler Polymerdünnsfilm eingesetzt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass als hydrophiler Polymerdünnsfilm Poly(ethylen-alt-maleinsäure) (PEMSA) verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fibrillogenese in der strömenden Lösung stattfindet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass gekühlte Kollagenlösung aus einem Vorratsbehälter durch temperierte Schläuche gepumpt und gleichzeitig erwärmt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Temperatur der gekühlten Kollagenlösung 4°C beträgt und die Schläuche auf 37°C temperiert werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine vorfibrillierte Kollagenlösung eingesetzt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die vorfibrillierte Kollagenlösung vor der Anwendung homogenisiert und zentrifugiert wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass im gesamten System die Temperatur konstant gehalten wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Belegungsdichte durch die Scherrate variiert wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Belegungsdichte durch die Lösungskonzentration variiert wird.

16. Verfahren nach einem der Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass jeweils als unterschiedliche Lösungskonzentrationen (A) 0,2 mg/ml, (B) 0,4 mg/ml und (C) 0,8 mg/ml angewendet werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fibrillengröße durch die Fibrillierzeit variiert wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Ausrichtung durch die Scherrate variiert wird.

Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

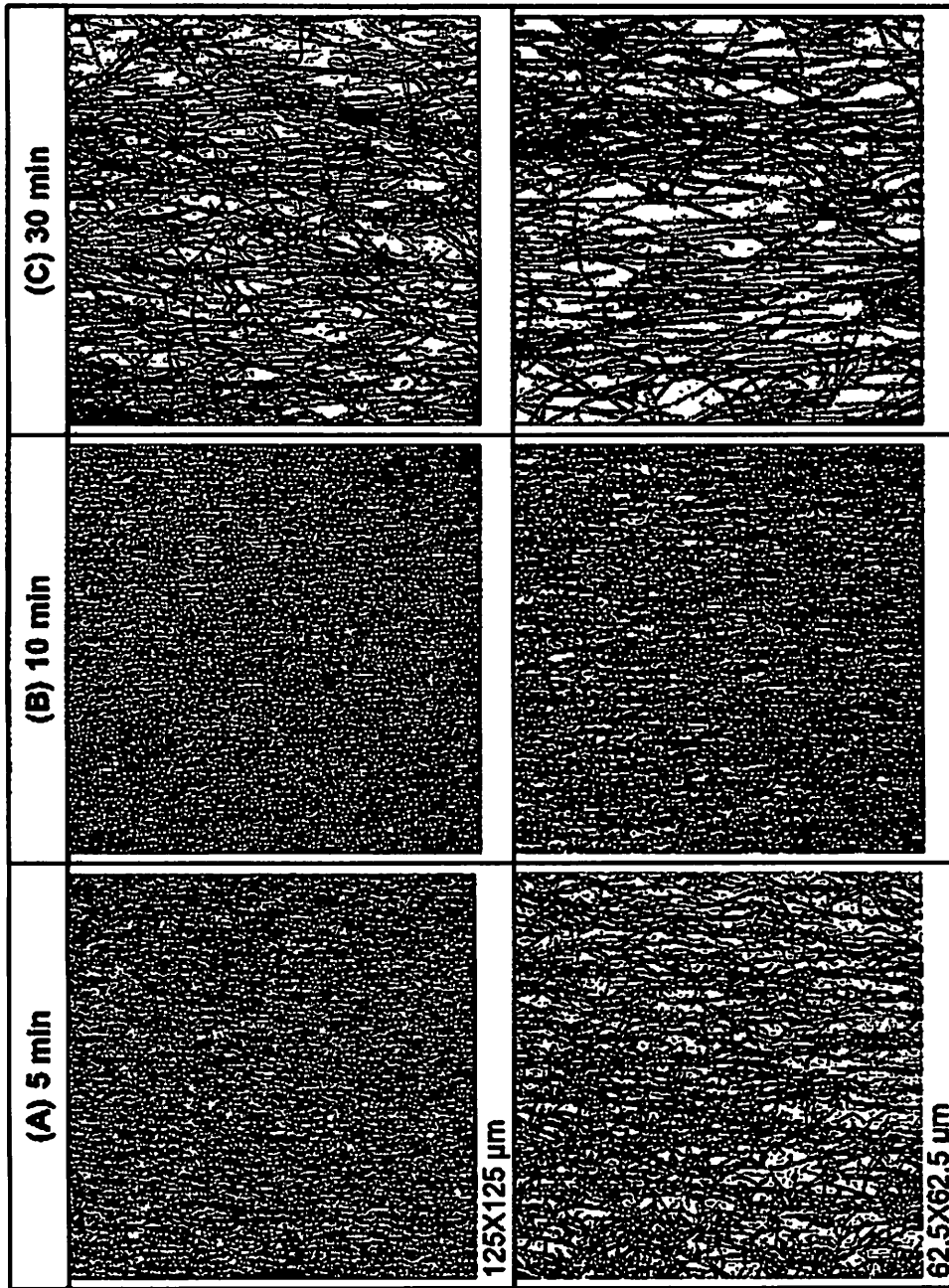


Fig. 1

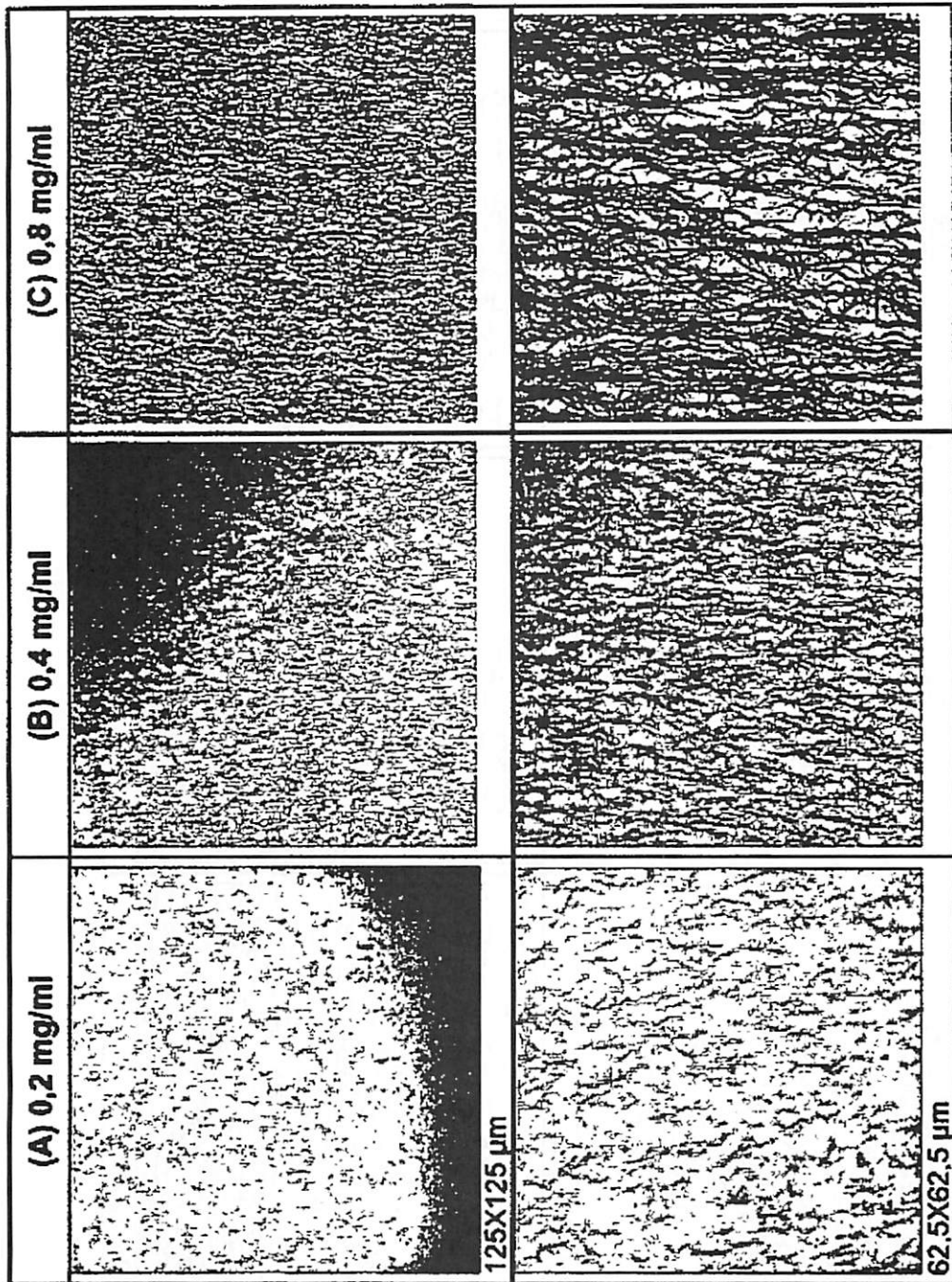


Fig. 2

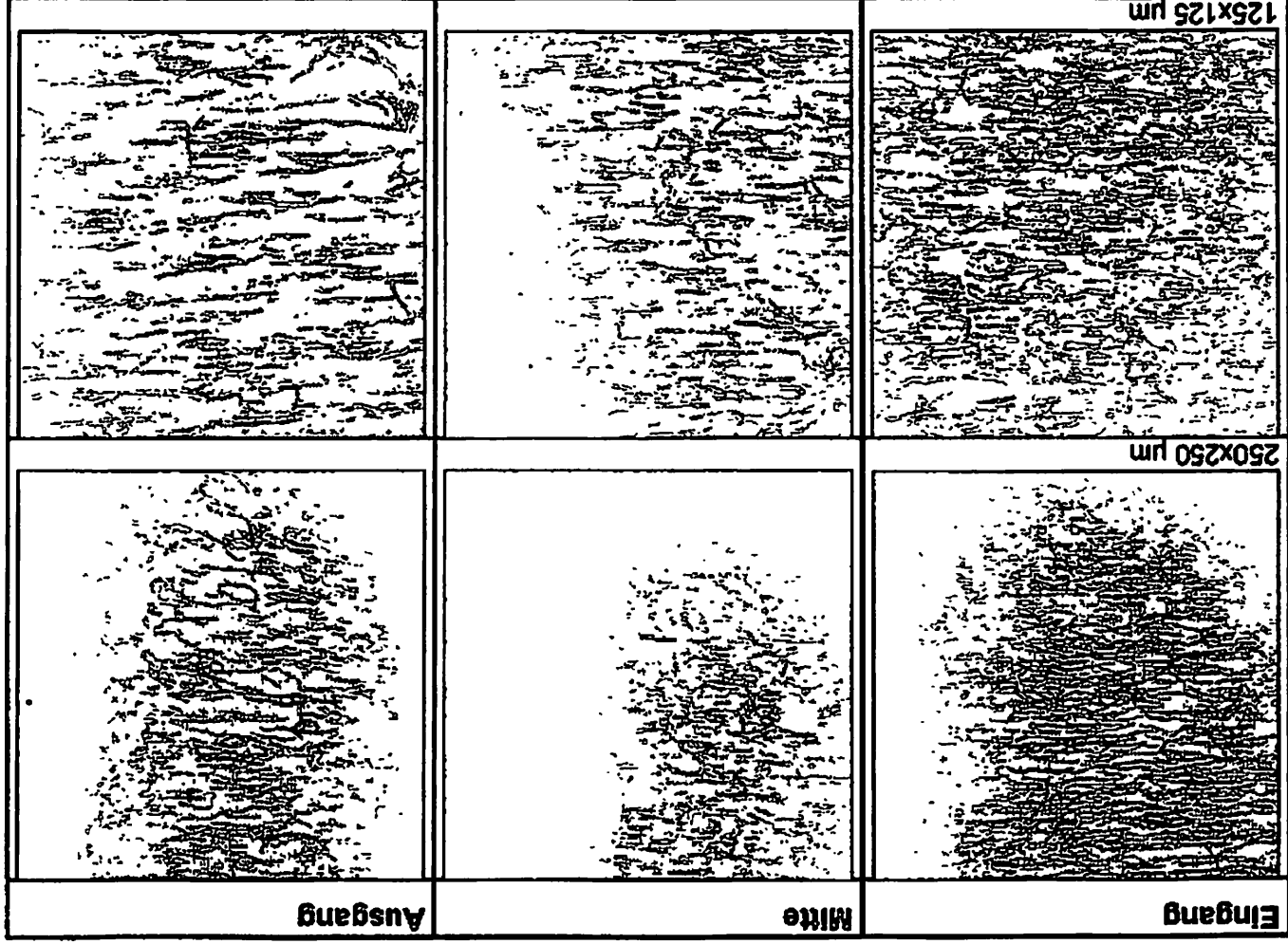


Fig. 3

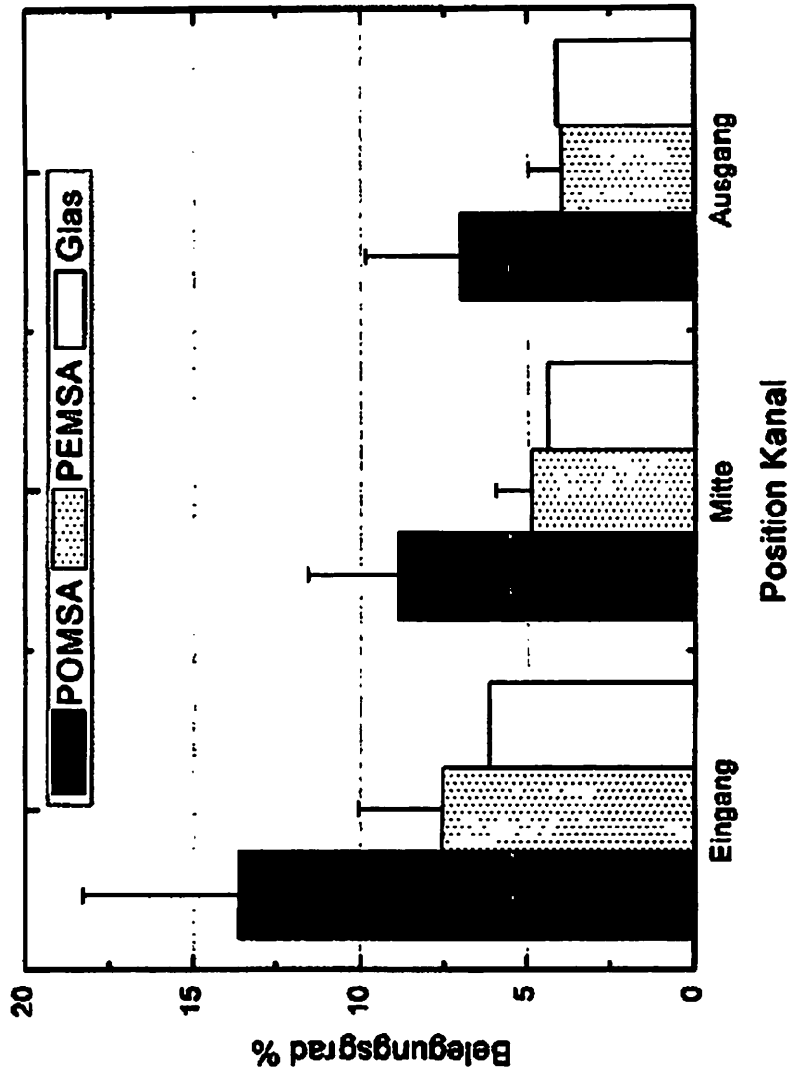


Fig. 4

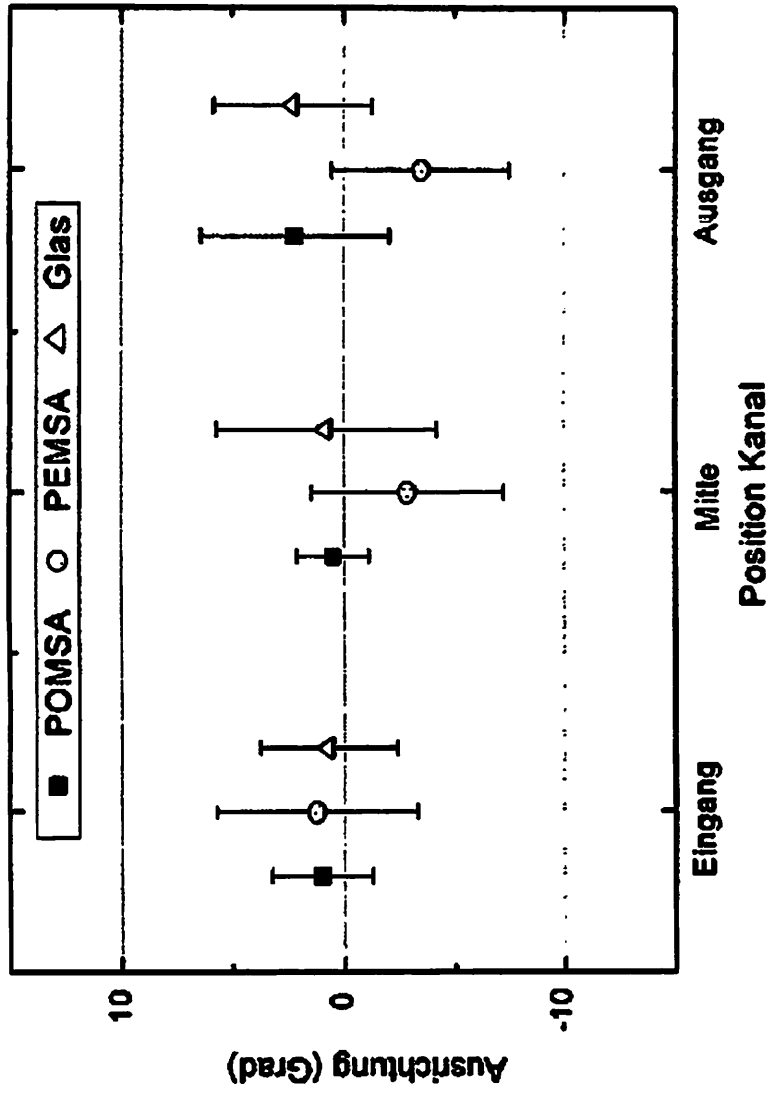


Fig. 5