

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



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

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/010232 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 5/00 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/005643

(22) Internationales Anmeldedatum:

10. Juli 2008 (10.07.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2007 034 580.3 13. Juli 2007 (13.07.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UND
MEDIZINISCHES INSTITUT AN DER UNIVER-
SITÄT TÜBINGEN IN REUTLINGEN STIFTUNG
BÜRGERLICHEN RECHTS [DE/DE]; Markwiesen-
strasse 55, 72770 Reutlingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WURST, Helmut
[DE/DE]; Amselweg 22, 77793 Pfullingen (DE).

(74) Anwälte: LAUFER, Gabriele usw.; Witte, Weller & Part-
ner, Postfach 10 54 62, 70047 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, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom In-
ternationalen Büro erhältlich

(54) Title: BIOMATERIAL BASED ON A HYDROPHILIC POLYMER CARRIER

(54) Bezeichnung: BIOMATERIAL BASIEREND AUF EINEM HYDROPHILEN POLYMEREN TRÄGER

(57) Abstract: The invention relates to a biomaterial for cultivating cells and tissues, based on a polymer carrier that contains at least one cross-linkable hydrophilic polymer. Said polymer is functionalised with groups that are selected from maleimide, vinyl sulfone, acrylate, alkylhalogenide, azirine, pyridyl, thionitrobenzene acid group, or arylating groups. The invention also relates to a method for producing said type of biomaterial, and to the use of specific functional groups for producing a biomaterial for cultivating tissue and/or cells. Said biomaterial can have biofactors that have a specific effect on cells.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Biomaterial für die Kultivierung von Zellen oder Gewebe, basierend auf einem polymeren Träger, der zumindest ein vernetzbares hydrophiles Polymer enthält. Das Polymer ist dabei mit Gruppen funktionalisiert, die ausgewählt sind aus Maleimid-, Vinylsulfon-, Acrylat-, Alkylhalogenid-, Azirin-, Pyridyl-, Thionitrobenzolsäuregruppengruppen, oder arylierende Gruppen. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Biomaterials, sowie die Verwendung bestimmter funktionalisierender Gruppen zur Herstellung eines Biomaterials für die Kultivierung von Gewebe und/oder Zellen. Das Biomaterial kann dabei Biofaktoren aufweisen, die eine bestimmte Wirkung auf Zellen ausüben.



WO 2009/010232 A1

Biomaterial basierend auf einem hydrophilen polymeren Träger

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Biomaterial für die Kultivierung von Zellen und/oder aus Zellen bestehendem Gewebe, basierend auf einem polymeren Träger, der zumindest ein vernetztes hydrophiles Polymer enthält.

Derartige Biomaterialien werden im Stand der Technik bspw. als sog. Drug-Release-Materialien, als Implantate, als Gewebe-bildende Matrices oder als Materialien für die Kultur von Zellen eingesetzt, und oftmals auch als „Hydrogele“ bezeichnet. Diese Biomaterialien werden üblicherweise für therapeutische Zwecke oder für die biologische Grundlagenforschung verwendet, da sie aufgrund ihrer einstellbaren biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften wertvolle Werkzeuge in der regenerativen Medizin und im „Tissue Engineering“, sowie bei der allgemeinen Kultivierung von Zellen darstellen.

Mit den Biomaterialien kann daher bspw. die Wiederherstellung der Struktur und Funktion von degeneriertem oder verletztem Gewebe erreicht werden, wenn sie mit Zellen beladen werden, anschließend implantiert werden und im Folgenden die Morphogenese von Gewebe somit fördern, oder wenn sie, nicht mit Zellen beladen, an Stellen implantiert werden, an denen sie durch das Einwachsen von Zellen und ggf. deren Differenzierung die Bildung von neuem Gewebe *in situ* fördern.

Wie bereits erwähnt, liegt ein weiteres Haupteinsatzgebiet von auf natürlichen oder synthetischen Materialien basierenden Biomaterialien in analytischen Zellkulturanwendungen, anhand derer bspw. die Wirkungsweise von Biofaktoren auf Zellen untersucht werden kann.

Im Stand der Technik sind verschiedene, auf natürlichen oder künstlichen Materialien basierende Biomaterialien mit verschiedenen Eigenschaften bekannt, die sich im Allgemeinen, und je nach erwünschtem Einsatzgebiet, durch eine hinreichende mechanische Stabilität, Elastizität, und durch eine Stabilität gegenüber einem Abbau auszeichnen, und die vor allem nicht toxisch sind. Häufig verwendete Materialien natürlichen Ursprungs sind Präparationen von Kollagen I. Dieses hydrophile Protein enthält Bereiche, die mit Zellen reagieren, wie bspw. Adhäsionssignale, Signale zur proteolytischen Spaltung vom Kollagen I, oder zur Zelldifferenzierung. Diese Signale und die dreidimensionale Natur der Kultivierung tragen dazu bei, dass sich Zellen in diesen Kollagen-Gelen natürlicher verhalten als in konventioneller zweidimensionaler Kultur auf Oberflächen von Kultivierungsbehältnissen.

Um die Funktionswege dieser Signale besser verstehen zu können, ist es notwendig, Biomaterialien einzusetzen, bei denen die Art und die Menge der Signalgruppen kontrolliert werden können, also ein Biomaterial, das die Zellen nicht schädigt und zunächst keine Signale trägt und somit Zellen gegenüber neutral ist, und das mit Signalgruppen modifiziert werden kann.

Im Stand der Technik (siehe bspw. Hersel *et al.*, Biomaterials 24 (2003) 4385-4415; Lutolf und Hubbell, Nature Biotechnology, 23 (2005) 47-66) wird in aller Regel als ein solches zellneutrales Polymer Polyethylenglykol (im Folgenden öfters auch mit „PEG“ abgekürzt) eingesetzt, da es nicht toxisch wirkt, nicht durch Zellen gebunden wird und hydrophil ist. Da lineares PEG jedoch nur an beiden Enden modifiziert werden kann, und da für die Bildung eines vernetzten Gels jedoch mindestens ein Reaktionspartner mindestens drei reaktive Gruppen tragen muss, werden einerseits zur Vernetzung Peptide eingesetzt, die mindestens drei reaktive Gruppen tragen, oder aber es wird verzweigtes PEG eingesetzt, das bspw. vier modifizierbare Enden besitzt.

Die im Stand der Technik bekannten Polymere bzw. Hydrogele, haben jedoch den Nachteil, dass die Herstellung/Gewinnung der zur Vernetzung eingesetzten Peptide aufwändig und teuer ist, ebenso wie die Herstellung von verzweigtem PEG. Ferner ist von Nachteil, dass bei der Herstellung von Gelen aus Reaktionspartnern mit drei oder vier reaktiven Gruppen pro Molekül, sehr sorgfältig gearbeitet werden muss, da für die Gelbildung alle Reaktionspartner im richtigen Verhältnis stehen müssen.

Die im Stand der Technik bekannten Ansätze sind daher für die Entwicklung von Reagenzien für die Kultivierung von Zellen und Geweben von Nachteil.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Biomaterial bereitzustellen, mit dem die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Biomaterialien überwunden werden können.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung eines Biomaterials gelöst, das auf einem polymeren Träger basiert, der zumindest ein vernetztes hydrophiles Polymer enthält, wobei das Polymer mit Gruppen funktionalisiert ist, die aus Maleimid-, Vinylsulfon-, Acrylat-, Alkylhalogenid-, Azirin-, Pyridyl-, Thionitrobenzolsäuregruppengruppen, oder arylierenden Gruppen ausgewählt sind.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Mit dem erfindungsgemäßen Biomaterial wird ein Polymer bereitgestellt, das sehr viele modifizierbare Gruppen aufweist, und das im Vergleich zu verzweigtem PEG gleichzeitig sehr kostengünstig herzustellen ist.

Mit dem erfindungsgemäßen Biomaterial können kostengünstig Hydrogele bereitgestellt werden, die einerseits bei der Kultivierung von Zellen, sowie deren Untersuchung hinsichtlich der Reaktion auf Biofaktoren eingesetzt werden können, oder aber andererseits auch ggf. bei der Kultivierung von Gewebe, sei es *ex vivo* durch Besiede-

lung mit Zellen und Implantation in ein zu regenerierendes Gewebe, oder *in situ* durch Bereitstellung einer Matrix, in welche Zellen einwandern können.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, das Biomaterial bzw. das Hydrogel auch als „Drug-Release“-Biomaterial zu verwenden, also als Material, aus dem *in situ* Wirkstoffe freigesetzt werden. Solche Wirkstoffe können bspw. Arzneimittel, Pharmazeutika oder sonstige natürliche oder synthetische Wirkstoffe sein, also Substanzen, die eine bestimmte Wirkung auf das das Biomaterial umgebende Gewebe oder Zellen ausüben.

Vorliegend wird unter „Biomaterial“ jedes natürliche und synthetische Material verstanden, das für die Herstellung von Matrices oder Gelen geeignet ist, die für die Kultivierung von Zellen/Gewebe *ex vivo* oder *in vivo* verwendet werden können.

Unter „funktionalisiert“ bzw. funktionalisieren ist vorliegend jeder (abgeschlossene) Vorgang zu verstehen, mit dem dem Polymer – bspw. durch Hinzufügen von Gruppen an das Polymer – eine Funktion verliehen wird, die es normalerweise nicht besitzt. Das derart „funktionalisierte Polymer“ wird dann als „Biomaterial“ bezeichnet.

Unter „Gewebe“ wird vorliegend jeder Verband gleichartig differenzierter oder unterschiedlich differenzierter Zellen verstanden. In einem vielzelligen Organismus können Gewebe gemeinsam einen umschriebenen Aufgabenbereich erfüllen und/oder das spezifische Baumaterial für Organe bilden, gerade im Gegensatz zum bloßen Zusammenschluss undifferenzierter oder nur zeitweilig differenzierter Einzelzellen.

Mit „Kultivierung von Zellen oder Geweben“ ist vorliegend jede Anwendung gemeint, bei der Zellen zum Zwecke der Vermehrung oder der Differenzierung, oder der Synthese von zellulären und extrazellulären Komponenten auf das Biomaterial aufgebracht werden bzw. einwandern können, und ggf. ein Gewebe bilden.

Das Biomaterial ist dabei zellneutral, was vorliegend einerseits wörtlich bedeutet, dass das Biomaterial sich gegenüber Zellen „neutral“ verhält, und somit keinen Einfluss auf die Zellen hat, bzw. keine Reaktion bei den Zellen auslöst. Die Zellen binden bei diesen Materialien nicht „von sich aus“ an das Polymer, sondern ggf. erst nach einer Modifizierung des Polymers mit entsprechenden Gruppen.

Das so bereitgestellte Biomaterial kann danach je nach Anwendung und Zweck gezielt mit Biofaktoren modifiziert werden. Zellen können in das Biomaterial eingebracht werden, mit den daran gekoppelten Biofaktoren interagieren und anschließend untersucht werden. Dadurch ist eine gezielte Untersuchung von bestimmten Biofaktoren bzw. deren Wirkung auf Zellen möglich.

Mit den im Stand der Technik bekannten, auf bspw. Kollagen basierenden Biomaterialien war dies nicht möglich, da diese bereits von sich aus mit den Zellen reagieren und Zellreaktionen auslösen können, was eine gezielte Untersuchung von Biofaktoren bzw. deren Wirkungsmechanismen auf Zellen unmöglich macht.

Die für die Funktionalisierung des Polymers eingesetzten Substanzen sind bei dem erfindungsgemäßen Biomaterial ausgewählt aus Maleimid-, Vinylsulfon-, Acrylat-, Alkylhalogenid-, Azirin-, Pyridyl-, Thionitrobenzolsäuregruppengruppen, oder arylisierende Gruppen. Über diese Gruppen können wiederum bspw. Biofaktoren an dem Polymer angebracht werden, an welche wiederum Zellen binden können. Das Polymer wird dann mit Zellen kombiniert und durch einen Vernetzer in ein dreidimensionales hydrophiles Netzwerk überführt. Andererseits können die Zellen aber auch, bspw. zur bloßen Kultivierung, auch ohne Biofaktoren in das Biomaterial eingebracht sein, so dass die Zellen bei dieser Ausführungsform direkt zu dem funktionalisierten Polymer gegeben werden, wonach dieses anschließend in Anwesenheit der Zellen vernetzt wird.

In den beschriebenen Versuchen konnte die Adhäsion von Zellen an Gelkomponenten und die Kultivierung von Zellen in dem Gel, sowie die Modifikation des Biomaterials mit Peptiden gezeigt werden.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Biomaterials ist bevorzugt, wenn das Polymer aus Polyvinylalkohol (PVA), Serumalbumin (z. B. vom Rind), Pullulan, Polyvinylpyrrolidon, Methylzellulose, Amylose, Amylopektin, Glykogen, oder Mischungen davon ausgewählt ist.

Dabei sind insbesondere funktionalisierter Polyvinylalkohol und funktionalisiertes Rinderserumalbumin bevorzugt. Mit den letzten beiden Materialien konnten erfolgreich Versuche zur Kopplung von Peptiden an das Polymer, sowie zur Kultivierung von Zellen in dem Biomaterial gezeigt werden.

Der Einsatz der genannten hydrophilen, zellneutralen, funktionalisierten Polymere für die Kultivierung von Zellen und/oder Geweben ist im Stand der Technik nicht bekannt oder nahe gelegt. So wird zwar für die Antikörperherstellung maleimidfunktionalisiertes Rinderserumalbumin zur Kopplung von Peptiden an BSA eingesetzt, allerdings wurde dessen Einsatz zur Kultivierung von Zellen und/oder Geweben weder gezeigt noch vorgeschlagen.

Ferner ist im Stand der Technik der Einsatz von maleimidfunktionalisiertes Polyvinylalkohol bekannt (siehe Manecke und Vogt, Biochimie 62 (1980) 603-613), allerdings lediglich zur Immobilisierung von Enzymen, ohne einen Hinweis oder eine Offenbarung für einen Einsatz zur Zell-/Gewebekultur.

Dass maleimidfunktionalisierte Polymere, oder Polymere, die mit einer der anderen genannten Gruppen funktionalisiert werden, für einen Einsatz als Biomaterial zur Kultivierung von Zellen und/oder Geweben geeignet sind, war unerwartet und nicht nahe gelegt. Die der Anmeldung zugrunde liegenden Versuche zeigen zum ersten Mal, dass mit den erfindungsgemäßen Biomaterialien ein effizientes Werkzeug für die Zell-/Gewebekultur bereitgestellt wird, das herausragende Eigenschaften auch für die Untersuchung von Biofaktoren, bzw. für deren Reaktion auf/mit Zellen bietet.

Daher ist in weiteren Ausführungsformen bevorzugt, wenn das Biomaterial ferner zumindest einen Biofaktor aufweist, und insbesondere, wenn der Biofaktor zumindest eine Thiolgruppe aufweist, über welche der Biofaktor an Maleimidgruppen des Polymers kovalent gebunden ist.

„Biofaktor“ soll vorliegend jede natürliche oder synthetische Substanz bedeuten, die einen Einfluss auf Zellen haben kann, bzw. die Reaktionen auf/in Zellen ausüben kann. Dieser Einfluss kann dabei auf bestimmte Zellen und bestimmte Bedingungen beschränkt sein, ohne dass die Substanz ihre Bedeutung als „Biofaktor“ verlieren würde. Die chemische Beschaffenheit der vorliegend als „Biofaktoren“ bezeichneten Substanzen ist dabei nicht auf eine bestimmte (Verbindungs-)Klasse beschränkt, sondern kann vielmehr jede natürliche und synthetische Substanz mit einschließen die von ihrer Natur aus und/oder in modifizierter Form irgendeine Wirkung auf biologische Zellen ausübt.

Unter „Signalgruppen“ soll dabei vorliegend jeder Teil eines Biofaktoren verstanden werden, über welche eine Reaktion von Zellen auf die Biofaktoren ausgelöst wird.

Mit „Zellen“ sind dabei sämtliche Zellen umfasst, die mit dem vorliegenden Biomaterial kultiviert werden können, und schließen insbesondere eukaryontische Zellen, insbesondere Säugetierzellen wie humane und tierische Zellen mit ein.

Insbesondere ist bevorzugt, wenn der Biofaktor ausgewählt ist aus Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, organische Wirkstoffe, Apoptose-induzierende Wirkstoffe, adhäsionsvermittelnde Wirkstoffe, wachstumshemmende Wirkstoffe, entzündungshemmende Wirkstoffe, Rezeptoragonisten- und Rezeptorantagonisten, oder Mischungen davon.

Diese Ausführungsform hat den Vorteil, dass gezielt verschiedene Faktoren ausgewählt werden können, deren Wirkung auf Zellen zwar bekannt ist, deren spezifische Wirkung in dreidimensionaler Kulturmgebung jedoch noch aufzudecken ist.

Insbesondere ist bevorzugt, wenn der Biofaktor ausgewählt ist aus: Proteinen der extrazellulären Matrix, Proteinen der Zelloberfläche, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Zucker, Lektine, Kohlenhydrate, Zytokine, DNA, RNA, siRNA, Aptamere, sowie bindungs- oder wirkungsrelevanten Fragmenten davon, oder Mischungen davon.

Die Extrazelluläre Matrix (Extrazellulärmatrix, Interzellulärsubstanz, EZM, ECM) ist der Anteil des Gewebes, der von Zellen in den Interzellularraum, also den Raum zwischen den Zellen sezerniert wird. Die EZM stellt daher die Gesamtheit aller Makromoleküle dar, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden. Die extrazelluläre Matrix besteht zu großen Teil aus verschiedenen Proteinen, insbesondere Kollagene, und Glykoproteinen, insbesondere Laminine, Vitronectin, Fibronectin, bzw. aus bestimmten Polysacchariden, den Glykosaminoglykanen.

Mit „bindungs- oder wirkungsrelevanten Fragmenten davon“ sind Teile/Abschnitte der aufgeführten Biofaktoren gemeint, die, obwohl ev. nicht der vollständige Biofaktor eingesetzt wird, für sich genommen immer noch die gleiche/nahezu gleiche oder zumindest ähnliche Reaktion oder Wirkung auf Zellen ausüben, wie der komplette Biofaktor. Unter Reaktion kann dabei bereits die bloße Bindung von/an Zellen zu verstehen sein, aber auch die einer Bindung anschließende Reaktion in einer Zelle auf die Bindung, wie bspw. die Auslösung von bestimmten Reaktionswegen in den Zellen, die zu einer Produktion/Ausschüttung bestimmter Substanzen durch die Zellen führen können, oder aber zur einer Umwandlung oder Differenzierung der Zellen.

In diesem Zusammenhang ist bevorzugt, wenn das Peptid eine Sequenz aufweist, das ausgewählt ist aus SEQ ID Nr. 1 (Peptid „HW1“), SEQ ID Nr. 2 (Peptid „HW2“) oder SEQ ID Nr. 9 (Peptid „HW9“) aus dem beigefügten Sequenzprotokoll. Die Aminosäuresequenz 6-11 in HW 9 ist eine Adhäsionssequenz aus menschlichem Fibronectin, die aber auch in einigen anderen Organismen zu finden ist. Die flankierenden Sequenzen sind keines natürlichen Ursprungs.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Biomaterials für Zell-/Gewebekulturenanwendungen, das die folgenden Schritte aufweist:

- a) Bereitstellen eines hydrophilen Polymers,
- b) Funktionalisieren des Polymers aus Schritt a) mit einer Substanz, die ausgewählt ist aus Maleimid, Vinylsulfon, Acrylsäure-, Alkylhalogenid-, Azirin-, Pyridyl-, Thionitrobenzolsäuregruppengruppen, oder arylierende Gruppen, und
- c) Hinzufügen eines Vernetzers zum Vernetzen des in Schritt b) modifizierten Polymers.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat den Vorteil, dass dadurch kostengünstig Biomaterialien hergestellt werden können, die Zellen gegenüber zellneutral sind, und mit welchen ein einfaches und zuverlässiges Werkzeug bereitgestellt wird, anhand dessen bspw. Zellen untersucht oder kultiviert werden können.

Insbesondere ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt, wenn es ferner den Schritt a)' aufweist:

- a)' Aminierung des Polymers.

Dieses Verfahren wird insbesondere bei der Herstellung von maleimidfunktionalisiertem PVA eingesetzt, wohingegen bspw. BSA, d.h. Rinderserumalbumin, vor der Funktionalisierung nicht aminiert werden muss.

Ferner ist bevorzugt, wenn das Verfahren ferner nach Schritt b) den Schritt b)' aufweist:

- b)' Hinzufügen von und Inkubieren mit Biofaktoren und/oder Zellen, insbesondere Säugetierzellen.

Bei dieser Ausführungsform werden vorteilhafterweise entweder zunächst Biofaktoren und anschließend Zellen zu dem funktionalisierten Polymer hinzugefügt, wodurch die Biofaktoren kovalent an die funktionellen Gruppen, und die Zellen an die Biofaktoren binden können. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Zellen ohne kovalent gebundene Biofaktoren zu dem Polymer zugegeben werden, wodurch bspw. ein Biomaterial lediglich für die Kultivierung von Zellen, ohne eine Untersuchung der Reaktionen von Biofaktoren auf die Zellen.

In einer weiteren Ausführungsform ist bevorzugt, wenn das Polymer ausgewählt ist aus Polyvinylalkohol, Serumalbumin, insbesondere Rinderserumalbumin, Dextran, Pullulan, Polyvinylpyrrolidon, Methylzellulose, Amylose, Amylopektin, Glykogen, oder Mischungen davon.

Diese Ausführungsformen haben den Vorteil, dass auf Substanzen zurückgegriffen werden kann, die sich nachgewiesenermaßen gegenüber Zellen neutral verhalten.

Ferner ist bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt, wenn der Biofaktor ausgewählt ist aus Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, organische Wirkstoffe, Apoptose-induzierende Wirkstoffe, adhäsionsvermittelnde Wirkstoffe, wachstumshemmende Wirkstoffe, entzündungshemmende Wirkstoffe, Rezeptoragonisten- und Rezeptorantagonisten, und insbesondere aus Proteinen der extrazellulären Matrix, Proteinen der Zelloberfläche, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Zucker, Lektine, Kohlenhydrate, Zytokine, DNA, RNA, siRNA, Aptamere, sowie bindungs- oder wirkungsrelevanten Fragmenten davon, oder Mischungen davon.

Bei einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist bevorzugt, wenn der Vernetzer in Schritt c) ausgewählt ist aus Dithio-PEG oder SH-modifiziertem Dextran.

In der Erfindung zugrunde liegenden Versuchen konnte der Einsatz dieser Vernetzer erfolgreich gezeigt werden. Ferner ist von Vorteil, dass beide Substanzen im Stand der Technik hinreichend beschrieben und auf ev. unerwünscht Nebenreaktionen getestet sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist dabei bevorzugt, wenn ein erfindungsgemäßes Biomaterial, wie beschrieben, hergestellt wird.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Maleimid, Vinylsulfon, *Acrylat*, Alkylhalogenid, Azirin, Pyridyl, oder Thionitrobenzolsäure, zur Funktionalisierung von hydrophilen Polymeren für die Herstellung eines Biomaterials für Zellkulturanwendungen, und insbesondere die Verwendung der Substanzen zur Herstellung eines wie zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Biomaterials.

Mit der vorliegenden Anmeldung wird zum ersten Mal die neue Verwendung der aufgeführten Substanzen zur Herstellung eines Biomaterials offenbart, das für die Zell-/Gewebekultur geeignet ist.

Es versteht sich, dass zur genauen Untersuchung und Analyse der Zellen, sollte diese gewünscht sein, das Biomaterial durch jeweils spezifisch geeignete Substanzen abgebaut werden kann. Dabei hängt die einzusetzende Substanz von dem verwendeten Vernetzer und/oder Polymer ab, so dass bspw. bei der Verwendung von Dextran als Vernetzer oder als Polymer Dextranasen zum Abbau eingesetzt werden können.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der Beschreibung und der beigefügten Zeichnung.

Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der Zeichnung dargestellt und werden in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 Die Ergebnisse von Adhäsionsversuchen von 3T3-Zellen an verschiedene Gelkomponenten;
- Fig. 2a, b konfokale Laser Scanning Mikroskopie-Aufnahmen von MDCK-Zysten nach 15 Tagen im PVA-Gel; und
- Fig. 3 die Ergebnisse der Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen in PVA und BSA-Gelen (Calcein/Propidiumjodid-Färbung).

Beispiel 1: Herstellung von maleimidfunktionalisierter BSA

250 mg BSA (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. A7030) wurden in 5 ml 1M Na-Borat (pH 8,2) gelöst. Diese Lösung wurde mit 6 mg N-Maleoyl- β -Alanin (Sigma-Aldrich Kat.-Nr 63285) versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Weiterhin wurden 130 mg N-Hydroxysuccinimid in 730 μ l Acetonitril gelöst. Danach wurden 96 mg N-Maleoyl- β -Alanin in 570 μ l der N-Hydroxysuccinimid-Lösung gelöst. Zu dieser Lösung wurden 80 μ l Acetonitril und 80 μ l Diisopropylcarbodiimid gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde tropfenweise zu der BSA-Lösung unter ständigem Rühren zugegeben. Nach Inkubation von 45 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz viermal gegen 500 ml PBS auf Eis dialysiert und anschließend durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 4 ml konzentriert.

Beispiel 2: Herstellung von maleimidfunktionalisiertem PVA

120 mg Carbonyldiimidazol wurden in 3 ml 4% (w/v) PVA in DMSO (Sigma, Kat.-Nr P8136) gelöst und für 3 hr bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde danach zu 420 μ l Ethylendiamin unter Rühren zugetropft und für 2 Tage bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Gefäß gerührt. Aminiertes PVA wurde durch

Zugabe von 30 ml Ethanol/Diethylether (1:5) präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml PBS gelöst und durch Zugabe von 2,5 M HCl auf pH 6 gebracht. Danach wurde die Lösung dreimal gegen 1 Liter 100 mM Na-Carbonat (pH 8,2) dialysiert. Zur Funktionalisierung des aminierten PVA wurden zunächst 75 mg N-Maleoyl- β -Alanin in 1029 μ l 1M N-Hydroxysuccinimid in Acetonitril gelöst und durch Zugabe von 125 μ l Diisopropylcarbodiimid aktiviert. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde tropfenweise zu der gerührten Amin-PVA-Lösung gegeben. Nach 1 hr bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde dreimal gegen 600 ml PBS dialysiert. Danach wurde der Ansatz durch Ultrafiltration auf 3,5 ml eingengt.

Statt PVA kann auch Dextran durch Maleimid- oder Thiolgruppen funktionalisiert werden. Zur Herstellung von thiofunktionalisiertem Dextran wurden beispielsweise zunächst 1 g Dextran (Serva, Kat. Nr. 18690) in 10 ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid gelöst. In dieser Lösung wurden zusätzlich 100 mg Carbonyldiimidazol gelöst. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden 1,12 g Cystamin x 2 HCl und 1,5 ml Pyridin zugegeben. Zur vollständigen Auflösung des Diamins wurde der Ansatz einige Minuten im Ultraschallbad behandelt. Nach einer zweitägigen Inkubation wurde der Ansatz dreimal gegen 1 Liter H₂O dialysiert (regenerierte Zellulosemembran, MWCO 3000). Während der Dialyse wurde der Säuregehalt durch Zugabe von HCl auf pH 6 eingestellt. Anschließend wurden im Dialysat 347 mg Dithiothreitol gelöst. Modifiziertes Dextran wurde sofort danach von niedermolekularen Komponenten durch Gelfiltrationschromatografie mit Sephadex G25 (HiPrep™ 26/10 Desalting Column (GE Healthcare/Life Sciences) mit 5 mM Na-Phosphat (pH 5) und einer Flussrate von 10 ml/min abgetrennt. Dextran enthaltende Fraktionen wurden vereinigt (36 ml) und anschließend durch Dialyse zunächst gegen 1 Liter 1 mM HCl, und anschließend gegen 1 Liter 0,5 mM HCl unter Stickstoffatmosphäre weiter gereinigt. Zum Schluss wurde der Ansatz durch Lyophilisation auf 9 ml eingengt und durch Zentrifugation von ungelöstem Material abgetrennt.

Beispiel 3: Kopplung von Peptiden und Gelbildung

Bindung von Peptiden an Maleimid-BSA: 10 µl Maleimid-BSA wurden mit unterschiedlichen Mengen Peptid HW1 (Acetyl-KGLQGCGGLQGK-OH; SEQ ID Nr. 1) oder HW2 (Acetyl-KGGLQGK-OH; SEQ ID Nr. 2) bei Raumtemperatur für mindestens 10 min in einem Volumen von 12 µl inkubiert. Danach wurde freies von gekoppeltem Peptid durch Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt und das Elutionsprofil durch Messung der Absorption bei 214 nm bestimmt. Zur Bestimmung des Einbaus wurden die Chromatogramme integriert. Für HW1 wurde ein Einbau von 93% in Maleimid-BSA und für HW2 ein Einbau von 10% gemessen. Dagegen konnte keine Kopplung von HW1 an unmodifizierte BSA nachgewiesen werden.

Bindung von Peptiden an Maleimid-PVA: 4 µl Maleimid-PVA oder 2 µl 4% PVA wurden mit 100 nmol Peptid HW1 (Acetyl-KGLQGCGGLQGK-OH; SEQ ID Nr. 1) oder HW2 (Acetyl-KGGLQGK-OH; SEQ ID Nr. 2) bei Raumtemperatur für mindestens 10 min in einem Volumen von 16 µl inkubiert. Danach wurden 20 µl einer 1:4-Verdünnung durch Gelfiltrationschromatografie aufgetrennt und das Elutionsprofil durch Messung der Absorption bei 214 nm bestimmt. Zur Bestimmung des Einbaus wurden die Chromatogramme integriert. Tabelle 1 zeigt den relativen Anteil nicht gebundener Peptide:

Tabelle 1: Einbau von Peptiden

Mal-PVA	✓		✓			✓
PVA				✓		
HW1		✓	✓	✓		
HW2					✓	✓
Freies Peptid (%)	n/a	100	12	96	100	107

Gelbildung: Beide Materialien konnten durch Zugabe eines Vernetzers mit zwei Thiolgruppen zu Gelen umgebildet werden. Tabelle 2 zeigt typische Mengen, die zur Gelbildung in unterschiedlichen Stärken geeignet sind.

Tabelle 2: Gelbildung

Maleimid-BSA (µl)	308	167	178			
Maleimid-PVA (µl)				308	168	100
PBS (µl)	0	167	178	0	168	300
100 mg/ml Dithio-PEG (3 kDa) (µl)	92	66	54	92	64	50

Beispiel 4: Adhäsion von 3T3-Zellen an Gelkomponenten

Auf nitrozellulosebeschichtete Glasobjektträger (NMI Technologietransfer GmbH, Reutlingen) wurden jeweils 1 µl unterschiedlicher Komponenten in einem Druckpuffer (0,5% Trehalose, 1 µg/ml BSA-Tetramethylrhodamin-Konjugat (Invitrogen, Carlsbad, CA; Kat.-Nr.A-23016) in PBS (20 mM Na-Phosphat (pH 7,2), 150 mM NaCl)) aufgetragen. Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und am nächsten Tag mit Blockierlösung (Stabilguard, SurModics, Eden Prairie, MN) eingesprüht um die Flächen zwischen den Komponenten zu blockieren. Danach wurden die Träger zweimal mit PBS gewaschen und mit einer Zellsuspension (10^5 3T3-Zellen pro ml) für 2 Stunden geschwenkt. Danach wurde die Zellsuspension entfernt, die Träger wurden mit Comassie-Färbelösung behandelt und fotografiert.

In Fig. 1 sind die Ergebnisse der Adhäsion von 3T3-Zellen auf Gelkomponenten gezeigt, wobei in A 200 µg/ml Fibronektin eingesetzt wurden, in B eine 1:5-verdünnte Maleimid-PVA-Lösung, in C 1 µl einer Lösung bestehend aus 2 µl Maleimid-PVA, 0,5 µl HW9 (FITC-β-Ala-GCGYGRGDSPGSGC; SEQ ID Nr. 3 mit Fluoresceingruppe vor dem β-Alanin; 50 mM), 7,5 µl PBS, in D 20 mg/ml Di-Thio-PEG (3

kDa; Rapp-Polymere Tübingen; Kat.- Nr. 11 3000-40), in E 1:10-verdünnte Maleimid-BSA, und in F 1 μ l einer Lösung bestehend aus 2 μ l Maleimid-BSA, 0,38 μ l HW9 (FITC- β -Ala-GCGYGRGDSPGSGC; SEQ ID Nr. 3 mit Fluoresceingruppe vor dem β -Alanin; 50 mM), 7,62 μ l PBS.

Beispiel 5: Kultivierung von MDCK-Zellen in PVA-Gel

MDCK-Zellen (eine Epithelzelllinie aus der Hundeniere) wurden in einer Dichte von 1 Mio Zellen/ml in PVA-Gele eingesät. (Zusammensetzung des Gels: Maleimid-PVA: 10 μ l, PBS: 6 μ l, MDCK-Zellen: 10⁴ Zellen in 10 μ l PBS, Vernetzer (Dithio-PEG, 3 kDa; 100 mg/ml): 4 μ l). Das Gesamtvolumen des einzelnen Gels betrug hierbei 30 μ l, wobei die 4 μ l Vernetzer in das Zellkulturgefäß (Nalge Nunc Int., LAB-TEK II, Chambered Coverglass - Borosilicate) vorgelegt wurden. Erst nach der Fertigstellung der restlichen Gelmischung, die auch die Zellen enthielt, wurde der Vernetzer durch 3-maliges auf-und-ab pipettieren mit den Gelkomponenten vermischt. Innerhalb von ca. 10 Sekunden bildete sich darauf hin ein Gel. Das Gel wurde mit 400 μ l Kulturmedium (DMEM high Glucose, 4 mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% Fötale Kälberserum) überschichtet und bei 5% CO₂ und 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Nach 7 und 15 Tagen Kultivierung der Zellen im PVA-Gel wurde eine Aktinfärbung (TRITC-Phalloidin [0,3 μ g/ml], Sigma) und Kernfärbung (Syto Green [167 nM], Molecular Probes) zur Darstellung der MDCK-Zellen durchgeführt.

In Fig. 2a und 2b sind konfokale Laser Scanning Mikroskopie-Aufnahmen von MDCK-Zysten nach 15 Tagen im PVA-Gel gezeigt. Bei der gezeigten MDCK-Zyste in Abbildung 2 lässt die Fluoreszenzmarkierung des Aktinzytoskeletts eine Polarität der Zellen mit apikaler Zone in Richtung Lumen und basolateraler Zone in Richtung PVA-Matrix vermuten. Dabei ist in Fig. 2a der optische Schnitt durch eine MDCK-Zyste in PVA-Gel zur Darstellung des Lumens (konfokale Laser-Scanning Mikroskopie) gezeigt: A: Kernfärbung mit Syto Green. B: Aktinfärbung mit TRITC-Phalloidin. In Fig. 2b ist der optische Schnitt im äußeren Bereich durch eine MDCK-Zyste in PVA-Gel gezeigt, wobei das Lumen nicht sichtbar ist: A: Kernfärbung mit Syto Green.

B: Aktinfärbung mit TRITC-Phalloidin. C: Phasenkontrastaufnahme. D: Overlay von A, B, und C.

Beispiel 6: Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen in PVA- und BSA-Gelen

2D-Kultivierung der Zellen: Humane mesenchymale Stammzellen wurden mit Standardmethoden in Gewebekulturflaschen (T75-Flaschen, Greiner) kultiviert, durch Trypsinlösung von der Oberfläche abgelöst, pelletiert, in MSC-Medium aufgenommen und gezählt.

3D-Kultivierung: Zur Einbettung von Zellen in BSA-Gelen wurden 21,6 µl Maleimid-BSA und 19 µl Zellsuspension (50000 Zellen) in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte platziert und durch Einmischung von 9,4 µl Vernetzungslösung (100 mg/ml Dithio-PEG, 3000 Da) vernetzt. Zur Einbettung in PVA wurden 15,1 µl Maleimid-PVA und 28,7 µl Zellsuspension (50000 Zellen) in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte platziert und durch Einmischung von 6,2 µl Vernetzungslösung vernetzt. Nach ca. 5 min wurden die Gelpräparate mit 250 µl Medium überschichtet und für 6 Tage bei 37°C kultiviert. Es wurde eine Calcein-Propidiumjodidfärbung durchgeführt und die Gele wurden in einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Dabei zeigte sich, dass in beiden Gelen der überwiegende Anteil der Zellen (>95%) auch nach 6-tägiger Inkubation noch am Leben war.

In Fig. 3 sind die Ergebnisse der Calcein/Propidiumjodid-Färbung von mesenchymalen Stammzellen nach 6-tägiger 3-D-Kultivierung gezeigt: A: Zellen in BSA-Gel. B: Zellen in PVA-Gel.

Beispiel 7: Beispiele für Zellkulturen in BSA- und PVA-Gelen

Es wurden mehrere primäre Zellpräparationen sowie Zelllinien in PVA- und BSA-Gelen erfolgreich kultiviert. Tabelle 3 gibt einen Überblick über diese Versuche.

Tabelle 3: 3D-Zellkultur mit unterschiedlichen Zellarten

Zellart	Geltyp	Kultivierungsdauer (Tage)	Assays	Ergebnisse
Humane Chondrozyten aus Osteoarthritischem Knorpel	PVA	16	Calcein, Propidiumjodid	>80% Überleben
Humane Chondrozyten aus Osteoarthritischem Knorpel	BSA	16	Calcein, Propidiumjodid	>90% Überleben
Maus MC3T3-Zelllinie	PVA	3	Calcein, Propidiumjodid	>80% Überleben
Maus MC3T3-Zelllinie	BSA	3	Calcein, Propidiumjodid	>70% Überleben
Humane mesenchymale Stammzellen	PVA	6	Calcein, Propidiumjodid	>95% Überleben
Humane mesenchymale Stammzellen	BSA	6	Calcein, Propidiumjodid	>95% Überleben
MDCK	BSA	6	Phasenkontrast-Mikroskopie	Bildung von Zysten
NIH 3T3	PVA	17	Calcein, Propidiumjodid	>50% Überleben, Bildung von Aggregaten (Größe bis zu 60µm)
MDCK	PVA	17	Calcein, Propidiumjodid	>50% Überleben, Bildung von Zysten (Größe bis zu 100µm)
MDCK	PVA	7 und 15	Darstellung der Polarität von Zysten durch Actinfärbung	Apikale und basolaterale Zonen darstellbar. Bei den untersuchten Cysten beide Polaritäten gefunden: apikal sowohl in Richtung Lumen als auch in Richtung Matrix.

Aus den oben aufgeführten Ergebnissen mit den getesteten Biomaterialien zeigt sich, dass sowohl die eingesetzten Polymere, als auch die verwendeten Peptide herausragende Beispiele für die erfindungsgemäßen Biomaterialien sind.

Patentansprüche

1. Biomaterial für die Kultivierung von Zellen oder Gewebe, basierend auf einem polymeren Träger, der zumindest ein vernetzbares hydrophiles Polymer enthält, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer mit Gruppen funktionalisiert ist, die aus Maleimid-, Vinylsulfon-, Acrylat-, Alkylhalogenid-, Azirin-, Pyridyl-, Thionitrobenzolsäuregruppengruppen, oder arylierenden Gruppen ausgewählt sind.
2. Biomaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer in Anwesenheit von Zellen vernetzbar ist.
3. Biomaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ausgewählt ist aus Polyvinylalkohol, Serumalbumin, Pullulan, Polyvinylpyrrolidon, Methylzellulose, Amylose, Amylopektin, Glykogen, oder Mischungen davon.
4. Biomaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomaterial ferner zumindest einen Biofaktor aufweist.
5. Biomaterial nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Biofaktor zumindest eine Thiolgruppe aufweist, über welche die Biofaktoren an Maleimidgruppen des Polymers gebunden sind.
6. Biomaterial nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Biofaktor ausgewählt ist aus Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, organische Wirkstoffe, Apoptose-induzierende Wirkstoffe, adhäsionsvermittelnde Wirkstoffe, wachstumshemmende Wirkstoffe, entzündungshemmende Wirkstoffe, Rezeptoragonisten- und Rezeptorantagonisten.

7. Biomaterial nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Biofaktor ausgewählt ist aus Proteinen der extrazellulären Matrix, Proteinen der Zelloberfläche, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Zucker, Lektine, Kohlenhydrate, Zytokine, DNA, RNA, siRNA, Aptamere, sowie bindungs- oder wirkungsrelevanten Fragmenten davon, oder Mischungen davon.
8. Biomaterial nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer über an Biofaktoren gebundene Zellen vernetzbar ist.
9. Biomaterial nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Säugetierzellen sind.
10. Verfahren zur Herstellung eines Biomaterials für Zellkulturenanwendungen, das die folgenden Schritte aufweist:
 - a) Bereitstellen eines hydrophilen Polymers,
 - b) Funktionalisieren des Polymers aus Schritt a) mit Maleimid oder Vinylsulfon, und
 - c) Hinzufügen eines Vernetzers zum Vernetzen des in Schritt b) funktionalisierten Polymers.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es ferner den Schritt a)' aufweist:
 - a)' Aminierung des Polymers.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass es ferner nach Schritt b) den Schritt b)' aufweist:

- b)' Hinzufügen von und Inkubieren mit Biofaktoren und/oder Zellen, insbesondere Säugetierzellen.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ausgewählt ist aus Polyvinylalkohol, Serumalbumin, Pullulan, Polyvinylpyrrolidon, Methylzellulose, Amylose, Amylopektin, Glykogen, oder Mischungen davon.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Biofaktor ausgewählt ist aus Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, organische Wirkstoffe, Apoptose-induzierende Wirkstoffe, adhäsionsvermittelnde Wirkstoffe, wachstumshemmende Wirkstoffe, entzündungshemmende Wirkstoffe, Rezeptoragonisten- und Rezeptorantagonisten, und insbesondere aus Proteinen der extrazellulären Matrix, Proteinen der Zelloberfläche, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Zucker, Lektine, Kohlenhydrate, Zytokine, DNA, RNA, siRNA, Aptamere, sowie bindungs- oder wirkungsrelevanten Fragmenten davon, oder Mischungen davon.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Biofaktor ausgewählt ist aus Proteinen der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren, bindungs- oder wirkungsrelevanten Fragmenten davon, oder Mischung davon.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Vernetzer in Schritt c) ausgewählt ist aus thioolfunktionalisiertem PEG.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass ein Biomaterial nach einem der Ansprüche 1 bis 8 hergestellt wird.
18. Verwendung von Maleimid, Vinylsulfon, Acrylat, Alkylhalogenid, Azirin, Pyridyl, oder Thionitrobenzolsäure, zur Modifizierung von hydrophilen Polymeren für die Herstellung eines Biomaterials für Zellkulturanwendungen.

19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Biomaterials nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

1 / 3

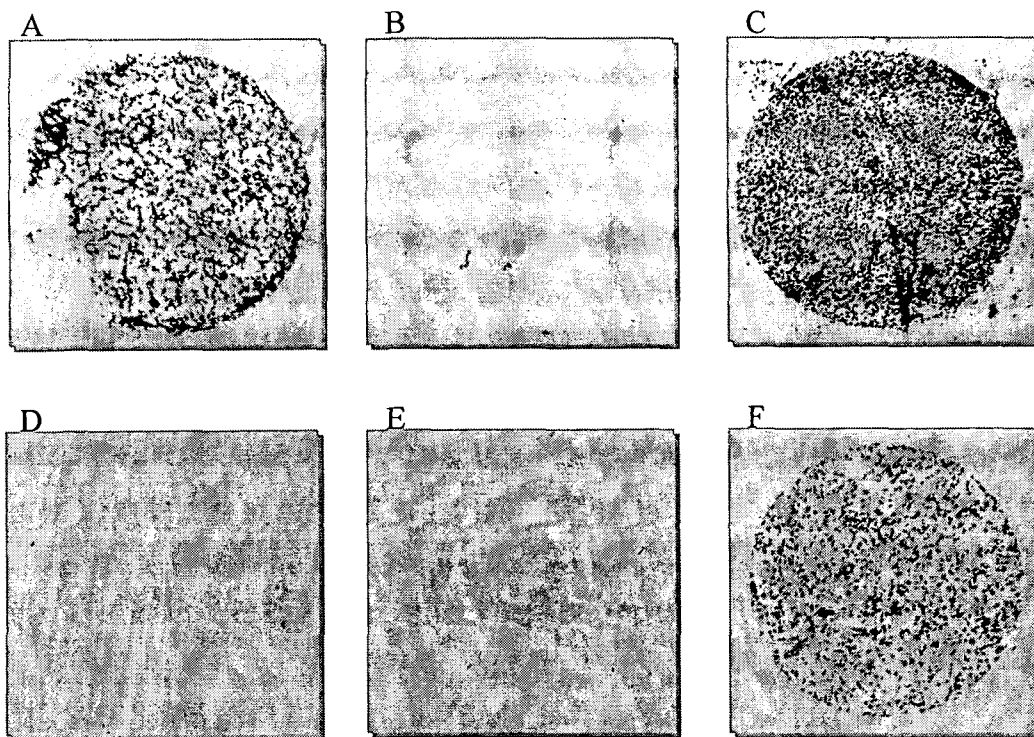


Fig. 1

2 / 3

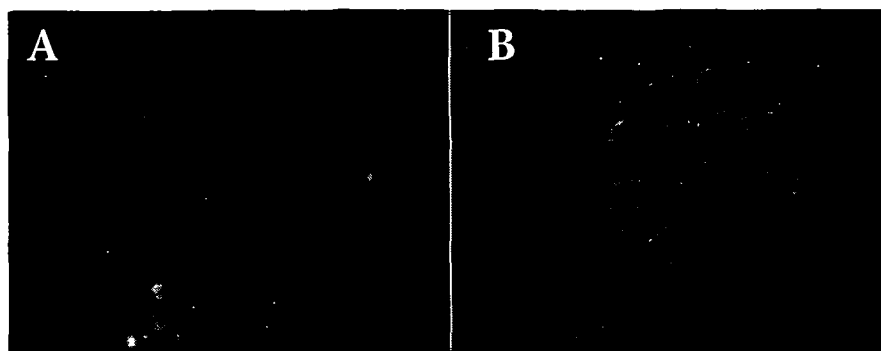


Fig. 2a

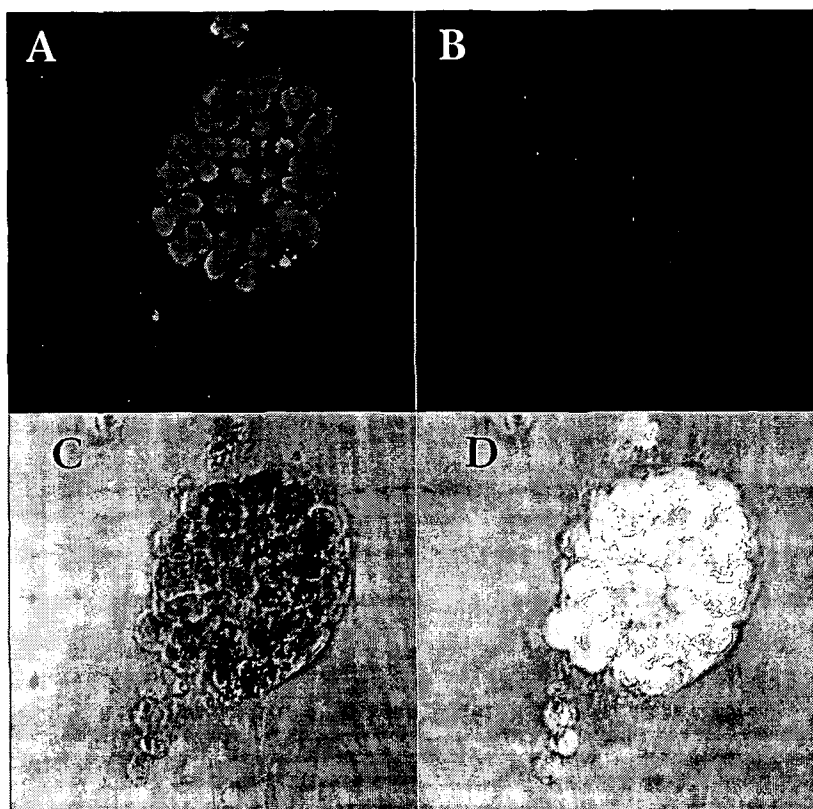


Fig. 2b

3 / 3

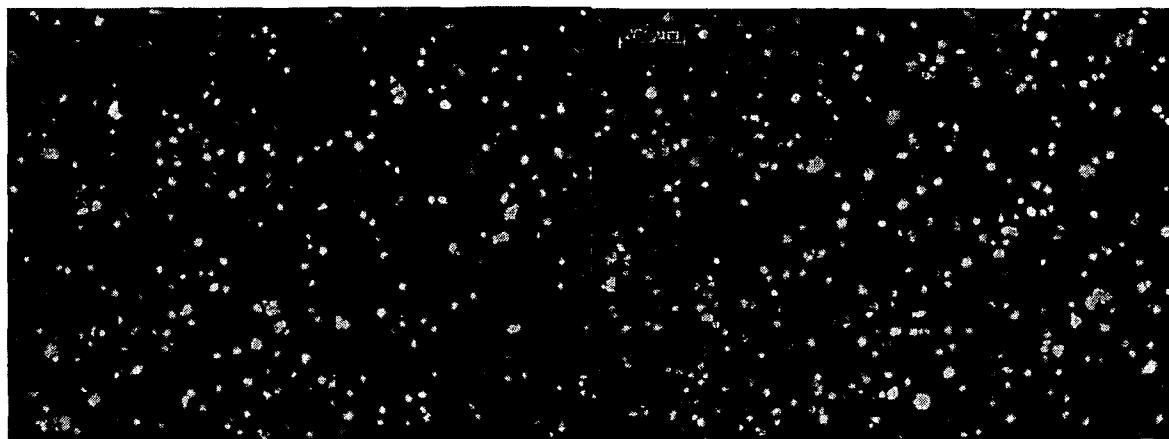


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/005643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/00 C12M3/00

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)
C12N C12M

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NIE T ET AL: "Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE - PROCEEDINGS OF THE THIRTHEENTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN DRUG DELIVERY SYSTEMS 20071008 ELSEVIER NL, vol. 122, no. 3, 10 May 2007 (2007-05-10), pages 287-296, XP022255961 online page 288, right-hand column, paragraph 3 - page 289, left-hand column, paragraph 2 ----- -/--	1-19

☒ 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 document 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.
- *S* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2008

Date of mailing of the international search report

09/12/2008

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

Authorized officer

Manu, Dominique

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/005643

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LÉVESQUE STÉPHANE G ET AL: "Synthesis of enzyme-degradable, peptide-cross-linked dextran hydrogels." BIOCONJUGATE CHEMISTRY 2007 MAY-JUN, vol. 18, no. 3, May 2007 (2007-05), pages 874-885, XP002504996 ISSN: 1043-1802 page 877, right-hand column, paragraph 3 - page 879, left-hand column, paragraph 1 figure 1	1-19
X	----- EP 0 844 252 A (REMACLE JOSE [BE] REMACLE JOSE) 27 May 1998 (1998-05-27) example 3 -----	1-9, 18, 19

Information on patent family members

PCT/EP2008/005643

NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N5/00 C12M3/00

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12N C12M

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, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NIE T ET AL: "Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE - PROCEEDINGS OF THE THIRTHEENTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN DRUG DELIVERY SYSTEMS 20071008 ELSEVIER NL, Bd. 122, Nr. 3, 10. Mai 2007 (2007-05-10), Seiten 287-296, XP02255961 online Seite 288, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 289, linke Spalte, Absatz 2 ----- -/--	1-19



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. November 2008

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/12/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Manu, Dominique

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LÉVESQUE STÉPHANE G ET AL: "Synthesis of enzyme-degradable, peptide-cross-linked dextran hydrogels." BIOCONJUGATE CHEMISTRY 2007 MAY-JUN, Bd. 18, Nr. 3, Mai 2007 (2007-05), Seiten 874-885, XP002504996 ISSN: 1043-1802 Seite 877, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 879, linke Spalte, Absatz 1 Abbildung 1 -----	1-19
X	EP 0 844 252 A (REMACLE JOSE [BE] REMACLE JOSE) 27. Mai 1998 (1998-05-27) Beispiel 3 -----	1-9, 18, 19

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP2008/005643

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument

Datum der
Veröffentlichung

Mitglied(er) der Patentfamilie

Datum der
Veröffentlichung

EP 0844252	A	27-05-1998	KEINE
------------	---	------------	-------