



(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2011 002 839.0**
 (22) Anmeldetag: **18.01.2011**
 (43) Offenlegungstag: **19.07.2012**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **05.02.2015**

(51) Int Cl.: **C12N 11/02 (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

(56) Ermittelter Stand der Technik:
DE 103 15 930 A1

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

Decaris, M. et al. "Design of Experiments Approach to Engineer Cell-Secreted Matrices for Directing Osteogenic Differentiation", Annals of Biomedical Engineering, Vol. 39, No. 4, 1 December, 2010, S. 1174-1185

(72) Erfinder:
Prewitz, Marina, M.Sc., 01099 Dresden, DE;
Freudenberg, Uwe, Dr-Ing., 01328 Dresden, DE;
Werner, Carsten, Prof.Dr.rer.nat., 01069 Dresden, DE

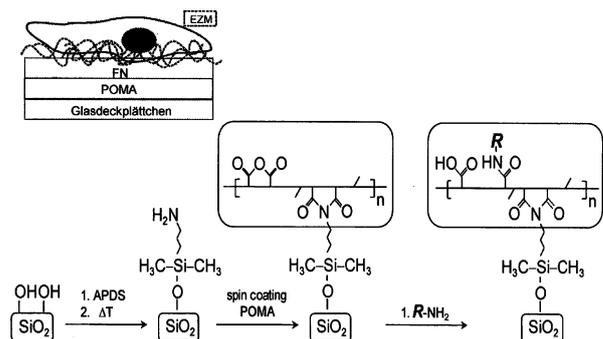
T. Pompe et al. Biomaterials 30, (2009) 35-44

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Immobilisierung und Aufbereitung funktioneller Multikomponentenstrukturen der extrazellulären Matrix**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Immobilisierung und Aufbereitung funktioneller Multikomponentenstrukturen der extrazellulären Matrix (EZM), umfassend die aufeinander folgenden Verfahrensschritte:

- kovalente Bindung einer Haftvermittlerschicht auf Zellkulturträgern;
 - Kultivierung von Zellen eines gewünschten Typs auf der Haftvermittlerschicht und somit Immobilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) durch Abscheidung und Anbindung an die Haftvermittlerschicht;
 - Anwendung eines Dezellularisierungsprotokolls, um matrixsezernierende Zellen von der Oberfläche zu entfernen und gleichzeitig die Struktur und Funktionalität der darunterliegenden, mit dem Haftvermittler verbundenen immobilisierten extrazellulären Matrix (EZM) zu erhalten; und
 - eine Funktionalisierung der nach den Verfahrensschritten a) bis c) aufbereiteten extrazellulären Matrix (EZM) mit Signalmolekülen,
- dadurch gekennzeichnet, dass in Verfahrensschritt c) Schichten, die aus den in Verfahrensschritt b) kultivierten Zellen abgeleitet sind, und die extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten in einer Dezellularisierungslösung, die sich aus einer Mischung
- aus oberflächenaktiven Substanzen, organischen Lösungsmitteln, Säuren oder Basen und physiologischer Salzlösung oder

- aus oberflächenaktiven Substanzen, Säuren oder Basen und komplexbildenden Substanzen oder
 - aus Säuren oder Basen, komplexbildenden Substanzen, Enzymen und physiologischer Salzlösung
- zusammensetzt, in einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C inkubiert und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen werden.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung und Aufbereitung funktioneller Multikomponentenstrukturen der extrazellulären Matrix.

[0002] Die in vitro Kultivierung von Zellen erfordert spezielle Methoden und Prozeduren, um Bedingungen zu schaffen, die denen im lebenden Organismus möglichst stark ähneln. Hierfür ist neben der Einstellung der Temperatur, der Gaszusammensetzung und der Komponenten der Nährlösung auch die Wahl der die Zelle umgebenden Materialien entscheidend. Gegenwärtig kommen in diesem Bereich unterschiedliche Kunststoffträger in Form von Einmalartikeln zum Einsatz, die als sogenannte TCP (= Tissue Culture Plastic) meist aus Polystyren bestehen. Die Zellen werden dabei direkt auf den Kunststoffoberflächen kultiviert. Die natürliche Zellumgebung, die sogenannte extrazelluläre Matrix, wird im Gegensatz dazu durch ein hochkomplexes Netzwerk aus supramolekularen Strukturen von Molekülen, wie Kollagen, Elastin, Proteoglykanen und Glykoproteinen, gebildet. Diese extrazelluläre Matrix reguliert und beeinflusst in ihrer Zusammensetzung die normale Funktion von Gewebearchitektur, Mikromilieu und Zellregulation. Wie aus der Druckschrift Lutolf, M. P. & Hubbell, J. A. „Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering“, Nature biotechnology 23, 47–55 (2005), bekannt ist, nimmt dieses Mikromilieu der Zelle einen entscheidenden Einfluss auf Zellschicksalsentscheidungen, wie zum Beispiel Wachstum und Differenzierung der Zellen, und wird somit als einer der Schlüsselfaktoren bei der Untersuchung von Entwicklung und Regulation derartiger biologischer Systeme betrachtet. Um dieses komplexe Milieu und dessen Einfluss auf die Zelle zu untersuchen, werden gegenwärtig in der Forschung und auch teilweise in kommerziellen Produkten in vitro unterschiedliche Bestandteile der extrazellulären Matrix künstlich aufbereitet und in Form von einfachen Beschichtungen als Zellkulturträger zur Verfügung gestellt. Fundstellen für entsprechenden Stand der Technik sind die Druckschriften

- Bio-One, G. CellCoat – Protein Coated Cell Culture Vessels. [http://www.greinerbioone.com/en/germany/articles/catalogue/articlegroups/23_1/\(2010\)](http://www.greinerbioone.com/en/germany/articles/catalogue/articlegroups/23_1/(2010)),
- Millipore 24-well Plate with Collagen I coating. <http://www.millipore.com/catalogue/item/picl24p05> (2010), sowie
- Millipore 6-well Plate with Fibronectin Coating. <http://www.millipore.com/catalogue/item/pifb06p05> (2010).

[0003] Gegenwärtig werden hierfür einzelne Komponenten, beispielsweise Kollagen I oder Fibronectin, oder Kombinationen aus mehreren von natürlichen Quellen isolierten Bestandteilen der extrazellulären

Matrix verwendet, um TCP-Oberflächen zu funktionalisieren, wobei die meisten Ansätze adsorptiv, nicht kovalent gebundene Biomoleküle verwenden. Funktionalisierungen mit Einzelkomponenten ermöglichen jedoch nur die Untersuchung einzelner Parameter der extrazellulären Matrix; die Eigenschaften sind noch immer weit von der in vivo Situation entfernt. Speziell die Netzwerkcharakteristik der extrazellulären Matrix, welche auch die Kultivierung der Zellen in komplexen 3D-Strukturen erlaubt, sowie die Fähigkeit, Signalmoleküle wie Cytokine oder Chemokine reversibel zu binden, sind aufgrund der Nutzung einzelner Bestandteile der extrazellulären Matrix erheblich eingeschränkt.

[0004] Ein weiterer Anwendungsnachteil besteht in der gegenwärtig meist nur adsorptiven Kopplung der Komponenten der extrazellulären Matrix auf den Substraten, wodurch keine Delaminationsstabilität gewährleistet wird. In Zellkulturanwendungen sind jedoch häufige Wasch- beziehungsweise Austauschschritte, zum Beispiel Mediumwechsel, Waschschriffe vor der Fixierung und Färbung der Zellen, notwendig, bei denen bedingt durch den Flüssigkeitsaustausch Scherbelastungen auf die funktionellen Beschichtungen wirken. Die meisten derzeit etablierten funktionellen Beschichtungen haben mitunter massive Stabilitätsprobleme.

[0005] Aus Pompe, T. et al.: „The impact of primary and secondary ligand coupling on extracellular matrix characteristics and formation of endothelial capillaries“, Biomaterials 30, (2009), Seiten 35 bis 44, sind Zellkulturträger mit aminosilanisierten Silikon-Mikrostrukturen der Grundsubstratoberfläche bekannt, an die Maleinsäureanhydrid-Copolymere kovalent gekoppelt sind. An die Maleinsäureanhydrid-Copolymere sind wiederum Proteine (Fibronectin) gekoppelt, die zunächst die äußere Beschichtung des Zellkulturträgers bilden, auf der dann Zellen platziert werden, die extrazelluläre Matrix (EZM) abscheiden.

[0006] In der Druckschrift DE 103 15 930 A1 ist ein Verfahren zur Vaskularisierung von künstlichen Materialien mit Endothelzellen beschrieben, bei dem a) das künstliche Material mit hydrophoben und hydrophilen funktionellen Gruppen angereichert wird, b) ein Matrixprotein an der modifizierten Oberfläche schwach adsorbiert wird, wonach c) Endothelzellen am Matrixprotein angesiedelt werden und die schwache Adsorption der Matrixproteine auf dem Copolymer eine dreidimensionale Selbststrukturierung der Endothelzellen mit dem Matrixprotein zulässt. Die Oberfläche des künstlichen Trägermaterials kann dabei zum Beispiel mit einem Polymer überzogen werden, das sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen aufweist. Die Vaskularisierung wird unabhängig von den Wachstumsbedingungen durch die physikochemischen Eigenschaften der Trägerstrukturgrenzfläche gesteuert. Die Matrixproteine sind nur

in geringer Dichte kovalent angebunden beziehungsweise irreversibel adsorbiert. Anderweitig sind die Matrixproteine nur in geringer Stärke adsorptiv gebunden, so dass sie noch durch Endothelzellen umlagert werden können. Dadurch bilden sich dreidimensionale Netzwerke der extrazellulären Matrixproteine. Diese Anbindungscharakteristik betrifft voradsorbierte und von den Zellen in der Kultur sezernierte Matrixproteine gleichermaßen.

[0007] Bei Decaris, M. et al.: „Design of Experiments Approach to Engineer Cell-Secreted Matrices for Directing Osteogenic Differentiation“, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 39, No. 4, 1 December 2010, Seiten 1174 bis 1185, ist eine Dezellularisierung von Zellschichten beschrieben, die mit einer Dezellularisierungslösung aus 0,1% Triton-x-100 und 20 mM Ammoniumhydroxid in PBS erfolgt. Nicht beschrieben ist die Verankerung von dezellularisierten Matrixschichten.

[0008] Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung funktioneller Beschichtungen auf Zellkulturträgern, die der natürlichen Zellumgebung weitgehend entsprechen und delaminationsstabil gegenüber mechanischen Belastungen, insbesondere Scherbelastungen beim Flüssigkeitsaustausch und bei Waschschritten, sind.

[0009] Die Lösung der Aufgabe der Erfindung besteht in einem Verfahren zur Immobilisierung und Aufbereitung funktioneller Multikomponentenstrukturen der extrazellulären Matrix (EZM), umfassend die aufeinander folgenden Verfahrensschritte:

- a) kovalente Bindung einer Haftvermittlerschicht auf Zellkulturträgern;
- b) Kultivierung von Zellen eines gewünschten Typs auf der Haftvermittlerschicht und somit Immobilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) durch Abscheidung und Anbindung an die Haftvermittlerschicht;
- c) Anwendung eines Dezellularisierungsprotokolls, um matrixsezernierende Zellen von der Oberfläche zu entfernen und gleichzeitig die Struktur und Funktionalität der darunterliegenden, mit dem Haftvermittler verbundenen immobilisierten extrazellulären Matrix (EZM) zu erhalten; und
- d) eine Funktionalisierung der nach den Verfahrensschritten a) bis c) aufbereiteten extrazellulären Matrix (EZM) mit Signalmolekülen.

[0010] Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden natürliche extrazelluläre Matrices dezellularisiert und die dadurch gewonnenen Netzwerke bedarfsgerecht als weitgehend naturidentische Zellumgebung in Zellkulturanwendungen eingesetzt. Der Fokus liegt dabei auf einer weitgehenden Erhaltung der ursprünglichen Funktionalität der Strukturen der extrazellulären Matrix, besonders in Bezug auf Adhäsivität und der Beladbarkeit mit Signalmolekü-

len. Ein weiterer Vorteil liegt in der stabilen Anbindung der Matrix an das Substrat. Hierfür wird durch die kovalente Anbringung beziehungsweise Nutzung des Haftvermittlers eine auch unter Scherbelastungen delaminationsstabile Kopplung der Materialien gewährleistet.

[0011] Die zuvor aufgezeigten Eigenschaften werden durch das mehrstufige Immobilisierungs- und Aufreinigungsverfahren erreicht. Im ersten Verfahrensschritt a) wird auf Einweg-Zellkulturträgern aus Kunststoff (TCP) oder anderen Zellkulturträgern, zum Beispiel Deckgläsern, sogenannten mikrostrukturierter Kunststoffoberflächen oder Zellkulturträgern mit sogenannten 3D-Strukturen, insbesondere poröse Materialien oder Gewebesheets, die Haftvermittlerschicht kovalent gebunden. Als Haftvermittlerschicht zur Stabilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) sind gemäß einer Ausführungsvariante der Erfindung Carbonsäuregruppen tragende Polymere vorgesehen. In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind als Haftvermittlerschicht zur Stabilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) Maleinsäureanhydrid-Copolymere vorgesehen. Dabei wird bevorzugt ein als Haftvermittlerschicht verwendetes Maleinsäureanhydrid-Copolymer aus einer Gruppe ausgewählt, die die Copolymere Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA), Poly(propen-alt-maleinsäureanhydrid) (PPMA), Poly(styren-alt-maleinsäureanhydrid) (PSMA) und Poly(ethylen-alt-maleinsäureanhydrid) (PEMA) umfasst. Ebenso können als Haftvermittlerschicht zur Stabilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) Polyacrylate verwendet werden.

[0012] Auf dem Haftvermittler werden im Anschluss daran im zweiten Verfahrensschritt b) zuerst eine Schicht eines EZM-Proteins kovalent gebunden, auf welcher dann Zellen eines gewünschten Organismus kultiviert und somit die von ihnen sezernierte Matrix abgeschieden und an die Haftvermittlerschicht angebonden wird. Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens werden dabei als zu kultivierende Zellen mesenchymale Stammzellen verwendet. Ebenso können in Verfahrensschritt b) auch fibroblastenartige Zelllinien kultiviert werden.

[0013] Im Anschluss an Verfahrensschritt b) wird in einem dritten Verfahrensschritt c) ein Dezellularisierungsprotokoll angewandt, um die matrixsezernierenden Zellen von der Oberfläche zu entfernen und gleichzeitig die Struktur und Funktionalität der darunterliegenden, mit dem Haftvermittler verbundenen Matrix zu erhalten. Das heißt, es erfolgt zunächst die Entfernung/Auflösung/Zersetzung der vorhandenen Zellschicht, zum Beispiel durch Auflösen der Zellmembran. Dabei werden die funktionellen Bestandteile der extrazellulären Matrix, die durch einige

der für die Dezellularisierung benötigten Reagenzien auch angegriffen werden können, erhalten.

[0014] In einer Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Verfahrensschritt c) die Schichten, die aus den in Verfahrensschritt b) kultivierten Zellen abgeleitet sind, zum Beispiel Stammzellenschichten (MSC) oder von fibroblastenartigen Zelllinien abgeleitete Schichten, und die extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten in einer Dezellularisierungslösung, die sich aus einer Mischung aus oberflächenaktiven Substanzen (Tensiden), organischen Lösungsmitteln, Säuren oder Basen und physiologischer Salzlösung zusammensetzt, in einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C inkubiert und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Als organisches Lösemittel wird bevorzugt Tri(n-butyl)phosphat eingesetzt.

[0015] Alternativ werden in Verfahrensschritt c) die Schichten, die aus den in Verfahrensschritt b) kultivierten Zellen abgeleitet sind, zum Beispiel die Stammzellenschichten (MSC) oder die von fibroblastenartigen Zelllinien abgeleiteten Schichten, und die extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten in einer Dezellularisierungslösung, welche sich aus einer Mischung aus oberflächenaktiven Substanzen (Tensiden), Säuren oder Basen und komplexbildenden Substanzen zusammensetzt, in einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C inkubiert und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen.

[0016] In den genannten Verfahrensvarianten ist der Einsatz von oberflächenaktiven Substanzen in Verfahrensschritt c) vorgesehen. Als oberflächenaktive Substanz/Substanzen wird/werden eine oder mehrere der Substanzen Natriumdodecylsulfat (SDS), Triton X-200, Natriumdeoxycholat (SDC) und lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS) eingesetzt.

[0017] In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung werden in Verfahrensschritt c) die Schichten, die aus den in Verfahrensschritt b) kultivierten Zellen abgeleitet sind, zum Beispiel die mesenchymalen Stammzellenschichten (MSC) oder die von fibroblastenartigen Zelllinien abgeleiteten Schichten, und die extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten in einer Dezellularisierungslösung, welche sich aus einer Mischung aus Säuren oder Basen, komplexbildenden Substanzen, Enzymen und physiologischer Salzlösung zusammensetzt, in einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C inkubiert und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Als Enzym/Enzyme finden vorzugsweise ein oder mehrere der Enzyme Trypsin, Endonucleasen, Exonucleasen Anwendung.

[0018] Eine weitere erfindungsgemäße Variante besteht in einem Verfahren zur Immobilisierung und

Aufbereitung funktioneller Multikomponentenstrukturen der extrazellulären Matrix (EZM), umfassend die aufeinander folgenden Verfahrensschritte:

- a) kovalente Bindung einer Haftvermittlerschicht auf Zellkulturträgern;
- b) Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen eines gewünschten Typs auf der Haftvermittlerschicht und somit Immobilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) durch Abscheidung und Anbindung an die Haftvermittlerschicht;
- c) Anwendung eines Dezellularisierungsprotokolls, um matrixsezernierende Zellen von der Oberfläche zu entfernen und gleichzeitig die Struktur und Funktionalität der darunterliegenden, mit dem Haftvermittler verbundenen immobilisierten extrazellulären Matrix (EZM) zu erhalten; und
- d) eine Funktionalisierung der nach den Verfahrensschritten a) bis c) aufbereiteten extrazellulären Matrix (EZM) mit Signalmolekülen.

[0019] Es findet dabei in Verfahrensschritt c) eine Dezellularisierungslösung Anwendung, die sich aus 5 Prozent Triton x-100 und 20 Millimol (mM) Ammoniumhydroxid (NH₄OH) pro Liter in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zusammensetzt. In dieser Dezellularisierungslösung werden die mesenchymalen Stammzellenschichten (MSC) und extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten in einem Temperaturbereich von 35°C bis 39°C inkubiert. Vorzugsweise beträgt die Temperatur 37°C und die Inkubationszeit mindestens zwei Minuten. Um die so gewonnenen Matrix-Schichten zu reinigen und vom Dezellularisierungspuffer zu befreien, schließt sich ein Waschprozess, vorzugsweise in drei Waschschritten mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), an.

[0020] Jeder einzelne Verfahrensschritt ist durch ein hohes Maß an Flexibilität gekennzeichnet. Die Art der Ankopplung der Haftvermittlerschicht, der Haftvermittler selbst, die Art der Zellen oder Organkulturen, das Dezellularisierungsprotokoll und die Art der Refunktionalisierung, insbesondere Wachstumsfaktoren und Adhäsionssequenzen, sind austauschbar beziehungsweise an einzelne Fragestellungen gezielt anpassbar. Im Verfahrensschritt b), der Matrixsezernierung, können zudem gezielt stimulierende Bedingungen, zum Beispiel im Hinblick auf Zelldifferenzierung, eingestellt und somit auch die Matrixsezernierung beeinflusst werden. Durch diesen modularen Charakter kann die extrazelluläre Matrix-Beschichtung an eine Vielzahl von Anwendungen angepasst und für bestimmte zellbiologische Fragestellungen optimiert werden. Weiterhin wird durch den Einsatz der kovalent gekoppelten Haftvermittlerschicht ein deutlicher Stabilitätsgewinn erzielt, der einerseits das Handling der Matrixkultur allgemein erleichtert. Für die nachfolgende Kultivierung der Zielzellen auf den immobilisierten Matrix-Schichten können zudem andererseits eine deutlich größere Bandbreite an

Verfahrensschritten angewandt werden, es sind zum Beispiel auch Kultivierungsbedingungen unter Scherstress möglich. Dies hat wiederum eine deutliche Erweiterung des Anwendungsspektrums derartiger Beschichtungen gegenüber bestehenden Einzelkomponenten-Matrixbeschichtungen zur Folge. Andererseits können durch die stabile Anbindung auch eine Vielzahl unterschiedlicher Dezellularisierungsprotokolle angewandt werden, womit auch von diesem Parameter her die resultierenden Matrixeigenschaften besser einstellbar und somit an einzelne Fragestellung besser anpassbar sind.

[0021] Als weiterer Vorteil ist die – auch aufgrund der so unterschiedlichen Aufreinigungsprotokolle gezielt variierbare – Beladbarkeit/Funktionalisierbarkeit mit Signalmolekülen zu nennen. Gemäß der Erfindung erfolgt daher in einem zusätzlichen Verfahrensschritt d) eine Funktionalisierung der nach den Verfahrensschritten a) bis c) aufbereiteten extrazellulären Matrices mit Wachstumsfaktoren oder anderen Signalmolekülen. Dadurch wird gerade gegenüber Verfahrenen zur Immobilisierung von Einzelkomponenten eine deutliche Verbesserung in Bezug auf die Regulation von Zellschicksalsentscheidungen erreicht.

[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: (A) eine schematische Darstellung der durch mesenchymale Stammzellen generierten extrazellulären Matrix und (B) ein Verfahrensschema zur Herstellung der kovalenten Anbindung von Fibronectin an einem mit Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) beschichteten Glasdeckgläschen;

[0024] Fig. 2: mikroskopische Aufnahmen von der Anbindung der extrazellulären Matrix an TCP-Oberflächen und an mit Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid)/Fibronectin vorbeschichteten Oberflächen des Zellkulturträgers;

[0025] Fig. 3: hellfeld- und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Arten von durch mesenchymale Stammzellen generierter extrazellulärer Matrix und

[0026] Fig. 4: durch mesenchymale Stammzellen generierte extrazelluläre Matrices auf unterschiedlichen Haftvermittlern zur Stabilisierung der Matrixschichten.

[0027] Das erste Ausführungsbeispiel 1 betrifft verschiedene, durch mesenchymale Stammzellen (MSC) generierte extrazelluläre Matrices (EZM) auf kovalent gebundenen Fibronectinschichten. Die Fig. 1(A) zeigt dabei eine schematische Darstellung

von mesenchymalen Stammzellen (MSC) generierter extrazellulärer Matrix (EZM) auf kovalent gebundenen, mit Fibronectin (FN) beschichteten Zellkulturträgern, welche in Form von Glasdeckgläsern vorliegen. Des Weiteren ist in Fig. 1(B) ein Verfahrensschema zur Herstellung der kovalenten Anbindung von Fibronectin (FN, R) an dem mit Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA) beschichteten Glasdeckgläschen dargestellt.

Ausführungsbeispiel I, Verfahrensschritt a)
: Kovalente Anbindung des Haftvermittlers
Fibronectin (FN, R) an mit Poly
(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid)
(POMA) beschichtete Glasdeckgläser

[0028] Für die kovalente Anbindung von Fibronectin (FN, R) wurden polymerbehandelte Glasdeckgläschen verwendet, welche nach Pompe, T. et al. „Maleic anhydride copolymers – a versatile platform for molecular biosurface engineering“. Biomacromolecules 4, 1072–1079 (2003), zunächst unter Wärmezufuhr mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APDS) und danach mit einer Lösung von Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA) im Spin-Coating-Verfahren beschichtet worden waren. Diese reaktive Polymerschicht erlaubt die kovalente Anbindung von Aminogruppen(NH₂)-haltigen Molekülen über die vorhandenen Anhydridgruppen im Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA), wie es in Fig. 1(B) schematisch gezeigt wird. Die Koppelung von Aminogruppen(NH₂)-haltigem Fibronectin (FN, R), welches als extrazelluläres Matrixprotein (R) gemäß Fig. 1(B) dient, erfolgte mit einer 50 µg/ml konzentrierten Lösung von humanem isoliertem Fibronectin (FN, R) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Für eine 6-Well-Zellkulturoberfläche von 9 cm² wurden 500 µl der Fibronectinlösung verwendet, um eine komplette Benetzung der Oberfläche zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde ungebundenes Fibronectin (FN, R) durch zwei Waschschriffe mit 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) entfernt. Die auf diese Weise mit Fibronectin (FN) beschichteten Zellkulturträger (Glasdeckgläser) wurden unter 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für kurze Zeit bei 4°C und maximal sieben Tagen bis zur Weiterverarbeitung im nachfolgenden Verfahrensschritt b) gelagert.

Ausführungsbeispiel I, Verfahrensschritt
b): Matrixsezernierung durch Kultivierung
von mesenchymalen Stammzellen
(MSC) auf dem Haftvermittler

[0029] In diesem Verfahrensschritt wurden humane mesenchymale Stammzellen (MSC) zur Kultivierung und Matrixsezernierung verwendet. Isolierte primäre mesenchymale Stammzellen (MSC) aus humanem Knochenmark wurden durch das Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden bereitgestellt. Zur Ma-

trixsezernierung wurden nur frühe Passagen von mesenchymalen Stammzellen (MSC) verwendet (Passage 1 bis maximal 3). Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 10.000 Zellen/cm² auf die mit Fibronectin (FN, R) vorbeschichteten Zellkulturträger ausgesät. Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit zehn Prozent Fetalem Kälberserum (FBS) kultiviert. Nach einer Anwachsphase von zwei bis drei Tagen erreichten die Zellen 80 bis 100 Prozent Konfluenz. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Medium umgestellt, um die Zellen während der Matrix-Produktion mit unterschiedlichen Stimuli zu beeinflussen. Zur Anregung der Matrixsezernierung, insbesondere der Kollagensezernierung, wurden 50 µg/ml Ascorbinsäure zugesetzt, welches die Kollagensynthese stimuliert. Die hierbei entstehende Ascorbinsäure stimulierte extrazelluläre Matrix (EZM) wird als Ascorbinsäure-EZM beziehungsweise aaEZM bezeichnet. Weiterhin wurden die Zellen zur osteogenen Differenzierung stimuliert mittels Zugabe von 100 nM Dexamethasone, β-Glycerolphosphat 10 mM und 2-Phospho-Ascorbinsäure. Die hieraus entstandene extrazelluläre Matrix (EZM) wird als osteoEZM bezeichnet. Ab dem Tag der Mediumumstellung wurden die Zellen für zehn Tage kultiviert und bekamen aller zwei Tage einen kompletten Mediumwechsel. Nach zehn Tagen wurde die Matrixsezernierung abgebrochen und die entstandenen Schichten der extrazellulären Matrix wurden dezellularisiert. Die **Fig. 2** zeigt in den oberen beiden Abbildungen jeweils die konfluente mesenchymale Stammzellenschicht vor der Dezellularisierung auf TCP-Oberflächen einerseits und auf mit Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA)/Fibronectin (FN) vorbeschichteten Oberflächen des Zellkulturträgers andererseits.

Ausführungsbeispiel I, Verfahrensschritt c):
Dezellularisierung der zellsezernierten Schicht der extrazellulären Matrix (EZM) durch Triton X-100 und Ammoniumhydroxid (NH₄OH)

[0030] Zur Vorbereitung der Dezellularisierung wurden die mesenchymalen Stammzellen-Kulturen mit 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die Dezellularisierungslösung setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 5 Prozent Triton x-100 und 20 Millimol pro Liter Ammoniumhydroxid (NH₄OH) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Die Lösung wurde für jede Durchführung frisch hergestellt und auf 37°C temperiert. Zu jeder 6-Well-Zellkulturoberfläche mit mesenchymalen Stammzellenschichten (MSC) beziehungsweise extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten wurde 1 ml Dezellularisierungspuffer gegeben und die mesenchymalen Stammzellenschichten (MSC) beziehungsweise extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten wurden anschließend bei 37°C für fünf Minuten inkubiert. Der Dezellularisierungsprozess wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Alle zellulären Strukturen, zum Beispiel

Zellkerne, müssen von der Oberfläche abschwimmen. Um die so gewonnenen Matrix-Schichten zu reinigen und vom Dezellularisierungspuffer zu befreien, schlossen sich drei Waschschriffe mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) an. Hierbei wurden jeweils 3 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pro 6-Well zum Spülen verwendet. Jedoch durfte die Matrix dabei nie ganz trocken liegen. Nach Beendigung der Waschschriffe wurde die Matrix in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) unter sterilen Bedingungen bei 4°C für bis zu drei Monate gelagert. Die **Fig. 2** zeigt, dass extrazelluläre Matrix-(EZM)-Schichten, die auf Standard TCP-Zellkulturträgern generiert wurden, beim Waschprozess erhebliche Stabilitätsprobleme aufweisen. Im Gegensatz dazu konnten extrazelluläre Matrix-(EZM)-Schichten auf kovalent immobilisierten Fibronectin-(FN)-Oberflächen stabil gebunden und erhalten werden.

[0031] In **Fig. 3** wird das lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Erscheinungsbild der beiden oben genannten unterschiedlichen extrazellulären Matrix-Schichten (aaEZM-Schichten und osteoEZM-Schichten) nach deren Erzeugung durch die verschiedenen Stimuli während der Matrixsezernierung gezeigt. Die Messbalken entsprechen 100 µm bei hellfeldmikroskopischen Aufnahmen und 2 nm bei rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM).

Ausführungsbeispiel I, Verfahrensschritt
d): Beladung der Matrices mit
Wachstumsfaktoren/Cytokinen

[0032] Um die gewonnenen Matrices weiter zu variieren, wurde Stammzellenfaktor (SCF) adsorptiv an die Oberflächen gebunden. Dieses Cytokin spielt bei der Regulation von Hematopoietischen Stammzellen eine große Rolle, wie es auch aus Blank, U., Karlsson, G. & Karlsson, S. Signaling pathways governing stem cell fate. Blood (2007), bekannt ist. Eine Stammzellenfaktor-(SCF)-Lösung der Konzentration 100 ng/ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde auf die Oberflächen der extrazellulären Matrix (EZM) aufgebracht. Je 6-Well-Kulturoberfläche mit extrazellulärer Matrixbeschichtung wurde 1 ml Stammzellenfaktor-(SCF)-Lösung für eine Stunde bei 4°C inkubiert und im Anschluss einmalig mit 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die so funktionalisierten extrazellulären Matrix-(EZM)-Oberflächen wurden im Folgenden für Kulturexperimente mit Hematopoietischen Stammzellen eingesetzt.

[0033] Ein zweites Ausführungsbeispiel II betrifft die Stabilisierung einer durch mesenchymale Stammzellen (MSC) generierten extrazellulären Matrix (EZM) durch Maleinsäureanhydrid-Copolymere als Haftvermittler.

Ausführungsbeispiel II, Verfahrensschritt a):
Kovalente Bindung von Polymerdünnsschichten
an Glaträgern und zusätzliche
kovalente Bindung von Fibronectin

[0034] Weitere Haftvermittler zur Stabilisierung der zellsezernierten extrazellulären Matrix waren unterschiedliche Maleinsäureanhydrid-Copolymere: Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA), Poly(propen-alt-maleinsäureanhydrid) (PPMA), Poly(styren-alt-maleinsäureanhydrid) (PSMA) und Poly(ethylen-alt-maleinsäureanhydrid) (PEMA). Es wurden Dünnsschichtpräparationen dieser Polymere auf Glasoberflächen gemäß dem durch Pompe, T. et al. „Maleic anhydride copolymers – a versatile platform for molecular biosurface engineering“. Biomacromolecules 4, 1072–1079 (2003), bekannten Verfahren generiert. Die Fig. 4 zeigt mikroskopische Hellfeldaufnahmen der durch mesenchymale Stammzellen generierten extrazellulären Matrix auf den oben genannten unterschiedlichen, der Stabilisierung der Matrix-Schichten dienenden Haftvermittlern.

[0035] Die oben genannten erzeugten Polymeroberflächen unterschieden sich in ihren Eigenschaften hinsichtlich der Hydrophobizität. Weiterhin wurden diese Oberflächen entweder mit Fibronectin (FN, R) funktionalisiert, wie schon im ersten Ausführungsbeispiel I in Verfahrensschritt a) beschrieben, oder wurden mittels Wasser hydrolysiert, um kovalente Bindungen durch reaktive Seitengruppen zu unterbinden und allein Wechselwirkungen aufgrund der Hydrophobizität zu erhalten.

Ausführungsbeispiel II, Verfahrensschritt
b): Matrixsezernierung durch Kultivierung
von mesenchymalen Stammzellen (MSC)
auf den verschiedenen Haftvermittlern

[0036] Zur Matrix-Sezernierung wurden, wie schon im ersten Ausführungsbeispiel I beschrieben, mesenchymale Stammzellkulturen (MSC) verwendet. Im Unterschied zum ersten Ausführungsbeispiel I wurden jedoch keine weiteren Stimuli auf die Zellen ausgeübt. Die Kulturen wurden zehn Tage lang auf den verschiedenen, in Verfahrensschritt a) beschriebenen Oberflächen kultiviert.

Ausführungsbeispiel II, Verfahrensschritt
c): Dezellularisierung der zellsezernierten
extrazellulären Matrix-(EZM)-Schicht durch Triton
X-100 und 20 mM Ammoniumhydroxid (NH₄OH)

[0037] Die Dezellularisierung der extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten erfolgte identisch zu dem im ersten Ausführungsbeispiel I, Verfahrensschritt c), beschriebenen Protokoll. Die Effektivität der unterschiedlichen Oberflächen in Bezug auf die Anbindung der extrazellulären Matrix ist in Fig. 4 dargestellt. Die verschiedenen hydrolysierten Formen der

Maleinsäureanhydrid-Copolymere weisen eine Verbesserung der Stabilität der extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten auf. Besonders Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA) zeigt durch hohe Hydrophobizität eine verbesserte Interaktion der sezernierten Matrix mit der Oberfläche. Wie die Fig. 4 darüber hinaus verdeutlicht, kann durch kovalente Anbindung von Fibronectin (FN) an die verschiedenen Maleinsäureanhydrid-Copolymere die Stabilisierung der extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten noch verbessert werden.

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

APDS	3-Aminopropyldimethylethoxysilan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EZM	extrazelluläre Matrix
aaEZM	extrazelluläre Matrix (bei einer durch Ascorbinsäure stimulierten Matrixsezernierung)
osteoEZM	extrazelluläre Matrix (bei einer stimulierten Matrixsezernierung, die zu einer osteogenen Differenzierung führt)
FBS	Fetales Kälberserum
FN	Fibronectin
LAS	lineares Alkylbenzolsulfonat
MSC	mesenchymale Stammzellen
PEMA	Poly(ethylen-alt-maleinsäureanhydrid)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
POMA	Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid)
PPMA	Poly(propen-alt-maleinsäureanhydrid)
PSMA	Poly(styren-alt-maleinsäureanhydrid)
R	extrazelluläres Matrixprotein, Fibronectin
REM	Röntgenelektronenmikroskopische Aufnahme
SCF	Stammzellenfaktor
SDC	Natriumdeoxycholat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCP	Tissue Culture Plastics

Patentansprüche

1. Verfahren zur Immobilisierung und Aufbereitung funktioneller Multikomponentenstrukturen der extrazellulären Matrix (EZM), umfassend die aufeinander folgenden Verfahrensschritte:

- kovalente Bindung einer Haftvermittlerschicht auf Zellkulturträgern;
- Kultivierung von Zellen eines gewünschten Typs auf der Haftvermittlerschicht und somit Immobilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) durch Abscheidung und Anbindung an die Haftvermittlerschicht;

c) Anwendung eines Dezellularisierungsprotokolls, um matrixsezernierende Zellen von der Oberfläche zu entfernen und gleichzeitig die Struktur und Funktionalität der darunterliegenden, mit dem Haftvermittler verbundenen immobilisierten extrazellulären Matrix (EZM) zu erhalten; und

d) eine Funktionalisierung der nach den Verfahrensschritten a) bis c) aufbereiteten extrazellulären Matrix (EZM) mit Signalmolekülen, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Verfahrensschritt c) Schichten, die aus den in Verfahrensschritt b) kultivierten Zellen abgeleitet sind, und die extrazellulären Matrix-(EZM)-Schichten in einer Dezellularisierungslösung, die sich aus einer Mischung

- aus oberflächenaktiven Substanzen, organischen Lösungsmitteln, Säuren oder Basen und physiologischer Salzlösung oder
- aus oberflächenaktiven Substanzen, Säuren oder Basen und komplexbildenden Substanzen oder
- aus Säuren oder Basen, komplexbildenden Substanzen, Enzymen und physiologischer Salzlösung zusammensetzt, in einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C inkubiert und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Verfahrensschritt c) als oberflächenaktive Substanz/Substanzen eine oder mehrere der Substanzen Natriumdodecylsulfat (SDS), Triton X-200, Natriumdeoxycholat (SDC) und lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS) eingesetzt wird/werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass als organisches Lösemittel Tri(n-butyl)phosphat eingesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Verfahrensschritt c) als Enzym/Enzyme ein oder mehrere der Enzyme Trypsin, Endonucleasen, Exonucleasen eingesetzt werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Verfahrensschritt b) als zu kultivierende Zellen mesenchymale Stammzellen (MSC) oder fibroblastenartige Zelllinien eingesetzt werden.

6. Verfahren zur Immobilisierung und Aufbereitung funktioneller Multikomponentenstrukturen der extrazellulären Matrix (EZM), umfassend die aufeinander folgenden Verfahrensschritte:

- a) kovalente Bindung einer Haftvermittlerschicht auf Zellkulturträgern;
- b) Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) eines gewünschten Typs auf der Haftvermittlerschicht und somit Immobilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) durch Abscheidung und Anbindung an die Haftvermittlerschicht;

c) Anwendung eines Dezellularisierungsprotokolls, um matrixsezernierende Zellen von der Oberfläche zu entfernen und gleichzeitig die Struktur und Funktionalität der darunterliegenden, mit dem Haftvermittler verbundenen immobilisierten extrazellulären Matrix (EZM) zu erhalten; und

d) eine Funktionalisierung der nach den Verfahrensschritten a) bis c) aufbereiteten extrazellulären Matrix (EZM) mit Signalmolekülen, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Verfahrensschritt c) Stammzellenschichten (MSC) und extrazelluläre Matrix-(EZM)-Schichten in einer Dezellularisierungslösung, die sich aus 5 Prozent Triton x-100 und 20 mM Ammoniumhydroxid (NH₄OH) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zusammensetzt, in einem Temperaturbereich von 35°C bis 39°C inkubiert und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Zellkulturträger Einweg-Zellkulturträger aus Kunststoff (TCP) oder Deckgläser oder sogenannte mikrostrukturierte Kunststoffoberflächen oder sogenannte 3D-Strukturen, insbesondere poröse Materialien oder Gewebescheits, vorgesehen sind.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Haftvermittlerschicht zur Stabilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) Carbonsäuregruppen tragende Polymere vorgesehen sind.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Haftvermittlerschicht zur Stabilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) Maleinsäureanhydrid-Copolymere vorgesehen sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein als Haftvermittlerschicht verwendetes Maleinsäureanhydrid-Copolymer aus einer Gruppe ausgewählt wird, die Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) (POMA), Poly(propen-alt-maleinsäureanhydrid) (PPMA), Poly(styren-alt-maleinsäureanhydrid) (PSMA) und Poly(ethylen-alt-maleinsäureanhydrid) (PEMA) umfasst.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Haftvermittlerschicht zur Stabilisierung der von den Zellen sezernierten extrazellulären Matrix (EZM) Polyacrylate vorgesehen sind.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Funktionalisierung durch Beladung der immobilisierten extrazellulären Matrix (EZM) mit Wachstumsfaktoren erfolgt.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

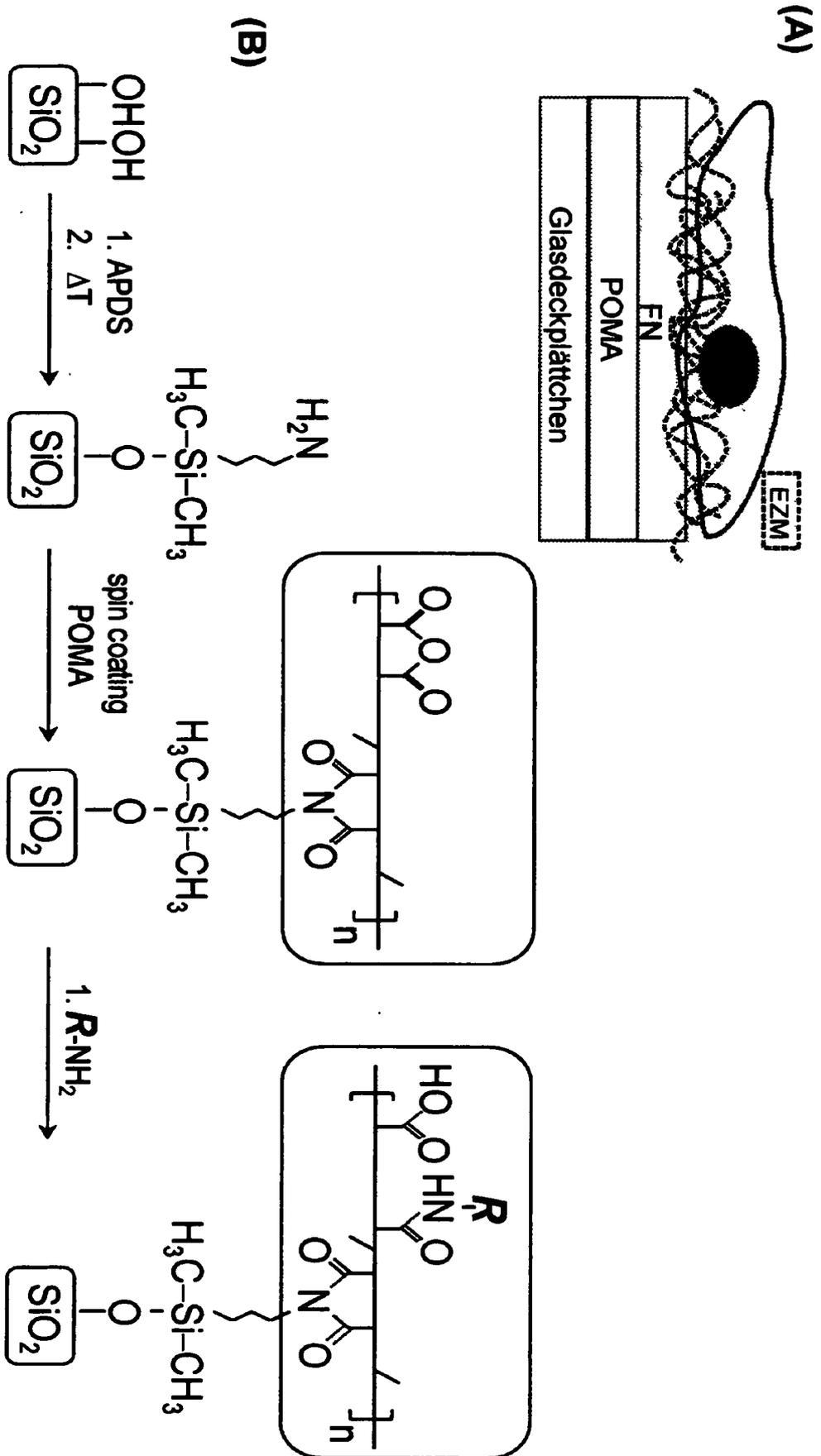


Fig. 1

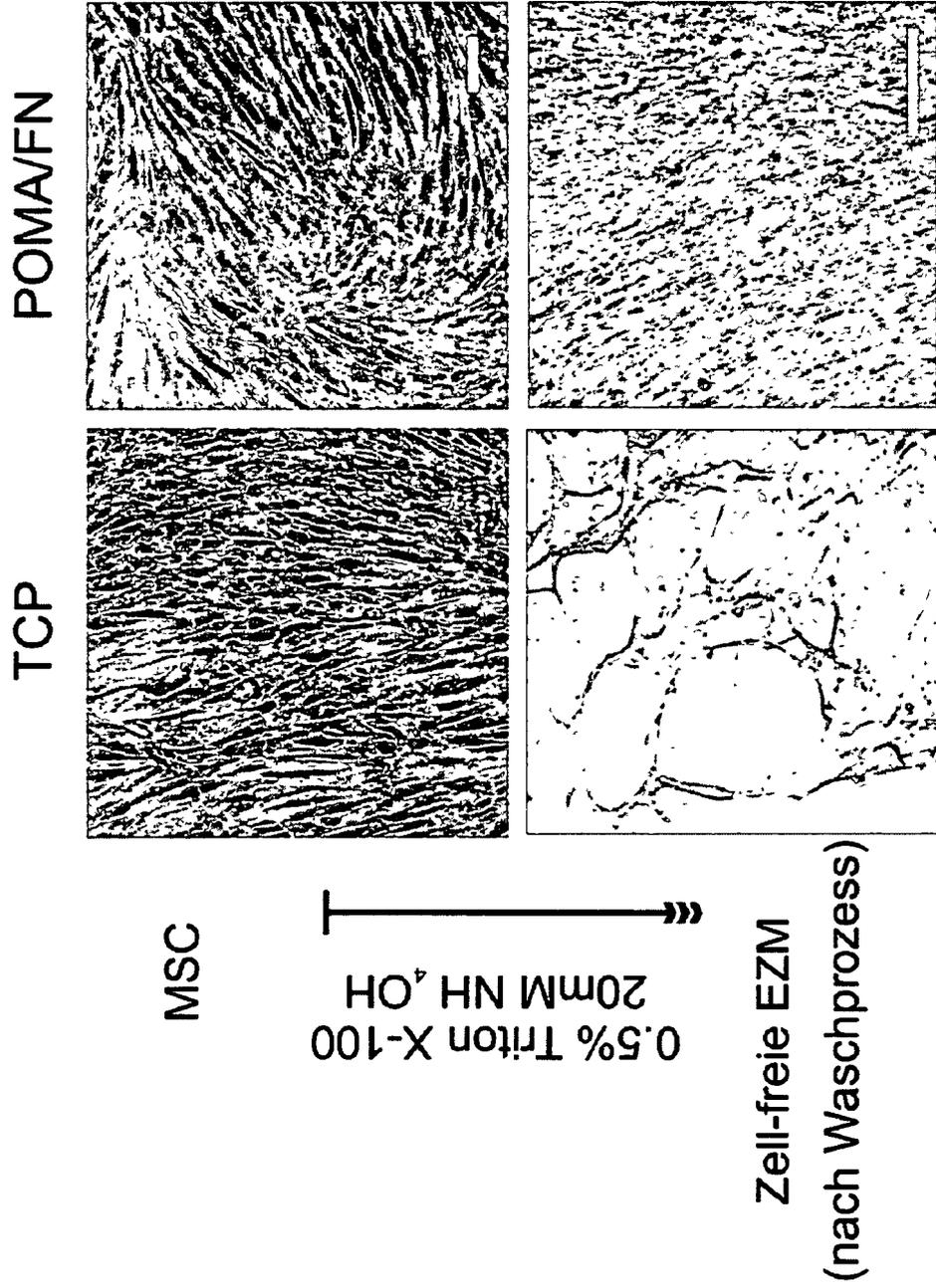
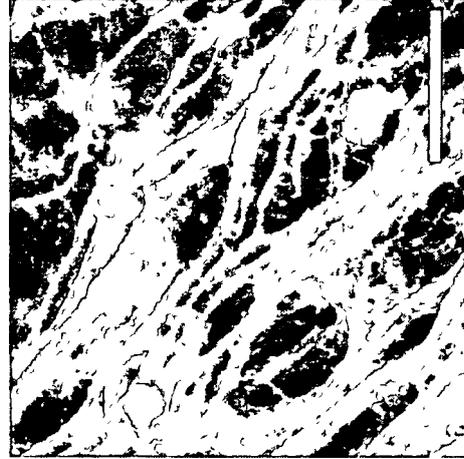
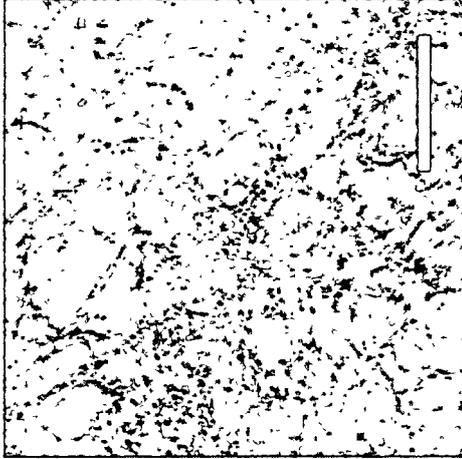
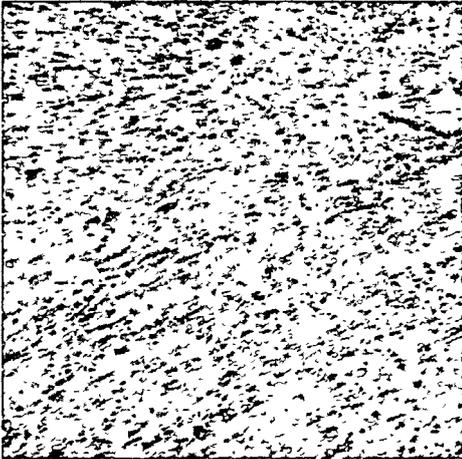


Fig. 2

osteoEZM



aaEZM



Helfeld

REM

Fig. 3

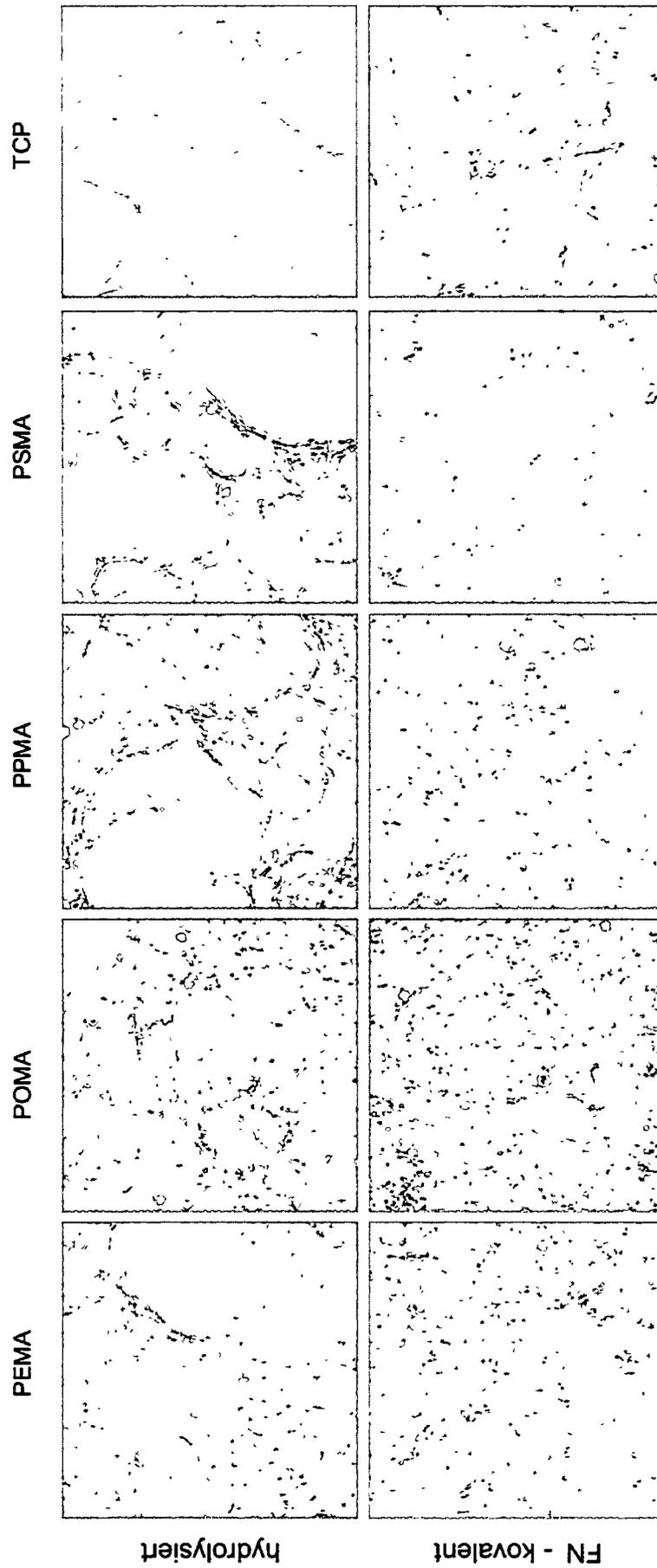


Fig. 4