

(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
29. September 2016 (29.09.2016)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2016/150652 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
A61F 2/14 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/054101

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Februar 2016 (26.02.2016)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2015 205 534.5 26. März 2015 (26.03.2015) DE

(71) Anmelder: **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E.V.** [DE/DE]; Hansastrasse 27 c, 80686 München (DE).

(72) Erfinder: **GUTERMUTH, Angela**; Hasselholzer Weg 6,
52074 Aachen (DE).

(74) Anwälte: **SCHWAHN, Hartmut** et al.; Gleiss Grosse
Schrell und Partner mbB, Leitzstrasse 45, 70469 Stuttgart
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: ARTIFICIAL DESCemet'S MEMBRANE

(54) Bezeichnung : ARTIFIZIELLE DESCEMENT-MEMBRAN

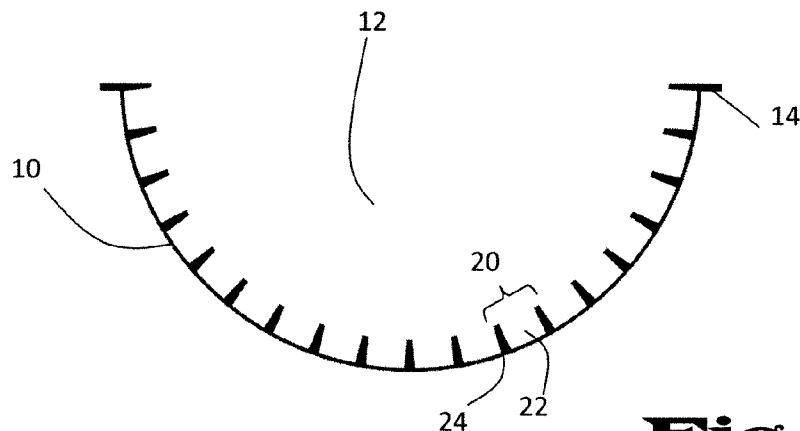


Fig. 2

(57) Abstract: The invention relates to methods and means for synthesizing endothelial tissue of the cornea and is directed to a structured artificial construct that allows corneal endothelium to be regenerated from isolated cells outside the human or animal body.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Herstellung von cornealem Endothelgewebe und stellt ein strukturiertes artifizielles Konstrukt bereit, welches die Neubildung eines Cornealendothels aus isolierten Zellen außerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers ermöglicht.



WO 2016/150652 A1

Artifizielle Descemet-Membran

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Herstellung von
5 cornealem Endothelgewebe des Säugetierauges und stellt ein strukturiertes
artifizielles Konstrukt bereit, welches die Neubildung eines Cornealendothels
aus isolierten Zellen außerhalb des Körpers ermöglicht.

Die Transparenz der Hornhaut (Cornea) des Auges ist essentiell für die Seh-
kraft. Sie erfordert vor allem ein intaktes Endothelgewebe (Cornealendothel).
10 Dieses einschichtige Endothel an der Rückseite der Cornea steht in direktem
Kontakt mit einer zellfreien Basalmembran, der sogenannten *Lamina limitans
posterior descementi* oder Descemet-Membran, welche dieses von der
Hauptschicht der Cornea, dem Stroma, abgrenzt. Die Descemet-Membran
besteht in der gesunden Cornea im Wesentlichen aus Collagen Typ VIII und
15 Laminin. Sie weist eine regelmäßige räumliche Struktur auf, die mit der
Struktur der Zellen des Endothels korrespondiert. Das Endothel entwässert
das Stroma aktiv über die Descemet-Membran hinweg und verhindert dort
Wassereinlagerung und Ödembildung und damit die Trübung der Cornea.

Humane corneale Endothelzellen arretieren in der G1-Phase und zeigen *in*
20 *vivo* nur eingeschränkte Proliferationsfähigkeit. Die Teilungsunfähigkeit hat
zur Folge, dass es bei Hornhautverletzung, sei sie durch Entzündungsprozes-
se oder durch mechanisches Trauma hervorgerufen, aber auch aufgrund na-
türlicher Alterungsprozesse zu einer unwiderruflichen Zerstörung des En-

dothels und im schlimmsten Falle zu einem kompletten Sehverlust aufgrund Hornhauttrübung kommen kann. Zwar werden abgestorbene Endothelzellen durch benachbarte ersetzt, die sich vergrößern und in Lücken migrieren, um die Dichtigkeit und damit die Funktion des Endothels weiter zu gewährleisten. Dieser Reparaturmechanismus ist jedoch sehr begrenzt.

Dem Endothelzellverlust in der Cornea kann bisher nur beschränkt durch medizinische Maßnahmen entgegengetreten werden. Eine häufig verwendete Methode ist die Substitution der gesamten erkrankten Hornhaut mit einer Spenderhornhaut, der sogenannten perforierenden Keratoplastik. Es treten aber oft klinische Komplikationen auf, die eine ausbleibende oder verminderte Rehabilitation des Auges bedingen, wie chronisch trockene Augen, Corneavaskularisierung (Gefäßeinsprossung) sowie im schlimmsten Fall die Abstoßung des fremden Spendermaterials.

Neben der Totalsubstitution sind inzwischen Verfahren etabliert, worin, nach lokaler Entfernung ausschließlich des erkrankten Endothels zusammen mit dessen Descemet-Membran (Descemetorhexis) anschließend über einen corneoscleralen-cornealen Tunnel ein lamelläres Transplantat, bestehend aus cornealem Endothel und anhängender Descemet-Membran sowie noch einem geringen Anteil anliegenden posteriorem Stroma, aus einer Spenderhornhaut in die Vorderkammer des Empfängers eingebracht wird. Durch diese spezifische Transplantation werden zwar die üblichen Risiken einer Transplantation und die Nebenwirkungen der Operation gegenüber einem Totaltransplantat reduziert. Dennoch bestehen auch hier weitere technische Probleme, die noch nicht überwunden sind.

Problematisch ist bei all diesen allogenen Transplantationen von cornealem Gewebe der auftretende Endothelzellverlust: Die Präparationstechnik am

Spenderauge, die Art und Weise der Lagerung sowie das verwendete Nährmedium, der Transport und schließlich die perioperative Handhabung des Spendergewebes gehen stets mit einem mehr oder weniger starken Endothelzellverlust im Transplantat einher. Neben der immunreaktiven Abstoßung des Fremdgewebes können auch diese Faktoren zu einem primären Transplantatversagen führen, wodurch das transplantierte Endothelgewebe funktionslos wird und keine Rehabilitation eintritt.

Die Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, diese Nachteile bei der klinischen Reparatur von Cornealendothelgewebe zu überwinden. Besonders sollen die bekannten Nachteile allogener Transplantate, aber auch besonders die Probleme des Endothelzelluntergangs in einem explantierten Spendergewebe reduziert werden.

Zur Lösung stellt die Erfindung Verfahren und Mittel zur Herstellung eines neuartigen biologischen Endothelimplantats bereit, welches die vorbeschriebenen Nachteile bekannter Transplantate überwindet: Ein *de novo* in der Gewebekultur aus isolierten Zellen herstellbares Cornealendothelgewebe auf einer neuartigen artifiziellen Descemet-Membran.

Die Erfinder fanden überraschend, dass durch ein spezielles artifizielles Konstrukt, welches die in der gesunden Hornhaut vorhandene Descemet-Membran spezifisch nachbildet, isolierte omnipotente oder pluripotente Stammzellen angeregt werden können, ein funktionales corneales Endothelgewebe *de novo* mit hoher Zelldichte auszubilden, das zusammen mit dem erfindungsgemäßen artifiziellen Descemet-Konstrukt selbst in das Auge des Patienten implantiert werden kann, um die Funktion der verlorengegangenen Cornealendothels vollständig zu ersetzen.

Die Erfindung stellt dazu ein artifizielles Descemet-Konstrukt bereit, welches besonders geeignet ist, eine mechanotransduktive Differenzierung biologischer Zellen, besonders pluripotenter oder omnipotente Zellen zu einem Cornealendothelgewebe *in vitro* zu unterstützen oder zu ermöglichen.

- 5 Ohne an die Theorie gebunden sein zu wollen, kommt es nach dem Aussäen isolierter Zellen auf das erfindungsgemäße Descemet-Konstrukt zu einer mechanotransduktiven Differenzierung der Zellen und dadurch zu einer Ausbildung eines funktionalen Cornealendothelgewebes. Dabei kann auf autologe Zellen, besonders pluripotente oder omnipotente Zellen des Empfänger
- 10 fängers selbst zurückgegriffen werden. Somit kann ein artifizielles corneales Implantat geschaffen werden, welches aus eigenen Zellen des Empfängers besteht und wobei durch geeignete Kultivierungsmaßnahmen bei der *in vitro* Kultivierung des Gewebes Zellzahl und Zelldichte so gewählt werden kann, dass ein möglicher peri- oder postoperativer Zelluntergang so kompensiert
- 15 kann, dass auch nach erfolgter Transplantation die Funktion des transplantierten Endothelgewebes dauerhaft erhalten bleibt und eine vollständige dauerhafte Rehabilitation erreicht werden kann.

- Erfindungsgemäß besteht das Descemet-Konstrukt aus einem im Wesentlichen kalottenförmigen Grundkörper, wobei in der konkaven Seite (Höhlung)
- 20 dieses Grundkörpers auf dessen Oberfläche eine Wabenstruktur ausgebildet ist. Die räumliche Wabenstrukturierung der Oberfläche des Grundkörpers ist mittels geeigneter Mikrostrukturierungsverfahren erzeugbar.

- Im Zusammenhang mit dieser Erfindung wird unter „Kalotte“ oder „kalottenförmig“ nicht ausschließlich ein Kugelschnitt im engeren Sinne verstanden,
- 25 sondern auch Formen, die im Wesentlichen dieser Form entsprechen, darunter fallen Halbschalen- oder Halbkuppelformen wie Abschnitte von Rotati-

onsellipsoiden, Rotationsparaboloiden sowie Übergangsformen davon. Erfindungsgemäß weist das artifizielle Descemet-Konstrukt besonders eine Form auf, die der Form der Cornea, worin ein durch das oder mit dem Konstrukt gebildetes Implantat eingesetzt werden soll, entspricht.

- 5 Besonders ist die Wabenstruktur als solche aus repetitiven geometrischen Grundelementen oder Waben zusammengesetzt gedacht, die wabenförmig bevorzugt lückenlos aneinander angeordnet sind, wobei jedes gedachte Grundelement eine zentrale Vertiefung und diese zu den Nachbargrunde-
- 10 menten hin begrenzende seitliche Stege aufweist. Bevorzugt beträgt die Steghöhe, und damit die Tiefe der zentralen Vertiefung, 0,3 bis 1 μm . Bevorzugt beträgt die Stegbreite 1 bis 8 μm . Bevorzugt beträgt die Breite der von den Stegen umschlossenen Vertiefung von 10 bis 20 μm .

- Bevorzugt weisen die Grundelemente jeweils eine hexagonale Grundform auf und bilden somit eine klassische Wabenstruktur. In alternativen Ausführ-
- 15 rungen ist die Grundform der repetitiven Grundelemente kreisförmig oder im Wesentlichen kreisförmig. In einer alternativen Variante ist die Grundform im Wesentlichen rechteckig oder quadratisch. In einer alternativen Variante ist die Grundform allgemein vieleckig. Bevorzugt wechseln sich Vielecke unterschiedlicher Anzahl an Ecken, bevorzugt mit fünf bis neun
- 20 Ecken, ab; besonders bevorzugt sind diese Wabenstrukturen aufgebaut aus Hexagonen und Pentagonen.

- In einer besonderen Variante ist die Wabenstruktur streng regelmäßig, das heißt sie ist aus im Wesentlichen gleichförmigen und bevorzugt im Wesentlichen gleichgroßen Grundelementen aufgebaut. In einer alternativen und
- 25 bevorzugten Variante ist die Wabenstruktur unregelmäßig gestaltet. Das heißt, die gedachten Grundelemente weisen jeweils unterschiedliche Größe

und/oder unterschiedliche Einzelform auf, wobei die Größen der Grundelemente in der Wabenstruktur bevorzugt (quasi) stochastisch verteilt sind; die mittlere Größe einer Gruppe von 6 bis etwa 24 aneinander liegenden Grundelementen ist dabei konstant gehalten. Die vorgenannten bevorzugten Größenbereiche werden dabei nicht überschritten.

Bevorzugt sind die Stege, das heißt Seitenwände der Grundelemente jeweils bevorzugt senkrecht zur Grundebene der strukturierten Oberfläche des Grundkörpers angeordnet. In einer alternativen Variante verlaufen die Seitenwände des Grundelements zu dem Boden seiner Vertiefung hin konisch zusammen. Dazu ist besonders vorgesehen, dass die Dicke der Seitenwände zum Boden der Vertiefung hin zunimmt. Die Vertiefung umschließt somit die Form eines vieleckigen Pyramidenstumpfs, beziehungsweise, bei im Wesentlichen kreisförmigem Querschnitt, diejenige eines Kegelstumpfs.

In einer Variante ist ein umlaufender, von der Halbschale abstehender Rand vorgesehen. Dieser braucht nicht strukturiert zu sein. Er dient dem erleichterten Handling des Descemet-Konstrukts zum einen während der Mikrostrukturierung, zum anderen während des Einsatzes des Descemet-Konstrukts bei der Zellkultivierung. Gegebenenfalls kann der Rand nach Abschluss der Zellkulturphase oder vor dem Einsetzen des Descemet-Konstrukts als Bestandteil eines Implantats abgetrennt werden.

In bevorzugter Ausgestaltung enthält das erfindungsgemäße Descemet-Konstrukt ein biologisches oder biokompatibles Polymer und besteht bevorzugt vollständig daraus. Das biologische oder biokompatible Polymer ist bevorzugt mechanisch elastisch und flexibel. In einer alternativen Variante ist es im Wesentlichen unelastisch aber flexibel.

- Für die Auswahl der biologischen oder biokompatiblen Polymeren ist relevant, dass, wenn das Descemet-Konstrukt als Bestandteil eines *in vitro* Implantats in das Auge implantiert ist, es postoperativ die physikalisch-chemische Funktion einer nativen Descemet-Membran ersetzen kann. Dazu
- 5 zählt insbesondere die Fähigkeit der Durchlässigkeit (passive Diffusion) von Wasser (Kammerwasser) aus dem Stroma hin zu dem aktiv pumpenden Endothelgewebe. Dabei ist besonders vorgesehen, diese Diffusion durch Wahl der Polarität der Materialkomponenten und/oder durch poröse oder durchbrochene Strukturen (Molekularsieb) zu ermöglichen.
- 10 Daneben ist vorgesehen, dass das artifizielle Descemet-Konstrukt nach der Implantation teilweise oder vollständig resorbierbar ist. Bevorzugt verbleibt dabei eine Reststruktur, welche die Funktion der nativen Basalmembran übernimmt, wohingegen unmittelbar nach der Implantation zur insbesondere mechanischen Stabilisierung des Implantats in dem Descemet-Konstrukt
- 15 vorhandene Materialien resorbierbar sind. Auch ist vorgesehen, dass sich eine Basalmembran aus dem artifiziellen Descemet-Konstrukt postoperativ bildet.

- Weiter ist vorgesehen, die mechanischen Eigenschaften des biologischen oder biokompatiblen Polymers so zu wählen, dass die mechanischen Eigenschaften einer nativen Descemet-Membran erreicht werden. Besonders ist
- 20 eine mechanische Steifigkeit des Descemet-Konstrukts gefordert, um einerseits die mechanotransduktive Ausbildung von Cornealendothelgewebe *de novo* aus isolierten Zellen *in vitro* in der Gewebekultur zu ermöglichen und um andererseits eine ausreichende Stabilität bei Implantation in das Empfängerauge peri- und postoperativ zu gewährleisten. In einer Variante ist
- 25 vorgesehen, dass sich die mechanischen Eigenschaften des Konstrukts während der *in vitro* Kultivierung und/oder postoperativ verändern. Hierzu wird

eine Zusammensetzung aus mehreren Komponenten gewählt, die unterschiedliche Resorption zeigen oder mit den Endothelzellen in Wechselwirkung treten.

Das oder die biokompatiblen Polymere in dem Konstrukt können vollständig oder teilweise synthetischen Ursprungs sein. Sie können in an sich bekannter Weise funktionalisiert und insbesondere auch mit adhäsionsfördernden Proteinen oder Peptiden gekoppelt sein.

Das Polymer enthält bevorzugt ein Collagen oder ein Collagengemisch oder besteht bevorzugt daraus. Bevorzugtes Collagen ist Collagen Typ I und/oder Typ II. Besonders bevorzugt ist Collagen Typ VIII und/oder Typ IV. Alternativ bevorzugt sind Mischungen daraus. Bevorzugt ist zusätzlich Laminin enthalten. Bevorzugt ist zusätzlich Fibronectin enthalten. Biochemisch setzt sich die native Descemet-Membran im Auge hauptsächlich aus Collagen Typ IV und VIII, Fibronectin und Laminin zusammen. Es ist bevorzugt vorgesehen, diese extrazellulären Matrixkomponenten bevorzugt nach standardisierten Verfahren und bevorzugt rekombinant zu produzieren. Es wird Mischungsverhältnis der Komponenten eingestellt, so dass die Porengröße in dem artifiziellen Konstrukt und damit das Diffusionspotential der nativen Descemet-Membran erreicht wird. Vorzugsweise wird ein Collagen oder Collagengemisch eingesetzt, welches eine natürliche Nanostrukturierung aufweist. Diese verstärkt die mechanotransduktive Wirkung der erfindungsgemäßen Mikrostrukturierung des Descemet-Konstrukts und beschleunigt und stabilisiert die Differenzierung der isolierten Zellen zu einem Endothelgewebe.

Zusätzlich oder alternativ enthält das Biomaterial rekombinant hergestellte Proteine, die aus der infantilen oder adulten nativen Descemet-Membran des

tierischen oder menschlichen Körpers bekannt sind, oder besteht daraus. Die Proteine können xenogenen oder allopathen Ursprungs sein. Bevorzugt ist rekombinant hergestelltes humanes Collagen oder Collagengemische daraus. Alternativ oder zusätzlich enthält das Descemet-Konstrukt Seidenprotein
5 oder besteht daraus. In einer Variante enthält das Konstrukt biokompatible Polymere nichtbiologischen Ursprungs oder besteht ausschließlich daraus.

In einer alternativen Variante ist der Werkstoff des Descemet-Konstrukts synthetische Polymere und Elastomere wie Silikonelastomer oder PMMA, Polyethylene, Polyamide, PVA sowie funktionalisierte Polymere, Misch-
10 und Co-Polymere. Besonders bevorzugt ist thermosensitives oder thermoresponsives Polymer, insbesondere ein N-Isopropylacrylamid, auch Abwandlungen oder Derivate davon sowie auch N,N-Diethylacrylamid (PDEAAm), N-Vinylcaprolactam (PVCL) und vergleichbare.

Bevorzugt ist zumindest die Oberfläche eines solchen synthetischen Polymers funktionalisiert, beispielsweise durch Beschichtung oder chemische
15 oder physikalische Behandlung des Polymers, um in an sich bekannter Weise eine Kompatibilität zu darauf kultivierten biologischen Zellen zu erzielen. Das Polymer kann durch einen Plasmasterilisationsprozess mit Laminin und/oder Fibronectin oder auch einem anderen Zelladhäsionsprotein über
20 Wasserstoffbrückenbildung verbunden sein. Das Polymer kann durch chemische Kopplung (z.B. EDC/NHS Reaktion) kovalent mit einem Adhäsion fördernden Protein (s.o.) gekoppelt sein.

Erfindungsgemäß wird das Descemet-Konstrukt mittels mikrostrukturierender Verfahren erzeugt. Diese sind bevorzugt ausgewählt aus
25 photolithographischen Strukturierungsverfahren, photolytischer Ablation, mikromechanischer Ablation, sowie Formgießen und Formprägen.

Die Mikrostrukturierung erfolgt dabei bevorzugt durch sogenannte abtragende Verfahren, welche aus einem Werkstoff materialabtragend die gewünschte Wabenstruktur herausarbeiten. Bevorzugt sind Laser-basierte Verfahren (photolytische Ablation). Bei der Laserdirektstrukturierung wird ein
5 fokussierter Laserstrahl auf die Bauteiloberfläche gerichtet, wobei durch Absorption in der randzonennahen Oberfläche die Energie der einfallenden Laserstrahlung in thermische Energie umgewandelt wird. Der Wirkungsgrad dieser Umwandlung wird durch den Absorptionsgrad des Werkstoffs in Abhängigkeit von der genutzten Laserwellenlänge, der Oberflächenrauheit,
10 dem Einstrahlwinkel und der Temperatur bestimmt. Abweichend davon kann die Strahlungsenergie direkt chemische Bindungen aufbrechen. Alternativ oder zusätzlich beinhaltet der Materialabtrag einen Phasenwechsel im Werkstoff von fest zu flüssig und nachfolgend zu gasförmig. In allen Fällen wird im Bereich des fokussierten Laserstrahls Werkstoff in Form von Partikeln und/oder Materialschmelze abgetragen. Bei gepulsten Lasern erzeugt dies insbesondere eine einzelne Abtraggeometrie pro Laserpuls, meist in Form eines Rotationsparaboloids („Näpfchen“).

Die Erzeugung zusammenhängender Strukturen geschieht durch eine geeignete Bewegung des Laserstrahls über die Werkstückoberfläche. Dies wird
20 bevorzugt mit Hilfe so genannter Laserscanner realisiert, die einen oder mehrere bewegliche Spiegel beinhalten, die über schnelle Motoren zuge stellt werden. Die Qualität des Abtrags hinsichtlich erreichbarer Strukturgröße, Strukturschärfe und Genauigkeit lassen sich dabei durch geeignete Wahl der Laserquelle wählen. Entscheidend dabei sind die Wellenlänge des
25 Laserlichts, die Ausgangsleistung (im Falle gepulster Laser die Einzelpulseenergie) sowie die Strahlqualität der Quelle.

Bevorzugte alternative Mikrostrukturierungsverfahren sind mechanische spanabtragende Verfahren, besonders das Mikro-Diamantfräsen mit mikrokristallinen Werkzeugen. Strukturgrößen im Submikrometerbereich werden dabei nur durch eine Kombination besonderer Maschinenteknik und hochscharfer Werkzeuge erzeugt. Strukturgrößen in diesem Bereich bedienen sich der sogenannten Ultrapräzisionstechnik. Anwendung finden hierbei bevorzugt monokristalline Diamantwerkzeuge, die durch ihre Härte und Schärfe und durch ihre präzisen Schnitte die Herstellung der gewünschten Strukturen ermöglichen. Die Fertigung von ultrapräzisen Komponenten im Drehprozess ist bevorzugt auf die Herstellung rotationssymmetrischer Oberflächen beschränkt. Durch Erweiterung auf die sogenannte Unrundbearbeitung können alternativ auch Oberflächen und Strukturen erzeugt werden, die nicht symmetrisch zur Rotationsachse sind.

Alternativ bevorzugte Ansätze zur Mikrostrukturierung des Descemet-Konstrukts sind sogenannte generierende Verfahren, wobei sich die erfindungsgemäße Wabenstruktur durch lokalen Materialaufbau beziehungsweise Materialaushärtung an einem Grundkörper durch Materialauftrag bildet. Bevorzugte Verfahren sind die Zwei-Photonen-Lithographie, die Interferenzlithographie und die Graustufenlithographie.

Die Zwei-Photonen-Lithographie (2PL) basiert auf dem physikalischen Effekt der Zwei-Photonen-Absorption (2PA) und ermöglicht die Herstellung dreidimensionaler Strukturen bei einer lateralen Auflösung von 150 nm und einer axialen Auflösung von 400 nm. Der aufgeweitete Strahl eines Femtosekunden-Faserlasers mit einer Wellenlänge von 780 nm wird in ein invertiertes Mikroskopobjektiv eingekoppelt und von diesem in ein flüssiges, photosensitives Polymer fokussiert. Da der Laser fokussiert und gepulst ist, ist die Intensität im Fokus hoch genug, um innerhalb des Fokus Zwei-

Photonen-Absorption zu ermöglichen. In dem entsprechenden Bereich wird anstatt infraroter Strahlung ultraviolette Strahlung mit einer Wellenlänge von 390 nm emittiert. Das flüssige Photopolymer als Bestandteil des Grundkörpers des Konstrukts vernetzt nur bei der Belichtung durch die energiereiche UV-Strahlung, so dass in dem Bereich, in welchem Zwei-Photonen-Absorption stattfindet, das flüssige Polymer an dem Grundkörper aushärtet und die Wabenstruktur ausbildet.

Bei der Interferenzlithographie wird die Zwei- oder Mehrstrahlinterferenz ausgenutzt um das entsprechende Interferenzmuster in einer lichtempfindlichen Fläche abzubilden und zu speichern. Dafür wird ein Laserstrahl (Argonionenlaser) aufgeweitet und (z.B. durch einen Strahlteilerwürfel) in zwei Teilstrahlen geteilt. Diese werden mit Spiegeln (Plan- oder Konkavspiegeln) unter einem bestimmten Winkel überlagert, so dass in Abhängigkeit dieses Winkels sowie der verwendeten Wellenlänge ein Streifenmuster mit einer bestimmten Gitterkonstanten entsteht. Durch wiederholte Anwendung, besonders nach Rotation des Grundkörpers, kann eine Wabenstruktur ausgebildet werden.

Die Grautonlithographie basiert auf der Belichtung einer Maske, deren Muster durch die Belichtung in einem photoempfindlichen Polymer gespeichert wird. Dabei werden unterschiedliche Strukturtiefen durch unterschiedliche Grautöne auf der Maske realisiert. Hinter der Maske bildet sich eine Intensitätsverteilung entsprechend der Grautonverteilung auf der Maske aus. Unter Verwendung eines Positivresists ist die Struktur dort am tiefsten, wo die Intensität am höchsten ist. Für Negativresists verhält sich dieser Zusammenhang umgekehrt.

- Besonders bevorzugt zur Herstellung eines biologischen oder biokompatiblen und implantierbaren Descemet-Konstrukts sind Präge- beziehungsweise Gießverfahren und Kombinationen davon, wobei zunächst mittels der vorgenannten abtragenden oder generierenden Verfahren in einem bevorzugt
- 5 polymeren Werkstoff eine Negativform (Matrize) des gewünschten Descemet-Konstrukts erzeugt wird und anschließend das Descemet-Konstrukt selbst aus biologischem oder biokompatiblen Polymer mittels Gießen und/oder Prägen als Positivform an der zuvor hergestellten Matrize erzeugt wird. Durch dieses bevorzugte zweistufige Verfahren, kann eine Mikro-
- 10 strukturierung auch an biologischen oder biokompatiblen Polymeren erfolgen, die selbst nicht unmittelbar den physikalischen mikrostrukturierenden Verfahren zugänglich wären. Die Abformung ist besonders für alle Biomaterialien vorgesehen, die einem Aushärtungs- beziehungsweise Polymerisationsprozess unterliegen, das heißt von einem flüssigen, gießbaren Aggregatzustand durch Aushärtung einen gelartigen oder festen Zustand gelangen.
- 15 Zur Abformung härtet es an der Negativform aus (Gießen) oder die Negativform wird in das Material gedrückt (Prägen). Neben reinen Biomaterialien biologischen Ursprungs sind auch die hierin beschriebenen synthetischen Polymere zur Abformung vorgesehen.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist damit ein Verfahren zur Herstellung eines artifiziellen Descemet-Konstrukts zumindest mit den Schritten: 1. Bereitstellen eines polymeren Grundkörpers und 2. Ausbilden einer räumlichen Wabenstruktur in einer Oberfläche des Grundkörpers mittels mikrostrukturierendem Verfahren. Das Verfahren ist bevorzugt ausgewählt aus:
- 25 photolithographischer Strukturierung, photolytischer Ablation, mikromechanischer Ablation, Formgießen und Formprägen.

Bevorzugt enthält der Schritt der Ausbildung der räumlichen Wabenstruktur die Unterschritte: 2.1. Erstellen einer negativen Form (Matrize) der Wabenstruktur mittels eines mikrostrukturierenden Verfahrens und anschließend 2.2. Ausbilden der finalen Wabenstruktur in einem biokompatiblen oder biologischen Polymer durch Gießen oder Prägen mittels der erstellten negativen Form.

Erfindungsgemäß wird das hierin beschriebene artifizielle Descemet-Konstrukt in einem Ansatz des „tissue engineering“ außerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers zur Neuherstellung eines Endothelgewebes aus Einzelzellen eingesetzt. Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung des artifiziellen Descemet-Konstrukts zur mechanotransduktiven Differenzierung von, insbesondere mesenchymalen, Vorläufer- oder Stammzellen zu einem Cornealendothelgewebe *in vitro*.

Die Zellen, woraus erfindungsgemäß das Cornealendothelgewebe *de novo* an dem Descemet-Konstrukt gebildet werden soll, sind bevorzugt eukaryotische Vorläuferzellen, besonders adulte Stammzellen, embryonale Stammzellen sowie induzierte pluripotente Stammzellen. Bevorzugt sind mesenchymale Zellen, besonders bevorzugt mesenchymale Stammzellen. Diese sind bevorzugt aus Gewebe des Empfängers isoliert. Bevorzugt werden dazu adulte Stammzellen minimal invasiv aus autologem Fettgewebe des Patienten entnommen.

Zur *in vitro* Differenzierung werden die Zellen auf die strukturierten Oberfläche des erfindungsgemäßen Descemet-Konstrukts ausgesät und dort an Ort und Stelle kultiviert. Die Zelldichte beim Aussäen beträgt bevorzugt mindestens $5 \times 10^5/\text{cm}^2$. Zur Unterstützung der Differenzierung der Zellen *in vitro* können schließlich zusätzlich an sich bekannte chemische Faktoren

eingesetzt werden, welche die Mechanotransduktion der Zellen an dem erfindungsgemäß mikrostrukturierten Descemet-Konstrukt unterstützen. Besonders ist aber vorgesehen, dass die Differenzierung der Zellen ausschließlich auf mechanotransduktivem Wege an der erfindungsgemäßen Mikrostrukturierung des artifiziellen Descemet-Konstrukts erfolgt. Die dadurch erhältlichen *de novo* Cornealendothelgewebe sind daher im Wesentlichen unbelastet von chemischen oder anderen physikalischen Differenzierungsfaktoren, was zum einen die Differenzierung stabilisiert, zum anderen auch die Mortalität dieser Zellen oder deren De-Differenzierung auch postoperativ reduziert.

Gegenstand der Erfindung ist damit auch ein Verfahren zur Herstellung eines *de novo* Cornealendothel-Implantats aus isolierten biologischen Zellen, enthaltend die Schritte: 1. Inkontaktbringen isolierter biologischer Zellen mit dem artifiziellen Descemet-Konstrukt, 2. Kultivierung der Zellen an dem Descemet-Konstrukt, wobei eine Differenzierung der Zellen in Endothelzellen eines cornealen Endothels erfolgt, und 3. Erhalten des *de novo* zu einem Cornealendothel ausdifferenzierten Gewebes mit dem erfindungsgemäßen Descemet-Konstrukt als artifizieller Descemet-Membran als das *in vitro* Cornealendothel-Implantat.

Es ist also in dieser Variante vorgesehen, das artifizielle Descemet-Konstrukt zusammen mit den daran zu einem Endothel differenzierten Zellen als Implantat zur Reparatur von Endotheldefekten an der Cornea von Patienten einzusetzen. In dieser Variante sind die vorgenannten Biomaterialien als Werkstoff für das Descemet-Konstrukt bevorzugt.

Als weiterer Gegenstand der Erfindung wird das artifizielle Descemet-Konstrukt zusammen mit dem darauf ausgebildeten cornealen Endothelge-

webe als *in vitro* Gewebeimplantat bereitgestellt. Dieses ist in das Auge eines Empfängers, Wirbeltierauge, besonders Säugetierauge, besonders menschliches Auge, implantierbar, um dort die Funktion eines zerstörten cornealen Endothelgewebes zu ersetzen. Gegenstand der Erfindung ist daher

5 auch ein *in vitro* Implantat, enthaltend aus isolierten Zellen *de novo* aufgebautes Cornealendothelgewebe und das artifizielle Descemet-Konstrukt. Das ausdifferenzierte *de novo* Cornealendothelgewebe, welches an das erfindungsgemäße Descemet-Konstrukt adhäriert, kann als konfektioniertes *in vitro* Implantat mittels an sich bekannter Operationstechniken, insbesondere

10 der DMEK (Descemet-Membran endotheliale Keratoplastie) oder DMAEK (Descemet-Membran automatisierte endotheliale Keratoplastie), in das Empfängerauge verbracht werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines *de novo* Cornealendothel-Implantats aus isolierten biologischen Zellen, enthal-

15 tend die Schritte: 1. Inkontaktbringen isolierter biologischer Zellen mit dem artifiziellen Descemet-Konstrukt, 2. Kultivierung der Zellen an dem Descemet-Konstrukt, wobei eine Differenzierung der Zellen in Endothelzellen eines cornealen Endothels erfolgt, 3. Erhalten des *de novo* zu einem Cornealendothel ausdifferenzierten Gewebes an dem erfindungsgemäßen

20 Descemet-Konstrukt, 4. Ablösen des Cornealendothelgewebes von dem Descemet-Konstrukt und Erhalt des isolierten Cornealendothelgewebes als das *in vitro* Cornealendothel-Implantat.

Es ist in dieser alternativen Variante also vorgesehen, das nach Ausdifferenzierung der darauf ausgesäten Zellen zu einem Endothelgewebe von dort

25 wieder abzulösen und das isolierte Endothelgewebe als Implantat zur Reparatur von Endotheldefekten an der Cornea von Patienten einzusetzen.

Das Ablösen des Endothelgewebes von dem artifiziellen Descemet-Konstrukt kann nach an sich aus der *in vitro* Gewebekultur bekannten Verfahren erfolgen. Darunter fällt die Verwendung von lösenden Enzymen, Detergenzien und ähnlichem. Es ist vorgesehen, dass die Zellen mit einem
5 schonenden Enzym wie Akkutase behandelt werden. Dabei muss verhindert werden, dass neben den Adhäsionsproteinen, welche die Anhaftung der Endothelzellen an das Substrat vermitteln, nicht auch "tight junctions" zwischen den Endothelzellen selbst zerstört werden, was die funktionelle Integrität des Gewebes beeinträchtigen würde.

10 Bevorzugt ist, alternativ oder zusätzlich, die Oberfläche Descemet-Konstrukts, zumindest an der Seite des Kontaktes mit den Endothelzellen, spezifisch beschichtet oder funktionalisiert, um die Ausbildung von Adhäsionsfaktoren zu vermindern und die Ablösung zu erleichtern.

In einer besonders bevorzugten Variante ist, alternativ oder zusätzlich, das
15 synthetische Polymer des Descemet-Konstrukts ein hierin beschriebenes thermosensitives oder thermoresponsives Polymer, bevorzugt ein N-Isopropylacrylamid. In solchen Werkstoffen kann über die Temperatur die Adhäsion beziehungsweise die Ablösung der Endothelzellen vom Substrat, das heißt dem Descemet-Konstrukt gesteuert werden. Bevorzugt wird zum
20 Ablösen der Endothelzellen das Descemet-Konstrukt mit den Endothelzellen nach Abschluss der Kultivierungs-/Differenzierungsphase auf eine niedrigere Temperatur von etwa 20 °C oder weniger gebracht. Dadurch erfährt das thermosensitive Substrat eine Zustandsänderung, was zur Ablösung des Endothelgewebes als Ganzes führt oder diese weitgehend unterstützt.

25 Als weiterer Gegenstand der Erfindung wird also das *in vitro* ausgebildete cornealen Endothelgewebe als solches als das *in vitro* Gewebeimplantat

- bereitgestellt. Dieses ist in das Auge eines Empfängers, Wirbeltierauge, besonders Säugetierauge, besonders menschliches Auge, implantierbar, um dort die Funktion eines zerstörten cornealen Endothelgewebes zu ersetzen. Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein *in vitro* Implantat, bestehend
- 5 aus dem aus isolierten Zellen *de novo* aufgebautes Cornealendothelgewebe. Das isolierte *de novo* Cornealendothelgewebe kann mittels an sich bekannter Operationstechniken, insbesondere der DMEK (Descemet-Membran endotheliale Keratoplastie) oder DMAEK (Descemet-Membran automatisierte endotheliale Keratoplastie), in das Empfängerauge verbracht werden.
- 10 Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Figuren und den Beispielen zu spezifischen Ausführungsformen näher beschrieben.

- Die Figuren zeigen schematisch und beispielhaft den Aufbau des Descemet-Konstrukts. In den Darstellungen in Figur 1 und Figur 2 sind die Größen nicht skaliert; vielmehr sind die wabenförmigen Strukturen gegenüber der
- 15 Gesamtgröße des Konstrukts mehrfach vergrößert dargestellt. Figur 1 zeigt eine Draufsicht in die konkave Seite 12 des erfindungsgemäßen kalottenförmigen Descemet-Konstrukts. Figur 2 zeigt eine Querschnittsansicht des Descemet-Konstrukts nach Figur 1. Zur Darstellung der Räumlichkeit der Struktur sind die Wabenstrukturen in Figur 1 zum Rand hin perspektivisch
- 20 verzerrt. Das Descemet-Konstrukt weist einen Grundkörper 10 in Form einer Kalotte oder Halbschale auf, wobei der entsprechende Kugelradius der Kalotte dem Radius der Cornea im Empfängerauge angepasst ist. Die Wabenstruktur der Mikrostrukturierung ist aus gedachten repetitiven Grundelementen 20 zusammengesetzt, welche jeweils eine zentrale Vertiefung 22
- 25 und seitliche als positive Stege 24 ausgebildete Abgrenzungen aufweist. In der dargestellten Ausgestaltung des Descemet-Konstrukts weist dieses randseitig einen umlaufenden überstehenden Rand 14 auf. In der Oberfläche der

konkaven Vertiefung 12 des kalottenförmigen Konstrukts 10 ist eine Wa-
benstruktur aus repetitiven Grundelementen 20, jeweils mit Vertiefungen 22
und seitlichen Stegen 24 vorgesehen. In der dargestellten Ausführung ist an
dem oberen Rand des kalottenförmigen Grundkörpers 10 ein umlaufender
5 im Wesentlichen glatter Rand 14 ausgebildet.

Beispiel 1: Herstellung eines artifiziellen Descemet-Konstrukts

1. Lithographische Herstellung einer Matrize

1.1 Zwei-Photonen-Lithographie

Die Zwei-Photonen-Lithographie (2PL) basiert auf dem physikalischen Ef-
10 fekt der Zwei-Photonen-Absorption (2PA) und ermöglicht die Herstellung
dreidimensionaler Strukturen bei einer lateralen Auflösung von 150 nm und
einer axialen Auflösung von 400 nm. Der aufgeweitete Strahl eines Femto-
sekunden-Faserlasers mit einer Wellenlänge von 780 nm wird in ein inver-
tiertes Mikroskopobjektiv eingekoppelt und von diesem in ein flüssiges,
15 photosensitives Polymer fokussiert. Da der Laser fokussiert und gepulst ist,
ist die Intensität im Fokus hoch genug um innerhalb des Fokus Zwei-
Photonen-Absorption zu ermöglichen. In dem entsprechenden Bereich wird
anstatt infraroter Strahlung ultraviolette Strahlung mit einer Wellenlänge
von 390 nm emittiert. Das flüssige Photopolymer vernetzt nur bei der Be-
20 lichtung durch die energiereiche UV-Strahlung, so dass in dem Bereich, in
welchem Zwei-Photonen-Absorption stattfindet, das flüssige Polymer aus-
härtet.

Durch Bewegung des photosensitiven Polymers relativ zum Fokus können
beliebige Strukturen aus Polymer, eingesetzt werden IP-Dip, IP-L, IP-G,
25 OrmoComp, AR-P3120, SU8, hergestellt werden. Ein abschließender Ent-

wicklungsschritt in einem Lösemittel löst das unbelichtete Material von dem belichteten um die Struktur frei zu legen.

Es gibt vier Variationen der Zwei-Photonen-Lithographie, die jeweils für die Herstellung relevanter Strukturen genutzt werden können:

- 5 a) Bei dem herkömmlichen Verfahren wird der Laserstrahl durch ein Glasplättchen hindurch in das photosensitive Polymer fokussiert. Zudem befindet sich zwischen dem Mikroskopobjektiv und dem Glasplättchen Immersionsöl, um möglichst viel Laserlicht in das Polymer einzukoppeln und damit eine maximale Auflösung zu ermöglichen. Der Arbeitsabstand des
10 Objektivs begrenzt bei dieser Variation des Verfahrens die maximale Strukturhöhe. Die Struktur wird von der Oberseite des Substrats aus nach oben hin aufgebaut.
- b) Die Dip-in Laserlithographie (DiLL) ermöglicht auch die Verwendung opaker Substrate wie Metall oder Silizium. Hier wird der Laserstrahl
15 auf die Unterseite des Substrates fokussiert, das photosensitive Polymer befindet sich zwischen Mikroskopobjektiv und Substrat und dient gleichzeitig als Immersionsmedium. Die Struktur wird von der Substratunterseite aus nach unten hin aufgebaut. Die maximale Strukturhöhe aufgrund der Piezosteuerung liegt bei 300 µm, durch Verwendung des z-Drives des Mikro-
20 skopobjektivs können auch weitaus höhere Strukturen realisiert werden.
- c) Die dritte Variation besteht in der Verwendung eines Luftobjektivs. Das Prinzip entspricht dem des herkömmlichen Verfahrens, jedoch ohne Verwendung von Immersionsöl.

d) Durch ein AddOn, welches auf Galvoscantern basiert, kann durch das Schreiben mit mehreren Foki gleichzeitig die Schreibgeschwindigkeit auf bis zu 200 fach erhöht werden.

Die Strukturen, welche mit der 2PL hergestellt werden sollen, müssen zuerst
5 programmiert werden. Hierfür kann entweder die Software Describe (für andere Systeme auch Matlab) verwendet werden, die mit der Programmiersprache GWL arbeitet, oder die entsprechende Struktur kann als stl-Datei programmiert und dann dem Programm Nanoslicer übergeben werden. Da das photosensitive Polymer nicht als Material für die Zelldifferenzierung
10 geeignet ist, wird die invertierte Struktur der Descemet-Membran hergestellt und in ein geeignetes Material abgeformt. Verwendet werden Silikonkautschuk oder humanes oder tierisches Collagen. Entsprechend werden sechseckige Noppen realisiert, die Abweichungen in Durchmesser und Höhe aufweisen und zufällig angeordnet sind.

15 Die Vorgehensweise zur Herstellung der Strukturen gestaltet sich wie folgt:

- Fixierung des Substrats mit Kleber (Fixogum) im Probenhalter
- Auftropfen des entsprechenden Photopolymers auf die Oberseite (für das herkömmliche Verfahren und das Luftobjektiv) oder die Unterseite (für das DiLL-Verfahren) des Substrats
- 20 • Für das herkömmliche Verfahren zudem Aufbringung von Immersionsöl an der Unterseite des Substrats
- Fixierung des Probenhalters mit der Probe in dem 2PL-Gerät

- Starten des Schreibvorgangs durch entsprechende Programmierung der Struktur. Die Probe wird entsprechend der programmierten Struktur relativ zum Fokus des Lasers bewegt.

1.2. Interferenzlithographie

- 5 Bei der Interferenzlithographie wird die Zwei- oder Mehrstrahlinterferenz ausgenutzt um das entsprechende Interferenzmuster in einer lichtempfindlichen Fläche abzubilden und zu speichern. Dafür wird ein Laserstrahl (Argonionenlaser) aufgeweitet und (z.B. durch einen Strahlteilerwürfel) in zwei Teilstrahlen geteilt. Diese werden mit Spiegeln (Plan- oder Konkavspiegeln)
- 10 unter einem bestimmten Winkel überlagert, so dass in Abhängigkeit dieses Winkels sowie der verwendeten Wellenlänge ein Streifenmuster mit einer bestimmten Gitterkonstanten entsteht.

- Die lichtempfindliche Probe, welche in dem Interferenzmuster positioniert wird, besteht aus einem Substrat (Metall, Silizium, Glas), auf welches mittels Spin Coatings eine glatte Schicht aus Photopolymer aufgeschleudert
- 15 wird (Schichtdicke, Schleuderprogramm). Hierbei können Positiv- oder Negativlacke verwendet werden, wobei Negativlacke dort vernetzen, wo sie belichtet werden, bei Positivlacken bildet der unbelichtete Anteil des Polymers die Struktur.

- 20 Um das streifenförmige Interferenzmuster in der Polymerschicht zu speichern, wird eine Probe (Substrat mit Resistschicht) mit dem Interferenzmuster belichtet. Ein darauf folgender Entwicklungsschritt löst (bei Positivresist) das belichtete Polymer aus der Schicht heraus. Damit mit diesem Verfahren sechseckige Noppen hergestellt werden können, muss dieselbe Probe dreimal mit dem Interferenzmuster belichtet werden, wobei die Probe nach jeder
- 25 Belichtung um 60° gedreht wird. Nach dem Entwicklungsschritt liegen

sechseckige Noppen, bestehend aus Kunststoff vor, die ebenfalls für die Abformung der Descemet-Struktur in ein anderes Material verwendet werden können. Die Vorgehensweise gestaltet sich dabei wie folgt: Beschichten eines Substrats mit Photopolymer, je nach Polymer ggf. Ausbacken der Probe auf einer „Hot Plate“; Positionieren der Probe an der Stelle des Interferenzmusters im optischen Aufbau, Dreimaliges Belichten der Probe mit dem Interferenzmuster, wobei die Probe nach jeder Belichtung um 60° in dieselbe Richtung gedreht wird, und Entwickeln der Probe in dem entsprechenden Entwicklerbad

10 1.3 Grauton-Lithographie

Die Grauton-Lithographie basiert auf der Belichtung einer Maske, deren Muster durch die Belichtung in einem photoempfindlichen Polymer gespeichert wird. Dabei werden unterschiedliche Strukturtiefen durch unterschiedliche Grautöne auf der Maske realisiert. Hinter der Maske bildet sich eine Intensitätsverteilung entsprechend der Grautonverteilung auf der Maske aus. Unter Verwendung eines Positivresists ist die Struktur dort am tiefsten, wo die Intensität am höchsten ist. Für Negativresist-Materialien verhält sich dieser Zusammenhang umgekehrt.

Um mit der Grautonlithographie die invertierte Descemet-Struktur herzustellen, muss eine Maske designt werden, welche die Struktur in Grautönen abbildet. Bei Verwendung eines Positivresist-Materialien sind die Konturen der Sechsecke hell und werden zur Mitte hin dunkler. Wird Negativresist-Material verwendet, so sind die Sechsecke auf der Maske in der Mitte hell und werden nach außen hin dunkler. Um eine flächige Ausleuchtung der Maske zu gewährleisten, wird diese senkrecht zur optischen Achse in einen aufgeweiteten und fokussierten Laserstrahl positioniert. Durch die Fokussie-

5 rung wird die Maske verkleinert auf der Probe abgebildet, so dass die Maße der Struktur originalgetreu sind. Hier gestaltet sich die Vorgehensweise wie folgt: Beschichten eines Substrats mit Photopolymer, je nach Polymer ggf. Ausbacken der Probe auf einer „Hot Plate“, Positionieren der Probe an der Stelle des Interferenzmusters im optischen Aufbau, Belichten der Probe mit einem aufgeweiteten, fokussierten Laserstrahl, der unmittelbar nach der Aufweitung die Grauton-Maske durchleuchtet, und Entwickeln der Probe in dem entsprechenden Entwicklerbad.

2. Abformen des finalen biologischen Descemet-Konstrukts

10 Da für die Zelldifferenzierung die Materialeigenschaften von großer Bedeutung sind, wird die so lithographisch hergestellte Struktur in ein weicheres Material, verwendet werden Silikonkautschuk oder tierisches oder humanes Collagen, abgeformt, so dass in dem Material die nachgebildete Descemet-Struktur vorliegt. Zur Herstellung eines implantierbaren Descemet-
15 Konstrukts aus biokompatiblen Material, verwendet wird eine gießfähige Collagenzusammensetzung, wird zunächst eine strukturierte Matrice aus Kunststoff erzeugt.

Beispiel 2: Herstellung des *in vitro* Cornealendothel-Gewebes

20 Mesenchymale Stammzellen, die zuvor aus dem Fettgewebe entnommen und isoliert wurden, werden auf dem gemäß Beispiel 1 hergestellten artifiziellen Descemet-Konstrukt in einer Zelldichte von mindestens 5×10^5 Zellen pro cm^2 ausgesät. Zur gleichmäßigen Verteilung und Adhäsion wird das Konstrukt orbital geschüttelt.

25 Nach vollständiger Adhäsion wird die Membran in einen Bioreaktor eingespannt (37°C , 5 % CO_2 , 100 % rel. Feuchte) und solange kultiviert, bis die

Stammzellen vollständig differenziert und die Funktionskraft cornealer Endothelzellen erzielt wurde (testbar durch Endothelzell-spezifische Marker beziehungsweise Funktionstests). Die Kultivierungsdauer richtet sich individuell nach der Differenzierungsgeschwindigkeit der konkreten Stammzellen. Zur Kultivierung wird ein basales Kulturmedium verwendet, das zu 10
5 % Serum und 1 % Antibiotika enthält.

Nach Abschluss der Kultivierung wird ein ausdifferenziertes vollfunktionsfähiges *de novo* Cornealendothel-Gewebe auf dem Descemet-Konstrukt erhalten. Dieses Gewebe haftet auf dem Descemet-Konstrukt an und bildet
10 zusammen mit dem Descemet-Konstrukt ein *in vitro*-Implantat zur Reparatur eines Cornealendotheldefekts in einem Empfängerauge.

Ansprüche

1. Artifizielles Descemet-Konstrukt zur mechanotransduktiven Differenzierung biologischer Zellen zu einem *de novo* Cornealendothel-Gewebe, wobei das Konstrukt aus einem kalottenförmigen Grundkörper (10) mit einer in der konkaven Seite (12) des Grundkörpers (10) ausgebildeten Wabenstruktur gebildet ist.
5
2. Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Wabenstruktur aus repetitiven Grundelementen (20) mit zentraler Vertiefung (22) und seitlichen Stegen (24) gebildet ist und die Steghöhe 0,3 bis 1 μm , die Stegbreite 1 bis 8 μm und die Breite der von den Stegen umschlossenen Vertiefung jeweils von 10 bis 20 μm beträgt.
10
3. Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Wabenstruktur aus repetitiven Grundelementen (20) von im Wesentlichen gleicher Größe gebildet ist.
4. Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Wabenstruktur aus repetitiven Grundelementen (20) verschiedener Größe gebildet ist für eine quasi-stochastische Verteilung der Größen der Grundelemente (20) in der Wabenstruktur.
15
5. Konstrukt nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei die Grundelemente (20) jeweils eine hexagonale Grundform aufweisen.
- 20 6. Konstrukt nach einem der vorstehenden Ansprüche, bestehend aus biologischem oder biokompatiblen Polymer.

7. *In vitro* Implantat, enthaltend das Descemet-Konstrukt nach einem der vorstehenden Ansprüche und *de novo* aus isolierten Zellen gebildetes Cornealendothelgewebe.
8. Verfahren zur Herstellung eines artifiziellen Descemet-Konstrukts
5 nach einem der Ansprüche 1 bis 6, enthaltend die Schritte:
- Bereitstellen eines polymeren Grundkörpers,
 - Ausbilden einer räumlichen Wabenstruktur in einer Oberfläche des Grundkörpers mittels mikrostrukturierendem Verfahren, ausgewählt aus: photolithographischer Strukturierung, photolytischer Ablation,
10 mikromechanischer Ablation, Formgießen und Formprägen.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Ausbildung der räumlichen Wabenstruktur die Schritte enthält:
- Erstellen einer negativen Form der Wabenstruktur mittels eines der mikrostrukturierenden Verfahren und anschließend
 - 15 – Ausbilden der Wabenstruktur in einem biokompatiblen oder biologischen Polymer durch Gießen oder Prägen mittels der erstellten negativen Form.
10. Verwendung des artifiziellen Descemet-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur mechanotransduktiven Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Cornealendothel-Gewebe.
20
11. Verfahren zur Herstellung eines *in vitro* Cornealendothel-Implantats aus isolierten biologischen Zellen *de novo*, enthaltend die Schritte:

- Inkontaktbringen isolierter biologischer Zellen mit dem artifiziellen Descemet-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
 - Kultivierung der Zellen auf dem Descemet-Konstrukt, wobei eine Differenzierung der Zellen in Endothelzellen eines cornealen Endothels erfolgt, und
 - Erhalten des zu einem *de novo* Cornealendothel ausdifferenzierten Gewebes mit dem Descemet-Konstrukt als das *in vitro* Cornealendothel-Implantat.
12. Verfahren nach Anspruch 11 mit dem weiteren Schritt:
- Ablösen des zu einem *de novo* Cornealendothel ausdifferenzierten Gewebes von dem Descemet-Konstrukt und Erhalt des isolierten Cornealendothels als das *in vitro* Cornealendothel-Implantat.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die isolierten biologischen Zellen mesenchymale Stammzellen sind.
14. *in vitro* Cornealendothel-Implantat, hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13.

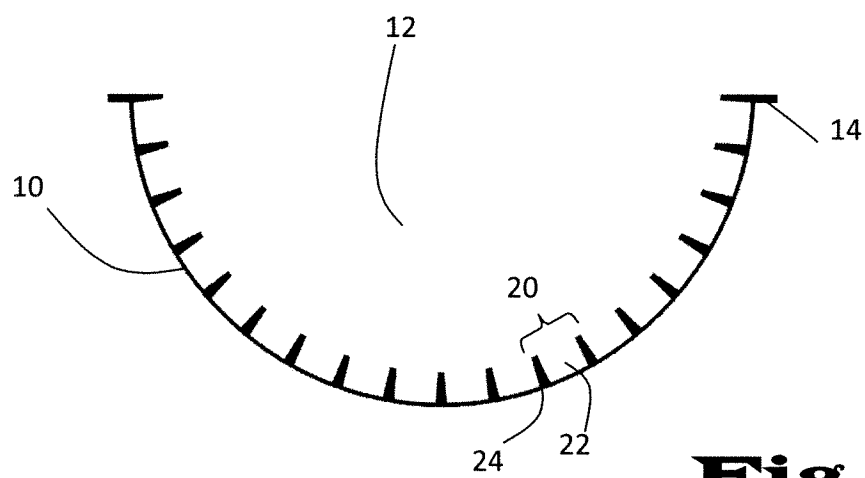
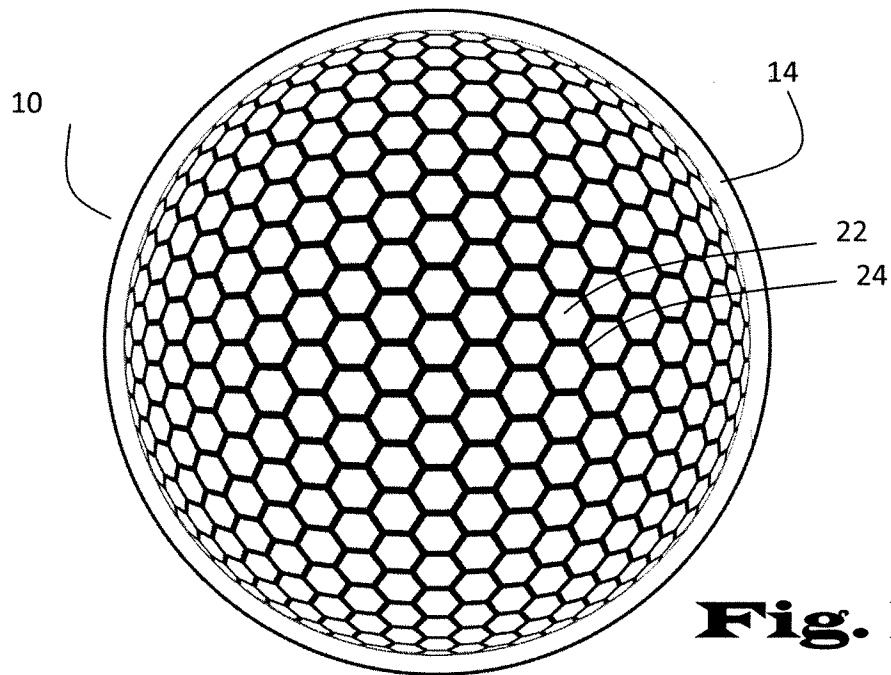


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/054101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61F2/14
ADD.

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)

A61F A61L 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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 835 023 A1 (AMANO SHIRO [JP]; YAMAGAMI SATORU [JP]; MIMURA TATSUYA [JP]) 19 September 2007 (2007-09-19)	8-14
A	paragraphs [0001], [0010], [0011], [0020] - [0049], [0066]; claims 1-3,9,11,12,15,28,29,33,38,40,43; figures 1,2,6	1-7
A	----- US 2005/214259 A1 (SANO YOICHIRO [JP] ET AL) 29 September 2005 (2005-09-29) paragraphs [0001], [0006], [0007], [0036], [0045], [0084], [0094]; claims 1,2,4,7,9; figure 5	1,3,5,8, 11,12,14
A	----- US 2010/215717 A1 (SOKER SHAY [US] ET AL) 26 August 2010 (2010-08-26) paragraphs [0008] - [0012], [0026] -----	1,10,11



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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2016

Date of mailing of the international search report

04/07/2016

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

Merté, Birgit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/054101

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1835023	A1	19-09-2007	EP 1835023 A1 19-09-2007
		US 2009232772 A1	17-09-2009
		WO 2006092894 A1	08-09-2006

US 2005214259	A1	29-09-2005	AU 2003211971 A1 17-11-2003
			CA 2483659 A1 13-11-2003
			US 2005214259 A1 29-09-2005
			WO 03092762 A1 13-11-2003

US 2010215717	A1	26-08-2010	US 2010215717 A1 26-08-2010
			US 2014099290 A1 10-04-2014
			WO 2010099310 A1 02-09-2010

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. A61F2/14

ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A61F A61L 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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 835 023 A1 (AMANO SHIRO [JP]; YAMAGAMI SATORU [JP]; MIMURA TATSUYA [JP]) 19. September 2007 (2007-09-19)	8-14
A	Absätze [0001], [0010], [0011], [0020] - [0049], [0066]; Ansprüche 1-3, 9, 11, 12, 15, 28, 29, 33, 38, 40, 43; Abbildungen 1, 2, 6	1-7
A	US 2005/214259 A1 (SANO YOICHIRO [JP] ET AL) 29. September 2005 (2005-09-29) Absätze [0001], [0006], [0007], [0036], [0045], [0084], [0094]; Ansprüche 1, 2, 4, 7, 9; Abbildung 5	1, 3, 5, 8, 11, 12, 14
A	US 2010/215717 A1 (SOKER SHAY [US] ET AL) 26. August 2010 (2010-08-26) Absätze [0008] - [0012], [0026]	1, 10, 11



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" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 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

22. Juni 2016

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/07/2016

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

Merté, Birgit

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/054101

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
EP 1835023	A1	19-09-2007	EP	1835023	A1		19-09-2007	
			US	2009232772	A1		17-09-2009	
			WO	2006092894	A1		08-09-2006	

US 2005214259	A1	29-09-2005	AU	2003211971	A1		17-11-2003	
			CA	2483659	A1		13-11-2003	
			US	2005214259	A1		29-09-2005	
			WO	03092762	A1		13-11-2003	

US 2010215717	A1	26-08-2010	US	2010215717	A1		26-08-2010	
			US	2014099290	A1		10-04-2014	
			WO	2010099310	A1		02-09-2010	
