



(10) **DE 10 2010 012 252 A1** 2011.09.22

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2010 012 252.1**

(22) Anmeldetag: **22.03.2010**

(43) Offenlegungstag: **22.09.2011**

(51) Int Cl.: **C12N 1/00 (2006.01)**

(71) Anmelder:

**Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der  
angewandten Forschung e.V., 80686, München,  
DE**

(74) Vertreter:

**v. Bezold & Partner, 80799, München, DE**

(72) Erfinder:

**Duschl, Claus, 10115, Berlin, DE; Lankeu,  
Andreas, 14469, Potsdam, DE; Schmidt, Stephan,  
10963, Berlin, DE; Hellweg, Thomas, 33615,  
Bielefeld, DE; Wischerhoff, Erik, 14469, Potsdam,  
DE; Laschewsky, André, 14469, Potsdam, DE;  
Lutz, Jean-Francois, 14467, Potsdam, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

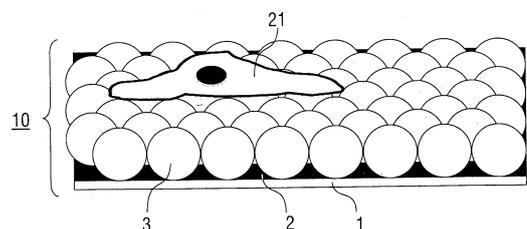
**US 2009/02 47 666 A1**  
**WO 2004/0 11 669 A2**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Thermoresponsives Substrat mit Mikrogelen, Verfahren zu dessen Herstellung und Kultivierungsverfahren für biologische Zellen**

(57) Zusammenfassung: Ein Substrat (10), insbesondere zur Aufnahme biologischer Zellen (21), umfasst einen Substratkörper (1), der eine Trägerfläche (2) aufweist, auf der thermoresponsive Mikrogel (3) fixiert sind. Es werden auch ein Verfahren zur Herstellung des Substrates (10) und ein Verfahren zur Kultivierung biologischer Zellen (21) auf dem Substrat (10) beschrieben.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein thermoresponsives Substrat zur Aufnahme biologischer Zellen, insbesondere ein Substrat, dessen Oberflächeneigenschaften in Abhängigkeit von der Temperatur veränderlich sind. Des Weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines derartigen Substrats, insbesondere ein Verfahren zur Aufbringung von thermoresponsivem Polymermaterial auf einer Substratkörper. Des Weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Kultivierung biologischer Zellen auf einem thermoresponsiven Substrat. Anwendungen der Erfindung sind bei der in-vitro-Kultivierung biologischer Zellen gegeben.

**[0002]** Es ist allgemein bekannt, lebende biologische Zellen auf Substraten außerhalb eines Organismus zu kultivieren (in-vitro-Kultivierung). Ein zur Kultivierung vorgesehenes Substrat (Kultivierungssubstrat) besitzt typischerweise einen festen Substratkörper, z. B. aus Glas oder Kunststoff, dessen Oberfläche (Trägerfläche) funktionalisiert ist. Mit der Funktionalisierung, die z. B. eine Plasmabehandlung, eine Beschichtung mit Proteinen (wie z. B. Fibronectin, Kollagen) oder eine Beschichtung mit Polymeren (wie z. B. Polylysin) umfasst, wird eine Wechselwirkung der Zellen mit der Oberfläche beeinflusst. Es besteht ein Interesse an Kultivierungssubstraten, die eine gezielte Manipulation der biologischen Zellen und insbesondere eine Beeinflussung z. B. der Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung oder Zelltransformation (Bildung von Tumorzellen) ermöglichen. Ein grundsätzliches Problem stellt insbesondere die schonende Ablösung der Zellen von den Oberflächen dar. Dies geschieht in der Regel über eine Enzymbehandlung (Trypsinierung), die zu Zellschädigungen und Zellverlusten führen kann.

**[0003]** Durch Experimente wurde festgestellt, dass Eigenschaften biologischer Zellen durch die Härte der Oberfläche des Kultivierungssubstrats beeinflusst werden können. Beispielsweise führten Härtevariationen, die durch sequenzielle Beschichtungen mit Polyacrylamid und Biomolekülen erzielt wurden, zu verschiedenen Differenzierungen von mesenchymalen Stammzellen (siehe Discher et al. in „Cell“ 126 (2006) 677–689). Des Weiteren ist bekannt, dass die Adhäsion biologischer Zellen von der Härte der Substratoberfläche abhängig ist.

**[0004]** Des Weiteren sind thermoresponsive Polymere bekannt. Ein thermoresponsives Polymer zeichnet sich dadurch aus, dass es eine Schalltemperatur (LCST, "lower critical solution temperature") in wässrigen Medien aufweist. Wässrige Medien sind z. B. reines Wasser, kommerziell erhältliche Pufferlösungen, Zellkulturmedien oder Mischungen von Wasser mit organischen Lösungsmitteln. Unterhalb der Schalltemperatur sind wässrige Lösungen thermore-

sponsiver Polymere einphasig, darüber zweiphasig. Wenn thermoresponsive Polymere an Oberflächen immobilisiert werden, so vollziehen sie in wässrigen Medien bei Überschreiten der Schalltemperatur einen Phasenübergang (Konformationsübergang): sie sind unterhalb der Schalltemperatur stärker hydratisiert als oberhalb.

**[0005]** Es wurde festgestellt, dass die Adhäsion auf Substraten, die mit dem thermoresponsiven (thermosensitiven) Polymer Poly-(N-isopropyl-acrylamid) ("PNIPam") oder Derivaten davon beschichtet sind und die temperaturabhängige Hydratisierung aufweisen, gezielt in Abhängigkeit von der Temperatur beeinflusst werden kann (siehe N. Yamada et al. in „Makromol. Chem.“ 11 (1990) 571; C. Williams et al. in „Adv. Mater.“ 21 (2009) 2161–2164, O. Ernst et al. in „Lab Chip“ 7 (2007) 1322). Diese Eigenschaft wurde auch an Polyethylenglykol (PEG)-basierten Polymeren gezeigt (siehe E. Wischerhoff et al. in „Angew. Chem.“ 47 (2008) 5666).

**[0006]** Herkömmliche Substrate, deren Oberflächen mit thermoresponsiven Polymeren beschichtet sind, können sowohl in Bezug auf die Herstellung der Beschichtung als auch in Bezug auf die Eignung für die Zellkultivierung Nachteile haben. So erfordert die Herstellung eines mit einem thermoresponsiven Polymer beschichteten Substrats mehrere aufwendige Prozessschritte, die mit einem kostspieligen apparativen Aufbau realisiert werden. Des Weiteren besteht nur eine beschränkte Variabilität der Polymerzusammensetzung. Beispielsweise kann das thermische Ansprechverhalten des thermoresponsiven Polymers sich verändern oder verschwinden, wenn dem Polymer eine zweite Polymerkomponente zugesetzt wird. Daher besteht nur eine beschränkte Flexibilität hinsichtlich der Einführung einer weiteren Funktionalisierung eines mit einem thermoresponsiven Polymer beschichteten Substrats.

**[0007]** Zur Herstellung von mit thermoresponsiven Polymeren beschichteten Substraten wurden in der Praxis verschiedene Protokolle zur Funktionalisierung des Substratkörpers entwickelt, wie z. B. Reaktionen mit Silanen, eine Plasmabehandlung oder eine chemische Behandlung. Dabei werden an der Oberfläche des Substratkörpers funktionelle Gruppen, wie z. B.  $-NH_2$ ,  $-COOH$  oder Epoxide bereitgestellt, die komplementär funktionalisierten Molekülen, wie insbesondere den thermoresponsiven Polymeren eine kovalente Anbindung ermöglichen. Dabei hat sich eine beschränkte Reproduzierbarkeit und Steuerbarkeit der Funktionalisierung insbesondere in Bezug auf die Anbindungsichte und Homogenität, sowie die Beschränkung auf spezielle Substratmaterialien und chemische Substanzen und eine Beschränkung auf harte, planare Substratkörper als nachteilig erwiesen. Die Herstellung einer Oberfläche mit definierten Mischungen verschiedener Moleküle ist nur in spezi-

ellen Ausnahmefällen und mit hohem Aufwand möglich.

**[0008]** Für die Kultivierung biologischer Zellen hat sich insbesondere die folgende Eigenschaft thermoresponsiver Polymere als nachteilig erwiesen. Allgemein ist ein thermoresponsives Polymer ein Polymer, das in Abhängigkeit von der Temperatur einen physikalischen Phasenübergang durchläuft, bei dem z. B. eine Umordnung von Polymerketten erfolgt. Während der Phasenübergang in einer flüssigen Lösung in einem Temperaturbereich von wenigen °C scharf definiert ist, zeichnen sich schichtförmig immobilisierte thermoresponsive Polymere durch ein breites Temperaturprofil des Phasenübergangs aus. So wurde gefunden, dass für bestimmte Typen adhärenter Zellen eine Abkühlung von 37°C auf Temperaturen unterhalb von 20°C von bis zu einer Stunde erforderlich sind, um die Adhäsion von der Oberfläche des Substrats zu lösen (siehe „Application Notes“ für die PNIPam-beschichteten UpCell-Kultivierungssubstrate des Herstellers Nunc). Eine derartige Abkühlung über diesen Zeitraum ist jedoch wegen der damit verbundenen möglichen Beeinflussung der Zellfunktion unerwünscht. Des Weiteren wurde in der Praxis festgestellt, dass thermoresponsive Polymerschichten für verschiedene Zelllinien, wie z. B. MCF7-Tumorzellen oder MG63 Osteoblasten-Zellen, unzureichend wirksam sein können.

**[0009]** Herkömmliche Techniken zeichnen sich ferner durch Nachteile bei der Kultivierung mit so genannten Kokulturen aus. Da ein zu kultivierender Zelltyp zum Wachstum oder zur Aufrechterhaltung der Vitalität im adhärenen Zustand Botenstoffe (parakrine Faktoren) von anderen Zellen benötigt, müssen häufig die Kultivierung, das Wachstum oder manipulative oder analytische Prozesse von adhärenen Zellen in der Kokultur gemeinsam durchgeführt werden (z. B. Stammzellen und Feederzellen oder Melanozyten und Keratinozyten). Für die anschließende Trennung der Zellen stehen bisher nur Verfahren zur Verfügung, die auf einer Zelltrennung in flüssigen Zellsuspensionen basieren. Hierzu müssen die Zellen vom Substrat abgelöst und in eine Trennvorrichtung (Durchfluss-Zytometer) überführt werden, was wegen des Zeit- und Präparationsaufwandes und der geringen Ausbeute erhebliche Nachteile hat. Insbesondere für Proben mit Zellzahlen unterhalb von  $10^5$  Zellen ist die herkömmliche Zelltrennung nicht durchführbar, da bei der Bildung der Suspension und der Trennung im Durchfluss-Zytometer übermäßig viele Zellen verloren gehen.

**[0010]** Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes thermoresponsives Substrat zur Aufnahme biologischer Zellen bereitzustellen, mit dem Nachteile der herkömmlichen Technik überwunden werden. Die Aufgabe der Erfindung ist es insbesondere, ein verbessertes thermoresponsives Substrat be-

reitzustellen, das sich durch eine einfache Herstellung, eine hohe Flexibilität bei der Einstellung von Oberflächeneigenschaften, eine erweiterte Funktionalisierungsfähigkeit, eine Eignung für eine erweiterte Zahl von Zelltypen und/oder eine Eignung für eine schonende Zellkultivierung und Adhäsionssteuerung mit geringen Temperaturunterschieden auszeichnet. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung eines thermoresponsiven Substrats, insbesondere zur Aufnahme biologischer Zellen, bereitzustellen, mit dem Nachteile herkömmlicher Verfahren zur Substratherstellung überwunden werden. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Kultivierungsverfahren unter Verwendung eines thermoresponsiven Substrats bereitzustellen, mit dem Nachteile und Beschränkungen herkömmlicher Kultivierungsverfahren überwunden werden.

**[0011]** Diese Aufgaben werden durch ein Substrat und Verfahren mit den Merkmalen der unabhängigen Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

**[0012]** Gemäß einem ersten Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Substrat, insbesondere zur Aufnahme biologischer Zellen, bereitgestellt, das einen Substratkörper mit einer Trägerfläche aufweist. Erfindungsgemäß sind auf der Trägerfläche thermoresponsive Mikrogele angeordnet. Im Unterschied zu herkömmlichen thermoresponsiven Substraten mit isotropen oder homogenen Polymerschichten zeichnet sich das erfindungsgemäße Substrat durch eine Trägerfläche des Substratkörpers aus, an der thermoresponsive Mikrogele (Partikel, die ein thermoresponsives oder thermosensitives Polymer enthalten) freiliegen. Die thermoresponsiven Mikrogele sind an der Trägerfläche fixierte Polymerpartikel, die bei einer vorbestimmten kritischen Temperatur (Schalttemperatur) einen physikalischen Phasenübergang zwischen verschiedenen Hydratisierungszuständen aufweisen.

**[0013]** Gemäß einem zweiten Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Substrats bereitgestellt, bei dem thermoresponsive Mikrogele als Dispersion (Mikrogele-Dispersion,  $\mu$ -Gel-Dispersion) hergestellt werden. Zur Bereitstellung der thermoresponsiven Mikrogele auf der Trägerfläche des Substratkörpers wird die Dispersion auf die Trägerfläche aufgetragen, wobei thermoresponsive Mikrogele, welche die Trägerfläche berühren, mit dieser verbunden werden, während überschüssige Mikrogele von der Trägerfläche getrennt, z. B. abgewaschen werden.

**[0014]** Gemäß einem dritten Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Verfahren zur Kultivierung biologischer Zellen auf dem erfindungsgemäßen Sub-

strat bereitgestellt, bei dem die biologischen Zellen auf dem Substrat in Kontakt mit den freiliegenden thermoresponsiven Mikrogele angeordnet werden. Erfindungsgemäß werden Kultivierungsbedingungen für die Zellen auf dem Substrat derart eingestellt, dass die Zellen einer zerstörungsfreien Ablösung (Abtrennung vom Substrat), einem Wachstum, einer Differenzierung und/oder einer Zellwanderung unterzogen werden.

**[0015]** Die erfindungsgemäße Bereitstellung eines Kultivierungssubstrats mit thermoresponsiven Mikrogele hat eine Reihe von Vorteilen in Bezug auf die Einstellung physikalischer und/oder chemischer Oberflächeneigenschaften, die gezielte Veränderung von Oberflächeneigenschaften, die Herstellung des Substrats und die Schaffung neuer Anwendungen oder Funktionen von Kultivierungssubstraten. Die Erfinder haben festgestellt, dass der Phasenübergang der thermoresponsiven Mikrogele in einem engen Temperaturbereich erfolgt, welcher mit dem schmalen Temperaturprofil des Phasenübergangs gelöster thermoresponsiver Polymere vergleichbar ist. Breite Temperaturprofile über Intervalle von 20°C bis 30°C, wie sie bei herkömmlichen, isotropen Polymerschichten auftreten, werden erfindungsgemäß vermieden.

**[0016]** Die Erfinder haben festgestellt, dass sich der Phasenübergang durch eine Änderung eines Festigkeitsparameters des thermoresponsiven Polymers (z. B. Härte, plastische oder elastische Deformierbarkeit, insbesondere Young'scher Elastizitätsmodul) auszeichnet. Mit dem Festigkeitsparameter ändert sich die Adhäsion von Zellen unter- und oberhalb einer kritischen Temperatur des Phasenübergangs (Schalttemperatur des Polymers).

**[0017]** Gleichzeitig ändert sich der Wassergehalt des thermoresponsiven Polymers. Im Ergebnis wird die Adhäsion der Zellen beeinflusst. Die Einstellung der Adhäsion ist vorteilhafterweise mit größerer Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit möglich als bei herkömmlichen Polymerschichten. Die Erfinder haben festgestellt, dass mit dem Phasenübergang der immobilisierten Mikrogele eine wesentlich erhöhte Anzahl von Oberflächenwechselwirkungen angeboten oder unterbrochen und damit die Zuverlässigkeit einer temperaturgesteuerten Freigabe von Zellen verbessert wird.

**[0018]** In Bezug auf die gezielte Veränderung von Oberflächeneigenschaften hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, dass erfindungsgemäße Substrate einer Funktionalisierung für die biologischen Zellen unterzogen werden können, ohne dass die thermoresponsiven Mikrogele ihr Ansprechverhalten verlieren. Vorteile für die Herstellung des erfindungsgemäßen Substrats ergeben sich aus der Stabilität der Partikeldispersion über Wochen oder Monate und der unmittelbaren Gebrauchsfähigkeit des Substrats

nach der Beschichtung der Trägerfläche mit den Mikrogele. Die Funktionalisierung thermoresponsiver Substrate liefert neue Anwendungen, z. B. für eine passive Steuerung einer Zellwanderung auf der Substratoberfläche oder eine gezielte Ablösung von Zellen in vorbestimmten Substratbereichen.

**[0019]** Das erfindungsgemäße Substrat ist ein Kultivierungssubstrat für biologische Zellen. Das Substrat ist zur Aufnahme biologischer Zellen und zur Bereitstellung von physiologischen Kultivierungsbedingungen konfiguriert. Das Substrat ist insbesondere zur Aufnahme der Zellen in einem flüssigen Kultivierungsmedium eingerichtet, d. h. die Trägerfläche ist geeignet, das Kultivierungsmedium aufzunehmen. Der Substratkörper kann aus einem festen Material hergestellt sein, das starr oder nachgiebig (biegsam) ist. Das Material des Substratkörpers ist vorzugsweise temperaturstabil und insbesondere nicht thermoresponsiv. Die Trägerfläche ist vorzugsweise eine ebene Fläche, kann jedoch alternativ gekrümmt gebildet sein.

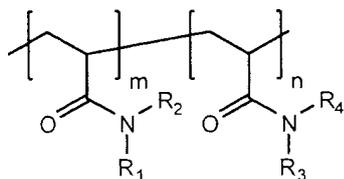
**[0020]** Die thermoresponsiven Mikrogele enthalten ein Polymer, das den Phasenübergang in einem physiologischen Temperaturbereich aufweist. Der Phasenübergang, der insbesondere ein Volumenphasenübergang ist, erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur unterhalb von 40°C, insbesondere unterhalb von 37°C, z. B. unterhalb von 35°C. Bevorzugt erfolgt der Phasenübergang bei einer Temperatur oberhalb von 10°C, insbesondere oberhalb von 20°C, z. B. oberhalb von 32°C. Das Temperaturintervall, in dem der Phasenübergang erfolgt, ist vorzugsweise schmaler als 15°C, insbesondere schmaler als 10°C, wie z. B. 5°C oder weniger.

**[0021]** Die thermoresponsiven Mikrogele sind vorzugsweise aus mindestens einem ungeladenen und nichtionisierbaren Polymer hergestellt. Besonders bevorzugt bestehen die Mikrogele zumindest an ihrer Oberfläche aus dem mindestens einen ungeladenen und nichtionisierbaren Polymer. Vorteilhafterweise werden damit unerwünschte Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche minimiert.

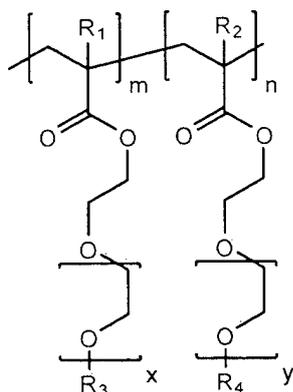
**[0022]** Gemäß bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sind die thermoresponsiven Mikrogele aus mindestens einem der Polymere der folgenden Polymere oder Polymergruppen gebildet:

- (1) Poly-(N-isopropylacrylamid),
- (2)  $-X-(\text{-CH}_2\text{-CR}_1\text{COO-R}_2\text{-})_n\text{-}(\text{-CH}_2\text{-CR}_1\text{COO-R}_3\text{-})_m\text{-R}_4$  oder ein Copolymere davon,
- (3)  $-X\text{-}[(\text{-CH}_2\text{-CR}_1\text{COO-R}_2\text{-})_n\text{-}(\text{-CH}_2\text{-CR}_1\text{COO-R}_3\text{-})_m\text{-R}_4]_2$  oder ein Copolymere davon, wobei X eine Kopplungsgruppe zur Trägerfläche,  $R_1 = \text{H}$  oder  $\text{CH}_3$ ,  $R_2/R_3 =$  aliphatische Kohlenwasserstoffketten mit mindestens einer Ethergruppe, vorzugsweise mit 1 bis 20 Ethergruppen (bevorzugt Polyethylenoxid), und  $R_4 \text{-H}$ , eine aliphatische

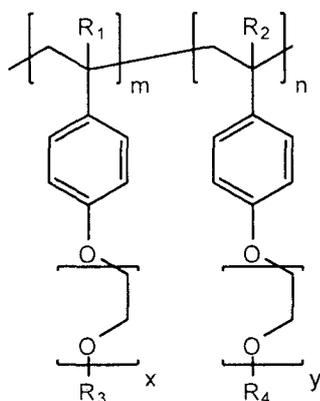
sche Kohlenwasserstoffkette oder eine funktionelle Gruppe ist, wie z. B. -Halogen,  $-N_3$ , -thiocarbonyl, -(di)thiocarbonyl  
(4)



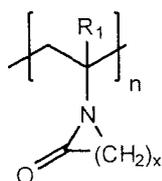
mit  $R_1, R_2, R_3$  und  $R_4 = H$  oder Alkyl, bevorzugt  $R_1 =$  Isopropyl,  $R_2 = H$ ,  $n = 0$ ,  
(5)



mit  $R_1, R_2 = H$  oder  $CH_3$ ,  $R_3, R_4 = H$  oder Alkyl,  $x, y = 0$  bis 20,  
(6)



mit  $R_1, R_2 = H$  oder  $CH_3$ ,  $R_3, R_4 = H$  oder Alkyl,  $x, y = 2$  bis 20, und  
(7)



mit  $R_1 = H$  oder  $CH_3$ ,  $x = 3$  bis 5, Copolymere mit  $x = 3$  und  $X > 3$ .

**[0023]** Bei den Polymeren gemäß (4) bis (7) beinhaltet mindestens eine terminale Einheit der Polymerhauptkette vorzugsweise eine Kopplungsgruppe zur Trägerfläche.

**[0024]** Die Trägerfläche kann die unmittelbare Oberfläche des Substratkörpers, z. B. aus Glas, Silizium oder Kunststoffen, wie Polystyrol, COP (Cyclo-Olefin Polymer), Polykarbonat, sein oder durch einen Metallfilm, z. B. aus Gold, Silber, Platin, Titan oder Chrom, auf dieser gebildet werden. In Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung der Trägerfläche kann X eine funktionelle Gruppe sein, wie z. B.  $-SS-$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$ ,  $-NH_2$  (SS ist eine beidseits symmetrisch substituierte Disulfidgruppe). Vorzugsweise ist  $n + m > 10$ .

**[0025]** Diese Polymere haben sich in Bezug auf die Biokompatibilität und die Flexibilität bei der Einstellung physikalischer oder chemischer Oberflächeneigenschaften als besonders vorteilhaft erwiesen.

**[0026]** Die Mikrogele auf der Trägerfläche können sämtlich identisch aus einem einzigen Polymer gebildet sein. Wenn gemäß einer alternativen Variante die Mikrogele aus mindestens zwei verschiedenen Polymeren gebildet sind, können sich Vorteile bei der Einstellung der Oberflächeneigenschaften ergeben. Des Weiteren können in diesem Fall Mikrogele mit verschiedenen Zusammensetzungen auf der Trägerfläche angeordnet sein. Mikrogele mit verschiedenen Zusammensetzungen können z. B. nach Teilbereichen getrennt vorgesehen sein, um auf der Trägerfläche verschiedene Kultivierungsbedingungen bereitzustellen. Alternativ können die Mikrogele mit den verschiedenen Zusammensetzungen miteinander vermischt auf der Trägerfläche verteilt angeordnet sein. Alternativ oder zusätzlich können die Mikrogele verschiedene Durchmesser aufweisen. Beispielsweise können thermoresponsive Mikrogele mit verschiedenen Durchmessern getrennt in verschiedenen Teilbereichen der Trägerfläche fixiert oder miteinander vermischt über die Trägerfläche verteilt angeordnet sein.

**[0027]** Vorteilhafterweise können Mikrogele mit einem vorbestimmten Durchmesser der dispergierten, kolloidalen Teilchen hergestellt werden (siehe M. Andersson, S. L. Maunu, in „J. Poly. Sci.“ B 44 (2006) 3305; X. Wu et al. in „Coll. Poly. Sci.“ 272 (1994) 467). Dies ermöglicht, die Größe, oder, falls Partikel mit verschiedenen Durchmessern angeordnet werden, die verschiedenen Größen der thermoresponsiven Mikrogele gezielt einzustellen. Gemäß bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung haben die thermoresponsiven Mikrogele einen Durchmesser von mindestens 10 nm, insbesondere mindestens 20 nm, besonders bevorzugt mindestens 50 nm, wie z. B. mindestens 100 nm. Die Obergrenze des Partikeldurchmessers beträgt vorzugsweise 50  $\mu m$ . Besonders be-

vorzugt ist der Durchmesser der thermoresponsiven Mikrogele kleiner oder gleich 30  $\mu\text{m}$ , insbesondere kleiner oder gleich 20  $\mu\text{m}$ , wie z. B. 10  $\mu\text{m}$  oder kleiner, z. B. kleiner als 1  $\mu\text{m}$ .

**[0028]** Gemäß einer weiteren Variante können die thermoresponsiven Mikrogele eine Kern-Schale-Struktur aufweisen, wobei ein Kern entweder aus einem nicht-thermoresponsiven Material, insbesondere einem festen Trägerpartikel oder aus einem vernetzten thermoresponsiven Material bestehen kann. Vorzugsweise besteht ausschließlich die Schale aus dem thermoresponsiven Polymermaterial. Die Verwendung des festen Trägerpartikels, der z. B. aus anorganischem Glas, Metall, Keramik oder Kunststoff, insbesondere Polymethylmethacrylat oder Polystyrol, gebildet sein kann, kann Vorteile in Bezug auf die Bereitstellung einer bestimmten Mindesthärte der Oberfläche des erfindungsgemäßen Substrats haben. Vorzugsweise wird der Zusammenhalt der Kerne der thermoresponsiven Mikrogele durch Nebervalenzwechselwirkungen (nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen Molekülen wie van der Waals-Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkung) oder durch chemische Vernetzung bewirkt.

**[0029]** Weiterhin bieten Kern-Schale-Partikel die Möglichkeit, unvernetzte oder schwach vernetzte Polymerketten in ein Mikrogele zu integrieren, ohne den mechanischen Zusammenhalt des Partikels zu beeinträchtigen. Unvernetzte oder schwach vernetzte Mikrogele bieten den Vorteil, dass die thermoresponsiven Ketten sehr beweglich bleiben und so die Konformationsänderung beim Phasenübergang besser zum Tragen kommen kann. Sofern schwach vernetzte Partikel zum Einsatz kommen, soll die Vernetzungsdichte nicht mehr als 1 pro 20 Wiederholungseinheiten betragen und bevorzugt zwischen 1 pro 100 und 1 pro 500 Wiederholungseinheiten liegen. Um einen ausgeprägten thermoresponsiven Effekt zu erreichen, soll die Dicke der Schale mindestens 10 nm und höchstens 400 nm, bevorzugt zwischen 30 und 100 nm betragen. Generelle Beispiele für die Herstellung von Kern-Schale-Partikeln finden sich zum Beispiel Schuller in „Kolloid Z. Z. Polym.“ 211, 113–121 (1966), Fulda et al. in „Progr. Colloid Polym. Sci.“ 101, 178–183 (1996), oder Gao et al. in „Macromolecules“ 39, 3154–3160 (2006).

**[0030]** Vorzugsweise ist die Dicke der Schicht aus thermoresponsiven Mikrogelen auf der Trägerfläche kleiner oder gleich dem Durchmesser der Mikrogele. Die Mikrogele bilden vorzugsweise eine Monolage. Es kann insbesondere eine geschlossene Monolage, d. h. eine geschlossene Bedeckung der Trägerfläche mit den Mikrogelen, oder eine Sub-Monolage mit Lücken zwischen den Mikrogelen vorgesehen sein. Da die fixierten Mikrogelen eine abgeflachte Gestalt haben können, kann die Dicke der Schicht aus ther-

mo-responsiven Mikrogelen kleiner als der Partikeldurchmesser sein. Mikrogele-Monolagen haben gegenüber Mehrfachlagen den Vorteil, dass die Adhäsion der biologischen Zellen mit größerer Zuverlässigkeit steuerbar ist.

**[0031]** Alternativ kann eine Schicht mehrere Lagen der thermoresponsiven Mikrogele enthalten. In diesem Fall können sich Vorteile durch eine größere Robustheit gegenüber Defekten bieten.

**[0032]** Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Trägerfläche mit einem Haftvermittler ausgestattet sein. Als Haftvermittler kann jede Substanz verwendet werden, die zur Immobilisierung der Mikrogele geeignet und biokompatibel ist. Der Haftvermittler kann z. B. eine kovalente Bindung mit der Trägerfläche und dem thermoresponsiven Polymer bilden. Des Weiteren können zur Immobilisierung der Polymere spezifische biologische Rezeptor-Ligand-Bindungen, wie z. B. die Bindung von Streptavidin und Biotin verwendet werden. Schließlich kann der Haftvermittler für eine Kopplung des Polymers durch eine unspezifische Wechselwirkung, wie z. B. eine Ladungs-Wechselwirkung, eine hydrophobe Wechselwirkung oder eine van-der-Waals-Wechselwirkung, ausgelegt sein. Mit diesen Wechselwirkungen wird das thermoresponsive Polymer auf der Trägerfläche temperaturunabhängig fest verankert. Die Verankerung der Partikel auf der Trägerfläche bleibt unabhängig vom Phasenübergang des thermoresponsiven Polymers bestehen.

**[0033]** Gemäß einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Substrat mit mindestens einer Modulatorsubstanz ausgestattet. Die mindestens eine Modulatorsubstanz ist auf der freiliegenden Oberfläche des Substrats, d. h. zwischen den thermoresponsiven Mikrogelen und/oder diese zumindest teilweise überdeckend angeordnet. Die Bereitstellung der mindestens einen Modulatorsubstanz ermöglicht vorteilhafterweise eine Funktionalisierung des Substrats. Somit stellt diese Ausführungsform der Erfindung einen wesentlichen Fortschritt gegenüber herkömmlichen Kultivierungssubstraten mit thermoresponsiven Polymeren dar, die für eine solche Funktionalisierung ungeeignet waren. Hierzu im Gegensatz ermöglicht die mindestens eine Modulatorsubstanz eine Beeinflussung der Kultivierungsbedingungen auf dem Substrat, ohne dass das Temperaturverhalten der Mikrogele beeinträchtigt wird.

**[0034]** Vorteilhafterweise können verschiedene Typen von Modulatorsubstanzen einzeln oder in Kombination vorgesehen sein. Beispielsweise können Modulatorsubstanzen vorgesehen, welche die Adhäsionsfähigkeit der biologischen Zellen steigern (adhäsionssteigernde Modulatorsubstanzen, zellanziehende Moleküle).

**[0035]** Hierzu ist mindestens eine der folgenden Substanzen vorgesehen:

- Biomoleküle, wie z. B. Fibronectin, Kollagen, Laminin,
- adhäsionsvermittelnde Peptide, wie z. B. Peptide, welche die Aminosäurefolge RGD enthalten,
- synthetische Polymere, wie z. B. Poly-L-Lysin, Polystyrolsulfonat, Polyallylamin, Polyethylenimin.

**[0036]** Alternativ können Modulatorsubstanzen vorgesehen sein, welche die Adhäsionsfähigkeit der biologischen Zellen vermindern (adhäsionsmindernde Modulatorsubstanzen, zellabstoßende Molekülen). In diesem Fall wird mindestens eine der folgenden Substanzen als Modulatorsubstanz verwendet:

- Proteine, wie z. B. Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA),
- adhäsionsmindernde Peptide, wie z. B. Peptide mit hohem Anteil an Leucin und Isoleucin,
- synthetische Polymere, wie z. B. Polymere, die Ketten aus Polyethylenglycol ("PEG") enthalten, und
- Lipide.

**[0037]** Es können des Weiteren adhäsionssteigernde und adhäsionsmindernde Modulatorsubstanzen auf einem Substrat kombiniert vorgesehen sein. Beispielsweise können die Modulatorsubstanzen mit verschiedenen Wirkungen in verschiedenen Teilbereichen der Trägerfläche getrennt oder miteinander vermischt über die Trägerfläche verteilt angeordnet sein. Im letzteren Fall kann durch das Mischungsverhältnis von adhäsionssteigernden und adhäsionsmindernden Modulatorsubstanzen eine effektive Adhäsionsfähigkeit in der Oberfläche des Substrats eingestellt werden, wobei durch die gleichzeitige Bereitstellung der thermoresponsiven Mikrogele die temperaturabhängige Fixierung oder Ablösung von Zellen erhalten bleibt.

**[0038]** Gemäß einer weiteren Variante der Erfindung kann alternativ oder zusätzlich eine Modulatorsubstanz vorgesehen sein, die geeignet ist, in den biologischen Zellen zelluläre Reaktionen zu induzieren. Beispielsweise kann vorgesehen sein, dass eine Modulatorsubstanz an Oberflächenrezeptoren der Zellen anbindet, um die Reaktionen auszulösen. Für diese Funktion sind Substanzen, wie z. B. Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibronectin, Antikörper gegen Rezeptoren (EGFR), die Wachstumsfaktoren binden, oder Antikörper z. B. gegen CD 28 und CD 3 von T-Zellen (Aktivierung der Immunantwort) besonders bevorzugt vorgesehen.

**[0039]** Ein weiterer Vorteil der Erfindung ergibt sich aus der Flexibilität der Bereitstellung der mindestens einen Modulatorsubstanz. Gemäß einer ersten Variante sind Modulatorpartikel vorgesehen, die aus der mindestens einen Modulatorsubstanz bestehen oder

mit dieser beschichtet sind und zwischen den thermoresponsiven Mikrogele auf der Trägerfläche angeordnet sind. Vorteilhafterweise können die Modulatorpartikel dem Mikrogel zugesetzt und mit diesem auf die Trägerfläche aufgetragen werden. Alternativ oder zusätzlich kann die mindestens eine Modulatorsubstanz als Substanzschicht auf der Trägerfläche gebildet sein, auf der die thermoresponsiven Partikel angeordnet sein können.

**[0040]** Vorteilhafterweise kann gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung eine räumliche Modulation der Oberflächeneigenschaften des Substrats auf der Trägerfläche vorgesehen sein. Die Trägerfläche weist in mindestens zwei Teilbereichen verschiedene Oberflächeneigenschaften auf. Vorteilhafterweise können die Teilbereiche dadurch gebildet werden, dass mindestens eines von den thermoresponsiven Mikrogele, dem Haftvermittler und der mindestens einen Modulatorsubstanz auf der Trägerfläche mit mindestens einem räumlichen Dichtegradienten angeordnet wird. Mindestens eine der genannten Komponenten der Oberfläche des Substrats ist mit einer räumlichen Dichte vorgesehen, die in mindestens einer Richtung entlang der Trägerfläche veränderlich ist. Der Dichtegradient kann stufenweise oder kontinuierlich gebildet sein. Die Bereitstellung des mindestens einen Dichtegradienten ermöglicht vorteilhafterweise, dass die Zellen entlang der Trägerfläche verschiedene Adhäsionsfähigkeiten, verschiedene Temperaturreaktionen, verschiedene zelluläre Reaktionen, wie z. B. verschiedene Differenzierungen, und/oder verschiedene Zellwanderungen zeigen.

**[0041]** Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung kann auf der Trägerfläche mindestens eine Kultivierungskavität vorgesehen sein. Die Kultivierungskavität ist ein über die Trägerfläche hinausragender Vorsprung, der die Trägerfläche partiell überdeckend gebildet ist. Die Kultivierungskavität umfasst z. B. die Gestalt eines einseitig offenen Hohlraums oder einer Tasche, und sie ist zur Aufnahme von mindestens einer biologischen Zelle eingerichtet. Mit der Kultivierungskavität werden räumliche Kultivierungsbedingungen nachgebildet, die bei der Kultivierung im Zellverband gegeben sind.

**[0042]** Vorteilhafterweise kann der mindestens eine Dichtegradient zur Funktionalisierung der Oberfläche des Substrats so gebildet sein, dass Zellen zu der Kultivierungskavität wandern, um dort einer weiteren Kultivierung und/oder Differenzierung unterzogen zu werden.

**[0043]** Das erfindungsgemäße Substrat ist für die Kultivierung biologischer Zellen ausgelegt. Hierzu ist der Substratkörper vorzugsweise ein Teil einer Kultivierungseinrichtung, wie z. B. eines Kultivierungsge-

fäßes oder einer Fluidikeinrichtung, in der Zellen kultivierbar sind, wie z. B. eines fluidischen Mikrosystems. Der Substratkörper kann mit der Kultivierungseinrichtung fest verbunden sein, z. B. den Boden des Kultivierungsgefäßes bilden, oder von der Kultivierungseinrichtung lösbar sein, z. B. ein in ein Kultivierungsgefäß einlegbares Teil darstellen.

**[0044]** Das erfindungsgemäße Verfahren zur Kultivierung biologischer Zellen kann mit einem oder mehreren der folgenden Verfahrensschritte ausgeführt werden. So kann eine Einstellung der Adhäsion der biologischen Zellen auf dem Substrat vorgesehen sein, indem die Temperatur des Substrats eingestellt wird. Die Temperatureinstellung kann global für das gesamte Substrat oder lokal für mindestens einen Teilbereich vorgesehen sein. Mit der Temperatureinstellung wird ein Festigkeitsparameter der Substratoberfläche beeinflusst. Des Weiteren kann eine Einstellung einer zelltypspezifischen Migration von mindestens einem Typ der biologischer Zellen vorgesehen sein, indem mindestens ein Zelltyp, z. B. mindestens ein Differenzierungstyp, entlang eines Dichtegradienten einer Modulatorsubstanz zur Migration angeregt wird. Des Weiteren kann eine Einstellung der Migration von mindestens einem Zelltyp mittels des Dichtegradienten der Modulatorsubstanz derart vorgesehen sein, dass die biologischen Zellen in eine Kultivierungskavität wandern.

**[0045]** Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen erläutert. Es. zeigen:

**[0046]** **Fig. 1:** eine schematische Perspektivansicht einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Substrats;

**[0047]** **Fig. 2:** schematische Illustrationen des Phasenübergangs von thermoresponsiven Mikrogelelen;

**[0048]** **Fig. 3:** experimentelle Ergebnisse, die den Phasenübergang von thermoresponsiven Mikrogelelen zeigen;

**[0049]** **Fig. 4:** eine schematische Illustration eines thermoresponsiven Mikrogeles mit Kern-Schale-Struktur;

**[0050]** **Fig. 5 bis Fig. 8:** weitere Ausführungsformen erfindungsgemäßer Substrate;

**[0051]** **Fig. 9:** eine schematische Illustration einer Kultivierungseinrichtung, die mit dem erfindungsgemäßen Substrat ausgestattet ist;

**[0052]** **Fig. 10 bis Fig. 13:** schematische Illustrationen weiterer Ausführungsformen erfindungsgemäßer Substrate, die mit mindestens einer Modulatorsubstanz ausgestattet sind;

**[0053]** **Fig. 14 bis Fig. 17:** schematische Illustrationen weiterer Ausführungsformen erfindungsgemäßer Substrate mit Dichtegradienten von Oberflächenkomponenten; und

**[0054]** **Fig. 18:** eine schematische Illustration eines erfindungsgemäßen Substrats mit einer Kultivierungskavität.

**[0055]** Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die Bereitstellung von thermoresponsiven Mikrogelelen auf der Trägerfläche eines Kultivierungssubstrats und dessen optional vorgesehene Funktionalisierung beschrieben. Einzelheiten von Kultivierungsverfahren, insbesondere von Verfahren zur Handhabung biologischer Zellen und deren gezielte Beeinflussung, werden nicht beschrieben, da diese an sich aus dem Stand der Technik bekannt sind. Des Weiteren wird betont, dass die beigefügten Zeichnungen schematische, vergrößerte Illustrationen von Ausschnitten des erfindungsgemäßen Kultivierungssubstrats darstellen. Die Umsetzung der Erfindung in der Praxis ist nicht auf die Illustrationen beschränkt, sondern mit abgewandelten Formen, Größen und Zusammensetzungen des Substrats möglich.

**[0056]** **Fig. 1** zeigt in schematischer Perspektivansicht eine erste Ausführungsform des erfindungsgemäßen Substrats **10** mit dem Substratkörper **1**, auf dessen Oberseite (Trägerfläche **2**) die thermoresponsiven Mikrogele **3** angeordnet sind. Der Substratkörper **1** besteht z. B. aus Metallen, wie Gold, Titan, Platin, Glas, Siliziumwafer oder Kunststoff, wie Polystyrol, COP, Polykarbonat, dessen Oberfläche die Trägerfläche **2** bildet. Die thermoresponsiven Mikrogele **3** sind aus den kolloidalen Bestandteilen eines thermoresponsiven Polymers gebildet. Abweichend von der schematisch illustrierten Kugelform können die thermoresponsiven Mikrogele **3** in der Praxis z. B. eine Halbkugelform oder eine in Abhängigkeit von den Beschichtungsbedingungen unregelmäßig deformierte Gestalt aufweisen.

**[0057]** Die thermoresponsiven Mikrogele **3**, die z. B. aus PNIPam hergestellt sind, zeigen den in den **Fig. 2A bis Fig. 2C** schematisch illustrierten Phasenübergang. Die thermoresponsiven Mikrogele **3** umfassen einen vernetzten Kern **3.1**, von dem radial nach außen abgehend Polymerketten **3.2** gebildet sind. Oberhalb einer kritischen Temperatur ("Lower Critical Solution Temperature", LCST, Schalttemperatur), die für Kultivierungsanwendungen typischerweise wenige °C, z. B. 2°C bis 10°C unterhalb von 37°C gewählt ist, liegen die Polymerketten **3.2** in einem kollabierten Zustand vor (**Fig. 2A**). Bei Abkühlung um eine vorbestimmte Temperaturdifferenz  $\Delta T$  und Unterschreitung der kritischen Temperatur gehen die Polymerketten **3.2** in einen nicht-kollabierten (gequollenen) Zustand über (**Fig. 2B**). Die Grö-

ße der thermoresponsiven Mikrogele wird mit einem hydrodynamischen Radius beschrieben, der im kollabierten Zustand (R1) geringer als im nicht-kollabierten Zustand (R2) ist. Im nicht-kollabierten Zustand, d. h. unterhalb der kritischen Temperatur können zwischen den Polymerketten **3.2** Kettenbrücken **3.3** bestehen bleiben (Fig. 2C), was sich auf die mechanischen Deformationseigenschaften und damit auf die Adhäsionseigenschaften des Substrats **10** für biologische Zellen auswirkt.

**[0058]** In einem praktischen Beispiel ist der Radius R1 der kollabierten Partikel z. B. im Bereich von 2 nm bis 5 µm gewählt. Entsprechend kann ein Radius R2 im nicht-kollabierten Zustand z. B. im Bereich von 4 nm bis 10 µm erreicht werden (z. B. 200 nm bis 420 nm oder 300 nm bis 480 nm, siehe Wu et al. in „Coll. Poly. Sci.“ 272 (1994) 467; z. B. 92 nm bis 200 nm, von 42 nm bis 97 nm, von 29 nm bis 65 nm und von 19 nm bis 35 nm, siehe M. Andersson et al. in „J. Poly. Sci. B 44 (2006) 3305).

**[0059]** Um die thermoresponsiven Mikrogele **3** auf der Trägerfläche **2** zu immobilisieren, wird zunächst eine Mikrogel-Dispersion hergestellt, welche die Mikrogel-Partikel als kolloidale Teilchen enthält. Der Radius R1 wird durch die Reaktionsbedingungen bei der Herstellung des Mikrogels eingestellt. Die Mikrogel-Dispersion kann stabil gelagert werden.

**[0060]** Bei der Herstellung der Mikrogel-Dispersion werden vorzugsweise die folgenden Parameter der Partikel eingestellt:

- Polymerkettenlänge,
- Vernetzungsdichte (z. B. Bildung von Kettenbrücken),
- Partikelradius R1 im kollabierten Zustand,
- Partikelradius R2 im nicht-kollabierten Zustand,
- Elastizitätsmodul im kollabierten Zustand,
- Elastizitätsmodul im nicht-kollabierten Zustand, und
- (optional) radialer Gradient der Steifigkeit von innen nach außen.

**[0061]** Die Mikrogel-Parameter werden in Abhängigkeit von der Anwendung des Substrats **10** gewählt. Obwohl mit den genannten Eigenschaften ein komplexer Parameterraum aufgespannt wird, ist die Auswahl der konkret zu verwendenden Parameter in Abhängigkeit von den zu kultivierenden Zellen und den zu realisierenden Kultivierungsbedingungen (geometrisch, physikalisch und chemisch) z. B. durch einfache Tests oder durch Verwendung von Tabellenwerten möglich. Die Erfinder haben festgestellt, dass zwischen der Adhäsion biologischer Zellen auf den thermoresponsiven Mikrogelen **3** und deren elastischen Eigenschaften eine starke Korrelation besteht, so dass durch die Auswahl insbesondere von elastischen Eigenschaften des Mikrogels eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen möglich ist. So wurde

z. B. festgestellt, dass bei einer Änderung des E-Moduls der Mikrogele von 600 kPa (oberhalb der LCST) auf 100 kPa (unterhalb der LCST) (siehe Fig. 3C) sehr gute Adhäsions- bzw. Zellablöseigenschaften bestehen.

**[0062]** Zur Herstellung des Substrats **10** wird das Mikrogel auf die Trägerfläche **2** aufgebracht. Es wird eine an sich bekannte Depositionstechnik, wie z. B. Spin-Coating, Eintauchen, Aufsprühen, Stempeln oder Dispensieren, z. B. mit Nadeln oder Dispenserdüsen, verwendet. Die thermoresponsiven Mikrogele **3**, die mit der Trägerfläche **2** in Kontakt kommen, bilden mit dieser z. B. eine kovalente Bindung. Anschließend wird die beschichtete Trägerfläche **2** gewaschen, z. B. mit Wasser, um die überschüssigen, nicht-gebundenen Teilchen abzutrennen. Die an der Trägerfläche **2** fixierten thermoresponsiven Mikrogele **3** können, wie in Fig. 1 schematisch gezeigt, eine regelmäßige, dichte Packung oder alternativ eine unregelmäßige Packung mit Lücken bilden.

**[0063]** Anschließend kann ein Trocknen der mit den Mikrogelen **3** versehenen Trägerfläche **2** vorgesehen sein. Die Trocknung ist jedoch nicht zwingend vorgesehen. Alternativ kann unmittelbar nach dem Abwaschen eine zusätzliche Funktionalisierung oder die Kultivierung biologischer Zellen vorgesehen sein. Des Weiteren kann eine Sterilisierung der freiliegenden Oberfläche der thermoresponsiven Partikel, z. B. durch ionisierende Strahlung (Gammastrahlung) oder Begasung (z. B. mit Ethylenoxid) vorgesehen sein.

**[0064]** Wie in Fig. 1 schematisch illustriert, ist mindestens eine biologische Zelle **21** auf der Oberfläche mit thermoresponsiven Mikrogelen **3** im kollabierten Zustand adhären angeordnet. Durch eine Temperaturabsenkung kann der Phasenübergang der thermoresponsiven Mikrogele **3** in den nicht-kollabierten Zustand induziert werden, in dem die Härte der Oberfläche mit den thermoresponsiven Mikrogelen **3** im Vergleich zum kollabierten Zustand vermindert ist. Auf der Oberfläche mit der verminderten Härte hat die mindestens eine biologische Zelle **21** eine verminderte Adhäsionsfähigkeit, so dass sie durch das flüssige Kultivierungsmedium über dem Substrat (in Fig. 1 nicht gezeigt) abgelöst, z. B. abgespült werden kann.

**[0065]** Experimentelle Ergebnisse, die den Phasenübergang von thermoresponsiven Mikrogelen **3** zeigen, sind beispielhaft in Fig. 3 gezeigt. Fig. 3A illustriert die mit einem Atomkraftmikroskop gemessene Topographie einzelner Mikrogele **3** (PNIPam) für verschiedene Temperaturen. Quellkurven der Mikrogele **3** im adsorbierten Zustand sind in Fig. 3B gezeigt. Die kleine Graphik in Fig. 3B zeigt mittlere Höhenprofile im Apex der Mikrogele **3** (Höhe H in Abhängigkeit von Durchmesserkoordinate, jeweils in µm). Schließlich illustriert Fig. 3C die Temperaturabhän-

gigkeit des Young'schen Elastizitäts-Moduls der Mikrogele, die aus Messungen mit dem Atomkraftmikroskop abgeleitet wurden. Während bei 37°C das Elastizitäts-Modul größer als 300 kPa, verringert sich das Elastizitäts-Modul bei 25°C auf Werte unterhalb von 100 kPa. Gleichzeitig haben die Partikel bei der höheren Temperatur einen geringen Wassergehalt von rund 65%, während bei 25°C der Wassergehalt der Mikrogele rund 90% ist.

**[0066]** Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass das thermische Ansprechverhalten der Mikrogele **3**, insbesondere das scharfe Temperaturprofil des Phasenübergangs, im adsorbierten Zustand mit dem flüssigen Zustand vergleichbar ist. Experimentelle Tests mit Maus-Fibroblasten haben ergeben, dass die Adhäsion der Fibroblasten auf der Oberfläche in dem Temperaturbereich, in dem der Phasenübergang mit der Änderung des Young-Moduls gemessen wurde, von einem adhärenen Zustand bei Temperaturen oberhalb des Phasenübergangs in einen nicht-adhärenen Zustand bei Temperaturen unterhalb des Phasenübergangs verstellt werden konnte. Oberhalb des Phasenübergangs, z. B. bei 37°C haben die Zellen eine größere Kontaktfläche mit dem Substrat als bei Temperaturen unterhalb des Phasenübergangs.

**[0067]** Die **Fig. 4** bis **Fig. 6** zeigen Varianten der Erfindung, welche insbesondere in Abhängigkeit von der konkreten Kultivierungsaufgabe gewählt werden können. So ist gemäß **Fig. 4** ein thermoresponsives Mikrogel **3** mit einer Kern-Schale-Struktur vorgesehen. Der Kern **3.4**, z. B. aus Latex, ist unter den Kultivierungsbedingungen und insbesondere bei einer Temperaturänderung unveränderlich. Die Schale **3.5** wird durch das thermoresponsive Polymer, z. B. PNIPam gebildet. Die Herstellung einer Mikrogel-Dispersion zur Bildung von Partikeln mit Kern-Schale-Struktur ist an sich bekannt (siehe Hellweg et al. in „Langmuir“ 20 (2004) 4330; Fernández-Barbera et al. in „Phys Rev E 66“ (2002) 051803/1-10). Die Fixierung von thermoresponsiven Mikrogele **3** mit Kern-Schale-Struktur auf der Trägerfläche und die weitere Behandlung des Substrats erfolgt, wie dies oben unter Bezug auf **Fig. 1** beschrieben ist.

**[0068]** Die thermoresponsiven Mikrogele **3** können eine geschlossene (**Fig. 5**) oder eine von Lücken unterbrochene, nicht-geschlossene Monolage (**Fig. 6**) auf der Trägerfläche **2** bilden. Die regelmäßige Anordnung der thermoresponsiven Mikrogele **3** gemäß **Fig. 5** kann durch Selbstorganisation (Bildung der dichtesten Packung) erzeugt werden. Bei der nicht-geschlossenen Schicht gemäß **Fig. 6** hingegen kann die regelmäßige Anordnung der thermoresponsiven Mikrogele **3** durch eine Vorbehandlung der Trägerfläche, z. B. mit lokal aufgetragenen Haftvermittler-Inseln erreicht werden. Abweichend von den **Fig. 5** und **Fig. 6** können die thermoresponsiven Mikrogele

**3** unregelmäßige Anordnungen auf der Trägerfläche **2** bilden.

**[0069]** Die **Fig. 7** und **Fig. 8** illustrieren schematisch, dass die Verankerung der thermoresponsiven Mikrogele **3** auf der Trägerfläche **2** verbessert werden kann, wenn auf dieser ein Haftvermittler **4** angeordnet ist. Der Haftvermittler **4** kann die Trägerfläche **2** komplett bedecken (**Fig. 7**) und so die für die Fixierung der thermoresponsiven Mikrogele **3** freiliegende, modifizierte Trägerfläche bilden. **Fig. 8** zeigt einen Ausschnitt des erfindungsgemäßen Substrats **10** mit den thermoresponsiven Mikrogele **3** im kollabierten Zustand (**Fig. 8A**) oberhalb der kritischen Temperatur und im nicht-kollabierten Zustand (**Fig. 8B**) unterhalb der kritischen Temperatur. **Fig. 8B** illustriert des Weiteren schematisch die zwischen dem Haftvermittler **4** mit einerseits dem Substratkörper **1** und andererseits den thermoresponsiven Partikeln **3** vorgesehenen Bindungsvarianten. So können an den freien Enden der Polymerketten **3.2** der thermoresponsiven Mikrogele **3** Bindungsplätze **3.6** für eine kovalente oder biospezifische Bindung **4.1** mit dem Haftvermittler **4** vorgesehen sein. Die Bindungsplätze **3.6** können bei der Herstellung des Mikrogele gebildet werden. Die kovalenten Bindungen basieren auf z. B. Epoxid-, Karboxy-, Amino-, Hydrazid-, Thiol- oder Maleimid-Verbindungen an den Enden der Polymerketten **3.2**. Zur Bildung der kovalenten oder biospezifischen Bindung **4.1** ist die Haftvermittler-Schicht **4** entsprechend mit Bindungsplätzen **4.2** ausgestattet, die mit den Bindungsplätzen **3.6** der thermoresponsiven Mikrogele **3** reagieren. Gleichzeitig bilden die Bindungsplätze **4.2** mit dem Substratkörper **1** kovalente oder biospezifische Bindungen aus. Die biospezifischen Bindungen können insbesondere durch Rezeptor-Ligand-Bindungen, wie z. B. zwischen Streptavidin und Biotin gebildet werden.

**[0070]** Im linken Teil von **Fig. 8B** ist schematisch illustriert, dass die Wirkung des Haftvermittlers **4** auf einer unspezifischen Wechselwirkung **4.3** einerseits mit den thermoresponsiven Partikeln **3** und andererseits mit dem Substratkörper **1** beruhen kann.

**[0071]** Der Haftvermittler **4** umfasst z. B. eine Biotin-Schicht mit einer Dicke von 1 nm bis 1 µm (siehe Spinke et al. in „J. Chem. Phys.“ 99 (1993) 7012; Hong et al. in „Progr. Colloid Polym. Sci.“ 93 (1993) 98; Zao et al. in „Electroanal.“ 18 (2006) 1737). Die Schicht wird mit an sich bekannten Verfahren, wie z. B. Spin-Coating oder Selbstassemblierung aus der Lösung, auf der Oberfläche des Substratkörpers **1** gebildet.

**[0072]** Das erfindungsgemäße Substrat **10** kann Teil einer Kultivierungseinrichtung **30** sein, wie beispielhaft in **Fig. 9** illustriert ist. Die Kultivierungseinrichtung **30** umfasst ein Kultivierungsgefäß **31** mit einem Boden **32** und einer umlaufenden Seitenwand **33**. Das

Kultivierungsgefäß **31** ist zur Aufnahme eines flüssigen Kultivierungsmediums **34** vorgesehen, das durch eine Zufuhrleitung **35** in das Kultivierungsgefäß **31** eingeführt und durch eine Auslassleitung **36** aus dem Kultivierungsgefäß **31** entfernt werden kann. Das erfindungsgemäße Substrat **10** ist auf dem Boden **32** angeordnet. Alternativ bildet der Boden **32** das Substrat **10**. Auf der zum Inneren des Kultivierungsgefäßes **31** weisenden Seite des Substrats **10** sind freiliegend die thermoresponsiven Partikel **3** angeordnet. Auf dem Substrat **10** befinden sich biologische Zellen **20**, **21**.

**[0073]** [Fig. 9](#) illustriert des Weiteren schematisch eine Temperatureinstelleinrichtung **40** und eine Manipulatoreinrichtung **50**. Mit der Temperatureinstelleinrichtung **40** kann die Temperatur des Substrats **10** oder von Teilbereichen (Segmenten) des Substrats **10** gezielt von einer Temperatur oberhalb bis zu einer Temperatur unterhalb der kritischen Temperatur des Phasenübergangs der thermoresponsiven Mikrogele **3** eingestellt werden. Die Temperatureinstelleinrichtung umfasst z. B. eine Heizeinrichtung, wie z. B. eine Widerstandsheizung, oder eine Kombination aus einer Heizeinrichtung und einer Kühleinrichtung, wie z. B. eine Peltier-Kühlung. Die Manipulatoreinrichtung **50** umfasst z. B. eine Zufuhrleitung **51**, durch die eine Zellsuspension in das Kultivierungsgefäß **31** gespült werden kann.

**[0074]** Des Weiteren kann die Kultivierungseinrichtung **30** mit einer Beobachtungseinrichtung, z. B. einem Mikroskop, und einer Messeinrichtung, z. B. einem Temperatursensor (nicht dargestellt) ausgestattet sein.

**[0075]** Die [Fig. 10](#) bis [Fig. 17](#) illustrieren verschiedene Varianten der Funktionalisierung eines erfindungsgemäßen Substrats mit mindestens einer Modulatorschicht, die mit Modulatorpartikeln (z. B. [Fig. 10](#) bis [Fig. 12](#)) und/oder als Modulatorschicht (z. B. [Fig. 13](#), [Fig. 15](#)) auf der Trägerfläche des Substrats vorgesehen sein kann. Allgemein umfasst die mindestens eine Modulatorschicht eine einzelne chemische Substanz oder eine Zusammensetzung chemischer Substanzen, zu der die biologischen Zellen eine im Vergleich zu den thermoresponsiven Mikrogele veränderte Adhäsionsfähigkeit aufweisen (Beispiele siehe oben) und/oder mit der in den biologischen Zellen zelluläre Reaktionen induzierbar sind.

**[0076]** Substanzen, welche zelluläre Reaktionen auslösen, sind allgemein Substanzen, welche durch Bindung an Oberflächenrezeptoren der biologischen Zellen z. B. eine verstärkte Adhäsion, eine Migration (Zellwanderung), eine Differenzierung (insbesondere Stammzellendifferenzierung), eine Änderung des Aktivierungsstatus oder eine Änderung der Malignität bewirken. Derartige Substanzen sind z. B.:

- Chemokine, wie z. B. FGF induzieren Chemotaxis, oder
- Osteonektin (induziert Differenzierung von Stammzellen in Herzmuskelzellen).

**[0077]** Vorteilhafterweise ermöglicht die Kombination verschieden wirkender Modulatorschichten die gezielte Einstellung vorbestimmter physikalischer oder chemischer Oberflächeneigenschaften. Da die mindestens eine Modulatorschicht bei der Herstellung des Mikrogeles der Dispersion kolloidaler Teilchen des thermoresponsiven Polymers zugesetzt werden kann, lassen sich die thermoresponsiven Mikrogele und die mindestens eine Modulatorschicht wie Module frei kombinieren. Die Oberfläche des erfindungsgemäßen Substrats kann wie ein modularer Baukasten gestaltet werden.

**[0078]** Bei dem schematisch in [Fig. 10](#) gezeigten Beispiel sind thermoresponsive Mikrogele **3**, Kunststoffpartikel, die mit zellanziehenden Molekülen beschichtet sind (adhäsionssteigernde Modulatorpartikel **5.1**) und Kunststoffpartikel, die mit zellabstoßenden Molekülen beschichtet sind (adhäsionsmindernde Modulatorpartikel **5.2**) kombiniert. Die Modulatorpartikel **5.1**, **5.2** haben einen Durchmesser, der z. B. im Bereich 50 nm bis 1 µm gewählt ist.

**[0079]** [Fig. 11](#) illustriert schematisch die verschiedenen Wirkungen der Kombination thermoresponsiver Mikrogele **3** mit adhäsionssteigernden Modulatorpartikeln **5.1** und adhäsionsmindernden Modulatorpartikeln **5.2** (symbolisiert in [Fig. 11A](#)). Gemäß [Fig. 11B](#) bewirken die adhäsionssteigernden Modulatorpartikel **5.1** durch eine relativ hohe Anzahl von Bindungsplätzen für die adhärenzte Anbindung der Zelle **21**, dass eine relativ kleine Kontaktfläche zwischen der Zelle **21** und der Substratoberfläche gebildet wird. Mit der kleineren Kontaktfläche berührt die Zelle **21** relativ wenige thermoresponsive Mikrogele **3**, so dass deren Wirkung bei einem temperaturabhängigen Phasenübergang vermindert wird. Im Ergebnis wird eine starke Bindung der Zelle **21** zum Substrat **10** erzielt.

**[0080]** Gemäß [Fig. 11C](#) bewirken adhäsionsmindernde Modulatorpartikel **5.2** einen gegenteiligen Effekt. Die Zelle **21** wird auf der Oberfläche des Substrats **10** ausgebreitet, um Bindungsplätze für die Adhäsionskontakte der Zelle **21** zu finden. Entsprechend erhält die Zelle **21** Kontakt mit einer relativ großen Anzahl thermoresponsiver Mikrogele **3**. Somit wirkt sich ein Phasenübergang der thermoresponsiven Mikrogele **3** stärker als bei den adhäsionssteigernden Modulatorpartikeln **5.1** ([Fig. 11B](#)) aus. Die Adhäsion der Zelle **21** auf der Oberfläche des Substrats **10** wird vermindert.

**[0081]** Durch eine Einstellung der quantitativen Mischungsverhältnisse der thermoresponsiven Mikrogele **3** mit mindestens einem Typ der Modulatorpar-

tikel **5.1**, **5.2** in der Dispersion zur Herstellung der Mikrogele können somit vorteilhafterweise die Adhäsionseigenschaften (Anhaft- oder Ablösungsparameter) der Substratoberfläche über einen weiten Bereich variiert werden, wobei der thermoresponsive Charakter der Oberfläche erhalten bleibt und die Oberfläche für einen Zelltyp oder mehrere Zelltypen optimale Adhäsionseigenschaften besitzt. Vorteilhafterweise können die Mischungsverhältnisse in Trägerlösungen zur Herstellung der Dispersionen einfach durch Einwiegen erzeugt werden. Die Verwendung der Mikrogele-Dispersion, welche die Teilchen des thermoresponsiven Polymers und die Modulatorpartikel enthält, ermöglicht die gemeinsame Übertragung auf die Trägerfläche des Substrats in einem einzigen Depositionsschritt.

**[0082]** Die in der schematischen Illustration von **Fig. 11** gewählten Größenverhältnisse einerseits der biologischen Zelle **21** und andererseits der Mikrogele **3**, **5.1** und **5.2** sind aus zeichnungstechnischen Gründen gewählt. Im Unterschied zur Illustration können erheblich geringere Partikelgrößen, z. B. bis 50 nm oder darunter, oder auch größere Partikel, z. B. 10 µm verwendet werden.

**[0083]** Gemäß einer weiteren Variante der Erfindung können auf der Oberfläche des Substrats **10** Partikel mit verschiedenen Größen kombiniert werden, wie beispielhaft in **Fig. 12** illustriert ist. Beispielsweise können die adhäsionssteigernden Modulatorpartikel **5.1** einen größeren Radius als die thermoresponsiven Mikrogele **3** haben (**Fig. 12A**). In diesem Fall wird die adhäsionssteigernde Wirkung der Modulatorpartikel **5.1** verstärkt, da diese im Vergleich zu den thermoresponsiven Mikrogele **3** für die Zelle **21** stärker zugänglich sind. Dazu im Gegensatz wird gemäß **Fig. 12B** mit adhäsionsmindernden Modulatorpartikeln **5.2**, deren Radius geringer als der Radius der thermoresponsiven Mikrogele **3** ist, die Wirkung der Modulatorpartikel **5.2** vermindert. Weitere Kombinationen, wie z. B. kleinere adhäsionssteigernde Modulatorpartikel **5.1** und/oder größere adhäsionsmindernde Modulatorpartikel **5.2** sind ebenfalls möglich.

**[0084]** Im Ergebnis können nicht nur die Adhäsionseigenschaften der Oberfläche eingestellt, sondern auch eine bestimmte Körnigkeit der Oberfläche bereitgestellt werden. Die Bereitstellung einer körnigen Oberfläche bedeutet, dass eine Oberflächentopologie mit Erhöhungen und Vertiefungen erzeugt wird. Vorteilhafterweise kann die Körnigkeit der Oberfläche an typische Dimensionen des Adhäsionsmusters eines bestimmten Zelltyps angepasst werden (Humane und Bovin Kapillarendothel-Zellen, siehe C. S. Chen et al. in „Science“ 276 (1997) 1425; und C2C12-Muskelzellen, siehe U. Joos et al. in „Eur. J. Cell Bio.“ 85 (2006) 225).

**[0085]** **Fig. 13** illustriert eine weitere Variante der Erfindung, bei der die mindestens eine Modulatorschicht in Kombination mit den thermoresponsiven Mikrogele **3** als adhäsionssteigernde Modulatorschicht **5.3** oder als adhäsionsmindernde Modulatorschicht **5.4** bereitgestellt wird (**Fig. 13A**). Auch in diesem Fall wird vorteilhafterweise eine modulare Gestaltung der Oberfläche des Substrats **10** durch eine Überlagerung der Wechselwirkung der Zelle **21** mit den verschiedenen Komponenten erzielt. Im Unterschied zu der Verwendung von Modulatorpartikeln wird die mindestens eine Modulatorschicht nicht dem Mikrogele zugesetzt, sondern in einem zusätzlichen Depositionsschritt durch eine Beschichtung der Trägerfläche des Substrats vor oder nach der Auftragung der thermoresponsiven Mikrogele bereitgestellt.

**[0086]** **Fig. 13B** illustriert die Wirkung einer adhäsionssteigernden Modulatorschicht **5.3**, die analog zu **Fig. 11B** eine verkleinerte Kontaktfläche der Zelle **21** und damit einer verminderten Wirkung der thermoresponsiven Mikrogele **3** ergibt. Dazu im Gegensatz liefert die adhäsionsmindernde Modulatorschicht **5.4** gemäß **Fig. 13C** eine Ausbreitung der Zelle **21** und damit eine verstärkte Wirkung der thermoresponsiven Mikrogele **3**.

**[0087]** Während bei den Varianten der **Fig. 13B** und **Fig. 13C** die thermoresponsiven Mikrogele **3** durch eine der oben beschriebenen Verbindungstypen mit dem Substratkörper **1** gekoppelt ist, besteht gemäß **Fig. 13D** alternativ die Möglichkeit, die thermoresponsiven Mikrogele **3** mit der adhäsionssteigernden Modulatorschicht **5.3** zu verbinden. In diesem Fall erfüllt die adhäsionssteigernde Modulatorschicht **5.3** eine Doppelfunktion als Haftvermittler (siehe oben, **Fig. 7**, **Fig. 8**) und als Modulatorschicht.

**[0088]** Gemäß einer weiteren (nicht dargestellten) Variante können zuerst die thermoresponsiven Mikrogele **3** mit dem Substratkörper **1** verbunden und anschließend die adhäsionssteigernde oder adhäsionsmindernde Modulatorschicht aufgebracht werden.

**[0089]** Die **Fig. 14**, **Fig. 15** und **Fig. 16** illustrieren Ausführungsformen der Erfindung, bei denen die thermoresponsiven Mikrogele, der Haftvermittler und/oder die Modulatorschicht auf der Trägerfläche des Substrats mit mindestens einem Dichtegradienten angeordnet sind. Diese Ausführungsformen sind insbesondere für die Manipulation biologischer Zellen bei der Kultivierung in Kokulturen von Vorteil. Durch die Bildung von Dichtegradienten lassen sich die Oberflächeneigenschaften des Substrats so modifizieren, dass eine Migration (Zellwanderung) der adhären Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp induziert wird. Hierzu kann ein Konzentrationsgradient (**Fig. 14**, **Fig. 15**) und/oder ein Funktionsgradient (**Fig. 16**) von mindestens einer Modulatorschicht

stanz mit chemotaktischen Eigenschaften vorgesehen sein.

**[0090]** Gemäß [Fig. 14](#) sind auf der Trägerfläche **2** des Substratkörpers **1** thermoresponsive Mikrogele **3** und adhäsionssteigernde Modulatorpartikel **5.1** so angeordnet, dass in einem ersten Teilbereich **1.1** eine höhere Flächendichte der thermoresponsiven Partikel **3** im Vergleich zu den adhäsionssteigernden Modulatorpartikeln **5.1** und in einem zweiten Teilbereich **1.2** umgekehrt eine geringere Dichte der thermoresponsiven Mikrogele **3** im Vergleich zu den adhäsionssteigernden Modulatorpartikeln **5.1** erzeugt wird. Im Ergebnis wird ein Dichtegradient **6** gebildet, der sich entlang der Trägerfläche **2** durch eine zunehmende Flächendichte der adhäsionssteigernden Modulatorpartikel **5.1** oder eine abnehmende Flächendichte der thermoresponsiven Mikrogele **3** auszeichnet. Der Dichtegradient **6**, der in [Fig. 14](#) schematisch illustriert ist, kann in der Praxis stufenweise durch die Deposition von Mikrogele mit verschiedenen Zusammensetzungen auf verschiedenen Teilbereichen des Substratkörpers **1** erzeugt werden.

**[0091]** Gemäß [Fig. 14](#) ist zur Kultivierung biologischer Zellen **21** von einem ersten, interessierenden Zelltyp gemeinsam mit Feeder-Zellen **22** die Bildung der Kokultur in dem ersten Teilbereich **1.1** mit einem hohen Anteil der thermoresponsiven Partikel **3** vorgesehen (Schritt S1). Nach der Kultivierung, die z. B. eine Differenzierung der Zellen **21** umfasst, wandern die Feeder-Zellen **22** unter der spezifischen Wirkung der adhäsionssteigernden Modulatorpartikel **5.1** aus dem ersten Teilbereich **1.1** heraus (Migration **7**, Schritt S2). Anschließend erfolgt die Ablösung der interessierenden Zellen **21**, indem durch eine Temperaturänderung des Substrats **10** der Phasenübergang der thermoresponsiven Mikrogele **3** induziert und im Teilbereich **1.1** die Adhäsionsfähigkeit für biologische Zellen **21** erheblich vermindert wird. Die Zellen **21** können dann, z. B. mit einer Manipulationseinrichtung, wie sie in [Fig. 9](#) gezeigt ist, vom Substrat **10** entfernt werden.

**[0092]** Um Zellen zelltypspezifisch zur Migration anzuregen, stehen eine Reihe von Modulatorsubstanzen zur Verfügung. Beispielsweise wirkt fMLP (Formyl Methionyl-Leucyl-Prolin) ausschließlich auf die Migration von HL 60 Leukämie-Zellen, während andere Zelltypen unbeeinflusst bleiben.

**[0093]** Das in [Fig. 14](#) schematisch gezeigte Prinzip der selektiven Migration **7** eines Zelltyps aus einer Mischung von adhären Zellen lässt sich entsprechend auf die Mischung von mehr als zwei Zelltypen verallgemeinern, wobei die adhäsionssteigernde Modulatorsubstanz so gewählt ist, dass mindestens ein Zelltyp aus der Mischung auswandert oder mindestens ein Zelltyp unverändert bleibt und keine Migration zeigt. Vorteilhafterweise können damit kleine Zell-

proben mit geringen Zellzahlen insbesondere unterhalb von  $10^5$  Zellen nach der Kokultivierung getrennt werden.

**[0094]** Die Trennung von Mischungen verschiedener Zelltypen ist nicht auf die Verwendung von adhäsionssteigernden Modulatorpartikeln beschränkt. Alternativ oder zusätzlich können thermoresponsive Partikel **3** mit adhäsionssteigernden Modulatorschichten **5.3** kombiniert werden, wie schematisch in [Fig. 15](#) illustriert ist. Es wird ein Dichtegradient **6** zwischen einem ersten Teilbereich **1.1** des Substratkörpers **1** mit einer erhöhten Flächendichte der thermoresponsiven Mikrogele **3** und einem weiteren Teilbereich **1.2** des Substratkörpers **1** mit einer erhöhten Flächendichte der adhäsionssteigernden Modulatorschicht **5.3** gebildet. Analog zu [Fig. 14](#) erfolgt zunächst die Ablage und Kokultur der interessierenden biologischen Zellen **21** gemeinsam mit Feeder-Zellen **22** (Schritt S1), anschließend die zelltypspezifische Migration **7** der Feeder-Zellen **22** aus dem Zellgemisch heraus (Schritt S2) und schließlich die Ablösung der interessierenden Zelle **21** durch den temperaturinduzierten Phasenübergang der thermoresponsiven Mikrogele **3** (Schritt S3).

**[0095]** Für die Ablösung der Zellen **21** stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Gemäß den [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#) kann die Temperatur des gesamten Substrats **10** unter die kritische Temperatur (LCST) abgesenkt werden. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn die adhären bleibenden Zellen **22** im Teilbereich **1.2** vom Phasenübergang der thermoresponsiven Partikel **3** unbeeinflusst bleiben. Alternativ kann eine lokale Verminderung der Temperatur vorgesehen sein, wie schematisch in [Fig. 16](#) illustriert ist. Bei dieser Ausführungsform der Erfindung ist die Temperatureinstelleinrichtung **40** (siehe auch [Fig. 9](#)) lokal auf den Teilbereich **1.1** des Substratkörpers **1** wirkend angeordnet. In diesem Fall kann der Phasenübergang der thermoresponsiven Mikrogele **3** lokal beschränkt im Teilbereich **1.1** induziert werden, während die thermoresponsiven Mikrogele in anderen Teilbereichen unverändert bleiben.

**[0096]** Die zelltypspezifische Migration auf der Substratoberfläche erfordert jedoch nicht zwingend einen Dichtegradienten. Alternativ oder zusätzlich können chemotaktisch wirkende Substanzen **8** dem Kultivierungsmedium zugesetzt werden, wie schematisch in [Fig. 17](#) illustriert ist.

**[0097]** Gemäß [Fig. 17](#) wird ein erfindungsgemäßes Substrat **10** verwendet, auf dessen Substratkörper **1** die thermoresponsiven Partikel **3** homogen verteilt angeordnet sind. Nach der Kokultivierung der Zellen **21**, **22** auf dem Substrat **10** (Schritt S1) erfolgt der Zusatz chemotaktisch wirkender Substanzen **8** in das Kultivierungsmedium, so dass eine Migration **7** der Zellen induziert wird. Durch Auswahl der che-

motaktisch wirkenden Substanz **8** kann die Migration **7** zelltypspezifisch induziert werden. Beispielsweise bewirkt fMLP ausschließlich eine Migration von HL 60 Leukämie-Zellen, während Zellen von Zelllinien, die aus gesundem Gewebe gewonnen wurden, unbeeinflusst bleiben.

**[0098]** Zur Ablösung der interessierenden Zellen **21** erfolgt bei Schritt S3 eine lokal begrenzte Temperaturabsenkung. Die thermoresponsiven Partikel **3** zeigen den Phasenübergang in dem nicht-kollabierten Zustand, so dass die Zelle **21** abgelöst werden kann.

**[0099]** [Fig. 18](#) zeigt eine weitere Variante der Erfindung, bei der das Substrat **10** mit einer Kultivierungskavität **9** ausgestattet ist. Die Kultivierungskavität **9** kann zur in-vitro-Simulation von Differenzierungsvorgängen in Stammzellnischen verwendet werden. So werden im biologischen Organismus Stammzellen in Kavitäten mit einer vorbestimmten biochemischen und/oder zellulären Auskleidung vorgehalten (siehe David T. Scadden in „Nature“ 441 (2006) 1075; M. C. Dusseiller et al. in „Biointerphases“ 1 (2006) P1) und einer Differenzierung unterzogen. Ein Beispiel einer derartigen Stammzellnische sind Haarfollikeln.

**[0100]** Mit der Kultivierungskavität **9** des erfindungsgemäßen Substrats **10** wird eine Mikroumgebung für biologische Zellen **21** geschaffen, in der die Bedingungen im Organismus nachgebildet werden. Herkömmliche Zellmanipulationstechniken zur Auskleidung künstlicher Kultivierungskavitäten mit biologischen Zellen erfordern die Verwendung optischer Pinzetten oder dielektrophoretisch wirkender Elemente. Dies ist hinsichtlich des Geräteaufwands und der komplexen Verfahren nachteilig. Dieses Problem wird mit dem erfindungsgemäßen Substrat gemäß [Fig. 18](#) dadurch gelöst, dass Zellen gezielt in die Kultivierungskavität **9** einwandern.

**[0101]** Gemäß Schritt S1 in [Fig. 18](#) wird ein Zellgemisch aus biologischen Zellen **21**, **22**, die in der Kultivierungskavität **9** angeordnet werden sollen, in einem ersten Teilbereich **1.1** des Substratkörpers **1** eingebracht und ggf. kultiviert. Bei einem zweiten Schritt S2 erfolgt die gezielte Migration der Zellen **21**, **22** in die Kultivierungskavität **9**, wobei einer der oben genannten Mechanismen, z. B. ein Dichtegradient und/oder eine aus dem Kulturmedium wirkende chemotaktische Substanz verwendet werden.

**[0102]** Die in der vorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- Discher et al. in „Cell” 126 (2006) 677–689 [0003]
- N. Yamada et al. in „Makromol. Chem.” 11 (1990) 571 [0005]
- C. Williams et al. in „Adv. Mater.” 21 (2009) 2161–2164 [0005]
- O. Ernst et al. in „Lab Chip” 7 (2007) 1322 [0005]
- E. Wischerhoff et al. in „Angew. Chem.” 47 (2008) 5666 [0005]
- M. Andersson, S. L. Maunu, in „J. Poly. Sci.” B 44 (2006) 3305 [0027]
- X. Wu et al. in „Coll. Poly. Sci.” 272 (1994) 467 [0027]
- Schuller in „Kolloid Z. Z. Polym.” 211, 113–121 (1966) [0029]
- Fulda et al. in „Progr. Colloid Polym. Sci.” 101, 178–183 (1996) [0029]
- Gao et al. in „Macromolecules” 39, 3154–3160 (2006) [0029]
- Wu et al. in „Coll. Poly. Sci.” 272 (1994) 467 [0058]
- M. Andersson et al. in „J. Poly. Sci. B 44 (2006) 3305) [0058]
- Hellweg et al. in „Langmuir” 20 (2004) 4330 [0067]
- Fernández-Barberá et al. in „Phys Rev E 66” (2002) 051803/1-10 [0067]
- Spinke et al. in „J. Chem. Phys.” 99 (1993) 7012 [0071]
- Hong et al. in „Progr. Colloid Polym. Sci.” 93 (1993) 98 [0071]
- Zao et al. in „Electroanal.” 18 (2006) 1737 [0071]
- Humane und Bovin Kapillarendothel-Zellen, siehe C. S. Chen et al. in „Science” 276 (1997) 1425 [0084]
- U. Joos et al. in „Eur. J. Cell Bio.” 85 (2006) 225 [0084]
- David T. Scadden in „Nature” 441 (2006) 1075 [0099]
- M. C. Dusseiller et al. in „Biointerphases” 1 (2006) P1) [0099]

**Patentansprüche**

1. Substrat (10), insbesondere zur Aufnahme biologischer Zellen (20, 21, 22), umfassend  
 – einen Substratkörper (1), der eine Trägerfläche (2) aufweist,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass  
 – auf der Trägerfläche (2) thermoresponsive Mikrogele (3) fixiert sind.

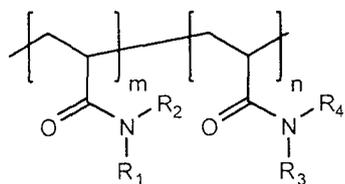
2. Substrat gemäß Anspruch 1, bei dem  
 – die thermoresponsiven Mikrogele (3) aus mindestens einem ungeladenen und nichtionisierbaren Polymer gebildet sind.

3. Substrat gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem die thermoresponsiven Mikrogele (3) aus mindestens einem der Polymere gebildet sind:

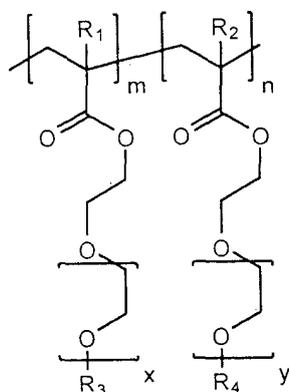
- Poly-(N-isopropylacrylamid),
- $-X-(-CH_2-CR_1COO-R_2-)_n-(-CH_2-CR_1COO-R_3-)_m-R_4$  oder Copolymere davon, und
- $-X-[-(CH_2-CR_1COO-R_2-)_n-(-CH_2-CR_1COO-R_3-)_m-R_4]_2$  oder Copolymere davon, wobei

X eine Kopplungsgruppe zur Trägerfläche,  $R_1 = H$  oder  $CH_3$ ,  $R_2/R_3 =$  aliphatische Kohlenwasserstoffketten mit Ethergruppen, und  $R_4 H$ , eine aliphatische Kohlenwasserstoffkette oder eine funktionelle Gruppe ist.

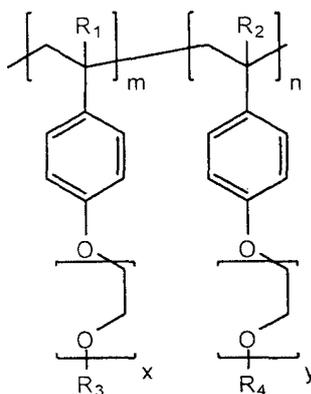
4. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die thermoresponsiven Mikrogele (3) aus mindestens einem der Polymere gebildet sind:



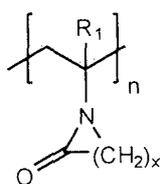
mit  $R_1, R_2, R_3$  und  $R_4 = H$  oder Alkyl, bevorzugt  $R_1 =$  Isopropyl,  $R_2 = H$ ,  $m + n > 10$ ,



mit  $R_1, R_2 = H$  oder  $CH_3$ ,  $R_3, R_4 = H$  oder Alkyl,  $x, y = 0$  bis 20,



mit  $R_1, R_2 = H$  oder  $CH_3$ ,  $R_3, R_4 = H$  oder Alkyl,  $x, y = 2$  bis 20, und



mit  $R_1 = H$  oder  $CH_3$ ,  $x = 3$  bis 5, Copolymere mit  $x = 3$  und  $n > 3$ .

5. Substrat gemäß Anspruch 4, bei dem mindestens eine terminale Einheit der Polymerhauptkette eine Kopplungsgruppe zur Trägerfläche (2) beinhaltet.

6. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem

- die thermoresponsiven Mikrogele (3) aus mindestens zwei verschiedenen Polymeren gebildet sind und/oder verschiedene Durchmesser aufweisen.

7. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem

- die thermoresponsiven Mikrogele (3) einen Durchmesser aufweisen, der mindestens 10 nm und/oder höchstens 50  $\mu m$  beträgt.

8. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem

- die thermoresponsiven Mikrogele (3) eine Kern-Schale-Struktur aufweisen.

9. Substrat gemäß Anspruch 8, mit mindestens einem der Merkmale

- ausschließlich die Schale der thermoresponsiven Mikrogele (3) ist thermoresponsiv,
- der Zusammenhalt der Kerne der thermoresponsiven Mikrogele (3) wird durch Nebervalenzwechselwirkungen bewirkt,
- der Zusammenhalt der Kerne der thermoresponsiven Mikrogele (3) wird durch chemische Vernetzung bewirkt,
- Polymerketten in der Schale der thermoresponsiven Mikrogele (3) sind unvernetzt,

– Polymerketten in der Schale der thermoresponsiven Mikrogele (3) sind vernetzt, wobei die Anzahl von Vernetzungspunkte nicht größer ist als 1 pro 20 unvernetzte Wiederholungseinheiten ist, und  
 – die Dicke der Schale der thermoresponsiven Mikrogele (3) beträgt mindestens 10 nm.

10. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem  
 – die thermoresponsiven Mikrogele (3) eine Monolage, insbesondere eine geschlossene Monolage, bilden.

11. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem  
 – die Trägerfläche (2) mit einem Haftvermittler (4) versehen ist.

12. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem  
 – mindestens eine Modulatorsubstanz (5) vorgesehen ist, mit der biologische Zellen eine Adhäsionsfähigkeit aufweisen, die sich von der Adhäsionsfähigkeit der biologischen Zellen an den thermoresponsiven Mikrogele (3) unterscheidet, und/oder mit der durch Bindung an Oberflächenrezeptoren der biologischen Zellen zelluläre Reaktionen induzierbar sind.

13. Substrat gemäß Anspruch 12, bei dem  
 – die mindestens eine Modulatorsubstanz (5) auf Modulatorpartikeln (5.1, 5.2) und/oder als Modulatorschicht (5.3, 5.4) auf der Trägerfläche (2) angeordnet ist.

14. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem  
 – mindestens eines von den thermoresponsiven Mikrogele (3), dem Haftvermittler und der Modulatorsubstanz auf der Trägerfläche (2) mindestens einen Dichtegradienten (6) bilden.

15. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem  
 – auf der Trägerfläche (2) mindestens eine Kultivierungskavität (9) vorgesehen ist.

16. Substrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem  
 – der Substratkörper (1) Teil einer Kultivierungseinrichtung (30) ist.

17. Verfahren zur Herstellung eines Substrates (10) gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, mit den Schritten:  
 – Bereitstellung des Substratkörpers (1) mit der Trägerfläche (2),  
 – Herstellung einer Dispersion der thermoresponsiven Mikrogele (3),  
 – Auftragung der Dispersion auf der Trägerfläche (2), und

– Fixierung der thermoresponsiven Mikrogele (3) auf der Trägerfläche (2).

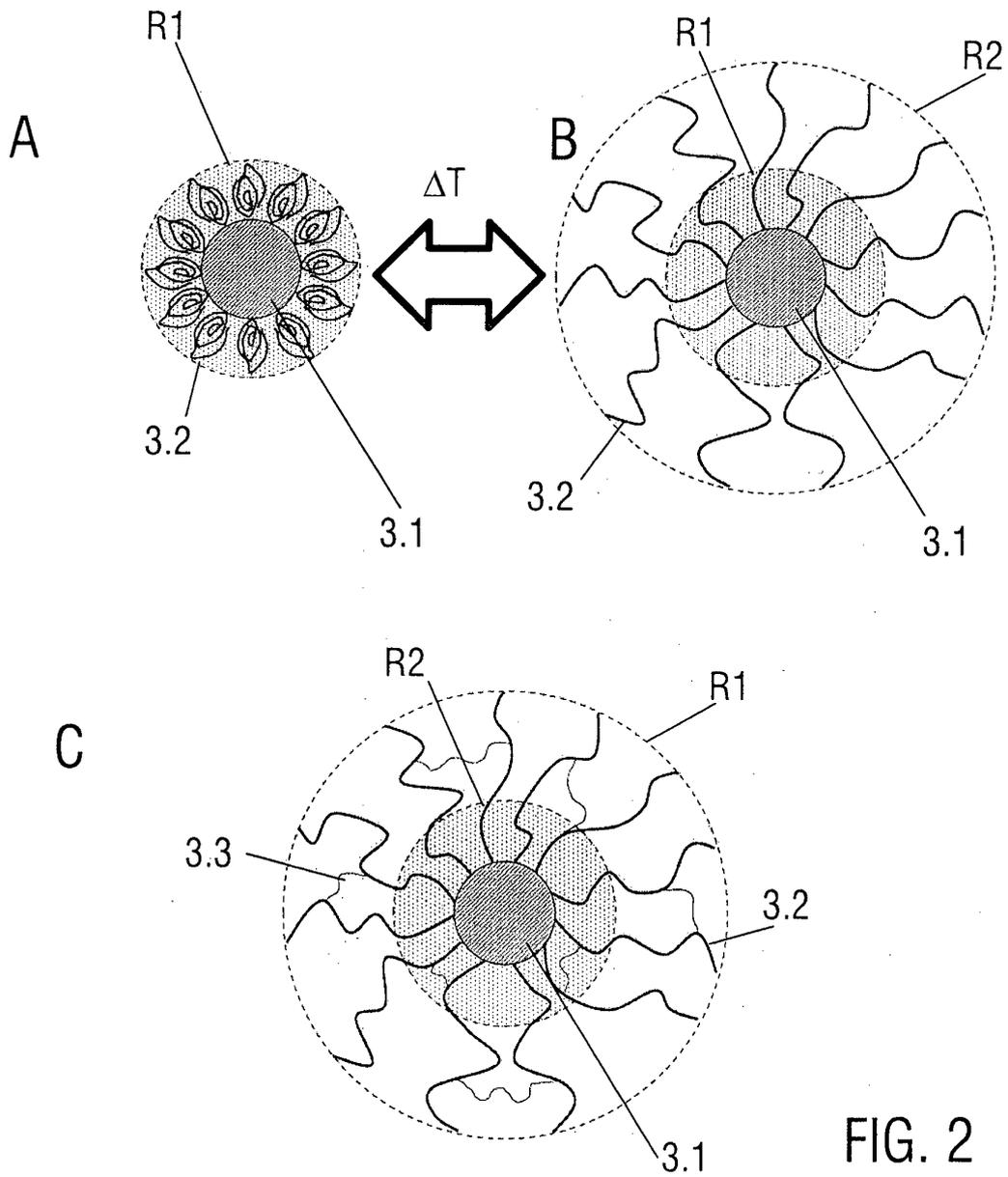
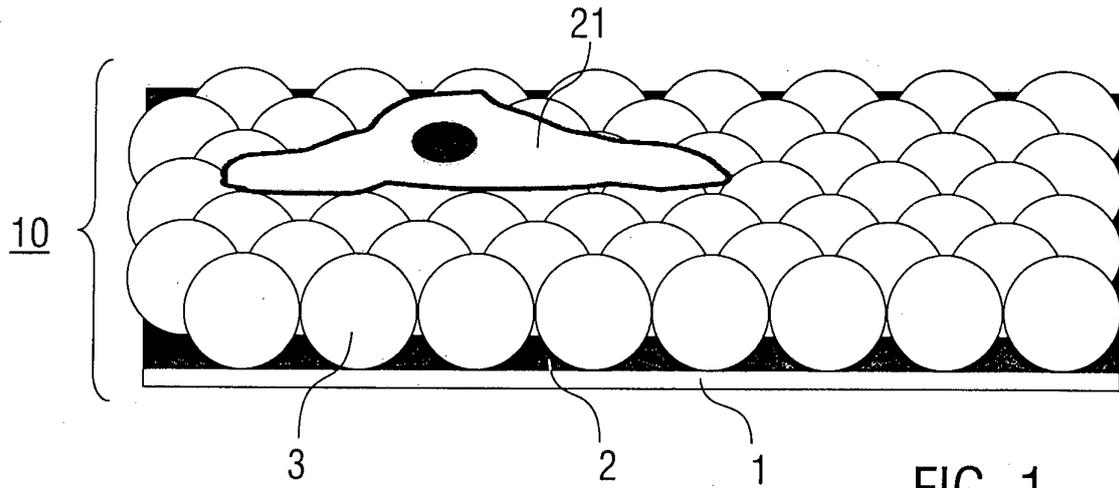
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, mit mindestens einem der Schritte  
 – Auftragung eines Haftvermittlers (4) auf der Trägerfläche (2),  
 – Auftragung von mindestens einer Modulatorsubstanz (5) auf der Trägerfläche (2), und  
 – Sterilisierung der Trägerfläche (2).

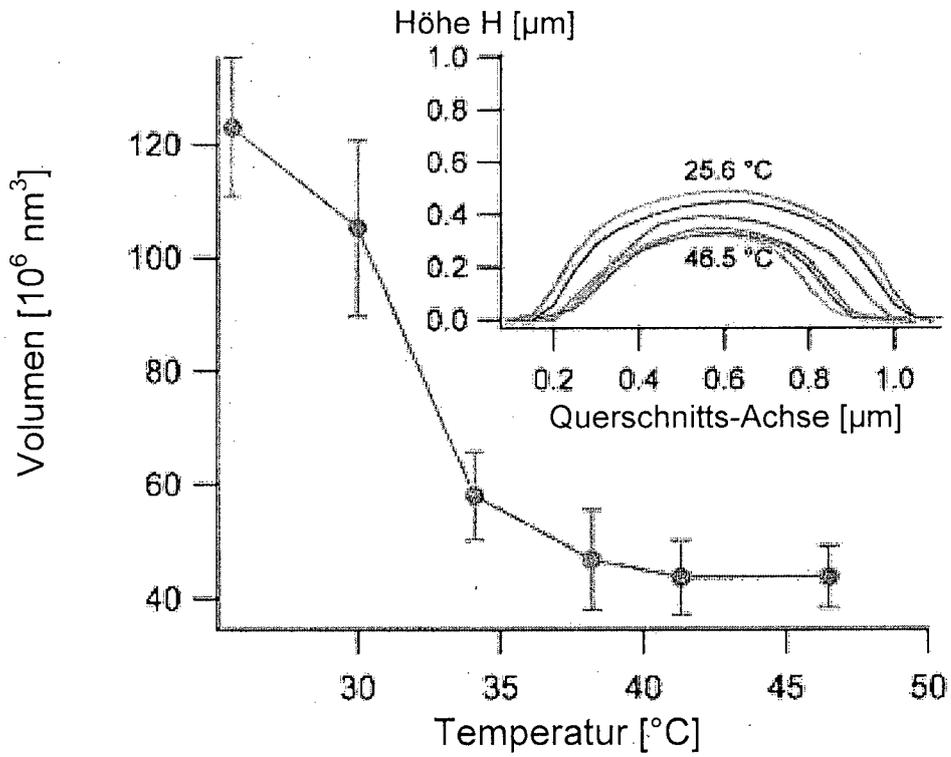
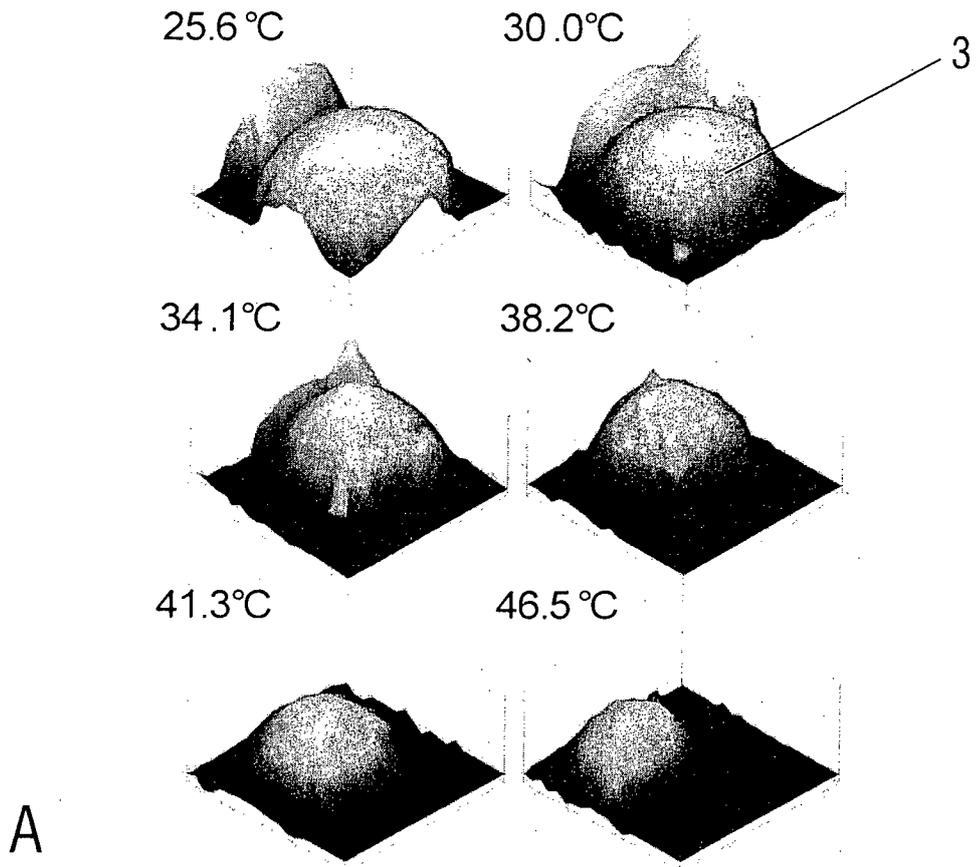
19. Verfahren zur Kultivierung biologischer Zellen (20, 21, 22) auf einem Substrat (10) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, mit den Schritten:  
 – Ablage der biologischer Zellen (20, 21, 22) auf dem Substrat (10), und  
 – Einstellung von Kultivierungsbedingungen derart, dass die biologischen Zellen (20) einem Wachstum, einer Differenzierung und/oder einer Migration (7) unterzogen werden.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19, mit mindestens einem der Schritte  
 – Einstellung der Adhäsion der biologischen Zellen (20, 21, 22) auf dem Substrat (10) durch eine Temperatureinstellung,  
 – Einstellung einer zelltypspezifischen Migration (7) von mindestens einem Typ der biologischer Zellen (20, 21, 22) mittels eines Dichtegradienten einer zelltypspezifisch wirkenden Modulatorsubstanz, und  
 – Einstellung der Migration (7) von mindestens einem Typ der biologischen Zellen (20, 21, 22) mittels eines Dichtegradienten einer Modulatorsubstanz derart, dass die biologischen Zellen (20, 21, 22) in eine Kultivierungskavität (9) wandern.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





B

FIG. 3

C

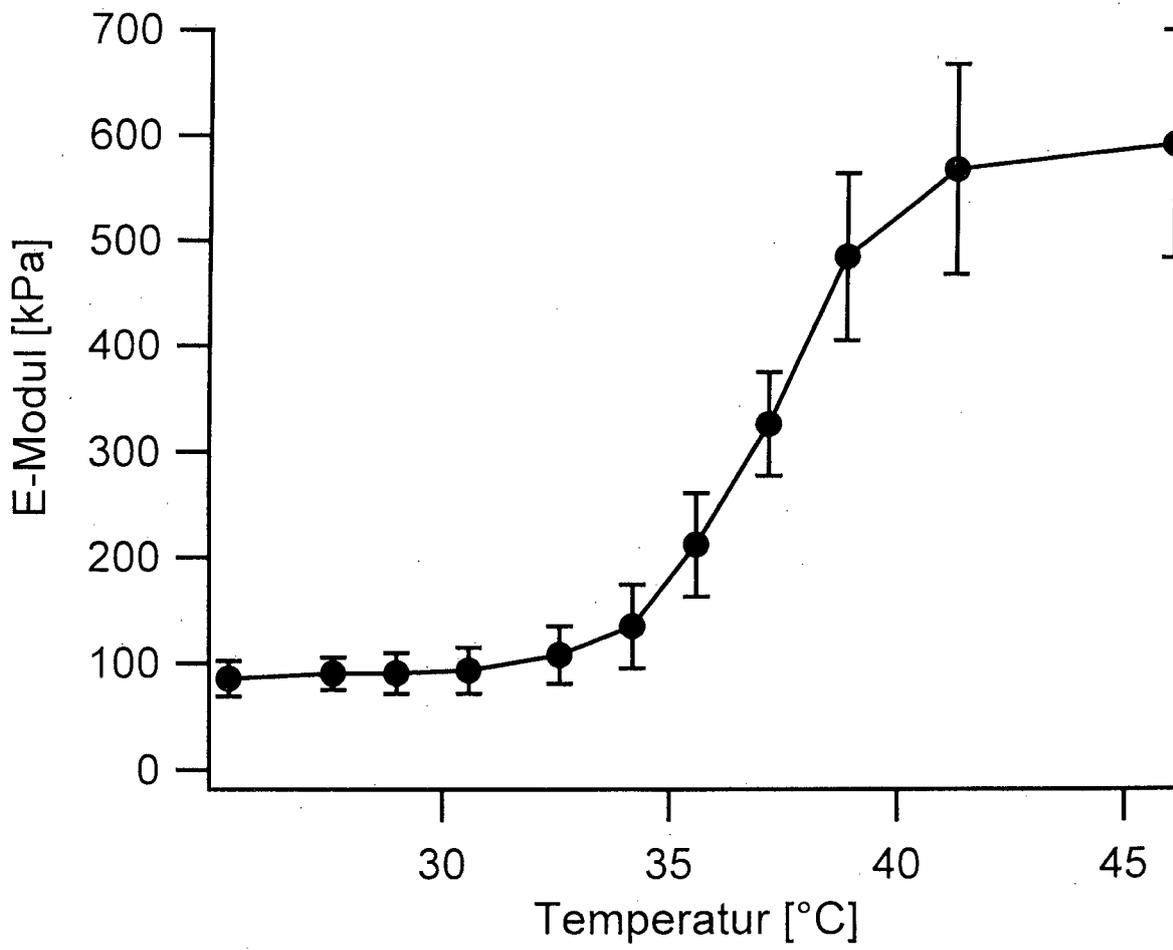


FIG. 3

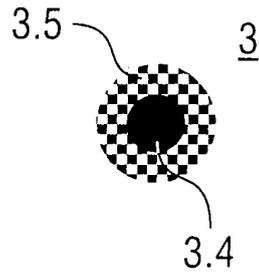


FIG. 4

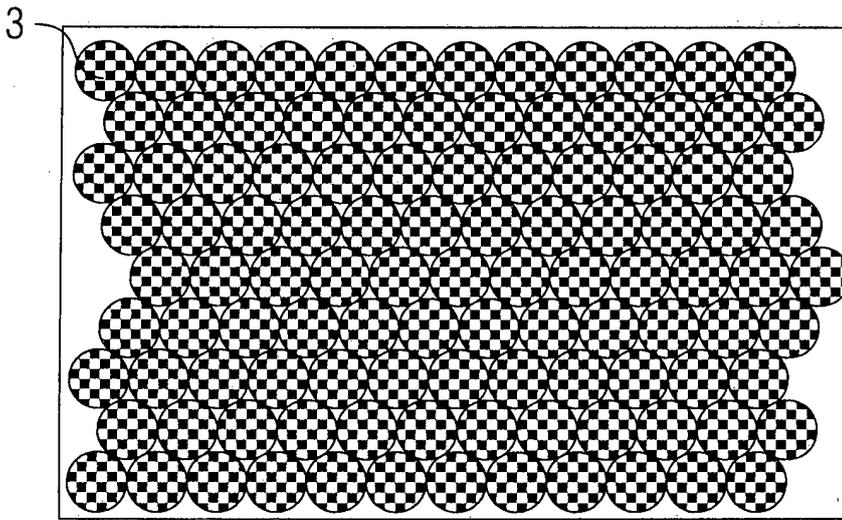


FIG. 5

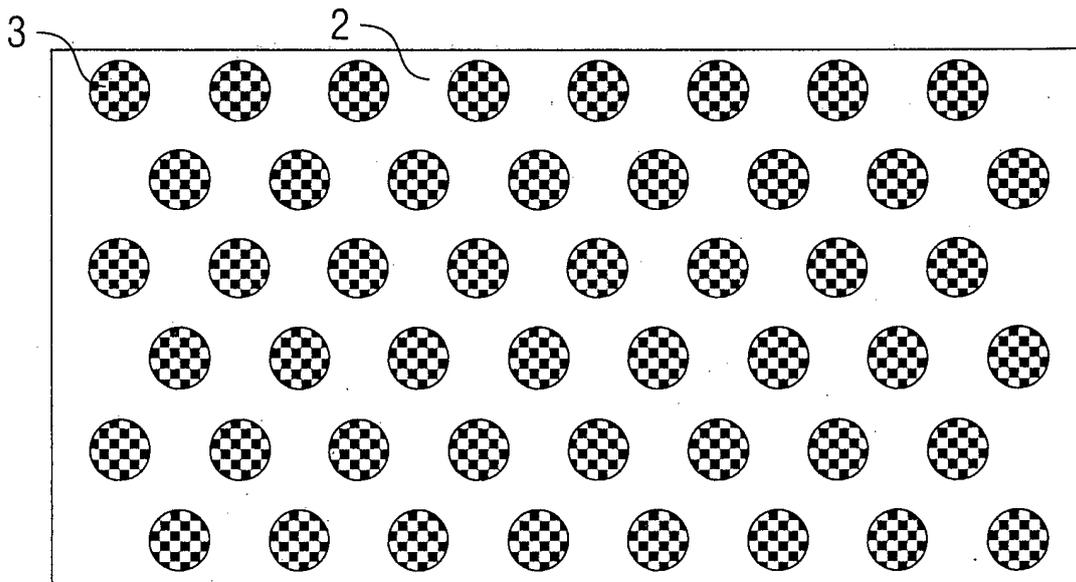


FIG. 6



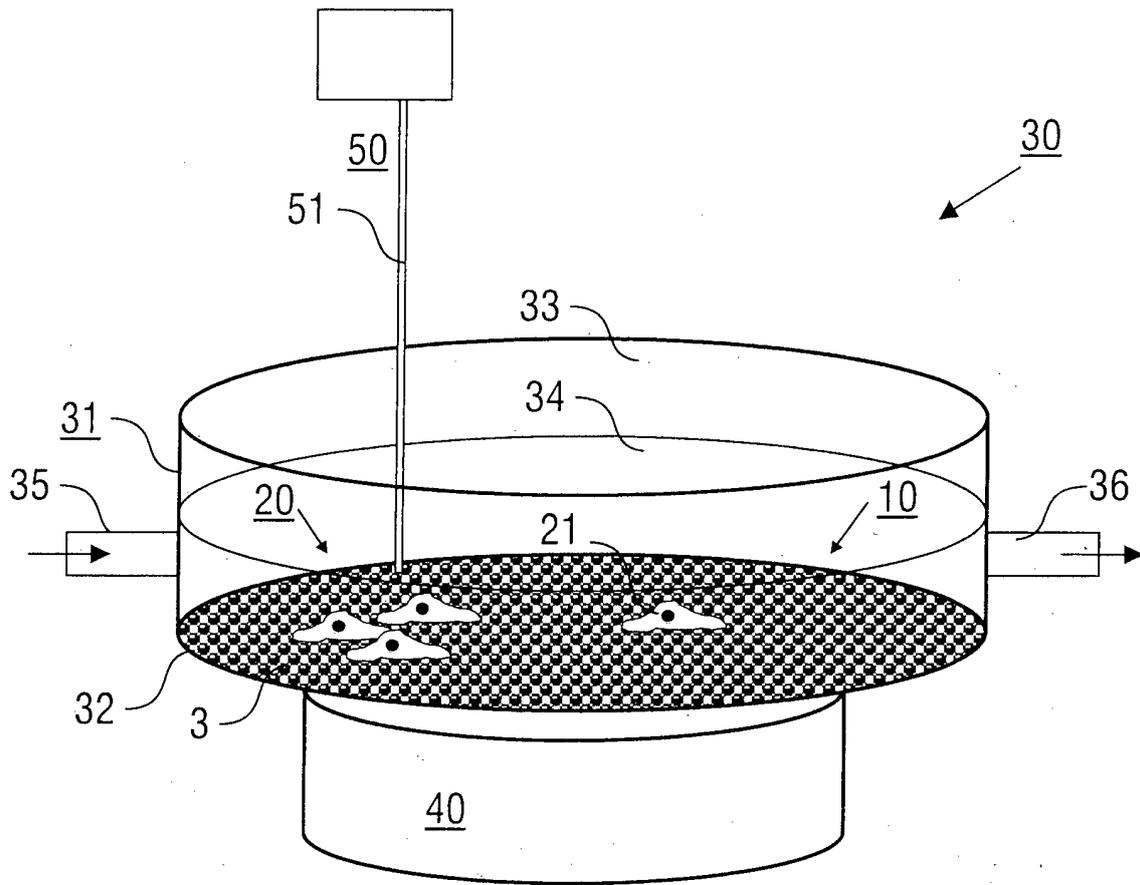


FIG. 9

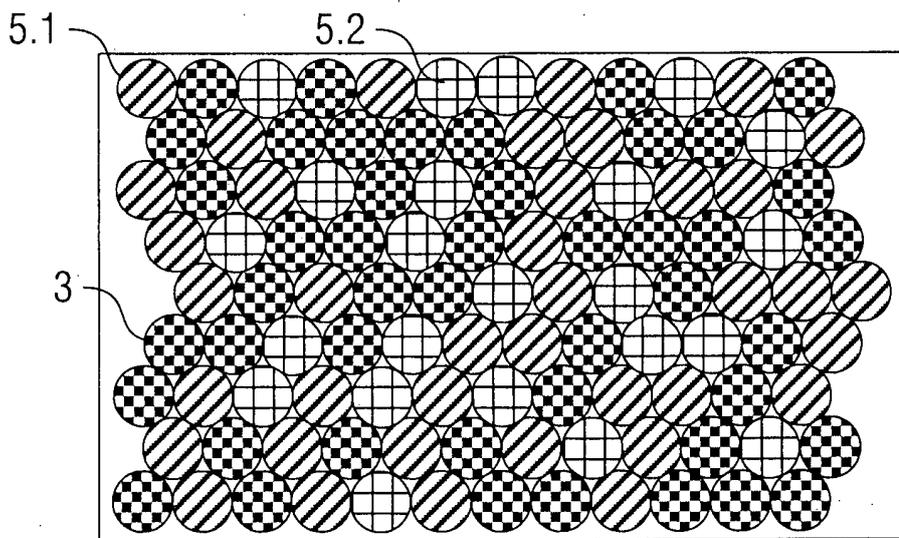


FIG. 10

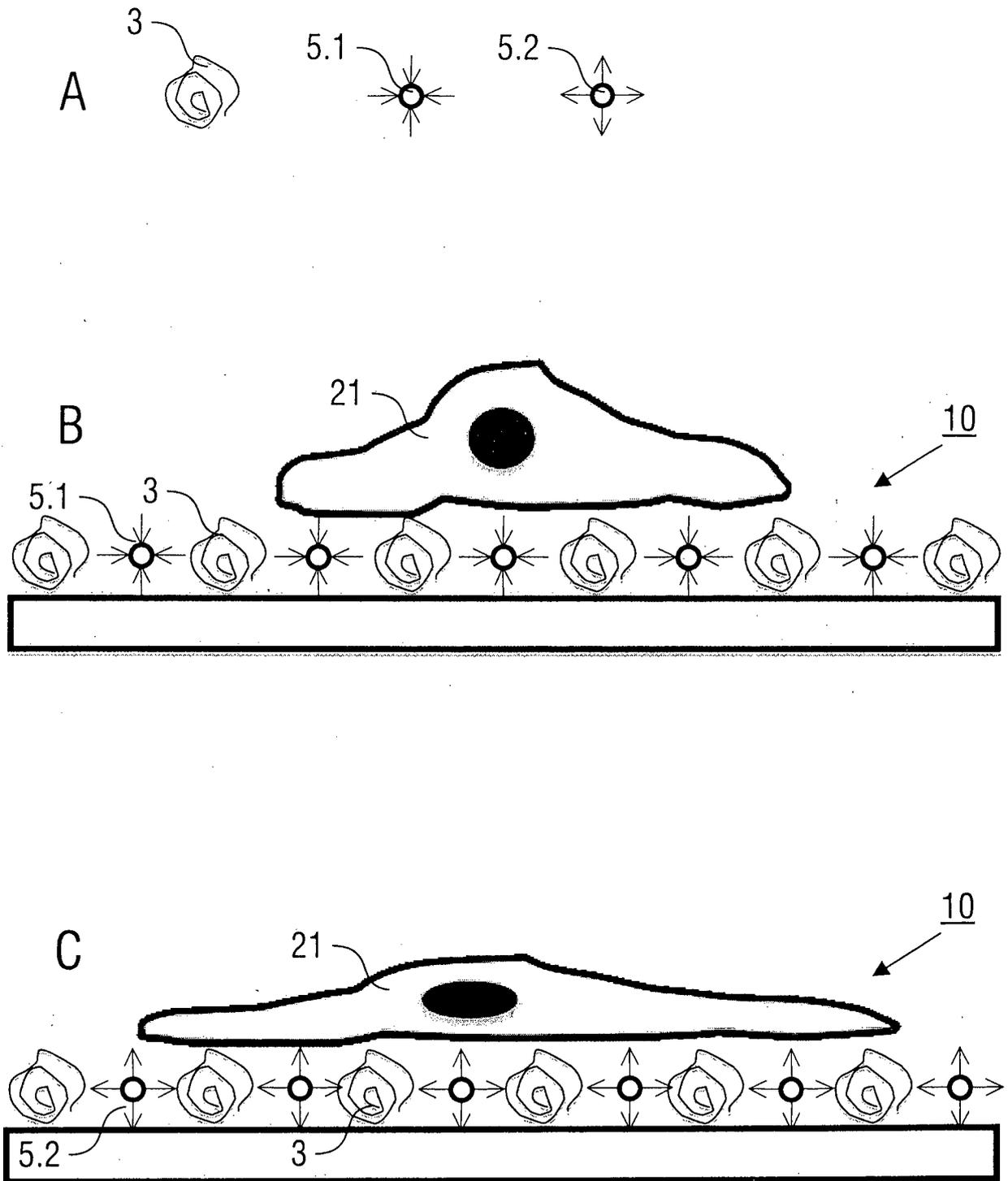


FIG. 11

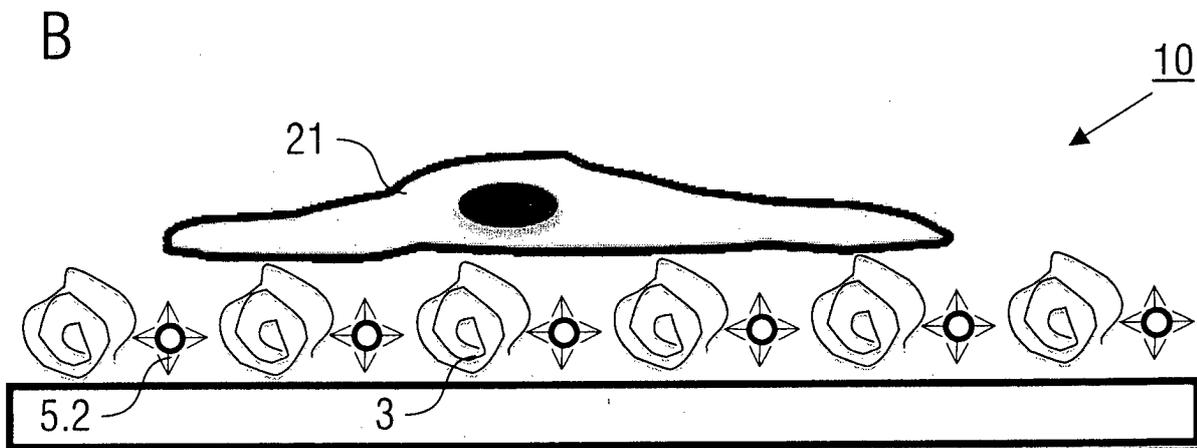
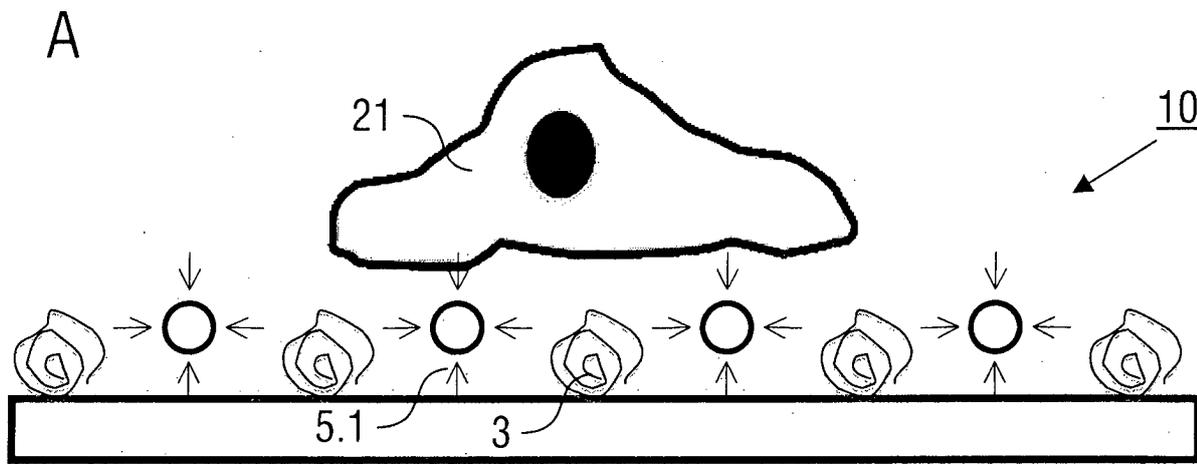


FIG. 12

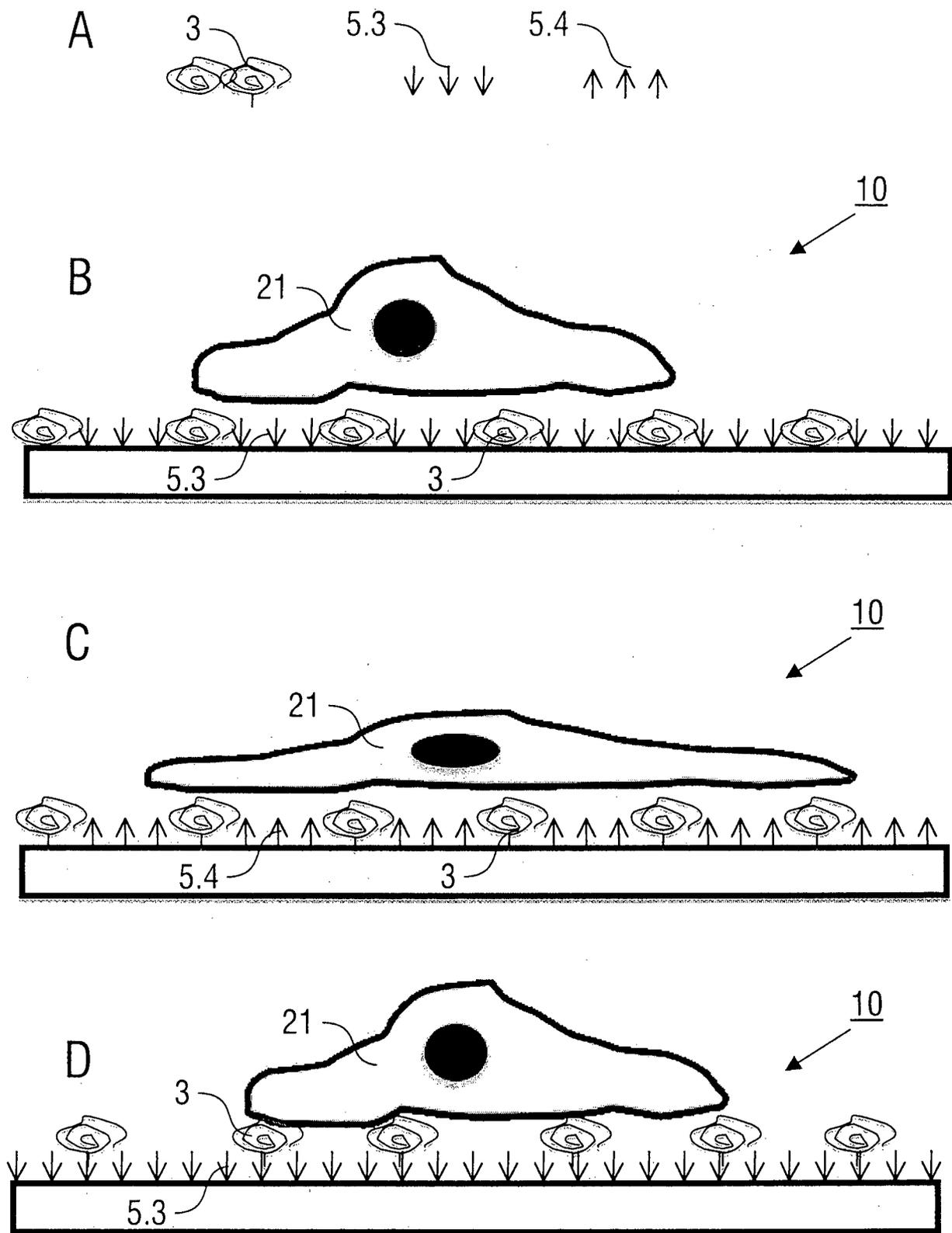
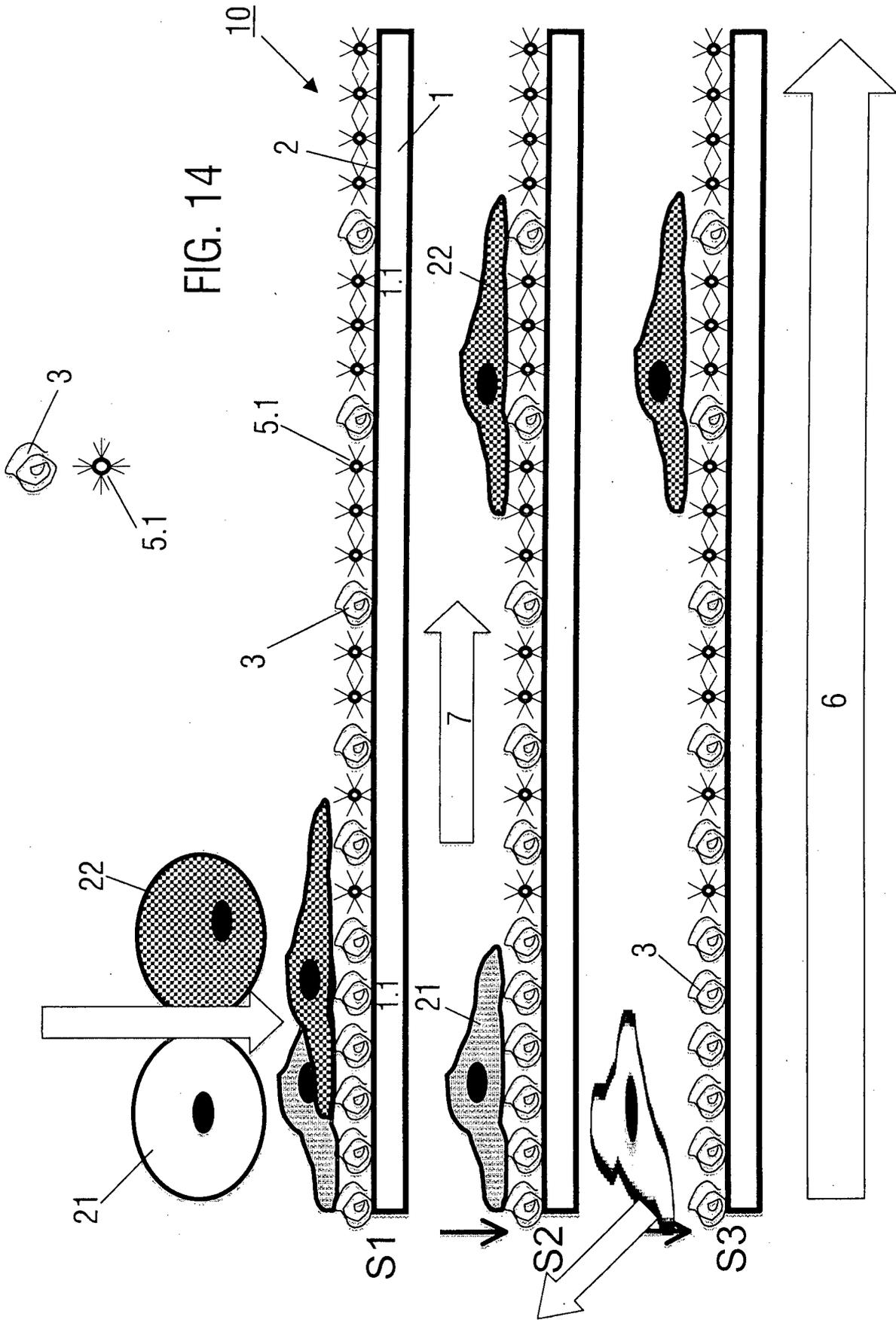
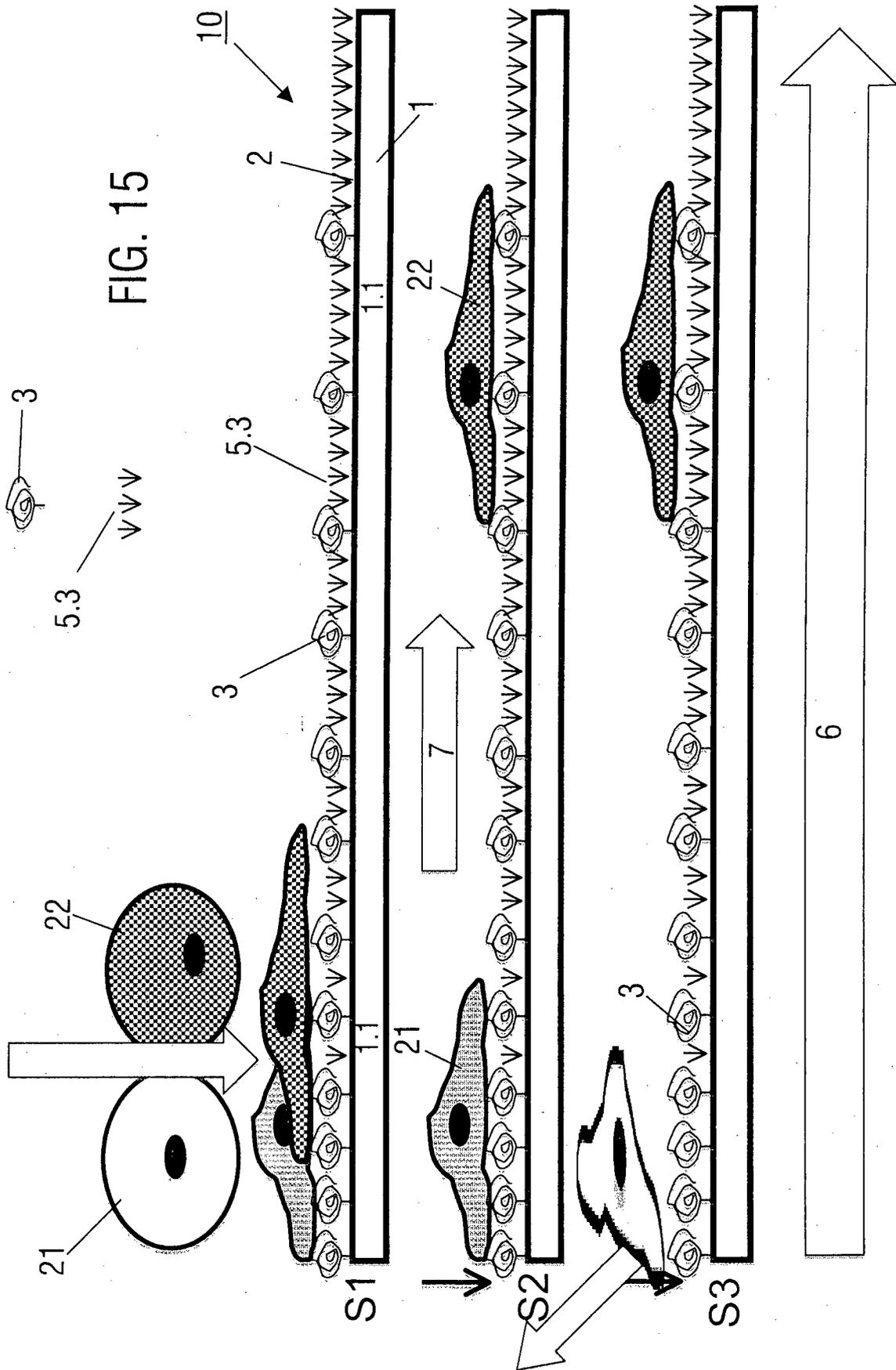
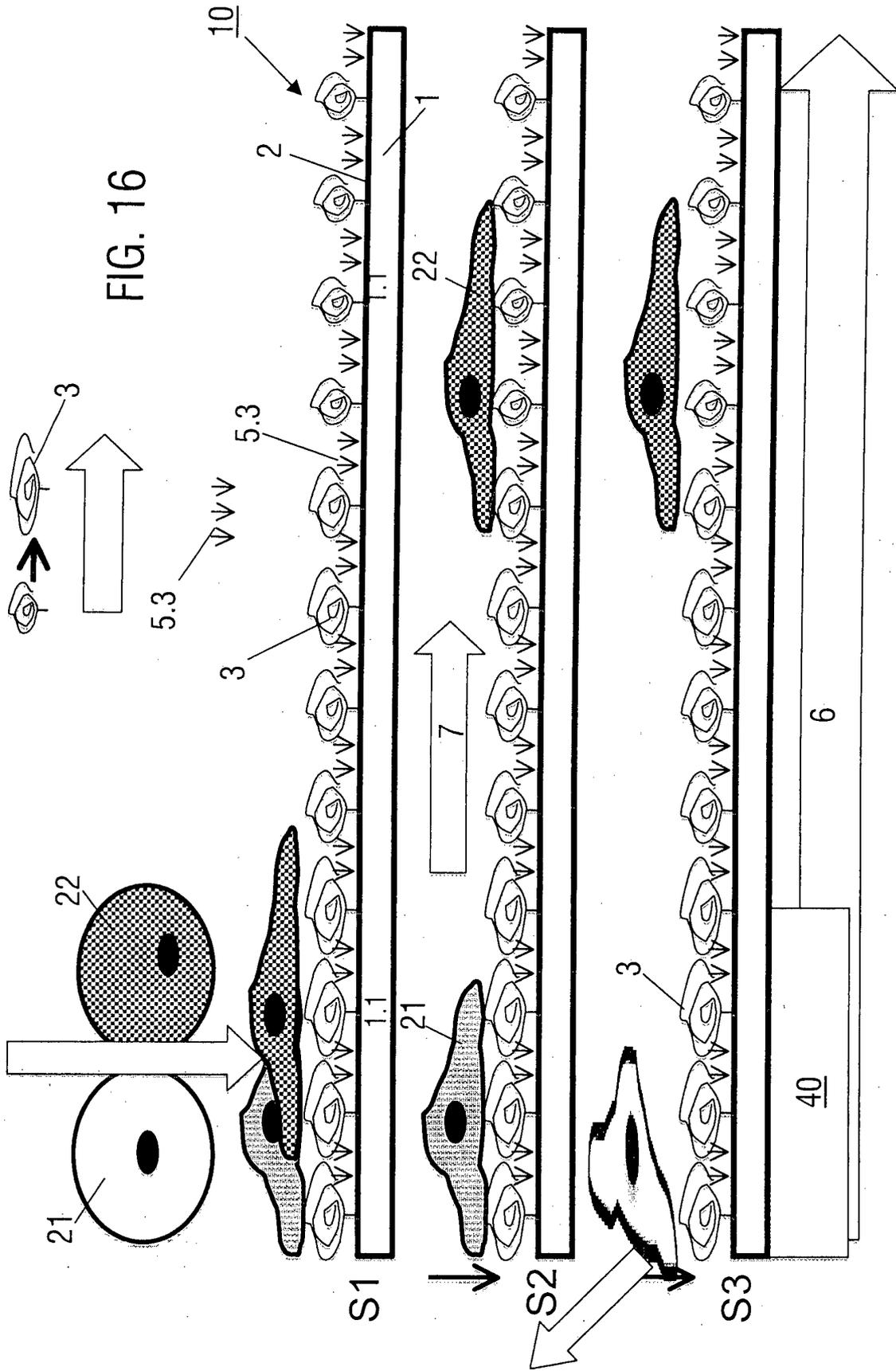


FIG. 13







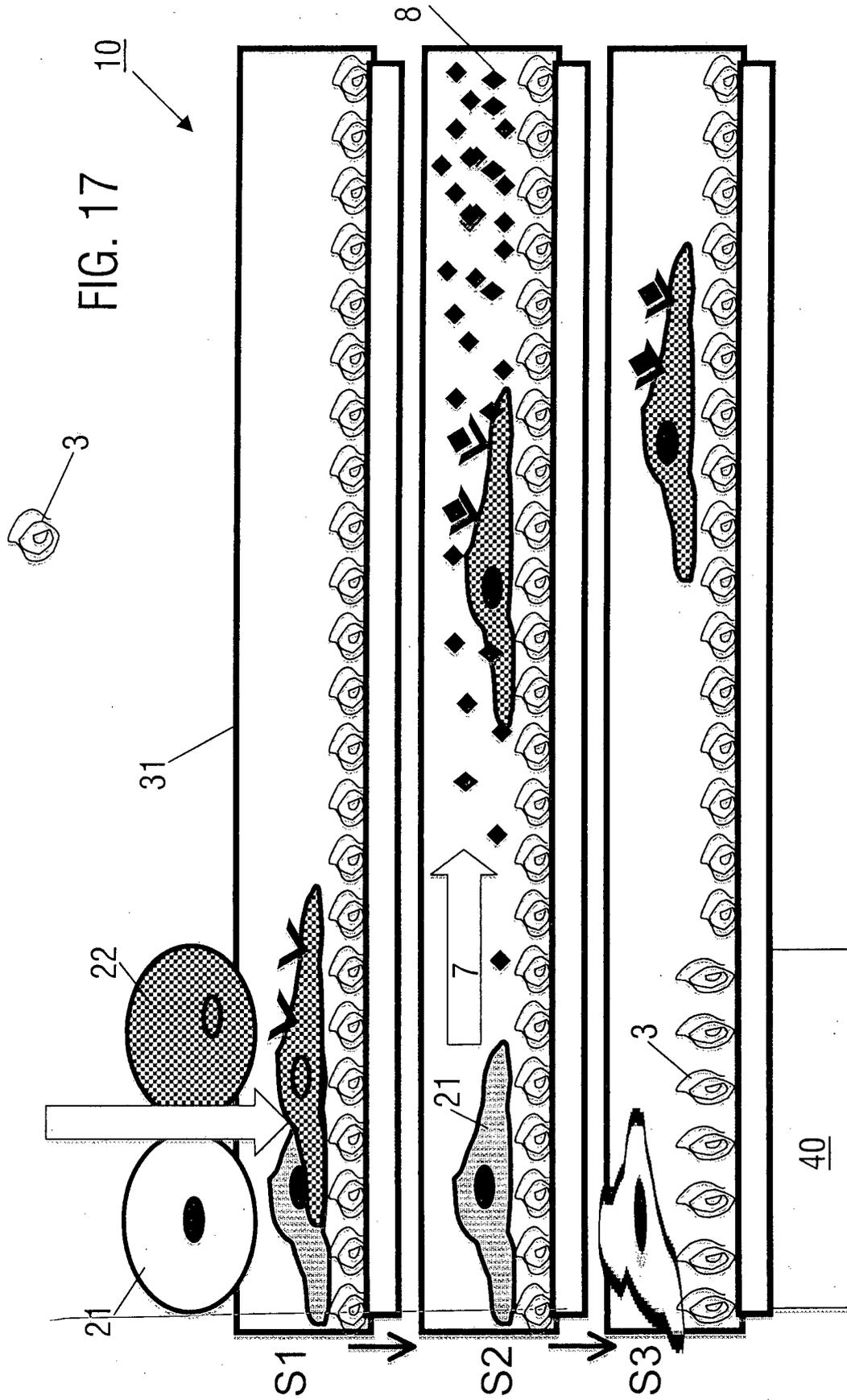


FIG. 18

