



(10) **DE 10 2019 123 799 B4 2021.11.04**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2019 123 799.8**
(22) Anmeldetag: **05.09.2019**
(43) Offenlegungstag: **11.03.2021**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **04.11.2021**

(51) Int Cl.: **A61L 27/22 (2006.01)**
A61L 27/56 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

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

(73) Patentinhaber:
Universität Bremen, 28359 Bremen, DE

(74) Vertreter:
**BOEHMERT & BOEHMERT Anwaltspartnerschaft
mbB - Patentanwälte Rechtsanwälte, 28209
Bremen, DE**

(72) Erfinder:
**Brüggemann, Dorothea, 28201 Bremen, DE; Suter,
Naiana, 28203 Bremen, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:
US 2011 / 0 270 394 A1

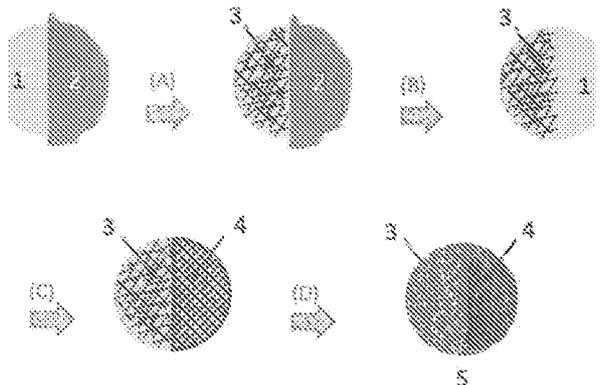
(2) Stapelfeldt, K. et al., "Fabrication of 3D-nanofibrous fibrinogen scaffolds using salt-induced self assembly", *Biofabrication*, (Apr 2019), Vol.11, No.2, S.1-13, Article No.: 025010

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von Biomaterialien mit porösen und glatten Topographien und deren Verwendung**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Herstellung eines Biomaterials, umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen eines Substrats,
- b) Maskieren mindestens eines ersten Bereichs des Substrats mit einer Maskierung,
- c) Hinzufügen mindestens eines ersten Proteins,
- d) Induzieren der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins,
- e) Fixieren des Substrats,
- f) Waschen des Substrats,
- g) Entfernen der Maskierung des mindestens einen ersten Bereichs aus Schritt b),
- h) Maskieren mindestens eines zweiten Bereichs des Substrats,
- i) Hinzufügen mindestens eines zweiten Proteins,
- j) Optional Induzieren der Selbstassemblierung des zweiten Proteins,
- k) Fixieren des Substrats,
- l) Wahlweise, Entfernen der Maskierung des mindestens einen zweiten Bereichs aus Schritt h),
- m) Wahlweise, Waschen des Substrats, wodurch das Biomaterial hergestellt wird; dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine erste Bereich eine glatte Struktur aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine poröse Struktur aufweist, oder dadurch gekennzeichnet, dass entweder der mindestens eine erste Bereich eine poröse Struktur aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine glatte Struktur aufweist oder der mindestens eine

erste Bereich eine Struktur einer ersten Porosität aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine Struktur einer zweiten Porosität aufweist, wobei die erste Porosität von der zweiten Porosität verschieden ist, und/oder das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein ein unterschiedliches Protein ist.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Biomaterialien mit unterschiedlichen Topographien. Die Biomaterialien weisen poröse und glatte Bereiche verschiedener Proteine, unterschiedlich poröse Bereiche verschiedener Proteine oder poröse und glatte Bereiche desselben Proteins auf, die als dreidimensionale Gerüststrukturen verwendet werden können. Die mittels des Verfahrens dieser Erfindung hergestellten Biomaterialien können für medizinische Zwecke eingesetzt werden, beispielsweise in der Wundheilung, im Tissue Engineering, der regenerativen Medizin, der Hautrekonstruktion, der Knochengefäßregeneration, der Blutgefäßregeneration und der Implantatbeschichtung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Unter Tissue Engineering versteht man das Züchten von Gewebe im Labor, welches für medizinische Zwecke wie beispielsweise als Knochen- und Knorpelersatz, Hautersatz und für Herz- und Lebererkrankungen genutzt werden kann. Dafür ist ein strukturelles, lebensfähiges Gewebegerüst, ein sogenanntes Scaffold erforderlich, welches die Form vorgibt und welches von den körpereigenen Zellen anschließend besiedelt werden kann.

[0003] Mittels Tissue Engineering sollen in der Praxis Teile des Gewebes oder ganzes Gewebe (wie beispielsweise Knochen, Knorpel, Blutgefäße und Haut) repariert oder ersetzt werden. Die Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Materialien im Tissue Engineering und den Zellen, die beispielsweise im menschlichen Körper natürlich vorkommen, werden von drei Hauptaspekten bestimmt: Biochemie, Mechanik und Topographie. Tissue Engineering soll biochemische Funktionen, mechanische und strukturelle Eigenschaften innerhalb einer künstlich geschaffenen Gerüststruktur, wie beispielsweise einer künstlichen Bauchspeicheldrüse oder einer bioartifizialen Leber, ermöglichen. So können Zelladhäsion, Morphologie, Migration und Ausrichtung - und darüber letzten Endes die Zellfunktion - durch die zugrunde liegenden Substrateigenschaften des Gewebegerüsts (des Scaffolds) gesteuert werden.

[0004] Im Tissue Engineering wird eine Vielzahl von Proteinen verwendet, die im menschlichen Körper natürlich vorkommen. Gerüste aus Faserproteinen sind besonders wichtig für die Geweberegeneration, da Zellen unter natürlichen Bedingungen in ein nanofaseriges Netzwerk aus Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) eingebettet sind.

[0005] Auch wenn mit dem Tissue Engineering bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden, wird nach wie vor intensiv auf diesem Gebiet geforscht. In Standardzellkultursystemen werden zwei-

dimensionale, d.h. glatte Proteinbeschichtungen verwendet, um die Zelladhäsion an polymeren Petrischalen oder Glasobjektträgern zu fördern.

[0006] In der Wundheilung und in der Gewebetechnik wird ein breites Spektrum an Proteinen eingesetzt, die im menschlichen sowie tierischen Körper vorkommen können. Für diese Anwendungen ist das Protein Fibrinogen von besonderem Interesse, da es an der Blutgerinnung beteiligt ist. Fibrinogen, auch als „Faktor I“ bezeichnet, ist ein Glykoprotein, das im Blut von Wirbeltieren zirkuliert. Bei Gewebe- und Gefäßverletzungen wird es enzymatisch durch Thrombin in Fibrin und anschließend in ein Blutgerinnsel auf Fibrinbasis umgewandelt. Fibrinogen dient in erster Linie dazu, Blutgefäße zu verschließen und hierdurch übermäßige Blutungen zu stoppen. Fibrinogen ist ein „positives“ Akutphasenprotein, d.h. sein Blutspiegel steigt als Reaktion auf systemische Entzündungen und Gewebeschäden.

[0007] Die extrazelluläre Matrix (englisch extracellular matrix, ECM) ist der Anteil tierischen Gewebes, der zwischen den Zellen im sogenannten Interzellularraum liegt. Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus diversen Komponenten zusammen und umfasst die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden. So dient die ECM primär als eine Fixierungsmöglichkeit für die in ihr eingebetteten Zellen. Zwischen Zellen und ECM herrscht stets eine wechselseitige Interaktion, sodass die ECM nicht statisch, sondern auf molekularer Ebene als im Fließgleichgewicht verstanden werden kann. Die Komponenten der ECM werden von Zellen synthetisiert und sezerniert, teilweise erst extrazellulär über weitere Bindungen fixiert und schließlich extrazellulär oder nach Endozytose intrazellulär abgebaut.

[0008] Darüber hinaus wird durch die Bindung an bestimmte Komponenten der ECM durch Zellrezeptoren die Expression von Genen in den Zellen reguliert. Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie der Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe resultieren damit ebenso aus der wechselseitigen Beeinflussung, die der ECM und Zellen widerfährt. Proteine der ECM sind beispielsweise beteiligt an der Adhäsion von Blutplättchen und Endothelzellen, der Zellausbreitung, der Proliferation von Gewebeszellen, der Bildung von Kapillarröhrchen und der Angiogenese.

[0009] ECM Proteine eignen sich zur Herstellung von Gewebegerüsten (Scaffolds). Um die Grenzen bestehender 2D-Kultursysteme zu überwinden und zellinstructive Biomaterialien als Gewebegerüste zu entwickeln, wird derzeit intensive Forschung in die Entwicklung biomimetischer 3D-Matrizen gesteckt, die als Gewebegerüste im Tissue Engineering verwendet werden sollen.

[0010] Zusammen mit biochemischen Hinweisen und der Substratsteifigkeit hat die Oberflächentopographie einen wichtigen Einfluss auf das Zellverhalten, sowohl im Mikro- als auch im Nanobereich. Insbesondere nanotopographische Strukturen auf Oberflächen wirken sich beispielsweise auf die Differenzierung von Stammzellen aus. Zudem reguliert auch die Mikrotopographie die zelluläre Mechanotransduktion. Darüber hinaus reagieren auch Makrophagen als Zellen der körpereigenen Immunabwehr auf die Mikrotopographie. Zur Kontrolle des anregenden Zellwachstums scheint es förderlich zu sein, ausgewählte Bereiche eines Proteingerüsts mit Nanofasern zu strukturieren.

[0011] W09732616 (A1) offenbart eine Abdeckmembran für die Geweberegeneration und/oder Knochenregeneration, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Abdeckmembran mindestens drei Schichten aufweist. Die beiden äußeren Schichten bestehen hierbei aus einem natürlichen Material und die dazwischenliegende Schicht aus mindestens einem Kunststoffmaterial. Das hierin beschriebene Biomaterial weist unterschiedliche Topographien mit einer regulierbaren Biokompatibilität, mechanischen Stabilität und kontrollierbaren Degradations- und Resorptionskinetiken auf.

[0012] US2006247791 (A1) beschreibt medizinische Vorrichtungen zum Unterstützen oder Induzieren des Knochenwachstums mittels eines Implantatkörpers, der eine oder mehrere Trennhilfslinien aufweist. Derartige Trennhilfslinien in Implantatkörpern sollen dem Gesamtkörper eine erhöhte und kontrollierte Flexibilität verleihen.

[0013] EP1252903 (B1) offenbart die Verwendung von Kollagenmaterial für die Herstellung einer mehrschichtigen Membran zur Förderung der Schleimhautregeneration, wobei die Membran eine Sperrschicht umfasst, die eine äußere glatte Seite und eine faserige Seite aufweist, sowie eine Matrixschicht aus Kollagenmaterial, welche an der faserigen Seite der Sperrschicht angebracht wird.

[0014] US 2011/0270394 A1 offenbart eine Struktur, die eine mehrschichtige Lage aus Kollagenmembranmaterial umfasst, die ein gereinigtes Kollagenbarrierelagenmaterial umfasst, das von natürlichem kollagenhaltigem Gewebe abgeleitet ist, wobei das Barrierelagenmaterial eine Barrierschicht mit einer äußeren glatten Barrierefläche und einer der glatten Barrierefläche gegenüberliegenden Faserfläche umfasst.

[0015] Stapelfeldt, K. et al., Biofabrication, (Apr 2019), Vol. 11, No.2, S.1-13, offenbart die Herstellung von 3D-nanofibrösen Fibrinogengerüsten unter Verwendung von salzinduzierter Selbstassemblierung

[0016] Bisherige Ansätze zur Herstellung von Gerüststrukturen für Tissue Engineering haben jedoch unterschiedliche Nachteile oder Einschränkungen. Bisherige Methoden zur Herstellung von Gewebegerüsten mit unterschiedlichen Topographien sehen beispielsweise vor, zunächst eine strukturierte Schablone als Untergrund zu verwenden, die beispielsweise hydrophobe und hydrophile Bereiche enthält. Anhand dieser Bereiche wird dann eine Strukturierung (sogenanntes „Patterning“) erreicht. Nachteilig dabei ist, dass nur sehr dünne Lagen von porösen oder nicht-porösen Proteinbereichen hergestellt werden können und somit keine dreidimensionalen Strukturen entstehen.

[0017] Trotz des vorhandenen Wissens über den Einfluss der Oberflächentopographie auf das Zellverhalten ist es mit herkömmlichen Methoden nicht möglich, dreidimensionale Proteinmuster mit unterschiedlichen Topographien auf demselben Gewebegerüst herzustellen.

[0018] Die Aufgabe dieser Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Herstellung von Biomaterialien mit glatten und porösen oder unterschiedlich porösen Oberflächentopographien in derselben Gerüststruktur bereitzustellen, wobei die Oberflächentopographien entweder aus ein- und demselben Protein oder aus verschiedenen Proteinen gebildet werden. Eine weitere zugrundeliegende Aufgabe dieser Erfindung ist es, ein einfaches und reproduzierbares Verfahren zur Herstellung von Biomaterialien mit dreidimensionalen Proteinmustern bereitzustellen. Eine weitere zugrundeliegende Aufgabe dieser Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, welches das Prozessieren von selbst-assemblierten Nanofasern aus bestimmten Proteinen zu einem übergeordneten Micropattern ermöglichen kann, wodurch die Herstellung strukturierter Proteinsubstrate mit glatten und nanofibrillären Oberflächentopographien in demselben 3D-Gerüst ermöglicht werden soll und sich die Gerüstmorphologie der Biomaterialien von der Nano- bis zur Mikroskala anpassen lässt.

[0019] Die Aufgabe wird gelöst gemäß den Gegenständen der unabhängigen Ansprüche. Weitere Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

[0020] Das vorstehende Problem wird in einem ersten Aspekt gelöst, indem ein Verfahren zur Herstellung eines Biomaterials bereitgestellt wird, umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen eines Substrats,
- b) Maskieren mindestens eines ersten Bereichs des Substrats mit einer Maskierung,
- c) Hinzufügen mindestens eines ersten Proteins,

- d) Induzieren der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins,
- e) Fixieren des Substrats,
- f) Waschen des Substrats,
- g) Entfernen der Maskierung des mindestens einen ersten Bereichs aus Schritt b),
- h) Maskieren mindestens eines zweiten Bereichs des Substrats,
- i) Hinzufügen mindestens eines zweiten Proteins, wobei das Hinzufügen entweder tropfenweise oder durch Eintauchen des Substrats in eine Lösung, die das zweite Protein enthält, erfolgen kann,
- j) Optional Induzieren der Selbstassemblierung des zweiten Proteins,
- k) Fixieren des Substrats,
- l) Wahlweise, Entfernen der Maskierung des mindestens einen zweiten Bereichs aus Schritt h),
- m) Wahlweise, Waschen des Substrats,

wodurch das Biomaterial hergestellt wird, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine erste Bereich eine glatte Struktur aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine poröse Struktur aufweist, oder dadurch gekennzeichnet, dass entweder der mindestens eine erste Bereich eine poröse Struktur aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine glatte Struktur aufweist oder der mindestens eine erste Bereich eine Struktur einer ersten Porosität aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine Struktur einer zweiten Porosität aufweist, wobei die erste Porosität von der zweiten Porosität verschieden ist, und/oder das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein ein unterschiedliches Protein ist.

[0021] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines Biomaterials ist nützlich für die Herstellung eines Biomaterials, welches aus mindestens zwei Bereichen besteht. In einer bevorzugten Ausführungsform weist das hierbei hergestellte Biomaterial ein topographisches Muster auf der Oberfläche des hergestellten Biomaterials auf, wobei der mindestens eine erste Bereich sich topographisch von dem mindestens einen zweiten Bereich unterscheidet.

[0022] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erstreckt sich das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Biomaterial in drei Dimensionen. Erfindungsgemäß wird somit ein dreidimensionales Biomaterial hergestellt. Vorzugsweise hat das hergestellte Biomaterial einen Durchmesser zwischen 0,1 nm und 1.000.000 µm, vorzugsweise zwi-

schen 1 nm und 100.000 µm, mehr bevorzugt zwischen 10 nm und 10.000 µm und am bevorzugtesten zwischen 100 nm und 1.000 µm.

[0023] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eignet sich das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Biomaterial für die Verwendung als ein Gerüst oder als eine Gerüststruktur, z.B. als ein Gewebegerüst oder als eine Gewebegerüststruktur.

[0024] Ein „Gerüst“ im Sinne dieser Erfindung ist jedes Trägersystem oder jeder Rahmen für die Bildung von neuem, lebensfähigem Gewebe. Ein solches Gerüst kann von Zellen besiedelt werden, um neues Gewebe zu bilden. Ein derart hergestelltes Gewebegerüst kann anschließend biologisches Gewebe, beispielsweise beschädigtes Gewebe, verbessern oder ersetzen. Dementsprechend kann das mit den Methoden dieser Erfindung erzeugte Gerüst für medizinische und kosmetische Zwecke verwendet werden.

[0025] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung des Biomaterials ist nicht abhängig vom in Schritt a) des Verfahrens verwendeten Substrat. Vorzugsweise wird in Schritt a) des Verfahrens jedoch ein Substrat verwendet, welches mindestens eine feste Oberfläche aufweist. Das Substrat wird besonders bevorzugt ausgewählt aus Materialien wie beispielsweise Glas, Keramik, Polymeren oder Metallen. Optional besteht das Substrat aus einem Material aus einem Metall, einem Polymer oder Glas und umfasst zudem mindestens eine Oberfläche, die aus Glas, einem Metall oder einem Polymer zusammengesetzt oder mit einem Glas, Metall oder einem Polymer beschichtet ist. Vorzugsweise ist das Metall ausgewählt aus Gold, Silber, Kupfer, vergoldetem Kupfer, verzinnem Kupfer, Aluminium, Platin, Indium, Wolfram, Beryllium, Gallium, Lithium, Calcium, Magnesium, Zink, Titan, Zirkonium, Hafnium und Mischungen davon. Weiterhin ist bevorzugt, dass das Polymer ausgewählt ist aus Polylactid (PLA), Polystyrol, Polybutyrat-Adipat Terephthalat (PBAT) und Mischungen davon.

[0026] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Substrat zwischen dem Schritt a) und dem Schritt b) in einem zusätzlichen Reinigungsschritt a2) gereinigt, um Fett, Schmutz und/oder organische Rückstände vom Substrat zu entfernen. Das Substrat kann mit Piranha-Lösung, Hexanen, Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) und/oder Aceton und/oder Ethanol und/oder Stickstoff gereinigt werden. Alternativ kann ein Kaliumhydroxid in einer Alkohollösung, wie beispielsweise ein 1-10%iges KOH in einer 1:1-Isopropylalkohol-Wasserlösung oder ein Natriumhydroxid in einer Alkohollösung, wie beispielsweise 1-10%iges Natriumhydroxid (NaOH) in einer 1:1-Isopropylalkohollösung, zur Reinigung des Substrats verwendet werden. Eine weitere Option

zur Reinigung des Substrats im zusätzlichen Reinigungsschritt a2) ist die Verwendung einer Kaliumhydroxid/Natriumhydroxid- und Kaliumphosphatlösung, wie beispielsweise einer Lösung, die 1% KOH und 0, 25% K_3PO_4 in Wasser enthält.

[0027] Vorzugsweise wird das Substrat im Reinigungsschritt a2) mit Piranha-Lösung gereinigt. „Piranha-Lösung“ im Rahmen dieser Erfindung ist ein Gemisch aus Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid. Ein Beispiel hierfür ist eine Lösung, die aus 3 Teilen Schwefelsäure (H_2SO_4) und 1 Teil Wasserstoffperoxid (H_2O_2) besteht. Die Konzentration des verwendeten Wasserstoffperoxids kann jede beliebige Konzentration zwischen 1 und 70%, vorzugsweise zwischen 5 und 60%, bevorzugter zwischen 10 und 50%, noch bevorzugter zwischen 20 und 40% und am meisten bevorzugt bei etwa 30% liegen. Eine solche Piranha-Lösung kann organische Rückstände effektiv von Substraten entfernen. Sofern ein Reinigungsschritt a2) mit Piranha-Lösung durchgeführt wird, ist es weiterhin vorteilhaft, das Substrat anschließend in Stickstoff (N_2) zu trocknen. Alternativ kann im Reinigungsschritt a2) die Plasmareinigung verwendet werden, um alle organischen Stoffe von den Oberflächen des Substrats zu entfernen. Der Fachmann ist sich bewusst, wie man eine Plasmareinigung durchführt. So kann beispielsweise das Substrat gereinigt werden, indem das Substrat einem ionisierten Gas, d.h. einem Plasma, ausgesetzt wird. Dieses Verfahren wird im Allgemeinen in einer Vakuumkammer unter Verwendung von Sauerstoff und/oder Argongas durchgeführt. Zu jeder der oben beschriebenen Lösungen kann ein Waschmittel hinzugefügt werden.

[0028] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Maskieren des mindestens einen ersten Bereichs des Substrats in Schritt b) des Verfahrens sowie wahlweise des mindestens einen zweiten Bereichs des Substrats in Schritt h) des Verfahrens mittels einer Maskierung, die eine Polymermaskierung ist. Vorzugsweise besteht die Maskierung aus Gummi und/oder Polymethylsiloxan (PDMS).

[0029] Die schrittweise Maskierung des mindestens einen ersten Bereichs sowie des mindestens einen zweiten Bereichs ermöglicht die Herstellung eines Biomaterials, welches nach Abschluss des Verfahrens sowohl mindestens eine glatte (z.B. planare oder nicht-poröse) Struktur oder Oberfläche aufweist als auch mindestens eine poröse (z.B. nanoporöse) Struktur oder Oberfläche aufweist. Alternativ kann hierdurch ein Biomaterial hergestellt werden, welches nach Abschluss des Verfahrens mindestens eine Struktur (oder Oberfläche) mit einer ersten Porosität und mindestens eine Struktur (oder Oberfläche) mit einer zweiten Porosität aufweist, wobei die erste Porosität von der zweiten Porosität verschieden ist. Die gezielte Anordnung der Maskierung des mindestens einen ersten Bereichs sowie wahlweise des min-

destens einen zweiten Bereichs ermöglicht somit die Herstellung eines Biomaterials mit topographischen Mustern.

[0030] Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Verfahren, in dem ein Biomaterial hergestellt wird, in welchem nach Abschluss des Verfahrens der mindestens eine erste Bereich eine glatte (z.B. planare oder nicht-poröse) Struktur oder Oberfläche (oder eine anders-poröse Struktur oder Oberfläche) aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine poröse (z.B. nanoporöse) Struktur oder Oberfläche aufweist. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft auch ein Verfahren, in dem ein Biomaterial hergestellt wird, in welchem nach Abschluss des Verfahrens der mindestens eine erste Bereich eine poröse (z.B. nanoporöse) Struktur oder Oberfläche aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine glatte (z.B. planare oder nicht-poröse) Struktur oder Oberfläche (oder eine anders-poröse Struktur oder Oberfläche) aufweist.

[0031] Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Verfahren, in dem der mindestens eine zweite Bereich vor dem mindestens einen ersten Bereich hergestellt wird, oder ein Verfahren, in dem der mindestens eine erste Bereich vor dem mindestens einen zweiten Bereich hergestellt wird. Erfindungsgemäß kann somit der zweite Bereich vor dem ersten Bereich hergestellt werden oder der erste Bereich vor dem zweiten Bereich hergestellt werden.

[0032] Weiterhin bevorzugt ist ein Verfahren, in dem ein Biomaterial hergestellt wird, in welchem nach Abschluss des Verfahrens der mindestens eine erste Bereich eine glatte (z.B. planare oder nicht-poröse) Struktur oder Oberfläche (oder eine anders-poröse Struktur oder Oberfläche) aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine poröse (z.B. nanoporöse) Struktur oder Oberfläche aufweist, wobei die Erzeugung der porösen (z.B. nanoporösen) Struktur oder Oberfläche vorzugsweise durch Selbstassemblierung des mindestens einen zweiten Bereichs erfolgt.

[0033] Erfindungsgemäß kann im Schritt h) wahlweise eine Maskierung mindestens eines zweiten Bereichs des Substrats erfolgen. Sofern dieser Maskierungsschritt h) erfolgt, sollte die Maskierung den zuvor hergestellten Bereich, welcher aufgrund der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Bereichs eine poröse (z.B. nanoporöse und/oder faserige) Struktur oder Oberfläche aufweist, maskieren. Somit soll die wahlweise Maskierung in Schritt h) die poröse (z.B. nanoporöse und/oder faserige) Struktur oder Oberfläche maskieren, woraufhin dann im Schritt i) tropfenweise mindestens ein zweites Protein bzw. das Hinzufügen mittels Eintauchen des Substrats in eine Lösung, die das zweite Protein enthält, hinzugefügt wird. Das tropfenweise Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins erfolgt vorzugs-

weise zu dem mindestens einen ersten Bereichs des Substrats, welcher in Schritt b) des Verfahrens mit einer Maskierung maskiert wurde. Nach Entfernung der Maskierung in Schritt g) ist der mindestens eine erste Bereich des Substrats zugänglich zum tropfenweisen Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins. Das tropfenweise Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins ermöglicht die Generierung einer glatten Struktur oder glatten Oberfläche, im Gegensatz zu der porösen Struktur, die mittels Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins in Schritt d) erzeugt wird. Das tropfenweisen Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins setzt nicht zwingend voraus, dass eine Maskierung des mindestens einen zweiten Bereichs des Substrats in Schritt h) erfolgen muss. Alternativ kann durch vorsichtiges tropfenweises Hinzufügen zu dem mindestens einen ersten Bereichs verhindert werden, dass der Bereich mit der porösen Struktur, die mittels Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins in Schritt d) erzeugt wird, verändert wird. Somit erzeugt das vorsichtige tropfenweise Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins ähnliche Ergebnisse, wenn nicht identische, wie durch Anbringung einer Maskierung des mindestens einen zweiten Bereichs und anschließendem tropfenweise Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins erzielt würden.

[0034] In einer alternativen Ausführungsform, in der verschiedene Strukturen verschiedener Porositäten erzeugt werden, umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zwischen dem Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins und des Fixierens des Substrats einen weiteren Schritt des Induzierens der Selbstassemblierung des mindestens einen zweiten Proteins.

[0035] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft das Verfahren, in dem das Maskieren des mindestens einen zweiten Bereichs des Substrats in Schritt h) erfolgt. In diesem Verfahren erfolgt neben dem Schritt h) auch das Entfernen der Maskierung des mindestens einen zweiten Bereichs aus Schritt h) im Schritt k). Falls somit eine Maskierung in Schritt h) des Verfahrens angebracht wird, so soll erfindungsgemäß diese Maskierung in Schritt k) auch wieder entfernt werden.

[0036] Die topographischen Muster aus glatten (z.B. planaren oder nicht-porösen) Strukturen oder Oberflächen und den porösen (z.B. nanoporösen) Strukturen oder Oberflächen (bzw. aus Strukturen oder Oberflächen unterschiedlicher Porosität) können darüber hinaus mit biochemischen Mustern kombiniert werden, indem unterschiedliche Proteine für das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein verwendet werden. Die hergestellten Biomaterialien weisen somit nicht nur Muster aus porösen und glatten Bereichen desselben Proteins auf, sondern auch topographische sowie biochemische

Muster aus porösen und glatten Bereichen verschiedener Proteine. Dies ermöglicht das Ansprechen verschiedener Zelltypen eines Gewebes. Somit ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Kombination aus biochemischen Stimuli (durch die Verwendung verschiedener Proteine) mit topographischen Reizen (porös vs. nicht-porös bzw. verschieden porös) zur gezielten Adhäsion unterschiedlicher Zelltypen auf einer Gerüststruktur, die aus dem erfindungsgemäß hergestellten Biomaterial besteht.

[0037] Die erfindungsgemäße Gerüststruktur, die aus einem Muster (Pattern) von verschiedenen Bereichen aus glatter und poröser (oder unterschiedlich poröser) Proteinstruktur besteht, bietet viele Vorteile. Die Proteinstrukturen haben einen großen Einfluss auf das Verhalten derjenigen Zellen, die mit den Oberflächen des Biomaterials, welches als Gewebegerüst verwendet wird, in Berührung kommen, so dass sie einen starken Einfluss auf beispielsweise Adhäsion, Proliferation, Migration und Morphologie haben. Hierbei spricht man von einem Micro-Environment, welches Zellreaktionen hervorrufen kann. Besonders interessant dabei ist, dass Zellen aus verschiedenen Gewebebereichen auf unterschiedliche Art und Weise auf topographische oder biochemische Reize reagieren. So ist beispielsweise bekannt, dass Fibroblasten (Zellen des Bindegewebes) eher glatte Bereiche bevorzugen, während Osteoblasten (Knochenzellen) vorzugsweise in poröse Bereiche hineinwachsen.

[0038] Erfindungsgemäß hergestellte Biomaterialien eignen sich daher zur Kontrolle des Wachstums verschiedener Zelltypen auf den Gerüststrukturen durch die gezielte Herstellung eines oder mehrerer Topographiemusters/Protein-Musters. So lassen sich beispielsweise Fibroblasten und Osteoblasten durch ein Topographiemuster gezielt ansiedeln, da Fibroblasten vorzugsweise auf glatten (z.B. planaren oder nicht-porösen) Strukturen oder Oberflächen wachsen, wohingegen Osteoblasten vorzugsweise auf porösen (z.B. nanoporöse) Strukturen oder Oberflächen wachsen. Mindestens ein biochemisches Muster (Protein-Muster), welches durch die Verwendung unterschiedlicher Proteine für das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein, erzeugt wird, ermöglicht darüber hinaus die gezielte Ansiedlung unterschiedlicher Zelltypen, wie beispielsweise Keratinozyten und Fibroblasten. Keratinozyten werden so beispielsweise durch Kollagenfasern über beta-Integrine adressiert, wohingegen Fibroblasten vorzugsweise von Strukturen bestehend aus Fibrinogen angesprochen werden (wobei zu bemerken ist, dass auch Fibroblasten über Integrine vom Fibrinogen adressiert werden, allerdings über andere als die Keratinozyten beim Kollagen). Die gezielte Herstellung eines topographischen Musters (Topographiemuster) sowie eines biochemischen Musters (Protein-Musters) ermöglicht somit

die gezielte Co-Kultivierung unterschiedlicher Zelltypen in der Geweberegeneration.

[0039] Da Zellen aus verschiedenen Gewebebereichen auf unterschiedliche Art und Weise auf topographische und/oder biochemische Reize reagieren, ermöglicht die Herstellung eines Biomaterials mit einem topographischen Muster (Topographiemuster) sowie einem biochemischen Muster (Protein-Muster) die gezielte Beeinflussung einer bestimmten Zellantwort. Somit lassen sich die erfindungsgemäß hergestellten Biomaterialien, welche als Gewebegerüststrukturen dienen, zur Induktion oder Beeinflussung einer Immunantwort in einem Probanden, beispielsweise einem Patienten, verwenden.

[0040] Die unterschiedlichen Topographien in einer Proteingerüststruktur haben Einfluss auf das Verhalten der sie umgebenden Zellen. Mit der Möglichkeit, die Topographien steuerbar zu gestalten, hat man gleichzeitig die Möglichkeit, bestimmte Zellantworten zu generieren. Dies bietet eine große Gestaltungsfreiheit für den Bereich des Tissue Engineering.

[0041] Die erfindungsgemäße Lösung des zugrundeliegenden Problems ermöglicht somit eine große Gestaltungsfreiheit bei der Herstellung von körperähnlichen Gerüststrukturen, die die Herstellung von maßgeschneiderten Lösungen für bestimmte Gewebetypen erlaubt. Dadurch bietet die Erfindung einen großen Vorteil im Bereich der regenerativen Medizin und Tissue Engineering, beispielsweise bei der Herstellung bzw. Beschichtung von Implantaten, Wundheilung und Rekonstruktion von Haut, Knochen oder Blutgefäßen. Zudem ist bekannt, dass auch Makrophagen als Zellen der körpereigenen Immunabwehr auf ein Micro-Environment reagieren können. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse ist es möglich, über die Topographien von zu implantierenden Gewebegerüsten die Immunabwehr des Körpers gezielt zu beeinflussen.

[0042] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft daher die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Biomaterialien, wobei Makrophagen auf die erfindungsgemäß hergestellten Biomaterialien reagieren und die körpereigene Immunabwehr induzieren.

[0043] Ein konkretes Anwendungsbeispiel des erfindungsgemäß hergestellten Biomaterials liegt zudem in der Wundheilung, da in der Haut, in der sich bei einer Wunde sowohl Fibrin- als auch Kollagen-Nanofasern befinden, auch unterschiedliche Zelltypen an der Regeneration beteiligt sind. Das erfindungsgemäß hergestellte Biomaterial ermöglicht es, ein Mikropattern bestehend aus beispielsweise Kollagen-Nanofasern und Fibrinogen-Nanofasern herzustellen. Mit den Kollagenfasern lassen sich Keratinozyten adres-

sieren, während die Fibrinogen- und Kollagenfasern das Wachstum von Fibroblasten verbessern.

[0044] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft dann die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Biomaterialien, wobei diese ein gezieltes Zellwachstum ermöglichen. So dienen die porösen (fibrillären, faserigen) Regionen dazu, Bereiche mit einem verstärktem Zellwachstum zu generieren, wohingegen die glatten (nicht-porösen) Bereiche geeignet sind, Bereiche zu generieren, in denen Zellen sich stärker ausgebreitet (im Sinne von „größere Zellfläche“) ansiedeln können.

[0045] Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung bezieht sich dann auf das Verfahren, wobei das Hinzufügen des mindestens einen ersten Proteins in Schritt c) erfolgt, indem das Substrat in eine Lösung bestehend aus dem mindestens einen ersten Proteins eingetaucht wird.

[0046] Noch eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung betrifft dann das Verfahren dieser Erfindung, wobei die Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins in Schritt d) zur Faserbildung führt.

Methoden zur Generierung von Fasern mittels Selbstassemblierung mindestens einen ersten Proteins sind in PCT/EP2019/051242 beschrieben, welches hiermit in seiner Gesamtheit aufgenommen wird.

[0047] Das Induzieren der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins erfolgt vorzugsweise durch die folgenden Schritte:

- i) Hinzufügen eines Salzpuffers und/oder eines wässrigen Puffers und/oder Wassers zu dem Substrat oder Eintauchen des Substrats in den Salzpuffer und/oder den wässrigen Puffer und/oder das Wasser,
- ii) Trocknen des Substrats,
- iii) Wahlweise Hinzufügen eines Salzpuffers und/oder eines wässrigen Puffers und/oder Wassers zu dem Substrat oder Eintauchen des Substrats in den Salzpuffer und/oder den wässrigen Puffer und/oder das Wasser,
- iv) Wahlweise Trocknen des Substrats,
- v) Optional kann eine oder mehrere Wiederholungen der Schritte i) bis iv) durchgeführt werden,
- vi) Fixieren des Substrats und
- vii) Waschen des Substrats,

wodurch ein faseriger (poröser) Bereich des Biomaterials erzeugt wird.

[0048] Die vorangehende Beschreibung betreffend die Induzierung der Selbstassemblierung ist vorzugsweise für Fibrinogene zu verwenden.

[0049] Soll eine Induzierung der Selbstassemblierung für Kollagen erfolgen, kann eine pH-induzierte Selbstassemblierung bevorzugt sein. Hierbei wird die Faserbildung induziert, wenn die Proteinlösung (vorliegend in saurem pH) einen Übergang zu neutralem pH, beispielsweise durch Zugabe einer Salzlösung, erfährt.

[0050] Die Schritte zum Induzieren der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins sind nützlich für die Herstellung von immobilisierten nanofaserigen Proteingerüsten unter Verwendung von beispielsweise salzinduzierter Selbstassemblierung. Darüber hinaus lassen sich mittels der oben beschriebenen Schritte zum Induzieren der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins auch Proteinfasern durch Rehydrierung herstellen. Bei der Herstellung von Proteinfasern durch Rehydrierung wird jedoch ein weiterer Schritt des Trocknens des Substrats vorzugsweise nach Zugabe der Proteinlösung zu dem Substrat und vor Zugabe des Salzpuffers in Schritt i) durchgeführt.

[0051] Sofern ein Salzpuffer zugesetzt wird, so umfasst der zugesetzte Salzpuffer vorzugsweise mindestens eine Komponente ausgewählt aus Natriumphosphat, Natriumchlorid, Ammoniumcarbonat, Ammoniumphosphat, Borsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Kaliumchlorid, Kaliumcitrat, Kaliummetaphosphat, Kaliumphosphat (einbasig), Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumlactat, Natriumphosphat (zweibasig), Natriumphosphat (einbasig) und Mischungen davon. Es wird ferner bevorzugt, dass, wenn das Salz des Puffers Natriumphosphat ist, die Konzentration von Natriumphosphat mindestens 1 mM, vorzugsweise mindestens 5 mM, bevorzugter mindestens 10 mM, noch bevorzugter mindestens 25 mM und am bevorzugten mindestens 50 mM beträgt. Wenn das Salz des Puffers nicht Natriumphosphat ist, kann die Konzentration des benötigten Salzes alternativ auch höher sein, wie beispielsweise mindestens 10 mM, bevorzugter mindestens 50 mM, noch bevorzugter mindestens 100 mM und am bevorzugten mindestens 1 M.

[0052] Darüber hinaus wird bevorzugt, dass der zugegebene Salzpuffer Phosphat-Puffer-Salin (PBS) ist, optional wobei das PBS Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumphosphat und Kaliumphosphat umfasst. Die Herstellungsverfahren dieser Erfindung beinhalten vorzugsweise physiologische Puffer bei neutralem pH-Wert. Dementsprechend weist eine bei diesem Verfahren verwendete Lösung einen pH-Wert zwischen 1 und 14, vorzugsweise zwischen 4 und 12, bevorzugter zwischen 6 und 10, noch bevorzugter zwischen 7 und 9 und am bevorzugtesten zwi-

schen 7,7 und 8,3 auf. Die Verwendung von physiologischen Pufferbedingungen haben den Vorteil, die biologische Funktionalität der verwendeten Proteine nicht zu beeinträchtigen.

[0053] Der Begriff „Faser“ oder „faserig“ bezieht sich auf jede schlanke, fadenförmige Struktur, die aus Proteinkomponenten besteht. Vorzugsweise bezeichnet der Begriff „Faser“ oder „Fasern“ filamentöse Strukturen wie fibrine oder kollagene elastische Bindegewebefasern. Wichtig ist, dass die Grundkomponenten des Bindegewebes Zellen und extrazelluläre Proteinfasern sind, die in einer Matrix oder Grundsubstanz aus großen Kohlenhydratmolekülen und Kohlenhydrat-Protein-Komplexen eingebettet sind, die als Mucopolysaccharide bezeichnet werden. „Faserig“ im Sinne dieser Erfindung ist jede Struktur, die aus Fasern besteht, diese enthält oder ihnen ähnelt. Eine Struktur kann ferner als „faserig“ bezeichnet werden, wenn die Struktur in einzelne Fasern zerlegt werden kann.

[0054] Weiterhin bevorzugt ist ein Verfahren, in dem ein Biomaterial hergestellt wird, in welchem nach Abschluss des Verfahrens der mindestens eine erste Bereich eine glatte (z.B. nicht-poröse oder unterschiedlich poröse) Struktur oder Oberfläche aufweist. Die Herstellung des mindestens einen ersten Bereichs, welcher eine glatte (z.B. nicht-poröse) Struktur oder Oberfläche aufweist, erfolgt vorzugsweise durch das tropfenweise Hinzufügen von Proteinen und/oder Proteinzellen auf das Substrat (sogenanntes „drip casting“) bzw. Eintauchen des Substrats in eine Lösung von Protein (sogenanntes „dip coating“), sodass hierdurch glatte Bereiche entstehen, die eine nicht-poröse Proteinstruktur aufweisen.

[0055] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform betrifft das Verfahren, in dem das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein eine Lösung eines oder mehrerer Proteine ist. Vorzugsweise ist das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein eine wässrige Proteinlösung, wobei die Lösung eine Proteinkonzentration zwischen 0,01 und 1000 mg/ml, vorzugsweise zwischen 0,1 und 100 mg/ml, mehr bevorzugt zwischen 0,5 und 50 mg/ml, und am bevorzugtesten zwischen 1 und 10 mg/ml aufweist.

[0056] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Verfahren, in welchem das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein eine Lösung eines oder mehrerer Proteine ist, welche vorzugsweise einen physiologischen pH aufweist. Vorzugsweise wird somit eine Lösung mit einem neutralen pH-Wert verwendet. Erfindungsgemäß weist eine bei diesem Verfahren verwendete Lösung einen pH-Wert zwischen 1 und 14, vorzugsweise zwischen 4 und 12, besonders bevorzugt zwi-

schen 6 und 10, noch bevorzugter zwischen 7 und 9 und am bevorzugtesten zwischen 7,7 und 8,3 auf.

[0057] Eine darüber hinaus bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Verfahren, in dem der mindestens eine erste Bereich und der mindestens eine zweite Bereich aus demselben Protein bestehen, oder aus verschiedenen Proteinen bestehen. Erfindungsgemäß kann somit der mindestens eine erste Bereich mit glatter (oder nicht-poröser) Struktur und der mindestens eine zweite Bereich mit poröser Struktur aus demselben Protein bestehen, aus verschiedenen Proteinen oder aus unterschiedlich porösen Bereichen verschiedener Proteine bestehen.

[0058] Somit kann das erfindungsgemäße Verfahren so gesteuert werden, dass die entstehende Gerüststruktur entweder aus nur einem Protein besteht oder aus unterschiedlichen Proteinen besteht.

[0059] Besonders bevorzugt ist zudem ein Verfahren, in dem nach dem Induzieren der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins in Schritt d) und/oder dem Tropfenweises Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins in Schritt i) das Substrat in einem zusätzlichen Schritt getrocknet wird. Das Trocknen des Substrats erfolgt vorzugsweise durch Inkubieren des Substrats in einer Kammer, wobei die Kammer dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine Luftfeuchtigkeit von weniger als 50%, vorzugsweise zwischen 10% und 40% und mehr bevorzugt zwischen 20% und 30% aufweist. Diese Trocknung ist insbesondere für eine Fibrinogen betreffende Ausführungsform bevorzugt. Der Fachmann ist sich bewusst, wie man die Feuchtigkeit einer Kammer bestimmt und einstellt. So ermöglicht beispielsweise der Einsatz einer Klimakammer eine Regulierung der Feuchtigkeit und der Temperatur. Die Temperatur, die bei dem Verfahren dieser Erfindung bevorzugt verwendet wird, liegt zwischen 15°C und 25°C, bevorzugter zwischen 17°C und 23°C, noch bevorzugter zwischen 19°C und 21°C und am meisten bevorzugt bei etwa 20°C. Darüber hinaus wird die Trocknung des Substrats auch vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 15°C und 25°C, bevorzugter zwischen 17°C und 23°C, noch bevorzugter zwischen 19°C und 21°C und am meisten bevorzugt bei etwa 20°C durchgeführt. Eine salzinduzierte Selbstassemblierung von Proteinfasern kann zudem verhindert werden, wenn das Substrat in einer Kammer inkubiert wird, wobei die Kammer dadurch gekennzeichnet ist, dass sie eine Feuchtigkeit von mehr als 50% aufweist.

[0060] Weiterhin bevorzugt ist ein Verfahren mit zusätzlichen Waschschrritten zwischen den anderen Schritten, oder ein Verfahren mit zusätzlichen Waschschrritten und mit zusätzlichen Trockenschritten zwischen den anderen Schritten. Darüber hinaus ist ein Verfahren bevorzugt, in dem einer der Schrit-

te, oder zwei der Schritte, drei der Schritte, vier der Schritte, fünf der Schritte, sechs der Schritte, sieben der Schritte, acht der Schritte, neun der Schritte, zehn der Schritte, elf der Schritte, zwölf der Schritte, oder alle der Schritte mindestens einmal, oder zweimal, dreimal, viermal, fünfmal, sechsmal, siebenmal, achtmal, neunmal, zehnmal, oder eine beliebige Anzahl wiederholt wird. Darüber hinaus betrifft eine bevorzugte Ausführungsform ein Verfahren, in welchem einzelne Schritte umgedreht werden können. So kann beispielsweise das Tropfenweise Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins bzw. das Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins durch Eintauchen des Substrats in eine Lösung des zweiten Proteins in Schritt i) vor der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins in Schritt d) durchgeführt werden. Erfindungsgemäß kann somit ein Biomaterial hergestellt werden, in welchem zunächst glatte (nicht-poröse) Bereiche und dann poröse Bereiche hergestellt werden, oder in welchem zunächst poröse Bereiche und dann glatte (nicht-poröse) Bereiche hergestellt werden.

[0061] Besonders bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren, wobei das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein ein Protein der extrazellulären Matrix (ECM) ist. Vorzugsweise wird das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein ausgewählt aus Fibrinogen, Kollagen, Fibronectin, Elastin, Vitronectin, Laminin und anderen Biopolymeren, oder Kombinationen hiervon, wobei es für den Fachmann offensichtlich ist, dass Proteine, die nicht durch Selbstassemblierung zu Fasern prozessiert werden können lediglich zur Herstellung glatter Oberflächen verwendet werden können.

[0062] Erfindungsgemäß ist das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein dasselbe Protein, oder ein unterschiedliches Protein. Weiterhin bevorzugt ist somit ein Verfahren, indem als das mindestens eine erste Protein und als das mindestens eine zweite Protein dasselbe Protein verwendet wird. Umfasst ist hierbei ein hergestelltes Biomaterial, in welchem ein einziges Protein in zwei verschiedenen Topographien auf der Oberfläche aufgebracht wird. Darüber hinaus ist auch ein Verfahren bevorzugt, in welchem als das mindestens eine erste Protein und als das mindestens eine zweite Protein ein unterschiedliches Protein verwendet wird. Umfasst ist somit auch ein hergestelltes Biomaterial, in welchem ein erstes Protein auf dem mindestens einen ersten Bereich angebracht wird, sowie ein zweites Protein auf dem mindestens einen zweiten Bereich angebracht wird, wobei sich das erste Protein und das zweite Protein unterscheiden. Dieses Verfahren erlaubt die Herstellung eines Biomaterials, in welchem ein Protein in dem einen Bereich und ein anderes Protein in dem anderen Bereich angebracht wird. Darüber hinaus kann auch die Lösung

des mindestens einen ersten Proteins und die Lösung des mindestens einen zweiten Proteins mehrere verschiedene Proteine umfassen, sodass sich durch das erfindungsgemäße Verfahren auch weitere Mischformen des Biomaterials herstellen lassen.

[0063] Das Verfahren dieser Erfindung ist besonders geeignet zur Herstellung eines Biomaterials, welches einerseits eine glatte (z.B. planare) und andererseits eine poröse (z.B. nanoporöse) Topographie aufweist. Das erfindungsgemäß hergestellte Biomaterial ermöglicht es dadurch, verschiedene Zelltypen eines Gewebes anzusprechen. So reagieren beispielsweise Fibroblasten vorzugsweise auf glatte (z.B. planare) Oberflächen und/oder glatte z.B. (planare) Bereiche, wohingegen beispielsweise Osteoblasten vorzugsweise auf poröse (z.B. nanoporöse) Oberflächen und/oder poröse (z.B. nanoporöse) Bereiche reagieren.

[0064] Im erfindungsgemäßen Verfahren können die Gerüstzusammensetzung und Gerüstmorphologie, die hierarchische Faseranordnung und die Gerüstdimensionen sowie deren mechanische Eigenschaften des hergestellten Biomaterials so angepasst werden, dass universelle neuartige Biomaterialien für verschiedene Bereiche der regenerativen Medizin entstehen, beispielsweise für Haut- und Knochenreparatur, Nervenregeneration und/oder Gefäßregeneration.

[0065] Das mindestens eine erste Protein, welches zur Selbstassemblierung fähig ist und somit selbstanordnend ist, ist vorzugsweise Fibrinogen oder Kollagen. Fibrinogen und Kollagen sind selbstanordnend und somit zur Faserbildung fähig.

[0066] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform betrifft das Verfahren, wobei das Fixieren im Schritt e) und im Schritt j) mittels eines Fixiermittels durchgeführt wird, welches ausgewählt ist aus Paraformaldehyd, Formaldehyd, Glutaraldehyd, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC), Genipin, Riboflavin, Quecksilberoxid, Bleioxid, Osmiumoxid, Trichloressigsäure, Essigsäure und Mischungen davon. Besonders bevorzugt wird als Fixiermittel Formaldehyd und/oder Glutaraldehyd verwendet.

[0067] Erfindungsgemäß wird der Fixierschritt vorzugsweise durch Inkubieren des Substrats in einem Fixiermittel durchgeführt, besonders bevorzugt durch Inkubieren des Substrats im Dampf eines Fixiermittels. Die Inkubation des Substrats im Dampf eines Fixiermittels anstelle eines flüssigen Fixiermittels ist weniger schädlich für das zu erzeugende Biomaterial. Darüber hinaus hätte die Verwendung eines Flüssigphasenfixierungsmittels als Nachteil, eine Rehydrierung von hergestellten Fasern einzuleiten. Zur Verhinderung der Rehydrierung von Fasern hat sich die Inkubation des Substrats im Dampf des Fixiermittels

für die vorliegende Erfindung als vorteilhaft erwiesen. Die Dampf fixation sollte vorzugsweise in einem geschlossenen Kasten erfolgen. Weiterhin wird bevorzugt, dass der Fixierschritt mindestens 1 Stunde, vorzugsweise 12 Stunden, besonders bevorzugt mindestens 24 Stunden beträgt. Die Konzentration des verwendeten Fixiermittels kann variieren. Wird Paraformaldehyd (PFA) als Dampf verwendet, beträgt die Konzentration von Paraformaldehyd (PFA) mindestens 4%, bevorzugter mindestens 20%, noch bevorzugter mindestens 30% und am meisten bevorzugt etwa 37%. Wird Glutaraldehyd als Dampf verwendet, beträgt die Glutaraldehydkonzentration mindestens 10%, bevorzugter mindestens 20%, noch bevorzugter mindestens 30%, weiter bevorzugt mindestens 40% und meisten bevorzugt etwa 50%. Wenn hingegen flüssiges PFA als Fixiermittel verwendet wird, beträgt die Konzentration von PFA mindestens 1%, vorzugsweise mindestens 3% und am meisten bevorzugt etwa 4%. Wird Glutaraldehyd als flüssiges Fixiermittel verwendet, beträgt die Glutaraldehydkonzentration mindestens 0,5%, vorzugsweise mindestens 1% und meisten bevorzugt etwa 2%.

[0068] Eine weitere Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren, wobei der Fixierschritt durch Inkubieren des Substrats im Dampf eines Fixiermittels, wie beispielsweise PFA, durchgeführt wird. Diesem Schritt folgt eine weitere Fixierung in einem flüssigen Fixiermittel, z.B. durch Inkubation der Probe in flüssigem PFA. Die Dauer des Fixierschrittes im Dampf eines Fixiermittels sollte mindestens 1 Stunde, vorzugsweise 12 Stunden, am meisten bevorzugt mindestens 24 Stunden betragen. Die Dauer der Flüssigkeitsfixierung sollte mindestens 10 Minuten, vorzugsweise mindestens 20 Minuten und besonders bevorzugt mindestens 30 Minuten betragen.

[0069] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren, wobei das wahlweise Waschen in Schritt f) sowie das wahlweise Waschen in Schritt 1) in einer wässrigen Lösung durchgeführt wird. Die wässrige Lösung kann Wasser oder ein wässriger Puffer sein, wie beispielsweise eine wässrige Ammoniumcarbonatlösung (NH_4HCO_3).

[0070] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform betrifft das Verfahren, wobei alle Schritte des Verfahrens an oder auf dem Substrat durchgeführt werden, ohne dass eine Überführung der Proteine, beispielsweise mittels eines Stempels, nötig ist.

[0071] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung bezieht sich dann auf ein Biomaterial, das mittels des Verfahrens dieser Erfindung hergestellt wird.

[0072] Ein zusätzlicher Aspekt dieser Erfindung bezieht sich auch auf eine Zusammensetzung, die das Biomaterial umfasst, das nach dem Verfahren dieser Erfindung hergestellt wird.

[0073] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung betrifft die Verwendung des Biomaterials, das durch das Verfahren dieser Erfindung hergestellt wird, in der Gewebetechnik (Tissue Engineering), Wundheilung, regenerativen Medizin, Nervenregeneration, dermalen Rekonstruktion, Haut- und/oder Knochengefäßreparatur, Blutgefäßregeneration, für Fasergerüste, Hautersatz, Knochenersatz, Gefäßprothesen, Wundauflagen, Herstellung von Implantaten, Implantatbeschichtungen, biologische Filtern, Biosensoren, als Substrate für Zellkultivierung, pharmazeutischen Screenings, pharmakologischen Screenings, toxikologischen Screenings und/oder drug delivery Systeme.

[0074] „Wundheilung“ im Kontext dieser Erfindung ist definiert als ein komplexer Prozess, bei dem sich die Haut und das darunter liegende Gewebe nach einer Verletzung selbst reparieren. Bei unbeschädigter Haut bilden die Epidermis (Oberflächenschicht) und die Dermis (tieferer Schicht) eine Schutzbarriere gegen die äußere Umgebung. Beim Durchbrechen der Barriere wird eine geregelte Abfolge von biochemischen Ereignissen in Gang gesetzt, um den Schaden zu beheben. Dieser Prozess ist in vorhersehbare Phasen unterteilt: Blutgerinnung (Hämostase), Entzündung, Gewebewachstum (Proliferation) und Gewebeumbau (Reifung). Die Blutgerinnung kann anstelle eines separaten Stadiums als Teil des Entzündungsstadiums betrachtet werden.

[0075] Unter „Regenerativer Medizin“ versteht man die Unterstützung der Regeneration von Gewebe oder Organen. Regenerative Medizin kann der Prozess des Ersetzens, Konstruierens oder Regenerierens menschlicher Zellen, Gewebe oder Organe zur Wiederherstellung der normalen Funktion sein. Der Bedarf an regenerativer Medizin kann aufgrund eines Unfalls oder einer Verletzung notwendig sein, oder weil ein Betroffener, wie beispielsweise ein Patient, an einer degenerativen Erkrankung leidet. Bei einer degenerativen Erkrankung verfallen Zellen oder sogar ganze Gewebe. Ein Beispiel für eine degenerative Erkrankung ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der beispielsweise Neuronen oder Gliazellen weitgehend sterben. Der Zelltod, in diesem Fall der Neuronen oder Gliazellen, führt dann zur Degeneration größerer Bereiche des betroffenen Gewebes, wie beispielsweise bestimmter Hirnareale. Ein Beispiel für eine neurodegenerative Erkrankung ist die Alzheimer Erkrankung.

[0076] Das erfindungsgemäß hergestellte Biomaterial kann auch für pharmazeutische Screenings verwendet werden. Das Tissue Engineering auf Basis des Biomaterials dieser Erfindung ermöglicht die Erzeugung von Gewebe im Reagenzglas. Dieses Gewebe kann anschließend für pharmazeutische, pharmakologische und/oder toxikologische Untersuchungen in vitro verwendet werden.

Das erfindungsgemäß hergestellte Biomaterial kann auch in „biologischen Filtern“ für Filtrationszwecke im biotechnologischen Bereich weiterverwendet werden. So können beispielsweise die fibrösen Fibrinogen-Biomarkierungen aus einem biologischen Filter, wie beispielsweise einem „Fibrinogen-Filter“ oder einem „Thrombin-Filter“ zur Filtration biologischer Flüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, verwendet werden. Dementsprechend könnte ein solcher nach dieser Erfindung hergestellter „Fibrinogen-Filter“ zur Blutkonservierung verwendet werden, indem die Blutgerinnung verhindert wird, da beispielsweise Thrombin aus den übrigen Blutbestandteilen gefiltert wird.

[0077] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung bezieht sich dann auf ein Biomaterial, das mittels des Verfahrens dieser Erfindung hergestellt wird, zur Verwendung als Medikament.

[0078] Eine medizinische „Verwendung“ im Rahmen dieser Erfindung bezieht sich vorzugsweise auf ein Verfahren zur Vorbeugung oder Behandlung einer Krankheit in einem Subjekt, wobei das Verfahren einen Schritt umfasst, in welchem dem Subjekt eine therapeutisch wirksame Menge des Biomaterials verabreicht wird, welches nach dem Verfahren dieser Erfindung zur Verwendung in der Medizin hergestellt wurde.

[0079] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff „Subjekt“ oder „Patient“ vorzugsweise auf ein Säugetier, wie z.B. eine Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze, Hund, Affe oder vorzugsweise einen Menschen, z.B. einen menschlichen Patienten. Das Subjekt kann an einer Krankheit leiden oder dem Risiko ausgesetzt sein, an einer Krankheit zu leiden. Eine detailliertere Beschreibung der im Zusammenhang mit der Erfindung relevanten medizinischen Indikationen sind an anderer Stelle beschrieben.

[0080] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung betrifft auch die Verwendung des Biomaterials, das nach dem Verfahren dieser Erfindung hergestellt wird, für die Behandlung oder Bekämpfung einer degenerativen Erkrankung, einer Wunde, einer dermalen Schädigung, einer Knochenschädigung, einer Gewebestörung, einer Blutgefäßschädigung, einer Hauterkrankung, einer Gefäßschädigung und/oder einer Hautschädigung.

[0081] Unter Behandlung versteht man z.B. die Behandlung, Verzögerung oder Linderung des Krankheitsverlaufs, die Verringerung der Symptome oder die Heilung der Krankheit oder des Leidens. Eine „effektive Menge“ ist eine Menge des Biomaterials, das nach dem Verfahren dieser Erfindung hergestellt wurde, welche Symptome lindert, die für die zu behandelnde Krankheit, wie z.B. eine degenerative und/

oder eine Hauterkrankung, festgestellt wurden. Unter Linderung versteht man z.B. das Vorbeugen, Behandeln und Reduzieren der Symptome oder das Heilen der Krankheit oder des Leidens. Die Erfindung beinhaltet auch ein Verfahren zur Behandlung eines gefährdeten Subjekts für die Entwicklung und/oder das Fortschreiten einer Erkrankung, worin dem Subjekt oder Patienten eine therapeutisch wirksame Menge des durch das Verfahren dieser Erfindung erzeugten Biomaterials verabreicht wird. Ein Risiko für die Krankheit kann z.B. aus einer familiären Vorgeschichte der Krankheit, einem Genotyp, der für die Krankheit prädisponiert, oder phänotypischen Symptomen resultieren, die für die Krankheit prädisponieren. In einer Ausführungsform bezieht sich der Begriff „Prävention“ oder „Vorbeugung“, wenn er im Zusammenhang mit einem Subjekt verwendet wird, auf das Stoppen, Hindern und/oder Verlangsamen der Entwicklung oder des Ausbruchs einer Krankheit und insbesondere der mit der Krankheit verbundenen Symptome.

[0082] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung bezieht sich dann auf die Verwendung eines erfindungsgemäß hergestellten Biomaterials, zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung für die Vorbeugung und/oder Behandlung einer degenerativen Erkrankung, einer Wunde, einer dermalen Schädigung, einer Knochenschädigung, einer Gewebestörung, einer Blutgefäßschädigung, einer Hauterkrankung, einer Gefäßschädigung und/oder einer Hautschädigung.

[0083] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung bezieht sich zudem auf ein Verfahren zum Verhindern von Blutungen an einer Zielstelle im Körper eines Patienten, wobei das Verfahren das Zuführen des erfindungsgemäß hergestellten Biomaterials an eine Zielstelle, ein blutendes Gewebe, eine abgeriebene Gewebeoberfläche und/oder eine beschädigte Gewebeoberfläche in einer ausreichenden Menge umfasst, um die Blutung zu hemmen.

[0084] Unter „Blutungen“ im Sinne dieser Erfindung ist der Prozess des Blutverlustes oder eine Änderung der Durchblutung zu verstehen, d.h. die Freisetzung von Blut aus dem Kreislauf. Blutungen können auch dann als Blutungen bezeichnet werden, wenn Blut nicht aus dem Kreislauf austritt.

[0085] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung bezieht sich dann auf ein Verfahren zum Zuführen des erfindungsgemäß hergestellten Biomaterials zu einer Zielstelle im Körper eines Patienten, wobei das Verfahren das Zuführen des erfindungsgemäß hergestellten Biomaterials zu der Zielstelle umfasst.

[0086] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zielstelle ein Gewebe, welches ausgewählt wird aus Muskel-, Haut-, Epithelgewebe, Bindegewebe, Stütz-

gewebe, Nervengewebe, ophthalmischem und anderem Sinnesorgangewebe, Gefäßgewebe, Herzgewebe, gastrointestinalem Organgewebe, Pleura und anderes Lungengewebe, Niere, endokrine Drüsen, männliche und weibliche Fortpflanzungsorgane, Fettgewebe, Leber, Bauchspeicheldrüse, Lymphe, Knorpel, Knochen, Mundgewebe, Schleimhautgewebe, Milzgewebe, Bauchorgangewebe und Kombinationen davon.

[0087] Weiterhin wird bevorzugt, dass die Zielstelle eine Blutungsstelle oder eine blutende Gewebeoberfläche eines Subjektes oder eines Patienten, oder eine beschädigte Gewebeoberfläche eines Subjektes oder eines Patienten ist.

[0088] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform bezieht sich dann auf die Zielstelle, die eine Hohlraumregion innerhalb des ausgewählten Gewebes ist. Weiterhin wird bevorzugt, dass die Hohlräume aus Gewebekammern, intravertebralen Räumen und/oder Körperhöhlen ausgewählt werden.

[0089] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform bezieht sich dann auf die Zielstelle, die eine Gewebeoberfläche ist. Die Gewebeoberfläche umfasst vorzugsweise eine Organoberfläche, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Leberoberfläche, einer Hautoberfläche, einer Milzoberfläche, einer Herzoberfläche, einer Nierenoberfläche, einer Darmfläche, einer Blutgefäßoberfläche, einer Gefäßoberfläche, einer Gefäßorganoberfläche und Kombinationen davon.

[0090] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung bezieht sich dann auf ein Kit, welches umfasst:

- a) Ein Biomaterial, das nach dem Verfahren dieser Erfindung hergestellt wird,
- b) schriftliche Anweisungen zum Auftragen des Biomaterials auf eine Zielstelle auf einem Gewebe; und
- c) optional einen Behälter, der das Biomaterial und die schriftlichen Anweisungen enthält.

[0091] Die vorliegende Erfindung wird nun in den folgenden bevorzugten nicht einschränkenden Beispielen unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen und Begleitzahlen näher beschrieben, ohne darauf beschränkt zu sein. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden alle hier zitierten Referenzen in ihrer Gesamtheit aufgenommen.

[0092] In den Zeichnungen zeigen die Abbildungen Folgendes, wie nachfolgend beschrieben.

[0093] Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Verfahrens zur erfindungsgemäßen Herstellung des Biomaterials, welches poröse und nicht-poröse Topographien in einer einzigen Gerüststruktur

aufweist. **1:** Substrat; **2:** Maskierung (z.B. Polymer-maskierung); **3:** Proteinfasern (poröse Struktur oder poröse Oberfläche); **4:** glatte (planare/nicht-poröse) Struktur oder Oberfläche; **5:** Erfindungsgemäß hergestelltes Biomaterial. Schritte des Verfahrens: (A) - Selbstassemblierung; (B) - Fixieren, Waschen und Entfernen der Maskierung; (C) - Tropfenweises Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins; (D) - Fixieren, Waschen und Trocknen. Piranha-gereinigtes Glas wird als Substrat für die Herstellung eines topographisch gemusterten Biomaterials, welches poröse und nicht-poröse Topographien in einer einzigen Gerüststruktur aufweist, verwendet. Bestimmte Bereiche des Substrats werden zunächst maskiert, gefolgt von der Induktion der Selbstassemblierung von Proteinen in Form von Proteinfasern. Die so hergestellten porösen Bereiche werden dann in Formaldehyd-Dampf fixiert und gewaschen. Nach Entfernung der Maskierung erfolgt das tropfenweise Hinzufügen des mindestens einen zweiten Proteins, gefolgt von weiteren Fixierungs-, Wasch- und Trockenschritten. Die so hergestellten Biomaterialien weisen Bereiche mit porösen und nicht-porösen Topographien in einer einzigen Gerüststruktur auf.

[0094] Fig. 2 zeigt Rasterelektronenmikroskop (REM)-Abbildungen des erfindungsgemäß hergestellten, topographisch gemusterten Biomaterials. **1:** Kollagenfasern (porös); **2:** Glattes (nicht-poröses) Kollagen; **3:** Fibrinogenfasern (porös); **4:** Glattes (nicht-poröses) Fibrinogen.

[0095] Fig. 3 zeigt das Wachsen von 3T3-Fibroblasten auf dem erfindungsgemäß hergestellten Biomaterial, welches Bereiche mit porösen und nicht-porösen Topographien in einer einzigen Gerüststruktur aufweist. A: Proteinfasern (porös); B: Glatter (nicht-poröser) Proteinbereich. Der Maßstabsbalken beträgt 20 µm (links), 2 µm (rechts oben) und 5 µm (rechts unten). Die Fibroblasten wachsen verstärkt auf den fibrillären (porösen) Substratbereichen (rechts oben), wohingegen sie in einer stärker ausgebreiteten und zeigen Wachstum in die porösen Faserstrukturen hinein Morphologie auf den glatten (nicht-porösen) Substratbereichen (rechts unten) wachsen.

Beispiele

Selbstassemblierung von Protein-Nanofasern (beispielhaft gezeigt für Fibrinogen)

[0096] 100 µl einer 10 mg/ml Protein-Stammlösung wird auf Piranha-gereinigte Glasträger aufgebracht. Anschließend wird die Faserbildung durch Zugabe von 100 µl entweder 5x PBS-Lösung, pH 7,4 (Thermo Fisher) oder 50 mM Natriumphosphat Puffer, pH 7,4 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingeleitet. Die Endkonzentration in den Proben beträgt 5 mg/ml Fibrinogen und 5 mM NH_4HCO_3 in entweder 2,5x PBS oder 25 mM NaPO_4 Puffer. Für planare Referenzproben

wird dem Fibrinogen anstelle von PBS- oder NaPO_4 -Puffer 100 µl deionisiertes Wasser zugesetzt. Alle Proben wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin werden die Biomaterialien in einer Kammer mit Formaldehyddampf fixiert, gefolgt von wiederholten Waschschritten in einem wässrigem Puffer.

Mikroskopische Analyse

[0097] Die Abdeckung von Glasobjektträgern mit getrockneten Biomaterialien wird mit einem USB-Universalmikroskop (Meade Instruments, Rhede, Deutschland) unter Verwendung einer 20-fachen Vergrößerung und Hellfeldaufnahme analysiert. Für die morphologische Analyse werden getrocknete Biomaterial-Proben mit einem Bal-Tec SCD 005 Sputtersystem (Leica Microsystems) mit 7 nm Gold beschichtet. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird mit einem Zeiss Auriga Feldemissionsgerät (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei Beschleunigungsspannungen von 3 kV durchgeführt. Oberflächenabdeckung und Faserdurchmesser wurden mit der Open-Source-Software ImageJ analysiert. Unterschiede in der Oberflächenabdeckung wurden durch ANOVA analysiert, gefolgt vom Tukey Post-Hoc-Test.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Biomaterials, umfassend die Schritte:
 - a) Bereitstellen eines Substrats,
 - b) Maskieren mindestens eines ersten Bereichs des Substrats mit einer Maskierung,
 - c) Hinzufügen mindestens eines ersten Proteins,
 - d) Induzieren der Selbstassemblierung des mindestens einen ersten Proteins,
 - e) Fixieren des Substrats,
 - f) Waschen des Substrats,
 - g) Entfernen der Maskierung des mindestens einen ersten Bereichs aus Schritt b),
 - h) Maskieren mindestens eines zweiten Bereichs des Substrats,
 - i) Hinzufügen mindestens eines zweiten Proteins,
 - j) Optional Induzieren der Selbstassemblierung des zweiten Proteins,
 - k) Fixieren des Substrats,
 - l) Wahlweise, Entfernen der Maskierung des mindestens einen zweiten Bereichs aus Schritt h),
 - m) Wahlweise, Waschen des Substrats, wodurch das Biomaterial hergestellt wird; **dadurch gekennzeichnet**, dass der mindestens eine erste Bereich eine glatte Struktur aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine poröse Struktur aufweist, oder **dadurch gekennzeichnet**, dass entweder der mindestens eine erste Bereich eine poröse Struktur aufweist und der mindestens eine zweite Bereich eine glatte Struktur aufweist oder der mindestens eine erste Bereich eine Struktur einer ersten Porosität auf-

weist und der mindestens eine zweite Bereich eine Struktur einer zweiten Porosität aufweist, wobei die erste Porosität von der zweiten Porosität verschieden ist, und/oder das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein ein unterschiedliches Protein ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das erzeugte Biomaterial ein Gerüst oder eine Gerüststruktur ist, optional wobei sich das erzeugte Biomaterial in drei Dimensionen erstreckt.

3. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das mindestens eine erste Protein und das mindestens eine zweite Protein eine wässrige Lösung eines oder mehrerer Proteine ist.

4. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Maskierung eine Polymermaskierung ist, optional wobei die Maskierung Gummi und/oder Polymethylsiloxan (PD-MS) umfasst.

5. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das mindestens eine erste Protein und/oder das mindestens eine zweite Protein ein Extrazelluläre Matrix Protein ist, welches vorzugsweise ausgewählt wird aus Fibrinogen, Kollagen, Fibronectin, Elastin, Vitronectin, Laminin und weiteren Biopolymeren, oder Kombinationen davon.

6. Biomaterial, hergestellt nach einem Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5.

7. Verwendung eines Biomaterials nach Anspruch 6 in der Gewebetechnik, Tissue Engineering, Wundheilung, regenerativen Medizin, Nervenregeneration, dermalen Rekonstruktion, Haut- und/oder Knochengefäßreparatur, Blutgefäßregeneration, Hautersatz, Knochenersatz, Gefäßprothesen, Wundauflagen, Herstellung von Implantaten, Implantatbeschichtungen, biologischen Filtern, Biosensoren, als Substrate für Zellkultivierung, pharmazeutischen Screenings, pharmakologischen Screenings, toxikologischen Screenings und/oder drug delivery systems.

8. Verwendung eines Biomaterials nach Anspruch 6 zur Induktion einer Immunantwort in einem Subjekt, optional wobei die Immunantwort die Reaktion von beispielsweise Makrophagen auf das Biomaterial umfasst.

9. Verwendung des Biomaterials nach Anspruch 6 als Medikament.

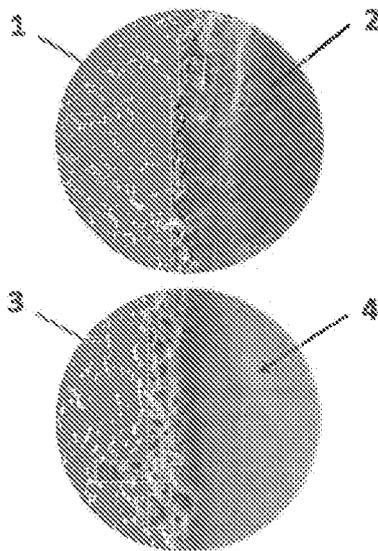
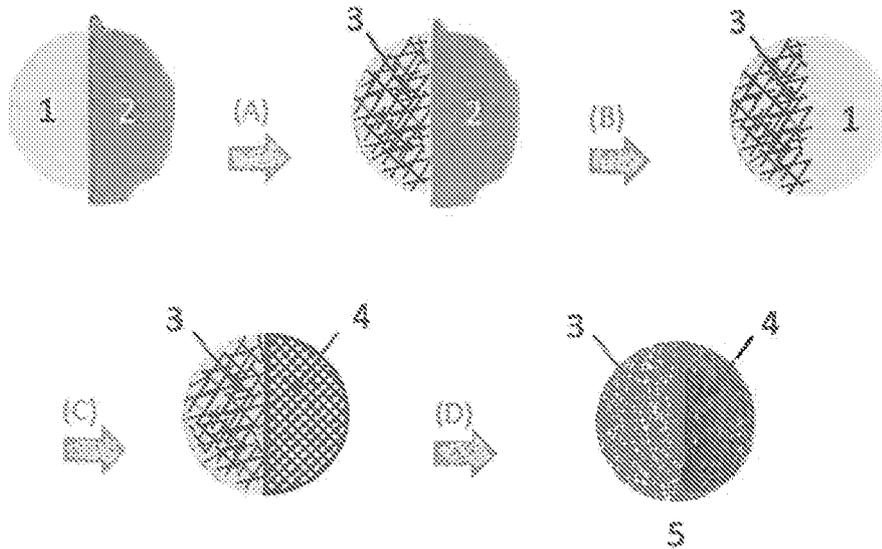
10. Verwendung des Biomaterials nach Anspruch 6 zur Bekämpfung einer degenerativen Erkrankung, einer Wunde, einer dermalen Schädigung, einer Knochenschädigung, einer Gewebestörung, einer Blut-

gefäßschädigung, einer Hauterkrankung, einer Gefäßschädigung und/oder einer Hautschädigung.

11. Biomaterial nach Anspruch 6 zur Verwendung zum Hemmen von Blutungen an einer Zielstelle in dem Körper eines Subjekts, zur Regeneration von zerstörtem oder angegriffenem Gewebe, und/oder zur Induktion einer Immunantwort, wobei die Verwendung das Zuführen zu einer Zielstelle, einem blutenden Gewebe, einer verletzten Gewebeoberfläche und/oder einer beschädigten Gewebeoberfläche in einer Menge umfasst, die ausreicht, um die Blutung zu hemmen.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



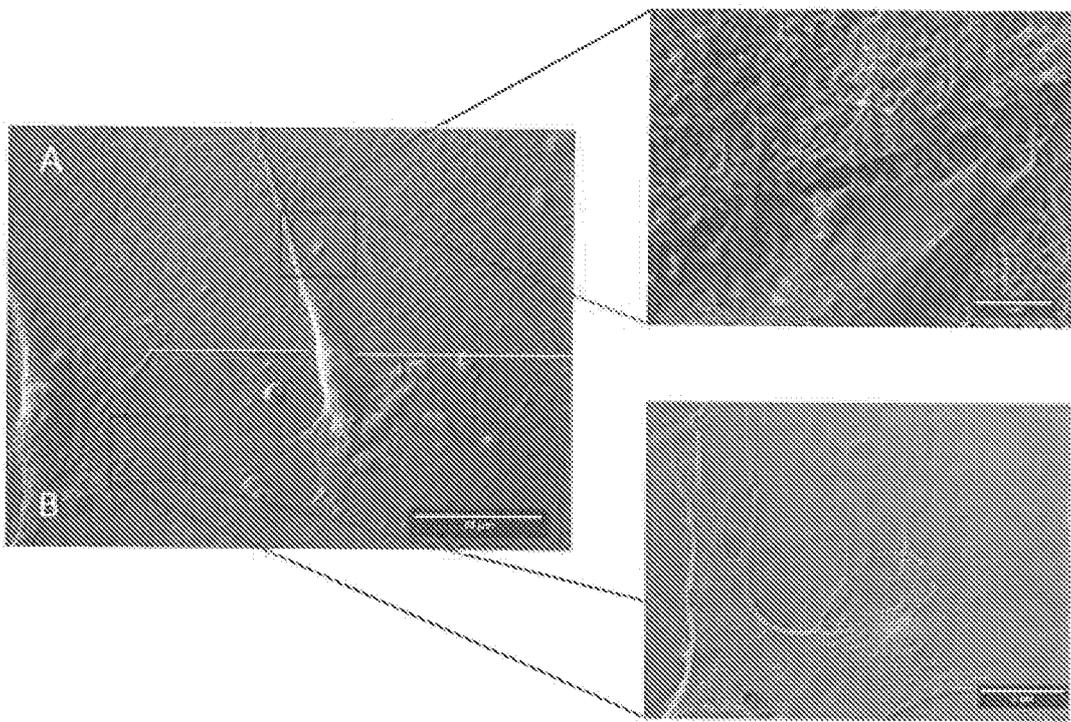


Fig. 3