

DISS. ETH NO.17551

**SILK FIBROIN SCAFFOLDING FOR GROWTH FACTOR
DELIVERY IN TISSUE REPAIR**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

Doctor of Sciences

presented by

LORENZ UEBERSAX

MSc molecular and cell biology, University Louis Pasteur of Strasbourg
Dipl. Biotech., University of Basel, Strasbourg, Freiburg and Karlsruhe (EUCOR)

born 20.02.1976

Citizen of Thörigen, Bern

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Hans P. Merkle, examiner

PD Dr. Dr. Lorenz Meinel, co-examiner

Prof. Dr. David L. Kaplan, co-examiner

Prof. Dr. Wendelin J. Stark, co-examiner

2008

SUMMARY

For the clinical treatment of tissue defects, biomaterial scaffolds have become an emerging alternative to tissue grafts. They share various advantages over tissue autografts and allografts such as nearly unlimited supply, straightforward sterilization and storage, and make second site surgery unnecessary. However, in contrast to autologous tissue grafts, biomaterials *per se* lack the capacity to deliver intrinsic biological signals that stimulate the self-regeneration of damaged tissue. Growth factors (GFs) are soluble or matrix bound mitogenic and morphogenic factors that control cell proliferation, differentiation and migration during tissue development, regeneration and maintenance. A promising strategy, therefore, to improve the performance of biomaterials for tissue repair, is to endow biomaterial scaffolds with GFs in order to strengthen their biological outcome. Pivotal for the accommodation of GFs in biomaterial scaffolds is the development of suitable technologies that allow for an efficient loading of the scaffolds with GFs and, at the same time, sustain the potency and the release of the GFs *in vivo*. Silk fibroin (SF) derived from the silk worm *Bombyx mori* is an attractive biomaterial to be investigated for its capacity to accommodate GFs, as it exerts excellent biocompatibility, good mechanical strength, slow *in vivo* degradation and a flexible processability.

The extracellular matrix (ECM) of tissues is regarded as a physiological depot for various GFs, from where they are to be released into the surrounding tissue and play their natural roles in tissue regulation. In addition to autocrine and paracrine cell signalling, they provide specific extracellular information necessary to conduct tissue homeostasis and (re)generation. **Chapter I** of this PhD thesis reports on various physiological concepts that have evolved during evolution to control the activity of GFs in a specific manner through interaction with biopolymers of the ECM, and how such interactions may respond to systemic or cellular signals. A fundamental understanding of the extracellular storage of GFs and its control could provide important cues about the nature of GF interactions and improve the potency of current implantable biopolymers for GF delivery in

tissue repair. Therefore, in a second part of this review, nature-derived biopolymers will be discussed with respect to their availability, suitability for scaffolding, mechanical properties, and efficiency to sustain the activity and release of GFs. Furthermore, we will detail on rational modifications and engineering approaches to improve their applicability as delivery systems. In particular, we discuss biotechnology and chemical engineering tools to adapt natural concepts of GF depots for delivery purposes. In conclusion, the engineering of novel biopolymer platforms holds promise to enhance the biological performance of GF loaded artificial tissue substitutes in order to replace autologous and allogeneous tissue grafts for the treatment of critical tissue defects.

In **Chapter II** we introduce a novel scaffolding technology for SF with the aim to fabricate porous scaffolds for skeletal tissue repair allowing for direct accommodation of (chemically and physically sensitive) GFs under comparably mild conditions in an aqueous system. In particular, 3D scaffolds with various pore sizes and interconnectivities were fabricated through freeze drying of aqueous SF solution using paraffin spheres as porogen. Furthermore, their ability was tested to guide *in vitro* bone formation through scaffold architecture. For this purpose human mesenchymal stem cells (hMSC) were seeded onto the scaffolds and cultured under osteogenic conditions in bioreactors. Osteogenic differentiation of hMSC resulted in extensive mineralization, alkaline phosphatase activity, and the formation of interconnected trabecular- or cortical-like mineralized bone-like structures which was governed by the interconnective pore diameters of the SF scaffolds. As a result of the slow biodegradation inherent to silk fibroin, the scaffolds preserved their initial morphology and provided a stable template throughout the mineralization phase of the hMSC, also involving osteogenic differentiation and new extracellular matrix formation. The ability to direct bone morphology via scaffold design suggests a new option in the use of biodegradable scaffolds to control *in vitro* engineered bone tissue outcomes. Moreover, the novel scaffolding process allows for the accommodation of growth factors in the SF matrix during fabrication in an aqueous milieu.

The performance of novel SF scaffolds was further explored upon implantation into drill hole defects in cancellous bone of sheep (**Chapter III**). The goal of this study was to compare biocompatibility and cellular responses to porous SF scaffolds produced by (i) an ultrapurified water based (UPW) process with paraffin microspheres as porogen and (ii) a Hexafluorisopropanol (HFIP) based process using salt crystals as porogen, applying two different SF sources. For this purpose, SF scaffolds with pore sizes between 200 and 300 μm were implanted ($n=6$) into drill hole defects in cancellous sheep bone using tibiae and humeri. The scaffolds were macroscopically and histologically evaluated for biocompatibility, cell-scaffold interactions, cellular ingrowth and new bone formation after 8 weeks post implantation. For semiquantitative evaluation, the investigated parameters were scored and subjected to statistical analysis (ANOVA). All implants showed good biocompatibility as evidenced by low infiltration of inflammatory cells and absence of any encapsulation of the scaffolds into connective tissue. However, multinuclear foreign body giant cells (GCs) and macrophages were present in all parts of the scaffolds and shown to degrade the SF scaffolds. Cell ingrowth and vascularization of the scaffolds were uniform and independent of scaffold type and SF source except for the scaffolds produced by the HFIP process. In fact, HFIP scaffolds exhibited local regions of empty pores throughout their pore structure. The lack of tissue ingrowth into HFIP scaffolds appeared to correspond with their lower pore interconnectivity and interconnective pore diameter as compared to UPW scaffolds, which featured enlarged interconnectivity and interconnective pore diameters and improved osteoconduction indicated by local clusters of trabecular-like bone. Overall, because of slow biodegradation and good biocompatibility, SF scaffolds provide favourable opportunities for osteoconduction.

The improvement of the biological performance of the novel scaffold type through the embedment of growth factors was the aim of **Chapter IV** of this PhD thesis. Growth factor releasing scaffolds are an emerging alternative to autologous or allogeneous implants, providing a biologically active template for tissue

(re)generation. The goal of this study was to evaluate the feasibility of controlled insulin-like growth factor I (IGF-I) releasing silk SF scaffolds in the context of cartilage repair. The impact of manufacturing parameters (pH, methanol treatment and drug load) was correlated with IGF-I release kinetics using ELISA and potency tests. Methanol treatment induced water insolubility of SF scaffolds, allowed the control of bioactive IGF-I delivery and did not affect IGF-I potency. The cumulative drug release correlated linearly with the IGF-I load. To evaluate the chondrogenic potential of the scaffolds, hMSC were seeded on unloaded and IGF-I loaded scaffolds in TGF- β supplemented medium. Indeed, IGF-I loaded scaffolds showed chondrogenic differentiation of hMSC, starting after 2 weeks and more strongly after 3 weeks, whereas no chondrogenic responses were observed on unloaded control scaffolds. IGF-I loaded porous SF scaffolds have the potential to provide chondrogenic stimuli to hMSC. Evidence for *in vivo* cartilage (re)generation needs to be demonstrated by future, pre-clinical proof of concept studies.

Chapter V of this PhD thesis attempts to enlarge the applicability of SF for drug delivery purposes. Its focus is on the co-formulation of nerve growth factor (NGF) and aqueous SF solution to produce GF loaded nerve conduits (NC) aimed at the enhancement of peripheral nerve repair. NC for peripheral nerve repair should guide the sprouting axons and physically protect the axonal cone from any damage. The NC should also degrade after completion of its function to obviate the need of subsequent explantation and should optionally be suitable for controlled drug release of embedded growth factors to enhance nerve regeneration. As a biocompatible and slowly biodegradable biomaterial with excellent mechanical properties SF was assumed to meet the above stated requirements. *In vitro* tests with SF films showed that SF supported the adherence and metabolic activity of PC12 cells, and, in combination with NGF, fostered neurite outgrowth during PC12 cell differentiation. NGF-loaded SF-NC were prepared from aqueous solutions of NGF and SF (20%, w/w), which were air-dried or freeze-dried (freezing at -20 °C or -196 °C) in suitable molds. NGF release from the three

differently prepared SF-NC was prolonged over at least three weeks, but the total amount released depended on the drying procedure of the NC. The potency of released NGF was retained in all formulations. Validation experiments with differently dried NGF-lactose solutions presented no evidence for marked protein aggregation (SEC, HPLC), loss of ELISA-reactivity, or lack of PC12 cell bioactivity. Our study encourages a further exploitation of SF-NC for growth factor delivery and evaluation in peripheral nerve repair.

In the last experimental chapter (**Chapter VI**) this PhD thesis further expands the use of SF as prospective biomaterial for the encapsulation of therapeutic cells into semipermeable, biodegradable bioreactors. Adenosine kinase deficient (*Adk*^{-/-}) embryonic stem cells (ESC) encapsulated in synthetic polymers have previously been shown to provide therapeutic adenosine release and transient seizure suppression in epileptic rats. However, the previously used polymers were not biodegradable and would need to be explanted after the cells have lost their function. SF could be an ideal material to support the long term delivery of adenosine produced by encapsulated cells, as the material is highly permeable for nutritional components such as glucose and degrades slowly but completely after implantation. To assess the suitability of SF for this purpose, different materials were studied: (1) type I collagen (Col-1), (2) silk-fibroin (SF), and (3) poly(L-ornithine) (PO) coated tissue culture plastic. *Adk*^{-/-} or wild type (wt) ESC-derived glial precursor cells were seeded on these substrates and cultured either in proliferation medium containing GFs or in differentiation medium devoid of growth factors. In proliferation medium cell proliferation was higher and metabolic activity lower on Col-1 and PO substrates as compared to SF. Cells from both genotypes readily differentiated into astrocytes after growth factor removal on all substrates. *Adk*^{-/-} cells cultured on SF or PO released significantly more adenosine than their wt counterparts at all developmental stages. Adenosine release was similar on SF and PO substrates and the amounts released from *Adk*^{-/-} cells (>20 ng/ml) were considered to be of therapeutic relevance. Taken together, these results suggest that silk matrices are particularly suitable biomaterials for

ESC encapsulation and for the design of adenosine releasing bioreactors for the treatment of epilepsy. Such a strategy could further help to engineer sustained delivery systems for cell mediated therapies with small pharmaceuticals.

ZUSAMMENFASSUNG

Medizinprodukte aus Biomaterialien stellen für die klinische Behandlung von Gewebedefekten eine wachsende Alternative zur Transplantation von autologen Geweben dar. Solche Gerüste aus Biomaterialien stehen fast unbeschränkt zur Verfügung und können einfach sterilisiert und gelagert werden. Ihr Einsatz erübrigt die sonst notwendige chirurgische Entnahme von Gewebe aus einer gesunden Körperpartie. Im Gegensatz zu autologen Gewebe besitzen Biomaterialien jedoch keine biologisch aktiven Signale, welche die Regeneration von beschädigtem Gewebe anregen können. Solche Signale sind beispielsweise gelöste oder an die extrazelluläre Matrix (EZM) gebundene Wachstumsfaktoren (WF) mit mitogener und mutagener Aktivität, welche die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen während der Entwicklung, Regeneration und Erhaltung von Geweben kontrollieren. Das Beladen von Biomaterialien mit WF stellt deshalb eine vielversprechende Strategie dar, die Effizienz der Reparatur des Gewebes zu steigern und somit die biologische Wirkung des künstlichen Gewebeersatzmaterials zu verbessern. Die erfolgreiche Einbettung von WF in Implantaten aus Biomaterialien benötigt geeignete Technologien, die eine effiziente Beladung mit WF ermöglichen und die Wirksamkeit des WFs während der Produktion, Lagerung und Freisetzung *in vivo* gewährleisten. Seidenfibroin (SF) vom Kokon des Seidenwurms *Bombyx mori* erscheint aufgrund seiner ausgezeichneten Biokompatibilität, seines langsamen Abbaus im Körper und seiner hervorragenden mechanischen Eigenschaften und flexiblen Verarbeitungsweise ein attraktives Trägermaterial für WF.

Die extrazelluläre Matrix (EZM) von Geweben kann als ein physiologisches Depot unterschiedlicher WF betrachtet werden, die in das umgebende Gewebe freigesetzt werden können, um ihre natürliche Funktion in der Geweberegulierung auszuüben. Zusätzlich zur autokrinen und parakrinen Signalgebung an Zellen steuern die in der EZM gespeicherten WF auch die Gewebemöostase. **Kapitel 1** dieser Dissertation beschreibt physiologische Konzepte, die sich während der Evolution entwickelt haben, um die Aktivität von

WF durch die Interaktion mit Biopolymeren der EZM spezifisch zu kontrollieren; das Kapitel zeigt auf, wie solche Interaktionen auf zelluläre und physiologische Signale reagieren können. Ein grundlegendes Verständnis der extrazellulären Speicherung von WF könnte wichtige Hinweise über die Natur der WF/EZM/Bipolymer-Interaktionen liefern und damit implantierbare biopolymere Gewebeersatzmaterialien mit verbesserten Eigenschaften und optimaler WF-Freisetzung ermöglichen. Im zweiten Teil dieser Übersicht werden natürliche Biopolymere bezüglich ihrer Verfügbarkeit, ihrer mechanischen Eigenschaften und ihrer Eignung zur Herstellung von Biopolymergerüsten beschrieben. Die Fähigkeit verschiedener Biopolymergerüste, die Aktivität von WF während einer verlängerten Freisetzung zu gewährleisten, wird hier besonders erörtert. WF-Freisetzungssysteme können beispielsweise durch rationale chemische Modifikationen existierender oder durch die Entwicklung neuartiger Biopolymeren verbessert werden. In diesem Zusammenhang erscheinen die biotechnologischen und chemischen Methoden erwähnenswert, welche natürliche Konzepte der WF-Speicherung für die Freisetzung aus Biopolymersystemen adaptieren. Die Steigerung der biologische Wirksamkeit von WF-beladenen künstlichen Gewebeersatzmaterialien durch die Entwicklung neuer Biopolymer-Plattformen stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, in Zukunft autologe und allogene Gewebetransplantate für die Behandlung kritischer Gewebedefekte zu ersetzen.

In **Kapitel II** stellen wir eine neue Technologie zur Herstellung von porösen SF Knochenimplantaten vor. Die Technologie ermöglicht, chemisch und physikalisch empfindliche WF in wässriger Lösung und unter vergleichbar milden Bedingungen in SF-Matrizen einzubetten. Gerüste mit verschiedenen Porengrößen und Durchmessern der Porenverbindungen wurden hergestellt. Die SF-Gerüste wurden mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSZ) besiedelt und in Bioreaktoren unter knocheninduzierenden Bedingungen inkubiert. Die zentrale wissenschaftliche Fragestellung dieser Arbeit lautete, ob und in welchem Ausmass die Gerüstarchitektur der SF Matrizen die Knochenneubildung *in vitro*

steuern kann. Die osteogene Differenzierung von hMSZ führte zu ausgiebiger Mineralisierung und Alkalinphosphataseaktivität; zudem entwickelten sich trabekuläre oder kortikale knochenähnliche Strukturen, die anhand der Durchmesser der Porenverbindungen charakterisiert wurden. Dank des langsamen Abbaus des SF-Materials behielten die SF-Gerüste ihre ursprüngliche Architektur bei und boten den Stammzellen eine stabile Unterlage für die Mineralisierung während ihrer osteogenen Differenzierung. Unser Ansatz, Gewebestrukturen durch unterschiedliche Gerüstarchitekturen zu steuern, sollte die Nachbildung komplexer Gewebemorphologien ermöglichen. Zudem erlaubt das neue Herstellungsverfahren, WF in wässriger Lösung direkt während des Fabrikationsprozesses in Matrizen einzubetten.

Die neuen SF-Gerüste wurden dann *in vivo* auf ihre Biokompatibilität und knochenbildende Eigenschaften untersucht. Dazu wurden SF-Matrizen in Bohrlochdefekte in der Spongiosa von Schafen implantiert (**Kapitel III**). Die porösen SF-Gerüste mit einheitlichen Porengrößen zwischen 200-300 µm wurden auf zwei unterschiedliche Arten hergestellt: (i) aus einer wässrigen SF-Lösung und unter Verwendung von Paraffinkugeln definierter Größe als Porogen; (ii) aus einer SF-Lösung in Hexafluorisopropanol und unter Verwendung von Salzkristallen definierter Größe als Porogen. Die Implantate wurden zudem aus zwei Seiden unterschiedlicher Herkunft hergestellt. Die SF-Gerüste wurden in Bohrlochdefekte der Tibia und des Humerus von Schafen implantiert (n=6). Die Zellreaktionen auf die SF-Implantate wurden nach 8 Wochen makroskopisch und histologisch auf Biokompatibilität, Zell-Gerüst-Interaktion, Einwachsen von Zellen und Knochenbildung untersucht. Die ausgewählten Parameter wurden nach dem Ausmass der jeweiligen Zellreaktion in verschiedene Kategorien eingeteilt und daraus gewonnene semiquantitative Resultate statistisch analysiert (ANOVA). Die geringe Zahl von Entzündungszellen und das Fehlen makroskopischer Anzeichen einer Entzündung, wie beispielsweise das Einkapseln von Implantat in fibröses Bindegewebe, bestätigten die gute Biokompatibilität aller SF-Implantate. Multinukleäre Fremdkörper-Riesenzellen und Makrophagen waren trotz der guten

Biokompatibilität in allen Teilen der Gerüste präsent und bauten das SF-Material aktiv ab. Blutgefässe und Gewebe wuchsen, unabhängig vom Gerüsttyp, gleichmässig in diejenigen SF-Implantate ein, die aus wässriger SF-Lösung hergestellt wurden. In den porösen SF-Strukturen waren lokale Regionen mit leeren Poren jedoch überall erkennbar. Die Implantate, die aus Hexafluorisopropanol-Lösung hergestellt wurden, zeigten hingegen Bereiche mit geringem Einwachsen von Blutgefässen und Gewebezellen, was möglicherweise mit der geringeren Interkonnektivität und kleineren Durchmesser der Porenverbindungen zusammenhängt. Der grosse Durchmesser der Porenverbindungen in den SF-Gerüsten, die aus wässrigen Lösungen hergestellt wurden, erwies sich als entscheidend für die verbesserte Osteokonduktivität, welche vereinzelte Clusterbildung aus trabekulärem Knochen ermöglichte. Der langsame Abbau und die gute Biokompatibilität der SF-Gerüste begünstigten zudem die Osteokonduktivität *in vivo*.

Gegenstand von **Kapitel IV** ist die Verbesserung der biologischen Wirksamkeit der neuen SF-Gerüste durch Einbettung von WF. WF freisetzende Implantate stellen eine wachsende Alternative zu autologen und allogenen Geweben dar, da sie ein biologisch wirksames Substrat für die Geweberegeneration bereitstellen können. Ziel dieser Studie war die kontrollierte Freigabe von Insulin ähnlichem Wachstumsfaktor (IGF-I) aus SF-Gerüsten im Hinblick auf Anwendbarkeit in der Knorpelregeneration. Die Auswirkung von Prozessparametern wie pH der wässrigen SF-Lösung, Methanolbehandlung der SF-Gerüste und der Gehalt an IGF-I auf die IGF-I-Freisetzungs kinetik wurden mittels ELISA und Bioaktivitätstests analysiert. Die Methanolbehandlung machte die SF-Gerüste wasserunlöslich und verlängerte dadurch die Freisetzungsdauer von bioaktivem IGF-I, ohne jedoch dessen Bioaktivität zu beeinträchtigen. Die nach 29 Tagen insgesamt freigesetzte Menge IGF-I korrelierte linear mit der initialen IGF-I-Beladung der SF-Gerüste. Die Bedeutung der IGF-I-Freisetzung für die Chondrogenese wurde mit hMSZ geprüft, die auf IGF-I beladenen (40 µg pro ml SF-Lösung) und unbeladenen SF-Gerüsten in TGF-β enthaltendem Medium

kultiviert wurden. Auf mit IGF-I beladenen Gerüsten begann die chondrogene Differenzierung der hMSZ bereits nach 2 Wochen und verstärkte sich noch in der 3. Woche. Dagegen zeigte sich auf unbeladenen Gerüsten keine Chondrogenese der hMSZ. Folglich besitzen mit IGF-I beladene SF-Gerüste das Potenzial die Chondrogenese von hMSZ durch die kontinuierliche Freisetzung von IGF-I zu unterstützen.

Kapitel V dieser Dissertation befasst sich mit einem weiteren möglichen Anwendungsbereich von SF als Freisetzungssystem für Proteinwirkstoffe. Aus SF-Lösungen mit darin gelöstem nerve growth factor (NGF) gelang es, SF-Nervenleitkanäle (NK) herzustellen, die die Reparatur von durchtrennten oder beschädigten peripheren Nerven fördern sollten. NK aus Kollagen werden bereits klinisch zur Reparatur von peripheren Nerven eingesetzt. NK leiten die aus dem proximalen Nervenende austreibenden Axone in die gewünschte Richtung und schützen gleichzeitig den Wachstumskonus des Nervs vor Beschädigungen durch Kompression. Um eine später zwingende Explantation zu vermeiden, sollten NK sich nach der Nervenreparatur abbauen. Neuere Konzepte zielen auf NK, die eingebettete WF kontrolliert freisetzen können. Aufgrund der guten Biokompatibilität, dem langsamen Abbau und den hervorragenden mechanischen Eigenschaften von SF erscheint dieses Material für NK besonders geeignet. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigten, dass SF-Filme das Anhaften und die metabolische Aktivität von PC12-Zellen unterstützen und, in Kombination mit löslichem NGF, das Auswachsen von Neuriten während deren Differenzierung ermöglichen. Mit NGF beladene SF-NK wurden durch Lufttrocknen oder Gefriertrocknen (Einfriertemperatur -20 °C oder -196 °C) einer NGF enthaltenden, wässrigen SF-Lösung (20%, w/w) in einer geeigneten Form hergestellt. Die drei unterschiedlichen SF-NK setzten den eingebetteten NGF über mindestens 3 Wochen frei, wobei die total freigesetzte Menge von der jeweiligen Trocknungsmethode abhängig war. Die biologische NGF-Aktivität blieb in allen Formulierungen erhalten. Als Kontrolle wurde NGF in Laktose-Lösung unter identischen Trocknungsbedingungen verarbeitet und danach auf Stabilität

untersucht. Die Ergebnisse zeigten weder wesentliche Proteinaggregate (SEC, HPLC) noch Verlust an ELISA-Aktivität oder Bioaktivität. Die Ergebnisse ermutigen zu *in vivo* Experimenten, um die mit NGF beladenen SF-NK hinsichtlich einer Beschleunigung des peripheren Nervenwachstums am Tier zu untersuchen.

Das letzte experimentelle Kapitel (**Kapitel VI**) befasst sich mit der Anwendung von SF als Biomaterial zur Verkapselung therapeutischer Zellen in einem semipermeablen, bioabbaubaren Bioreaktor. Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass embryonale adenosinkinase-defiziente Stammzellen (Adk-/-ES), die in synthetische Polymere verkapselt waren, Adenosin in therapeutischen Dosen freisetzen und dadurch epileptische Anfälle in Ratten unterdrücken können. Die dabei verwendeten synthetischen Materialien waren jedoch nicht degradierbar und mussten wieder explantiert werden, als die Funktion der eingekapselten Zellen erschöpft war. In unserer Arbeit betrachteten wir SF als geeignetes Material für die Verkapselung von Zellen und die verlängerte Freisetzung von Adenosin, welches durch die verkapselten Zellen produziert wurde. SF ist nämlich für Nährstoffe wie Glucose sehr gut permeabel und baut sich sehr langsam aber vollständig im Körper ab. Um die Anwendbarkeit von SF für diesen Zweck zu evaluieren, wurden zuerst unterschiedliche Materialien als Substrate für die Kultivierung von glialen Adk-/- und Vorläuferzellen vom Wildtyp (wt) verglichen: (i) Kollagen Typ I (Kol-I), (ii) SF, und (iii) Poly(L-Ornithin) (PO), alle jeweils als Filmschicht auf Zellkulturplatten. Die Zellproliferation war in Proliferationsmedium generell erhöht, die metabolische Aktivität auf Kol-I und PO jedoch geringer als auf SF. Die Differenzierung der Vorläuferzellen in Astrozyten erfolgte auf allen drei Substraten, unabhängig von den verwendeten Genotypen. Zur Bestimmung der Adenosinfreisetzung wurden die beiden ES-Zell-Genotypen auf SF und PO kultiviert. In jedem Entwicklungsstadium der Zellen war die von Adk-/- ES-Zellen freigesetzte Menge Adenosin gegenüber wt-Zellen auf beiden Substraten (SF und PO) signifikant erhöht und konnte in beiden Fällen als therapeutisch relevant eingestuft werden (>20 ng/ml). Diese Resultate zeichnen

SF als ein besonders geeignetes Biomaterial zur Verkapselung von Adenosin freisetzenden ES-Zellen aus. Auf der Grundlage dieser Arbeit könnten möglicherweise Bioreaktoren zur Behandlung von Epilepsie entwickelt werden. Generell sollte die hier erarbeitete Strategie die Entwicklung neuer Systeme ermöglichen, welche niedermolekulare Arzneistoffe lokal und zeitlich verlängert freisetzen.