

## **ABSCHLUSSBERICHT**

meidrix biomedicals GmbH Schelztorstraße 54-56 73728 Esslingen	FKZ: 13XP5089E
Verbundprojekt: Erforschung eines industriellen laserbasierten Nano-3D-Druckverfahrens für hierarchisch strukturierte Knochen-Knorpel-Implantate (Poly-IMPLANT-Druck)	
Teilvorhaben: Erforschung geeigneter ECM-Additive auf Kollagenbasis	
Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2019 –30.04.2024	
Berichtszeitraum: 01.05.2019 –30.04.2024	

## **Inhalt**

TEIL I: Kurzbericht: Ergebnisse des Projekts <i>Poly-Implant-Druck</i> .....	2
TEIL II: Detaillierte Darstellung der Arbeitspakete (AP) .....	4
AP 3.1 Präparation, Charakterisierung Kollagenlösung .....	4
AP 3.2 Untersuchung der spezifischen Zellaktivität und Zellverträglichkeit von Chondrozyten und Osteoblasten auf die unterschiedlichen Matrices .....	4
AP 3.3 Kollagenmodifizierung zur in situ Verkapselung (meidrix).....	6
AP 3.4 Migrations-Assay zum Nachweis der Einwanderung von Zellen .....	9
AP 3.5 Methode zum effektiven Füllen von Scaffolds mit Kollagen .....	11
AP 3.6 Nachweis der homogenen Füllung der Scaffolds .....	11
AP 3.7 Scaffoldfüllung mit Kollagen in Verbindung mit Zellen und Wachstumsfaktoren .....	12
AP 3.8 Optimierung geeigneter Sterilisationsverfahren .....	13
AP 7.4 EMC-beladene Scaffolds und autologe Zytokincocktails für in vitro und in vitro Versuche .....	15
TEIL III Erfolgskontrollbericht .....	16

## TEIL I: Kurzbericht: Ergebnisse des Projekts *Poly-Implant-Druck*

### Ursprüngliche Aufgabenstellung und Ausgangspunkt

Ziel des Projekts *Poly-IMPLANT-Druck* war die Entwicklung eines laserbasierten Nano-3D-Druckverfahrens zur Herstellung hierarchisch strukturierter Knochen-Knorpel-Implantate für die Behandlung von Knorpel-Knochendefekten, die aufgrund begrenzter Regenerationsfähigkeit nicht gut selbst abheilen können. Das Gesamtziel des Verbundprojekts fokussierte die Etablierung monolithischer biphasischer Implantate mit intrinsischer Heterogenität zur Stimulation der Geweberegeneration von Knorpel-Knochen-Defekten und die Erarbeitung eines Instrumentariums für dessen unversehrte Implantation in eine definierte Kavität im Knorpel-Knochendefekt.

Der Projektpartner meidrix biomedical hat den besonderen Fokus auf die Erforschung kollagenbasierter Extrazellulärmatrix (ECM)-Additive gelegt. Diese biologischen Additive sollten eingesetzt werden, um die Zellmigration in die Implantate zu verbessern. Weiterhin soll durch eine matrixgesteuerte Selbstorganisation die Gewebeintegration verbessert werden. Ausgangspunkt war der Stand der Technik, bei dem ECM-Materialien häufig begrenzte Biokompatibilität und mechanische Eigenschaften aufwiesen. Dies führte zu der Notwendigkeit, neue Methoden für die Identifizierung, Isolierung, Homogenität, Biokompatibilität und Sterilisierbarkeit solcher Materialien zu entwickeln.

### Ablauf des Vorhabens

Das Projekt gliederte sich in mehrere Arbeitspakete (AP), darunter:

- **AP.3.1** Vorbereitung und Charakterisierung von Kollagenlösungen (abgeschlossen 2020),
- **AP 3.2, 3.3 und 3.4** Entwicklung eines Migration-Assays zur Untersuchung der Zellwanderung in Kollagenmatrices (abgeschlossen 2022),
- **AP 3.5 und 3.6** Optimierung der Scaffold-Füllung mit Kollagen und Zellen (abgeschlossen 2022),
- **AP 3.7 und 3.8** Sterilisationstests mittels Gamma-Bestrahlung bei verschiedenen Bedingungen (abgeschlossen 2022). Bereitstellung von befüllten und sterilisierten LCM3 Scaffolds und ACM (Ronden) für den Einsatz im Tierversuch (abgeschlossen 2023),
- **AP 7.4** ECM-beladene Scaffolds und autologe Zytokincocktails für in vitro und in vivo Versuche konnte aus Mangel an Material nur teilweise durchgeführt werden.

Ein zentraler Bestandteil des Projekts war die Validierung der Materialergebnisse in Zellkultur- und Tierversuchen. Die Zusammenarbeit mit Projektpartnern, einschließlich der Bereitstellung von Materialien und Durchführung von Tests, war dabei essenziell.

### Wesentliche Ergebnisse

Das Projekt erzielte bedeutende Fortschritte in den folgenden Bereichen:

- **Zellmigration und Biokompatibilität:** Ein speziell entwickelter Migration-Assay zeigte, dass Chondrozyten und Osteoblasten effektiv in die hergestellten Kollagenmatrices unterschiedlicher Konzentrationen einwandern können. Dies unterstreicht das Potenzial der Materialien für regenerative Anwendungen.
- **Homogene Scaffold-Füllung:** Die gleichmäßige Verteilung von Kollagenlösungen in den Scaffolds wurde erfolgreich untersucht, optimiert und mittels Farbstoffanalysen validiert. Dies führte zu einer Verbesserung der mechanischen und biologischen Eigenschaften der Implantate.
- **Sterilisation:** Gamma-Bestrahlung unter optimierten Bedingungen (4 °C, mit PBS-Überschichtung) eliminierte Zytotoxizität vollständig und bewahrte die mechanische Stabilität der Scaffolds. Die Sterilität stellt einen wichtigen, unverzichtbaren Schritt zur klinischen Anwendbarkeit dar.

- **Tierversuche:** Materialien wurden für Tierversuche hergestellt und vorbereitet, wobei eine Zytotoxizität durch entsprechende Tests ausgeschlossen werden konnte. Dies legte die Grundlage für die weiterführenden In-vivo-Studien.
- **Zusammenarbeit:** Das Vorhaben wurde in enger Kooperation mit den Projektpartnern, weiteren Forschungseinrichtungen und Firmen wie bbf Sterilisationservice GmbH durchgeführt. Diese trugen ebenfalls wesentlich zur Prüfung und Validierung der Ergebnisse bei.

**Fazit.** Das Projekt *Poly-IMPLANT-Druck* demonstrierte erfolgreich die Machbarkeit eines laserbasierten 3D-Drucks für biologisch und mechanisch optimierte Knochen-Knorpel-Implantate in der gelenkerhaltenden Orthopädie. Die entwickelten Materialien zeigten hohe Biokompatibilität und Stabilität sowie eine sehr gute Integration, was sie für den klinischen Einsatz vielversprechend macht. Zukünftige Arbeiten könnten sich neben Optimierungen auf die klinische Validierung, Zulassung und Kommerzialisierung konzentrieren.

## **TEIL II: Detaillierte Darstellung der Arbeitspakete (AP)**

Das Projekt *Poly-IMPLANT-Druck* mit dem Arbeitstitel „Erforschung eines industriellen laserbasierten Nano-3D-Druckverfahrens für hierarchisch strukturierte Knochen-Knorpel-Implantate (Poly-IMPLANT-Druck)“ zielte auf die Entwicklung eines laserbasierten Nano-3D-Druckverfahrens zur Herstellung von biphasischen Knochen-Knorpel-Implantaten für die regenerative Medizin. Der Fokus der meidrix lag auf kollagenbasierten ECM-Additiven für eine verbesserte Zellmigration und Gewebeintegration dieser Implantate. Derzeit bestehende ECM-Materialien weisen teilweise begrenzte Biokompatibilität, mechanische und regenerative Eigenschaften auf. Für die Füllung und Verbesserung der Eigenschaften der 3 D gedruckten Implantate wurden daher neue Methoden und Herstellverfahren für die Optimierung der Homogenität, Biokompatibilität und Sterilisierbarkeit solcher orthobiologischen Matrices entwickelt.

### **AP 3.1 Präparation, Charakterisierung Kollagenlösung**

Für die Befüllung von Scaffolds mit ECM wurde zunächst die Herstellung von murinem hochreinem nativem Kollagen Typ I standardisiert, das anschließend mittels einer Neutralisationslösung zu einem Hydrogel geliert werden kann. Durch diese standardisierte Herstellung des Kollagens, kann auch eine standardisierte Befüllung und Beschichtung von diversen Scaffolds erreicht werden.

In diesem Arbeitspaket wurde eine hochkonzentrierte, native Kollagenlösung (10 mg/ml) erfolgreich hergestellt, die mit 0,1 %iger Essigsäure verdünnt werden kann.

Zur Gelierung der sauren Kollagenlösung (pH 3,8) wurden zwei Gelneutralisationslösungen entwickelt:

- **5GNL:** Wird im Verhältnis 4:1 mit Kollagen gemischt, um stabile Kollagengele zu erzeugen.
- **10GNL:** Wird zur Herstellung von zellbesiedelten Gelen verwendet.

Alle Lösungen wurden den Projektpartnern zur Verfügung gestellt und das Arbeitspaket 2020 erfolgreich abgeschlossen.

Das in diesem AP beschriebene Herstellverfahren wird nicht veröffentlicht.

### **AP 3.2 Untersuchung der spezifischen Zellaktivität und Zellverträglichkeit von Chondrozyten und Osteoblasten auf die unterschiedlichen Matrices**

Die kollagenbasierten ECMs für den Einsatz in Knochen-Knorpel-Implantate sind für den Einsatz im Gelenk und Knochen vorgesehen. Somit wurde im **AP 3.2** die Effektivität (Zellverträglichkeit, Differenzierung) des unter **AP 3.1** hergestellten Kollagens auf Zellen des Knochens und der Gelenke untersucht. In diesem Arbeitspaket wurde die Zellaktivität und -verträglichkeit von Chondrozyten und Osteoblasten auf verschiedenen Matrices untersucht. Bovine Chondrozyten, mesenchymale Stammzellen (MSCs), Osteoblasten und adipöse Stammzellen (ASCs) wurden aus Schlachthofmaterial isoliert. MSCs und ASCs differenzierten nach 21 Tagen im osteogenen oder chondrogenen Differenzierungsmedium zu Chondrozyten und Osteoblasten. Zellbesiedelte Kollagengele zeigten eine gute Biokompatibilität. Es wurden keine zytotoxischen Ergebnisse festgestellt. Hydrogele unterstützen die Zellviabilität und -proliferation. Diese Ergebnisse bestätigen die Eignung der Kollagenmatrix für die Zellkultivierung und Implantatanwendungen.

Bovine Chondrozyten, mesenchymale Stammzellen (MSCs), Osteoblasten und adipöse Stammzellen (ASCs) wurden aus Schlachtabfällen isoliert und in spezifischen Kulturmedien kultiviert. Chondrozyten wurden auf zellabweisenden Oberflächen gehalten, um eine Differenzierung zu

verhindern. Für die Differenzierung wurden MSCs und ASCs 21 Tage mit osteogenem oder chondrogenem Medium kultiviert. Chondrogen differenzierte Zellen bildeten knorpelartiges Gewebe mit Aggrecan-Expression, sichtbar durch Alcianblau-Färbung (Abb. 1, A und B). Osteoblasten zeigten extrazelluläre Calciumablagerungen (Mineralisierung), nachweisbar mit Alizarinrot S. Undifferenzierte Zellen dienten als Kontrolle und wiesen keine charakteristischen Färbungen auf (Abb. 1, C und D).

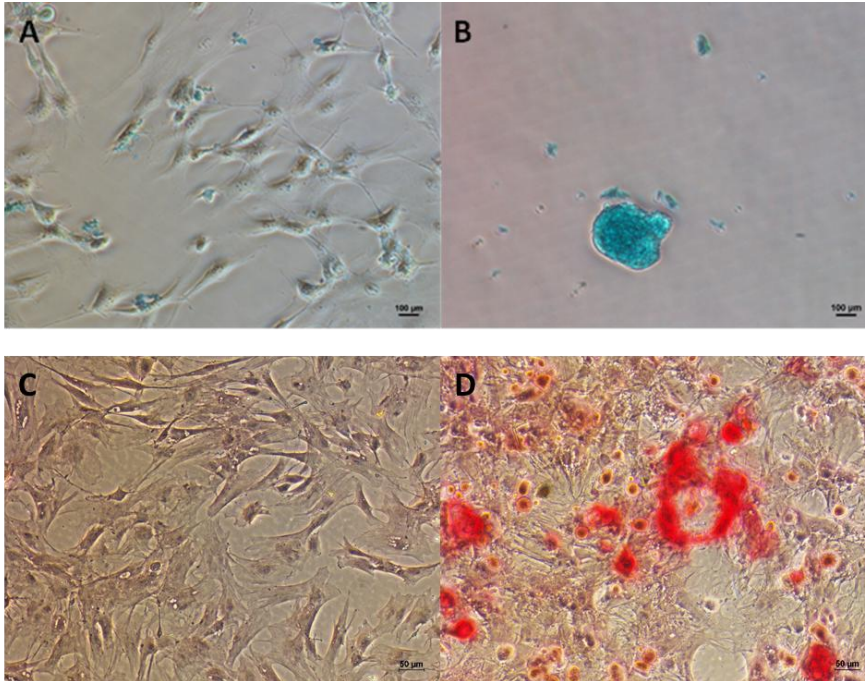


Abb. 1 **A und B:** Zellcharakterisierung chondrogen differenzierter boviner ASCs nach 21-tägiger Inkubation in chondrogenem Differenzierungsmedium (B) im Vergleich zur Kontrolle nicht-differenzierter ASCs (A) mittels Alcianblaufärbung. **C und D:** Zellcharakterisierung osteogen differenzierter boviner MSCs nach 21-tägiger Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium (D) im Vergleich zur Kontrolle nicht-differenzierter MSCs (C) mittels Alizarinrotfärbung.

Zur Untersuchung der Zellverträglichkeit wurden Kollagengele mit bovinen Chondrozyten ( $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml) hergestellt und sieben Tage kultiviert. Die Gele (Kollagengehalt: 8 mg/ml, Mischverhältnis 4:1) wurden mithilfe einer Zweikammerspritze homogen gemischt und in well-Platten inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen aus der Kollagenmatrix isoliert und mittels Trypanblaufärbung untersucht. Die durchschnittliche Zellzahl betrug  $1,04 \times 10^6 \pm 1,88 \times 10^5$ , mit einem Wachstumsfaktor von 17,86 % und einer Zellviabilität von 83,97 % (Abb. 2). Es zeigte sich, dass die Kollagenmatrix keinen zytotoxischen Einfluss auf die Chondrozyten hatte und die Zellen gut proliferierten.

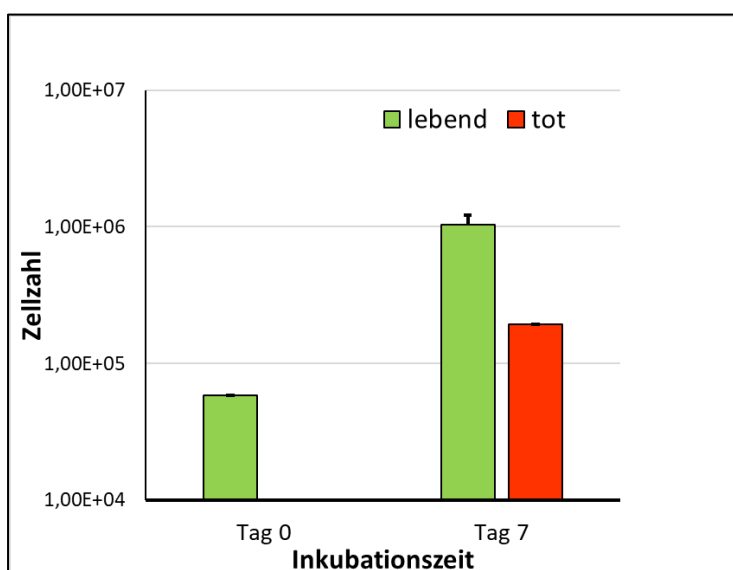


Abb. 2: Lebend-Totzellzahl nach siebentägiger Inkubation von Chondrozyten in 4:1-Kollagengelen.

Die Ergebnisse dieses AP zeigen, 1) dass aus tierischen Schlachtabfällen Chondrozyten und Osteoblasten isoliert werden können und 2) dass die von meidrix hergestellte Kollagen Typ I Matrix die Vitalität und Proliferation von Gelenkzellen wie Chondrozyten unterstützt.

Die Ergebnisse wurden nicht veröffentlicht. Jedoch wurden die befüllten Scaffolds in den Tierversuchen verwendet, deren Veröffentlichung durch die Justus-Liebig-Universität (Frau Dr. Lips) vorbereitet wird.

### **AP 3.3 Kollagenmodifizierung zur in situ Verkapselung (meidrix)**

Der pH-Wert des Hydrogels ist wichtig, um die Migration und Proliferation von Zellen zu gewährleisten. Das Kollagen (**AP 3.1**) ist flüssig hat ein pH-Wert von 3,8 und ist somit ungeeignet für Zellwachstum. Um aus saurem Kollagen ein Hydrogel herzustellen, muss somit diese saure Kollagenlösung neutralisiert werden. In diesem Abschnitt wurden geeignete Gelierlösungen (Gelneutralisationslösung, GNL) untersucht.

**Zusammenfassung.** In diesem Arbeitspaket wurde die Modifizierung der Kollagenmatrix zur in situ-Verkapselung von Zellen untersucht, um optimale Bedingungen für die Zellbesiedelung zu schaffen.

1. **pH-Anpassung für die Gelierung:** Die Gelierung der sauren Kollagenlösung erfordert eine Neutralisation auf pH 7 durch Zugabe einer Gelneutralisationslösung (GNL). Der pH-Wert der Gele zeigte anfänglich Werte um pH 7 und stabilisierte sich nach 16 h Inkubation auf pH 7,6.
2. **Untersuchung der Zellverträglichkeit der GNL:** Die Zellbesiedelung von Kollagengelen mit 5GNL und 10GNL wurde untersucht. 5GNL zeigte eine höhere Zellverträglichkeit als 10GNL, die eine mäßig bis stark zytotoxische Wirkung hatte. Die optimale Inkubationszeit für Zellen in GNL beträgt maximal 5 Minuten.

#### **1. pH-Anpassung für die Gelierung**

Um den pH-Wert sowie die Gelierung der sauren Kollagenlösung mit unterschiedlichen Gelneutralisationslösungen zu untersuchen wurden 4:1-Kollagengele mit unterschiedlicher GNL-Konzentration hergestellt. Für die Untersuchung der Gelierung wurden unterschiedliche Zusammensetzungen von Neutralisationslösungen (5GNL oder 10GNL) in Kombination mit Zellkulturmedium mit oder ohne Zusatz von HEPES (20 mM in Bezug auf das Medium) zur Verbesserung der Puffereigenschaften verwendet. Die Gele wurden mit Hilfe von Zweikammerspritzen in 6-Well-Platten-Einsätzen gegossen und für 30 min bei Raumtemperatur geliert. Bei der anschließenden Inkubation wurde: Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde eine pH-Wert-Bestimmung der Kollagengele sowie des Mediums durchgeführt. Es wurden insgesamt drei Kollagenchargen untersucht.

Die Ergebnisse (Zwischenbericht 2020, Abbildungen 4 und 5) zeigen, dass 5GNL die geeignetste Gelneutralisationslösung für zellbesiedelte Kollagene darstellt und eine schnelle, biokompatible Gelierung ermöglicht. Die standardisierte Herstellung von GNL ermöglicht die Produktion von qualitativ hochwertigen Gelen, die zu Befüllung von diversen Scaffolds verwendet werden können.

Die Ergebnisse werden nicht veröffentlicht. Die befüllten Scaffolds wurden in Tierversuchen verwendet, deren Veröffentlichung durch die Justus-Liebig-Universität (Frau Dr. Lips) vorbereitet wird.

#### **2. Untersuchung der Zellverträglichkeit der GNL**

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung verschiedener GNL-Puffer wurde ein MTT-Proliferationsassay mit bovinen ASCs durchgeführt. Die optimale Zellzahl wurde mittels Zelltitration bestimmt, wobei der lineare Bereich der metabolischen Aktivität als Grundlage diente. Für den

dreitägigen Test wurden 5.000 Zellen pro Well und für den siebentägigen Test  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well eingesetzt.

**Ergebnis.** Die Auswertung (Abb. 3) erfolgte über Extinktionswerte als Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle (100 % Proliferation). Die Zellen in 5GNL-Extraktionsmedium zeigten eine Proliferation von 82,26 % (3 d) bzw. 87,97 % (7 d) und somit keinen zytotoxischen Einfluss. Die Kultivierung in 10GNL-M-Extraktionsmedium zeigte eine Proliferation von 73,80 % (3 d) bzw. 67,26 % (7 d) und somit einen schwach bzw. mäßig toxischen Einfluss.

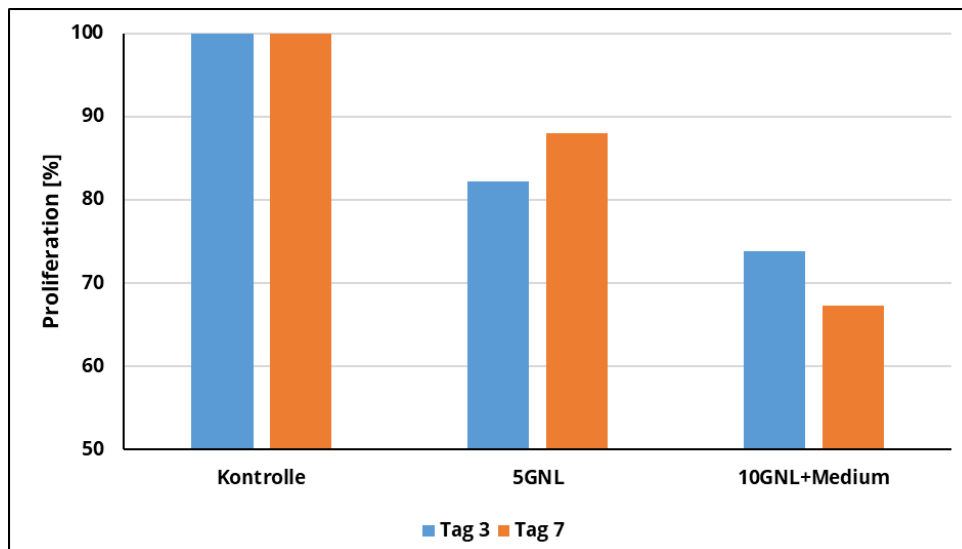


Abb. 3: Proliferation [%] nach 3 d bzw. 7 d Inkubation von bovinen ASCs in Kontrollmedium, 5GNL- bzw. 10GNL-M-Extraktionsmedium.

### Untersuchung der Effekte unterschiedlicher GNL-Konzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses von GNL-Puffern auf Zellen wurden drei Ansätze mit bovinen Osteoblasten und ASCs durchgeführt, die Proliferation und Zellvitalität analysierten.

**Ansatz 1:** Zellen wurden in Suspension für 5, 10, 20 und 40 Minuten in 5GNL, 10GNL-M oder Kultivierungsmedium (Kontrolle) inkubiert, anschließend erfolgte eine Lebend-Totzählung mittels Trypanblau.

**Ansatz 2:** Nach der gleichen Inkubation wurden die Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät (3 Replikate), 48 Stunden kultiviert und dann eine Lebend-Totzählung durchgeführt.

**Ansatz 3:** Zellen wurden über Nacht zur Adhärenz auf 96-Well-Platten kultiviert (6 Replikate), dann für 5, 10, 20 und 40 Minuten in den jeweiligen Medien inkubiert und nach 48 Stunden mithilfe des MTT-Assays auf ihre metabolische Aktivität getestet.

Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen grafisch dargestellt und mittels zweiseitigem t-Test (5 % Signifikanzniveau) ausgewertet.

### ASCs und GNL-Puffer-Tests

Drei Ansätze wurden durchgeführt, um den Einfluss von 5GNL und 10GNL-M auf bovine ASCs zu untersuchen. Dabei wurden die Zellen mit 5GNL oder 10GNL und einer Kontrolle inkubiert, mit oder ohne weitere Kultivierung:

**Ansatz 1:** Die Lebendzellzahl nahm mit steigender Zeit ab. Signifikante Unterschiede traten nach 10 min und länger auf — sowohl im Kontrollmedium als auch in den GNL-Puffern (Abb. 6, p-Werte sind im ZB nachzuschlagen)

**Ansatz 2:** Zellen wurden nach Inkubation ausgesät und 48 h kultiviert. Ein signifikanter Zellzahlrückgang zeigte sich nur bei 5GNL zwischen 20 und 40 min ( $p = 0,049$ ), während 10GNL-M und das Kontrollmedium keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

**Ansatz 3:** Signifikante Unterschiede traten bereits nach 10 min in beiden GNL-Puffern im Vergleich zur Kontrolle auf, verstärkt nach 40 min.

Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der GNL auf die Proliferation sind in Abb. 4 dargestellt: Nach 5 min zeigte sich keine zytotoxische Wirkung. Nach 10 min zeigte sich eine Schwache bis mäßige Zytotoxizität. Nach 20 min: Kein zytotoxischer Einfluss bei 5GNL aber einen mäßigen Einfluss bei 10GNL. Nach 40 min: Mäßig bis stark zytotoxisch.

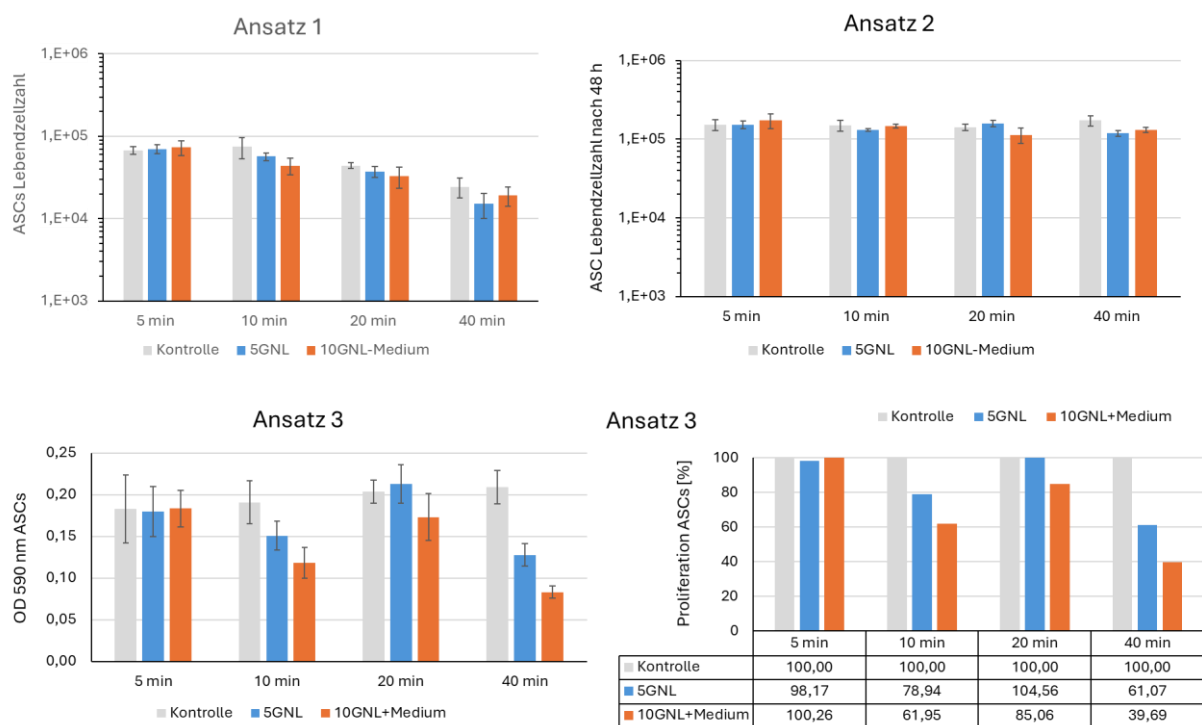


Abb. 4: Einfluss von GNL auf bovine ASCs in den drei Ansätzen

## Ergebnisse Osteoblasten

**Ansatz 1:** Die Lebendzellzahl nahm mit steigender Zeit ab. Signifikante Unterschiede traten nach 10 min (10 GNL) und 20 min (5GNL) auf (Abb. 5, p-Werte sind in Zwischenbericht zu finden).

**Ansatz 2:** Die Ergebnisse im Ansatz 2 waren gemischt. Sowohl 5GNL als auch 10 GNL verursachten eine Reduktion der Zellzahlen nach 20 bzw 40 min. Keine signifikanten Unterschiede wurden bei 5 und 10 min festgestellt.

**Ansatz 3:** Nach Inkubation der Osteoblasten in Kultivierungsmedium (Kontrolle), 5GNL und 10GNL-M sowie anschließender 48-stündiger Kultivierung, wurde die Zellviabilität mittels MTT-Assay gemessen. Bei der Anwendung von 5 GNL und 10 GNL wurden signifikante Unterschiede zwischen 5 und 10 min, 5 und 40 min, 10 und 40 min sowie 20 und 40 min festgestellt. Unabhängig von der Inkubationszeit wurde in 5GNL und 10GNL-M im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Zellzahl beobachtet. Bereits nach 5 min zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und 5GNL sowie Kontrolle und 10GNL-M. Nach 10, 20 und 40 min verstärkten sich diese Unterschiede, wobei auch zwischen 5GNL und 10GNL-M signifikante Differenzen auftraten.

Die Proliferation der Osteoblasten wurde durch 5GNL und 10 GNL mäßig bis stark zytotoxisch beeinträchtigt. Schon eine 5-minütige Inkubation in 5GNL und 10GNL-M führt zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle.

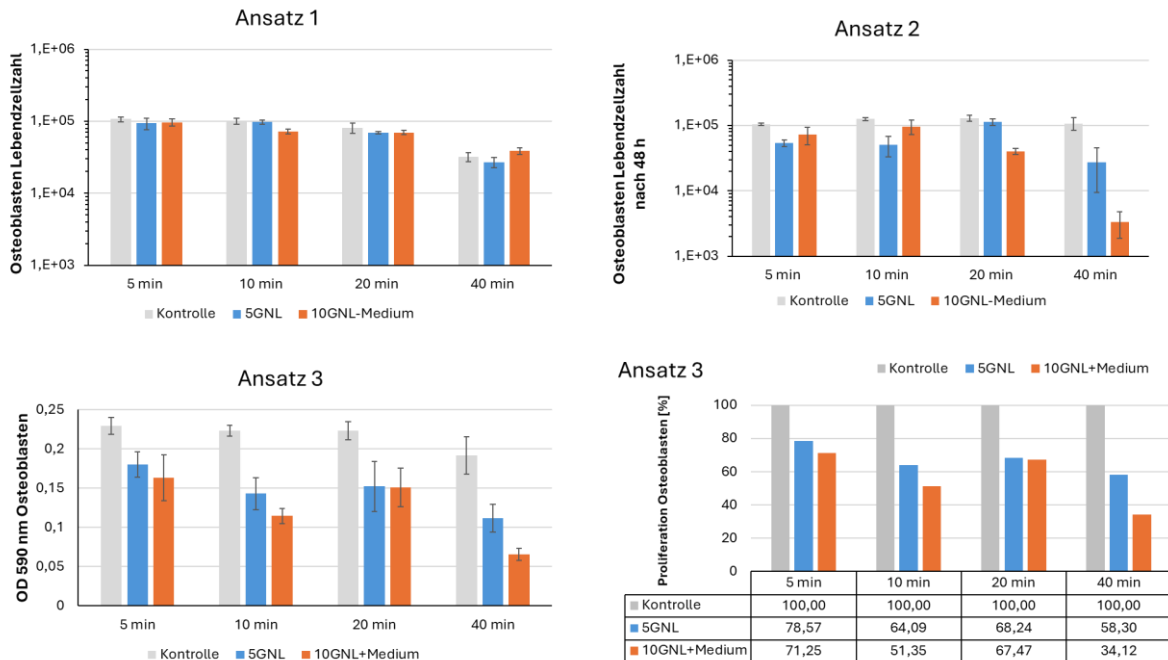


Abb. 5: Einfluss von GNL auf bovine Osteoblasten in den drei Ansätzen

**Fazit.** Eine 5-minütige Inkubation in 5GNL und 10GNL-M zeigte keinen zytotoxischen Einfluss auf ASCs. Ab 10 min war jedoch eine zytotoxische Wirkung erkennbar. Da kein signifikanter Unterschied zwischen 5GNL und 10GNL-M bestand, wurden für die Migration-Assay (AP 3.4) zellbesiedelte Kollagengewebe mit 5GNL hergestellt, um möglichst nah am angestrebten Endprodukt (4:1-Kollagengel mit 5GNL) zu bleiben. Die Inkubation wurde dabei auf maximal 5 Minuten begrenzt.

Die Ergebnisse werden nicht veröffentlicht. Jedoch wurden die befüllten Scaffolds in den Tierversuchen verwendet, deren Veröffentlichung durch die Justus-Liebig-Universität (Frau Dr. Lips) vorbereitet wird.

### AP 3.4 Migrations-Assay zum Nachweis der Einwanderung von Zellen

Das Ziel von AP 3.4 ist die Untersuchung der Migration von Chondrozyten zu Osteoblasten in Abhängigkeit von der Kollagenkonzentration und Zeitdauer. Die Untersuchung der Migration von Zellen in die Kollagenmatrix bestätigt die Effektivität (Proliferation, Differenzierung) des unter AP 3.1 und AP 3.3 hergestellten Hydrogels auf Zellen des Knochens und der Gelenke.

In diesem Arbeitspaket wurde ein Migration-Assay (Abb. 6) entwickelt, um die Einwanderung von Zellen in Kollagen-Scaffolds mit unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen (4, 6, 8 mg/ml) zu untersuchen.

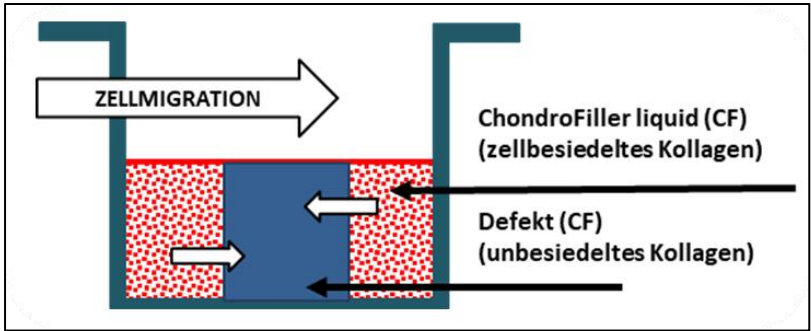


Abb. 6: Aufbau des in vitro-Migrationsmodells. Zellbesiedelte Gele in einem 6-Well-Insert. Auffüllen der ausgestanzten Defekte mit zellfreier Kollagenmatrix

Das Migrationsverhalten boviner Chondrozyten und Osteoblasten in Kollagenmatrices mit verschiedenen Kollagenkonzentrationen (4, 6, 8 mg/ml) wurde mittels Migration-Assay untersucht. Dazu wurden zellbesiedelte Gele ( $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml, 6 mm Höhe) in Well-Platten gegossen. Ein 8 mm großer Defekt wurde ausgestanzt und mit zellfreiem 4:1-Kollagengel gefüllt. Nach Gelierung wurden die Gele mit Medium überschichtet, über Nacht inkubiert und dann Well-Platten überführt. Die Kultivierung erfolgte über 1, 2, 4 und 8 Wochen mit Mediumwechsel alle 3–5 Tage.

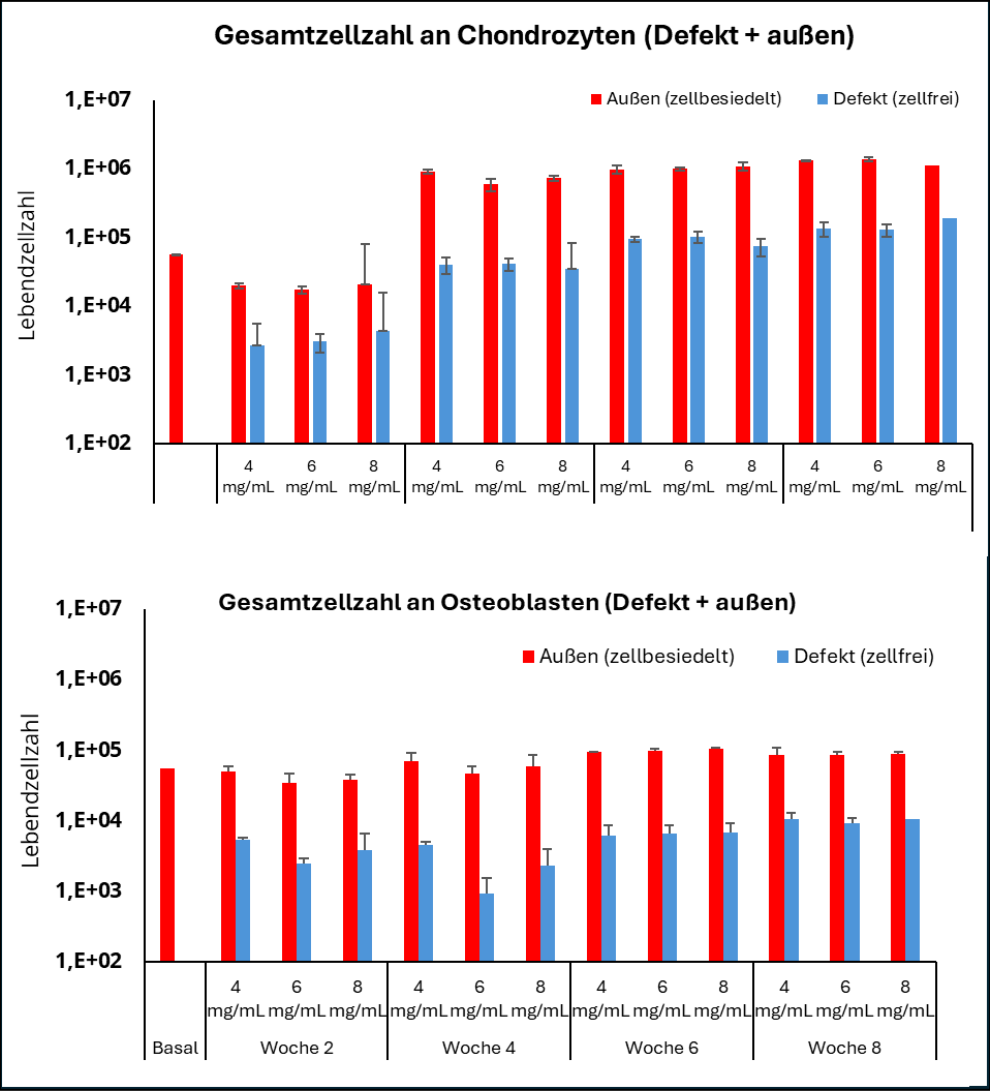


Abb. 7: Lebendzellzählung der Chondrozyten und Osteoblasten aus der Defektfüllung und dem äußeren Gel des Migration-Assays nach 1, 2, 4, 8 und 10 Wochen

## **Chondrozyten**

Die Untersuchung der Migration von Chondrozyten in Kollagenmatrices mit unterschiedlichen Konzentrationen (4, 6 und 8 mg/ml) zeigte, dass höhere Kollagengehalte mit einer erhöhten Zellzahl in den ursprünglich zellfreien Defektfüllungen korrelierten. Besonders bei 8 mg/ml wurde nach 4 und 8 Wochen eine signifikant höhere Lebendzellzahl festgestellt als bei den niedrigeren Konzentrationen. Ab Woche 4 kam es zu einer deutlichen Schrumpfung der Kollagengele, die bei den 4 mg/ml-Gelen am stärksten ausgeprägt war (Abb. 7).

Die Zellzahlen in den Defekten nahmen zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zum vorherigen zu. Während sich in den ersten beiden Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen zeigten, stiegen die Zellzahlen ab Woche 4, insbesondere zwischen den 4 und 8 mg/ml sowie den 6 und 8 mg/ml Gelen, signifikant an.

Auch im äußeren Gel wuchs die Vitalzellzahl stetig. Hier wurde bei allen Konzentrationen zwischen Woche 1 und 2 ein signifikanter Anstieg festgestellt, mit weiteren Zunahmen bei 4 und 8 mg/ml zwischen Woche 2 und 4 sowie bei 6 mg/ml zwischen Woche 4 und 8. Allerdings zeigten sich innerhalb der äußeren Bereiche der Gele keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kollagenkonzentrationen, auch nach 8 Wochen nicht.

## **Osteoblasten**

Osteoblasten wanderten nach 2 Wochen in den Defekt ein und besiedeln über die Kultivierungszeit von 8 Wochen kontinuierlich die Defektzone. Ein Trend hinsichtlich der unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen im Gel war nicht ersichtlich. Insgesamt waren die Zellzahlen niedriger als bei den Versuchen mit Chondrozyten (Abb. 7).

**Fazit.** Ein höherer Kollagengehalt (8 mg/ml) fördert die Zellmigration von Chondrozyten und erhöht die Zellzahl in den Defekten, während die Zellzahl im äußeren Gel unabhängig von der Kollagenkonzentration kontinuierlich zunimmt. Die stärkere Schrumpfung bei niedrigeren Kollagenkonzentrationen könnte die niedrigere Zellzahl in den 4 mg/ml-Gelen erklären.

Die zur effizienten Migration von Zellen notwendigen Kollagenkonzentration der Hydrogele erlaubt die standardisierte Herstellung von kollagen-befüllten Scaffolds.

Die Ergebnisse werden nicht veröffentlicht. Jedoch wurden die befüllten Scaffolds in den Tierversuchen verwendet, deren Veröffentlichung durch die Justus-Liebig-Universität (Frau Dr. Lips) vorbereitet wird

## **AP 3.5 Methode zum effektiven Füllen von Scaffolds mit Kollagen**

### **AP 3.6 Nachweis der homogenen Füllung der Scaffolds**

#### **Nachweis der homogenen Füllung**

Für die Befüllung der Scaffolds wurde Kollagen Typ I und 5GNL unter kalten Bedingungen verwendet, so dass das Hydrogel nicht vor Abschluss der Befüllung gelierte. Für die Befüllung wurden zwei Methoden erfolgreich getestet. Bei der ersten Methode wurde in einem Exsikkator (Abb. 8 A) Unterdruck angelegt (ca. 100 mBar, ca. 1 min). Die Gelierung war optisch durch die milchig-trübe Farbe des Kollagens zu erkennen.

Weiter wurde ein Versuch mit der Perfusionskammer (Abbildung 6 B), entwickelt und bereitgestellt durch das Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V (iba), durchgeführt. Die Kompartimente in der Perfusionskammer sind getrennt anströmbar, um gegebenenfalls in die Chondrophase bzw. Osteophase der Scaffolds unterschiedliche Kollagengele einbringen zu können. Die Kammern können über eine Luer-Verbindung mit einer Spritze einfach befüllt werden (Abb. 8 B).

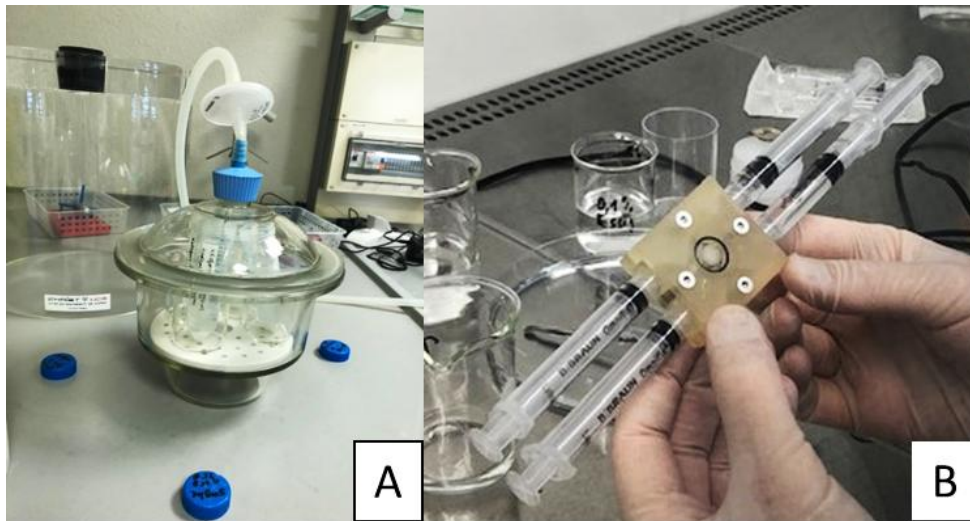


Abbildung 8: **A** Füllung von Scaffolds mit Kollagenlösung mittels Unterdrucks im Vakuumexsikkator. **B** Füllung von Scaffolds in der iba-Apparatur mit Kollagenlösung mittels Luer-Spritzen

Eine Befüllung eines Scaffolds ist im Gegensatz zur Methode mittels Unterdrucks im Vakuumexsikkator relativ zeitaufwendig.

Zum Nachweis der homogenen Füllung wurden die gefüllten Scaffolds mittels Azanfärbung und Methylblau gefärbt (Abb. 9). Bei der Azanfärbung nach Heidenhain handelt es sich um eine histologische Übersichtsfärbung, welche Kollagene blau färbt und die Kollagenfüllung des Scaffolds sichtbar machen soll. In Abbildung 9 ist die homogene Füllung der Scaffolds sichtbar. Zur weiteren Charakterisierung mittels Rasterelektronenmikroskop wurden im Mai 2020 kollagengefüllte Ormocer-Scaffolds (4 und 8 mg/ml) an MPO versendet.

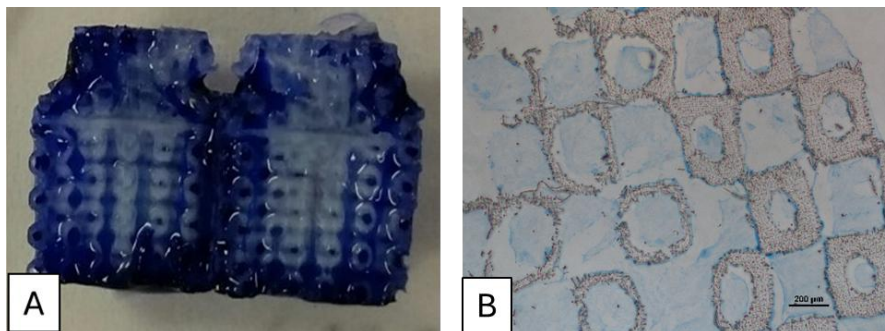


Abbildung 9: **A** LCM3-Scaffold mit 8 mg/ml Kollagenlösung befüllt, mit dem Skalpell halbiert und mit Methylblau gefärbt. **B** 4 mg/ml Kollagenlösung (Azanfärbung, 4fache Vergrößerung, Maßstab: 200 µm, Schnittdicke 6 µm)

Die einfache Umsetzbarkeit der Befüllung erlaubt die Herstellung größerer Stückzahlen an kollagen-Befüllung von Scaffolds. Die Ergebnisse werden nicht veröffentlicht.

### AP 3.7 Scaffoldfüllung mit Kollagen in Verbindung mit Zellen und Wachstumsfaktoren

In diesem Arbeitspaket wurde die Zellverträglichkeit mittels Medienextraktion und MTT-Assay von LCM3-beschichteten Scaffolds untersucht, um eine Kombination aus Kollagen, Zellen und Wachstumsfaktoren zu testen.

Um einen möglichen zytotoxischen Einfluss von LCM3 auf die Zellen zu untersuchen, wurde ein Proliferationstest mittels MTT-Assay und anschließender photometrischer Quantifizierung durchgeführt. Die Ergebnisse deuteten auf eine starke Zytotoxizität auf Chondrozyten und Osteoblasten

von LCM3 hin. Vermutlich waren nicht-auspolymerisiertes Material und Photoinitiator der Grund für diese starke Zytotoxizität. Für die nächsten Versuche wurde das LCM3-Material über drei Tage mit Aceton, Ethanol und Wasser gewaschen und anschließend in PBS gelagert.

Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen auf Zytotoxizität werden in AP 3.8 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigten den Bedarf einer Spülung mit nicht-zytotoxischen Lösungsmittel (Wasser und PBS) der Scaffolds vor der Befüllung auf. Die Ergebnisse werden nicht veröffentlicht.

### AP 3.8 Optimierung geeigneter Sterilisationsverfahren

Kollagen-befüllte Scaffolds müssen vor dem Einsatz im Tierversuch einer Sterilisation unterzogen werden. Dieses Arbeitspaket untersuchte verschiedene Bedingungen, um eine schonende Gamma-Sterilisation bei 17,5–25 kGy zu ermöglichen. Als geeignetes Sterilisationsverfahren wurde die Sterilisation mittels Gamma-Bestrahlung ausgewählt. Dieses Verfahren ist produktschonend, da keine Temperaturerhöhung notwendig ist. In einem ersten versuch wurden die Temperaturbedingungen für die Bestrahlung der LCM3-Scaffolds untersucht: 2-8°C vs -78,4°C. Die Bestrahlungsdosis betrug 17,5–25 kGy, basierend auf der Erfahrung von meidrix biomedicals und entsprechend der Gamma-Sterilisation des CE-zertifizierten Medizinprodukts ChondroFiller liquid. Nach der Bestrahlung wurden die Scaffolds mittels Rheologie vermessen, die Kollagenfüllung gefärbt und auf Zytotoxizität mittels MTT-Assay getestet.

**Rheologische Untersuchung.** Die rheologischen Untersuchungen bestimmten die Elastizität der Scaffolds durch eine Oszillationsmessung mit Frequenzsweep, wobei die elastischen Module in Abb. 10 dargestellt sind. Die Werte des elastischen Moduls lagen bei allen vier Scaffolds im selben Bereich. Die Lagerungs- bzw. Bestrahlungstemperaturen von 4 °C und -15 ° hatten einen nur geringen Einfluss auf dem elastischen Modul bzw. Steifigkeit der kollagengefüllten LCM3-Scaffolds.

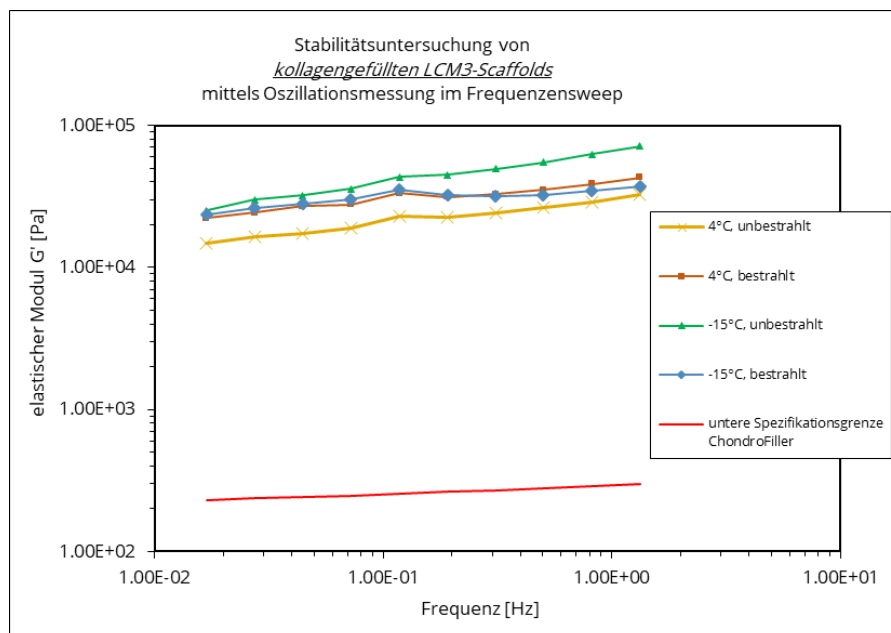


Abbildung 10: LCM3-Scaffold mit 8 mg/ml Kollagenlösung befüllt, rheologische Messung im Frequenzsweep.

**Methylfärbung von Kollagen.** Die Färbung des Kollagens mit Methylblau unter den getesteten Bedingungen, zeigte eine gute Befüllung mit Kollagen (Bilder im Zwischenbericht 2021).

**Zytotoxizität mittels MTT-Assay.** Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen, dass die gamma-bestrahlten kollagenbefüllten Scaffolds an der Grenze zu einem leicht zytotoxischen Potential sind. Die Viabilitäts-Werte sind bei der Lagerungs- und Bestrahlungstemperatur von 4 °C etwas besser

als bei - 15 °C. Im weiteren Projektverlauf soll daher bei 4 °C (2 bis 8 °C) gelagert und gamma- bestrahlt werden (Abb. 11).

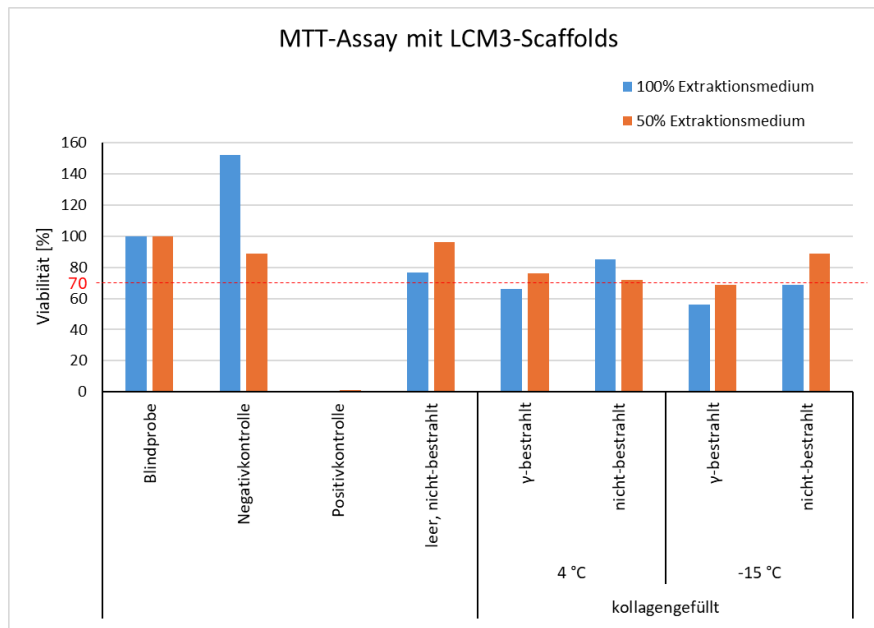


Abbildung 11: MTT-Assay von LCM3-Scaffold bei 4 und - 15 °C mit und ohne Gamma- Bestrahlung, 100 % Extrakti- onsmedium (0,2 g/ml). Das toxische Potenzial ist mir ei- ner roten Linie bei 70% ange- zeigt.

Aufgrund der obigen Ergebnisse wurden in weiterem Projektverlauf Kollagenbefüllte (8 mg/ml-Gel) LCM3-Scaffolds bei 2 bis 8 °C gammabestrahlt. Dabei wurde untersucht, ob die Lagerung im PBS auf die Festigkeit (rheologische Untersuchung), Befüllung und dem zytotoxischen Potenzial einen Einfluss ausübte.

**Rheologische Untersuchung.** Es ist zu erkennen, dass LCM3-Scaffolds die in PBS gelagert wurden, elastischer waren als solche, die ohne die Zugabe von PBS aufbewahrt wurden. Die Gamma-Steri- lisation hat dagegen keinen Einfluss auf die Elastizität bzw. Steifigkeit der Scaffolds (Abb. 12).

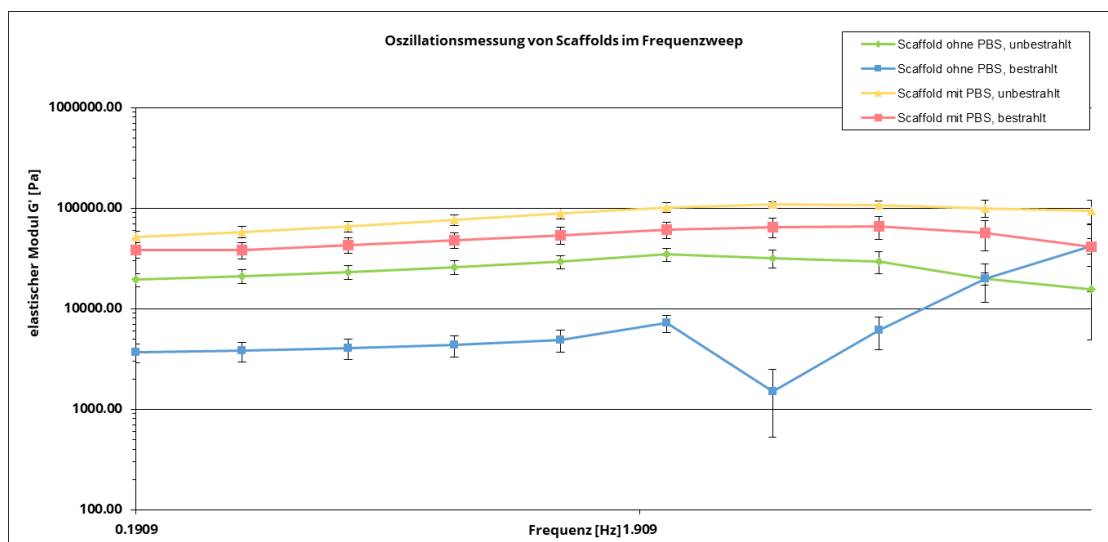


Abb. 12: LCM3-Scaffold mit 8 mg/ml Kollagenlösung befüllt, rheologische Messung im Frequenzweep, Dreifache Messung von jeweils einem Scaffold. Lagerung und Bestrahlung bei 2 bis 8 °C, mit und ohne PBS

**Methylfärbung von Kollagen.** Die LCM3-Scaffolds ohne PBS-Puffer-Überschichtung zeigten eine nur teilweise Befüllung mit Kollagen. Möglicherweise könnte das Kollagen während der Lagerung

und Bestrahlung ohne PBS-Puffer-Überschichtung nicht in den Scaffolds verblieben, so dass es teilweise ausgelief.

**Zytotoxizität mittels MTT-Assay.** Anhand der Ergebnisse des MTT-Assays ist keine zytotoxische Wirkung der LCM3-Scaffolds zu erkennen. Die Extrakte zeigten sich im Gegensatz zur Blindprobe sogar eine höhere Viabilität aus. Ohne PBS und mit Gamma-Bestrahlung ist die Viabilität etwas geringer (Abb. 13).

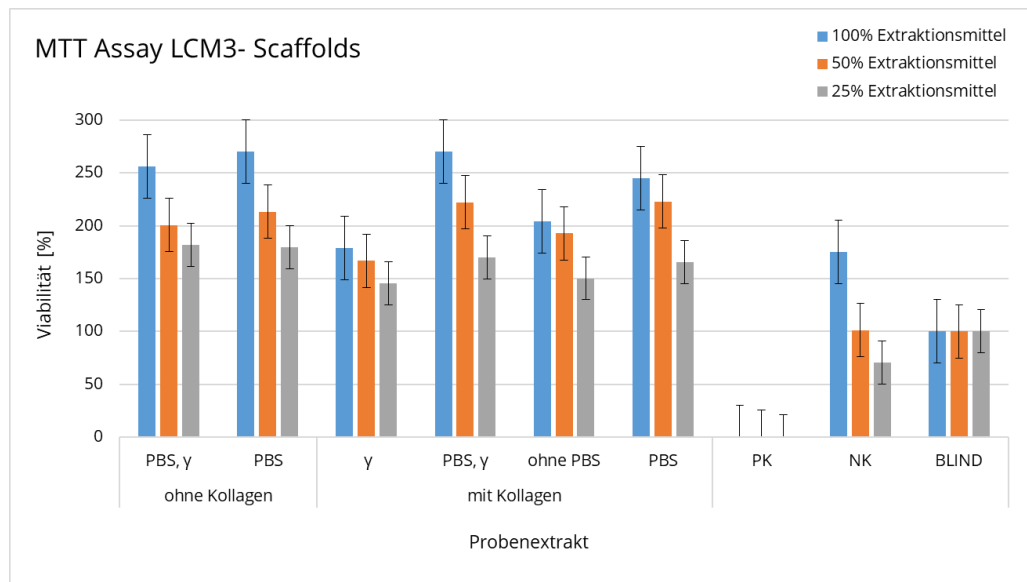


Abb. 13: MTT-Assay von LCM3-Scaffold mit und ohne PBS, mit und ohne Gamma-Bestrahlung ( $\gamma$ ), Lagerung und Bestrahlung bei 2 bis 8 °C, 100 %, 50 % und 25 % Extraktionsmedium.

### Sterilisation von LCM3-Scaffolds für den Einsatz im Tierversuch

Meidrix befüllte und sterilisierte die für den Einsatz im Tierversuch verwendeten LCM3-Scaffolds. Die idealen Bedingungen für die Sterilisation wurden in den obigen Versuchen etabliert. Diese umfassten:

1. Spülen der Scaffolds und Lagerung in PBS
2. Bestimmung des Bioburdens der Scaffolds durch ein externes akkreditiertes Labor, bevor die Sterilisation stattfinden konnte
3. Sterilisation mittels Gamma-Bestrahlung bei 17,5-25 kGy.
4. Gekühlter Versand.

Es wurden sowohl ungefüllte als auch befüllte LCM3-Scaffolds (siehe **AP. 3.5** und **3.6**) sterilisiert und für Tierversuche zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse ermöglichen die standardisierte Sterilisation von kollagen-befüllten Scaffolds. Die Ergebnisse werden nicht veröffentlicht.

### AP 7.4 EMC-beladene Scaffolds und autologe Zytokincocktails für in vitro und in vitro Versuche

Kollagen-befüllte LCM3-Scaffolds wurden Frau Lips zur Verwendung im Tierversuch bereitgestellt. Das Vorgehen ist in **AP 3.8** beschrieben.

### **TEIL III Erfolgskontrollbericht**

Das Projekt *Poly-IMPLANT-Druck* hat bedeutende Fortschritte in der Entwicklung eines laserbasierten Nano-3D-Druckverfahrens für Knochen-Knorpel-Implantate erzielt. Der Fokus lag auf der Optimierung kollagenbasierter Extrazellulärmatrix (ECM)-Additive zur Verbesserung der Zellmigration und Gewebeintegration. Die Arbeitspakete führten zu wichtigen Erkenntnissen hinsichtlich der Herstellung, Gelierung und Zellbesiedlung von Kollagenmatrices. Besonders hervorzuheben ist die erfolgreiche Entwicklung eines Migration-Assay zur Beurteilung von Zellmigration von Chondrozyten und Osteoblasten (**AP 3.3** und **AP 3.4**). Zudem wurde eine standardisierte Methode zur Scaffold-Befüllung (**AP 3.5** und **3.6**) und Sterilisation etabliert, die für zukünftige Implantatanwendungen vielversprechend ist (**AP 3.8**). Weitere Details zu den einzelnen Ergebnissen sind in Teil II dieses Abschlussberichtes zu finden. Obwohl viele der Ergebnisse nicht veröffentlicht wurden, sind die wissenschaftlichen und technologischen Fortschritte dieses Projekts für die regenerative Medizin von großer Relevanz. Die erfolgreiche Integration der Kollagenmatrices in Tierversuche unterstreicht das Potenzial dieser innovativen Ansätze für künftige klinische Anwendungen.

**Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten.**

<b>Erfindungen und Schutzrechtsanmeldungen</b>	
Welche neuen technischen Entwicklungen oder Innovationen sind im Rahmen des Projekts entstanden?	Befüllung von resorbierbaren Scaffolds mit einem nativen Kollagen mit sehr hoher Biokompatibilität und gutem Einwachsverhalten in vivo.
Sind bereits Schutzrechte erteilt worden, und wenn ja, von welchen Behörden (z. B. Deutsches Patent- und Markenamt, Europäisches Patentamt)?	nein
<b>Inanspruchnahme von Schutzrechten</b>	
Haben beteiligte Unternehmen, Universitäten oder Forschungseinrichtungen Schutzrechte genutzt oder in Anspruch genommen?	meidrix nein
Gibt es bestehende Lizenzen oder Vereinbarungen zur Nutzung der Erfindungen durch Dritte?	nein
<b>Standortbezogene Verwertung</b>	
Wie wird sichergestellt, dass die Patente und Schutzrechte in Deutschland oder an dem Standort des Projektträgers wirtschaftlich genutzt werden?	n.a
Gibt es Pläne für eine kommerzielle Verwertung am Standort, z. B. durch eigene Produktion, Kooperationen mit Unternehmen oder Lizenzvergaben?	Derzeit nicht
Werden lokale Unternehmen oder Forschungseinrichtungen in die Umsetzung einbezogen?	n.a.
<b>Weitere Verwertungsmöglichkeiten</b>	

Könnten die Innovationen in anderen Branchen oder Anwendungsbereichen eingesetzt werden?	Der Einsatz einer kollagen-basierten ECM ist für diverse Scaffolds oder 3D Drucke möglich und eine Bereicherung für den Markt der regenerativen Medizin.
Ist eine internationale Verwertung denkbar, z. B. durch weltweite Patentanmeldungen oder Kooperationen mit ausländischen Unternehmen?	ja

**Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende z. B. auch funktionale/wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/ -industrien, Umsetzungs- und Transferstrategien.**

<b>Funktionale und wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen</b>	
Wie hebt sich die entwickelte Technologie von bestehenden Lösungen ab?	Bestehende Scaffolds sind nicht mit nativem Kollagen beschichtet oder befüllt. Das in diesem Projekt entwickelte befüllte Scaffolds hebt sich durch die verbesserte Integration des Scaffolds in den Knochen ab.
Bietet sie bessere Leistung, geringere Kosten oder eine höhere Effizienz	Die Einwanderung von Zellen in den Scaffolds wird durch die Kollagenbefüllung effektiv verbessert.
Gibt es Alleinstellungsmerkmale, die einen Marktvorteil schaffen?	Der Einsatz eines nativen murinen Kollagen Typ I ist ein Alleinstellungsmerkmal.
<b>Nutzen für verschiedene Anwendergruppen und Industrien in Deutschland</b>	
Welche Branchen oder Unternehmen profitieren von der neuen Technologie (z. B. Medizintechnik, Biotechnologie, Gesundheitswesen)?	Kollagen-befüllte Scaffolds haben folgende eine Anwendungsmöglichkeit: (1) Herz-Kreislauf-Medizin: Entwicklung von bioresorbierbaren Gefäßprothesen oder Herzklappen; (2) Zahnmedizin & Kieferchirurgie: Verwendung zur Knochenregeneration im Kieferbereich; (3) Regenerative Therapien für Tiere: Anwendung in der Orthopädie bei Tieren.
Wie kann die Innovation die Wettbewerbsfähigkeit deutscher Unternehmen stärken?	Anwendungsmöglichkeit in der regenerativen Medizin
<b>Umsetzungs- und Transferstrategien</b>	
Wie wird die entwickelte Technologie kommerzialisiert (z. B. Lizenzierung, Firmengründungen, Kooperationen mit Industriepartnern)?	Meidrix kann die ECM Komponente für 3D Druck Implantate liefern.
Gibt es Pläne für eine Skalierung oder Weiterentwicklung nach Projektende?	Derzeit noch nicht.
Der <b>Zeithorizont</b> bezieht sich darauf, in welchem Zeitraum wirtschaftliche Erfolge erwartet werden, z. B. kurzfristig (1-2 Jahre nach Projektende) oder langfristig (5-10 Jahre bis zur Marktdurchdringung).	Langfristig kann der 2-PP Druck für verschiedene Implantate genutzt werden.

**Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z. B. für öffentliche Aufgaben, Netzwerke, etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen etc. darzustellen.**

<b>Weiterverwendung der Ergebnisse in der Wissenschaft und Technik</b>	
Wie können die erzielten Forschungsergebnisse für zukünftige wissenschaftliche Arbeiten genutzt werden?	Die erzielten Ergebnisse können für die Erforschung regenerativer Therapien im Bereich Knorpel und Knochen verwendet werden.
Gibt es geplante Folgeprojekte oder Forschungsk Kooperationen	Nein.
Können die Erkenntnisse als Grundlage für neue technologische Entwicklungen oder Produktinnovationen dienen?	Ja. Die Technologie der Befüllung von Scaffolds mit einem biologischen Material, kann aus andere Scaffolds ausgeweitet werden.
<b>Nutzung für öffentliche Aufgaben, Datenbanken und Netzwerke</b>	
Können die gewonnenen Daten in öffentlichen oder wissenschaftlichen Datenbanken hinterlegt werden?	Die gewonnenen Daten können in Form von Publikationen veröffentlicht werden.
<b>Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen und Unternehmen</b>	
Gibt es bestehende oder geplante Kooperationen mit Universitäten, Forschungsinstituten oder Unternehmen?	Noch nicht.
Gibt es Synergien mit anderen Projekten oder Branchen?	Noch nicht.
<b>Zeithorizont der wissenschaftlichen/technischen Umsetzung</b>	
Wann ist mit der praktischen Umsetzung der Ergebnisse zu rechnen (kurzfristig: 1-2 Jahre, mittelfristig: 3-5 Jahre, langfristig: 5+ Jahre)?	Langfristig +5
Welche weiteren Schritte sind nötig, um die Technologie zu validieren, zu standardisieren oder weiterzuentwickeln?	Mehr Tierstudien.

**Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse.**

<b>Wissenschaftliche Anschlussfähigkeit</b>	
Welche offenen Forschungsfragen gibt es nach Projektende?	Offene Forschungsfragen: 1) Das Resorptionsverhalten der befüllten Scaffolds im Tier ist nicht klar; 2) Es ist nicht klar welche Zellen in den Scaffolds einwandern und ob eine Differenzierung stattfindet. Die Klärung dieser Fragen würde die effektive Befüllung von Scaffolds mit zellbesiedeltem Kollagen ermöglichen.
Sind weitere experimentelle oder klinische Studien notwendig	Weitere Tierstudien sind notwendig, um die molekularen Mechanismen der Zellmigration und Differenzierung in den Scaffolds zu untersuchen.
<b>Wirtschaftliche Anschlussfähigkeit</b>	

Wie kann das Projekt wirtschaftlich genutzt werden (z. B. Produktentwicklung, Patente, Unternehmensgründung, Partnerschaften mit Firmen)?	Das Projekt kann zur Entwicklung eines Produktes für die Knorpel und Knochenregeneration im human- und tiermedizinischen Bereich verwendet werden.
Gibt es bereits industrielle Partner oder Investoren für eine Skalierung oder Markteinführung?	Derzeit nicht.
<b>Notwendige nächste Schritte</b>	
Welche innovativen Maßnahmen sind erforderlich, um die Technologie oder das Produkt zur Marktreife zu bringen?	Die Befüllung der Scaffolds mit Kollagen müsste automatisiert werden. Da das Kollagen ein biologisches Material hoher Viskosität ist, ist eine innovative Technologie oder Methodik notwendig, um eine hohe Zahl an Scaffolds bereitzustellen.
Müssen regulatorische Hürden überwunden werden (z. B. Zertifizierungen, klinische Prüfungen)?	Tierexperimentelle Studien sowie klinische Prüfungen sind notwendig.

Angaben zu Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben:

1. Die Untersuchung, Befüllung und Verwendung ACM Scaffolds konnte nur eingeschränkt durchgeführt werden, da der Druck dieser Scaffolds sehr aufwendig und langwierig war. Zuletzt wurde die Herstellung in Auftrag gegeben.
2. Die Untersuchung von befüllte Scaffolds, denen Zytokine und Wachstumsfaktoren zugesetzt werden sollte, konnte aufgrund der sehr geringen Anzahl an ACM Scaffolds nicht umgesetzt werden (**AP 7.4**)

Angaben über die Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung: Die geplanten Ausgaben wurden eingehalten und sogar unterschritten, da nicht alle Arbeitspakete durchgeführt werden konnten. Die Zeitplanung wurde im Rahmen der Verlängerung eingehalten.