

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen von künstlichem Skelettmuskelgewebe aus pluripotenten Stammzellen, umfassend die Schritte
 - (i) Induzieren von Mesodermdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen durch Kultivieren von pluripotenten Stammzellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) FGF2, (b) einem GSK3-Inhibitor, (c) einem SMAD-Inhibitor, und (d) einem serumfreien Zusatz, welcher Transferrin, Insulin, Progesteron, Putrescin und Selen oder ein bioverfügbares Salz davon umfasst;
 - (ii) Induzieren der myogenen Spezifikation durch Kultivieren der in Schritt (i) erhaltenen Zellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) FGF2, und (c) einem serumfreien Zusatz wie in (i), gefolgt von Fortsetzen der Kultivierung in dem Medium unter Zugabe einer wirksamen Menge von (d) HGF, gefolgt von Kultivieren der Zellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) HGF, (c) einem serumfreien Zusatz wie in (i), und (d) Knockout serum replacement (KSR);
 - (iii) Expansion und Maturieren der Zellen in Skelettmyoblasten und Satellitenzellen durch Kultivieren der in Schritt (ii) erhaltenen Zellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) HGF, (b) einem serumfreien Zusatz wie in (i), und (c) Knockout serum replacement (KSR);
 - (iv) Maturieren der Zellen zu Skelettmyotuben und Satellitenzellen durch Kultivieren der in Schritt (iii) erhaltenen Zellen, die in einer extrazellulären Matrix dispergiert sind, unter mechanischer Stimulation in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) einem serumfreien Zusatz wie in Schritt (i) und (b) einem zusätzlichen serumfreien Zusatz, welcher Albumin, Transferrin, Ethanolamin, Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, L-Carnitin, Fettsäurezusatz, und Triiod-L-Thyronin (T3) umfasst;
- dadurch Erzeugen von künstlichem Skelettmuskelgewebe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz eine Kontraktionskraft von mindestens 0,6 Millinewton (mN) erzeugt, bevorzugt mindestens 0,7 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,8 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,9 mN, stärker bevorzugt mindestens 1 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,2 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,3 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,4 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,5 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,6 mN, stärker

bevorzugt mindestens 1,7 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,8 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,9 mN, und am stärksten bevorzugt mindestens 2 mN erzeugt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die pluripotenten Stammzellen aus Primatenursprung, insbesondere humane pluripotente Stammzellen sind; und/oder wobei die pluripotenten Stammzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen, embryonalen Stammzellen, parthenogenetischen Stammzellen, über Kerntransfer hergestellten pluripotenten Stammzellen und über chemische Reprogrammierung hergestellten pluripotenten Zellen ausgewählt sind, insbesondere wobei die pluripotenten Stammzellen induzierte pluripotente Stammzellen sind.
4. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-3, wobei Schritt (i) für 24 bis 132 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 48 bis 120 Stunden, stärker bevorzugt für 60 bis 114 Stunden, noch stärker bevorzugt für 72 bis 108 Stunden, stärker bevorzugt für 84 bis 102 Stunden und am stärksten bevorzugt für etwa 96 Stunden durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-4, wobei in Schritt (i) der GSK3-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CHIR99021, CHIR98014, SB216763, TWS119, Tideglusib, SB415286, 6-bromoindirubin-3-oxime und einem Valproatsalz, bevorzugt wobei der GSK3-Inhibitor CHIR99021 ist; und /oder wobei in Schritt (i) der SMAD-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus LDN193189, K02288, LDN214117, ML347, LDN212854, DMH1, ausgewählt ist, bevorzugt wobei der SMAD Inhibitor LDN193189 ist.
6. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-5, wobei in Schritt (i) die wirksame Menge von FGF2 1-15 ng/ml beträgt, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 10 ng/ml beträgt; und/oder der serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von 50-500 µg/ml Transferrin, 1-20 µg/ml Insulin, 0,001-0,1 µg/ml Progesteron, 5-50 µg/ml Putrescin und 6-600 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, insbesondere Natriumselenit, in dem Medium bereitstellt, und/oder der GSK3-Inhibitor CHIR99021 ist, und die wirksame Menge 1-20 µM beträgt, bevorzugt 2-19 µM, stärker bevorzugt 3-18 µM, noch stärker bevorzugt 4-17 µM, noch stärker bevorzugt 5-16 µM, noch stärker bevorzugt 6-15 µM, noch stärker bevorzugt 7-14

- μM, noch stärker bevorzugt 7.5-13 μM, noch stärker bevorzugt 8-12 μM, noch stärker bevorzugt 9-11 μM, und am stärksten bevorzugt etwa 10 μM beträgt; und/oder der SMAD-Inhibitor LDN193189 ist, und die wirksame Menge 0,05-5 μM beträgt, bevorzugt 0,1-2,5 μM, stärker bevorzugt 0,2-1 μM, noch stärker bevorzugt 0,25-0,8 μM, noch stärker bevorzugt 0,3-0,75 μM, noch stärker bevorzugt 0,35-0,7 μM, noch stärker bevorzugt 0,4-0,6 μM, noch stärker bevorzugt 0,45-0,55 μM, und am stärksten bevorzugt etwa 0,5 μM beträgt.
- 5
7. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-6, wobei der serumfreie Zusatz in Schritt (i) 0,1-10% (v/v) N2-Zusatz, bevorzugt 0,3-7,5% (v/v) N2-Zusatz, stärker bevorzugt 0,5-5% (v/v) N2-Zusatz, stärker bevorzugt 0,75%-2% (v/v) N2-Zusatz, stärker bevorzugt 0,9%-1,2% (v/v) N2-Zusatz, und am stärksten bevorzugt etwa 1% (v/v) N2-Zusatz ist.
- 10
8. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-7, wobei das Basalmedium in Schritt (i), Schritt (ii), Schritt (iii) und/oder in Schritt (iv) ausgewählt ist aus DMEM, DMEM/F12, RPMI, IMDM, alphaMEM, Medium 199, Hams F-10, Hams F-12, wobei das Basalmedium bevorzugt DMEM ist, insbesondere wobei das Basalmedium mit Pyruvat und/oder nicht-essentiellen Aminosäuren ergänzt ist, und/oder 1 g/l Glukose umfasst.
- 15
9. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-8, wobei in Schritt (ii) die Kultivierung in Gegenwart von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) FGF2, und (c) dem serumfreien Zusatz für 36 bis 60 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 42 bis 54 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 48 Stunden durchgeführt wird; und/oder
- 20
- die Kultivierung in Gegenwart von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) FGF2, (c) dem serumfreien Zusatz und (d) HGF für 36 bis 60 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 42 bis 54 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 48 Stunden durchgeführt wird; und/oder
- 25
- die Kultivierung in Gegenwart von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) HGF, (c) dem serumfreien Zusatz, und (d) Knockout serum replacement (KSR) für 72 bis 120 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 76 bis 114 Stunden, stärker bevorzugt für 84 bis 108 Stunden, noch stärker bevorzugt für 90 bis 102 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 96 Stunden durchgeführt wird.
- 30
10. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-9, wobei in Schritt (ii) der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe DAPT, RO4929097, Se-
- 35

magacestat (LY450139), Avagacestat (BMS-708163), Dibenzazepine (YO-01027), LY411575, IMR-1, L685458, bevorzugt wobei der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor DAPT ist.

- 5 11. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-10, wobei in Schritt (ii) die wirksame Menge von FGF2 15-30 ng/ml beträgt, bevorzugt 17,5-25 ng/ml, stärker bevorzugt 18-22 ng/ml, noch stärker bevorzugt 19-21 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 20 ng/ml beträgt; und/oder
- 10 die wirksame Menge von HGF 1-15 ng/ml beträgt, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 10 ng/ml beträgt; und/oder
- 15 der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor DAPT ist, und die wirksame Menge 1-20 μ M beträgt, bevorzugt 2-19 μ M, stärker bevorzugt 3-18 μ M, noch stärker bevorzugt 4-17 μ M, noch stärker bevorzugt 5-16 μ M, noch stärker bevorzugt 6-15 μ M, noch stärker bevorzugt 7-14 μ M, noch stärker bevorzugt 7,5-13 μ M, noch stärker bevorzugt 8-12 μ M, noch stärker bevorzugt 9-11 μ M, und am stärksten bevorzugt etwa 10 μ M beträgt; das KSR in einer Menge von 5-20% (v/v), bevorzugt 6-17,5% (v/v), stärker bevorzugt 7-15% (v/v), stärker bevorzugt 8%-12% (v/v), stärker bevorzugt 9%-11% (v/v), und
- 20 am stärksten bevorzugt etwa 10% (v/v) KSR verwendet wird; insbesondere wobei das KSR in Gegenwart eines Reduktionsmittels wie beta-Mercaptoethanol und/oder alpha-Thioglycerol verwendet wird.
- 25 12. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-11, wobei in Schritt (iii) die wirksame Menge von HGF 1-15 ng/ml beträgt, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 10 ng/ml beträgt; und/oder
- 30 das KSR in einer Menge von 5-20% (v/v), bevorzugt 6-17,5% (v/v), stärker bevorzugt 7-15% (v/v), stärker bevorzugt 8%-12% (v/v), stärker bevorzugt 9%-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10% (v/v) KSR verwendet wird; insbesondere wobei das KSR in Gegenwart eines Reduktionsmittels wie beta-Mercaptoethanol und/oder alpha-Thioglycerol verwendet wird.
- 35 13. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-12, wobei in Schritt (iv) der zusätzliche serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von 0,5-50 mg/ml Albumin, 1-100 μ g/ml Transferrin, 0,1-10 μ g/ml Ethanolamin, 17,4-1744 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, insbesondere Natriumselenit, 0,4-40 μ g/ml L-Carnitin, 0,05-5

µl/ml Fettsäure- Zusatz, 0,0001-0,1 µg/ml Triod-L-Thyronin (T3) in dem Medium bereitstellt.

- 5 14. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-13, wobei der zusätzliche serumfreie Zusatz in Schritt (iv) 0,1-10 % (v/v) B27, bevorzugt 0,5-8 % (v/v), stärker bevorzugt 1-6 % (v/v), sogar stärker bevorzugt 1,5-4% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 2% (v/v) B27 ist.
- 10 15. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-14, wobei in Schritt (iv) die mechanische Stimulation ein statischer Zug, eine dynamische Stimulation oder eine auxotone Stimulation ist, bevorzugt wobei die mechanische Stimulation ein statischer Zug ist.
- 15 16. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-15, das vor Schritt (i) einen Saatschritt umfasst, in dem die pluripotenten Stammzellen in einem Stammzellmedium in der Gegenwart eines ROCK-Inhibitors ausgesät werden, bevorzugt wobei der Saatschritt 18-30 Stunden vor Schritt (i) ausgeführt wird.
- 20 17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der ROCK-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Y27632, H-1152P, Thiazovivin, Fasudil, Hydroxyfasudil, GSK429286A und RKI1447, bevorzugt ist der ROCK-Inhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Y27632, H-1152P, Thiozovivin, Fasudil und Hydroxyfasudil, stärker bevorzugt ist der ROCK-Inhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Y27632 und H-1152P, wobei besonders bevorzugt der ROCK-Inhibitor Y27632 ist.
- 25 18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei der ROCK-Inhibitor Y27632 ist und in einer Konzentration von 0,5-10 µM, bevorzugt 1-9 µM, stärker bevorzugt 2-8 µM, stärker bevorzugt 3-7 µM, stärker bevorzugt 4-6 µM, und am stärksten bevorzugt in einer Konzentration von etwa 5 µM verwendet wird; und/oder
30 wobei das Stammzellmedium iPS-Brew XF ist.
19. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 15-18, wobei die pluripotenten Stammzellen in dem Saatschritt zunächst in der Gegenwart von einem oder mehreren Bestandteilen einer extrazellulären Matrix in einem Mastermix in eine künstliche Form ausgesät werden, bevor das Stammzellmedium hinzugefügt wird.
- 35 20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Bestandteil einer extrazellulären Matrix in dem Mastermix Kollagen ist, bevorzugt Typ I Kollagen, stärker bevorzugt aus Rinderursprung, humanem Ursprung oder marinem Ursprung, insbesondere Kollagen aus Rin-

derursprung, gegebenenfalls wobei die extrazelluläre Matrix zusätzlich Laminin und /oder Fibronectin umfasst.

- 5 21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die pluripotenten Stammzellen in einem Verhältnis von $1-6 \times 10^6$ Zellen/ml und 0,7-1,4 mg/ml Kollagen in Medium ausgesät werden.
- 10 22. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 19-21, wobei der Mastermix 5-15% (v/v) eines Exsudats von Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkomzellen als extrazellulären Matrixbestandteil umfasst, bevorzugt 7,5%-12,5% (v/v), stärker bevorzugt 9-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10 % (v/v) umfasst, insbesondere wobei das Exsudat Matrigel ist; und/oder wobei der pH-Wert des Mastermix pH 7,2 bis pH 7,8 beträgt.
- 15 23. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 19-21, wobei der Mastermix Stromazellen umfasst, wobei die Stromazellen die extrazellulären Matrixbestandteile Kollagene, Laminin, Fibronectin und/oder Proteoglykane erzeugen; und/oder wobei der pH-Wert des Master mix pH 7,2 bis pH 7,8 beträgt.
- 20 24. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 19-23, wobei das Stammzellmedium nach etwa 1 Stunde zu dem Mastermix in der künstlichen Form hinzugefügt wird, wobei das Stammzellmedium KSR und FGF2 umfasst.
- 25 25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Stammzellmedium 5-20% (v/v), bevorzugt 6-17,5% (v/v), stärker bevorzugt 7-15% (v/v), stärker bevorzugt 8%-12% (v/v), stärker bevorzugt 9%-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10% (v/v) KSR umfasst; und/oder
wobei das Stammzellmedium 1-15 ng/ml FGF2 umfasst, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa
30 10 ng/ml FGF2 umfasst.
- 35 26. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 19-25, wobei Schritt (iii) für 7-11 Tage, bevorzugt für 8-10 Tage, und am stärksten bevorzugt für etwa 9 Tage durchgeführt wird.
27. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-18, wobei nach Schritt (iii) die Skelettmyoblasten und Satellitenzellen in einem zusätzlichen Schritt vor Schritt (iv) in der Gegenwart von einem oder mehreren Bestandteilen einer extrazellulären Matrix in einem Mastermix in eine künstliche Form ausgesät werden.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei der Bestandteil einer extrazellulären Matrix in dem Mastermix Kollagen ist, bevorzugt Typ I Kollagen, stärker bevorzugt aus Rinderursprung, humane Ursprung oder marinem Ursprung, insbesondere Kollagen aus Rinderursprung, gegebenenfalls wobei die extrazelluläre Matrix zusätzlich Laminin und/oder Fibronectin umfasst.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Skelettmyoblasten und Satellitenzellen in einem Verhältnis von $1-6 \times 10^6$ Zellen/ml und 0,7-1,4 mg/ml Kollagen in Medium ausgesät werden.
30. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 27-29, wobei der Mastermix 5-15% (v/v) eines Exsudats von Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkomzellen als extrazellulären Matrixbestandteil umfasst, bevorzugt 7.5%-12.5% (v/v), stärker bevorzugt 9-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10 % (v/v) umfasst, insbesondere wobei das Exsudat Matrigel ist; und/oder wobei der pH-Wert des Mastermix pH 7,2 bis pH 7,8 beträgt.
31. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 27-29, wobei der Mastermix Stromazellen umfasst, wobei die Stromazellen die extrazellulären Matrixbestandteile Kollagene, Laminin, Fibronectin und/oder Proteoglykane erzeugen; und/oder wobei der pH-Wert des Master mix pH 7,2 bis pH 7,8 beträgt.
32. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 27-31, wobei nach etwa einer Stunde ein wie in Schritt (iii) verwendetes Medium zu einem Mastermix in einer künstlichen Form hinzugefügt wird, wobei das Medium zusätzlich eine wirksame Menge eines ROCK-Inhibitors umfasst; insbesondere wobei der ROCK-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Y27632, H-1152P, Thiazovivin, Fasudil, Hydroxyfasudil, GSK429286A und RKI1447, bevorzugt ist der ROCK-Inhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Y27632, H-1152P, Thiozovivin, Fasudil und Hydroxyfasudil, stärker bevorzugt ist der ROCK-Inhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Y27632 und H-1152P, wobei besonders bevorzugt der ROCK-Inhibitor Y27632 ist.
33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei der ROCK-Inhibitor Y27632 ist und in einer Konzentration von 0,5-10 μM , bevorzugt 1-9 μM , stärker bevorzugt 2-8 μM , stärker bevorzugt 3-7 μM , stärker bevorzugt 4-6 μM , und am stärksten bevorzugt in einer Konzentration von etwa 5 μM verwendet wird.

34. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 27-33, wobei nach etwa einem Tag das Medium gegen ein wie in Schritt (iii) verwendetes Medium ausgetauscht wird, und die Zellen anschließend in diesem Medium für weitere 5-9 Tage, bevorzugt 6-8 Tage, am stärksten bevorzugt etwa 7 Tage weiterkultiviert werden.
35. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 19-34, wobei die künstliche Form die Form eines Ringes, eines Bandes, eines Stranges, eines Flickens, eines Beutels, oder eines Zylinders hat, wobei optional einzelne Skelettmuskelgewebe fusioniert werden.
36. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-35, wobei Schritt (iv) für mindestens 19 Tage, bevorzugt mindestens 28 Tage, stärker bevorzugt für mindestens 56 Tage durchgeführt wird, noch stärker bevorzugt für mindestens 120 Tage durchgeführt wird und insbesondere für mindestens 240 Tage durchgeführt wird.
37. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-36, wobei das Verfahren kein Differenzierungs- oder maturierungsbezogenes Transgen umfasst, bevorzugt wobei das Verfahren kein myogenes Transgen umfasst, stärker bevorzugt wobei das Verfahren nicht das Transgen Pax7 oder MyoD umfasst.
38. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-37, wobei das Verfahren keinen Schritt zur Anreicherung von Skelettmyoblasten enthält, bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Zellselektion, stärker bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Antikörper-basierte Zellselektion.
39. Verfahren zum Herstellen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen aus pluripotenten Stammzellen, umfassend die Schritte
- (i) Induzieren von Mesoderm Differenzierung der pluripotenten Stammzellen durch Kultivieren von pluripotenten Stammzellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) FGF2, (b) einem GSK3-Inhibitor, (c) einem SMAD-Inhibitor, und (d) einem serumfreien Zusatz, welcher Transferrin, Insulin, Progesteron, Putrescin und Selen oder ein bioverfügbares Salz davon umfasst;
 - (ii) Induzieren der myogenen Spezifikation durch Kultivieren der in Schritt (i) erhaltenen Zellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) FGF2, und (c) einem serumfreien Zusatz wie in (i), gefolgt von Fortsetzen der Kultivierung in dem Medium unter Zugabe einer wirksamen Menge von (d) HGF, gefolgt von

- Kultivieren der Zellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) HGF, (c) einem serumfreien Zusatz wie in (i), und (d) Knockout serum replacement (KSR);
- 5 (iii) Maturieren der Zellen in Skelettmyoblasten und Satellitenzellendurch Kultivieren der in Schritt (ii) erhaltenen Zellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) HGF, (b) einem serumfreien Zusatz wie in (i), und (c) Knockout serum replacement (KSR), gefolgt von
- 10 (iv) Maturieren der Zellen zu Skelettmyotuben und Satellitenzellen durch Kultivieren der in Schritt (iii) erhaltenen Zellen in einem Basalmedium, umfassend eine wirksame Menge von (a) einem serumfreien Zusatz wie in Schritt (i) und (b) einem zusätzlichen serumfreien Zusatz, welcher Albumin, Transferrin, Ethanolamin, Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, L-Carnitin, Fettsäurezusatz, und Triod-L-Thyronin (T3) umfasst;
- 15 dadurch Erzeugen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen.
40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei durch das Verfahren ein Anteil an Skelettmyoblasten von der Menge aller vorliegenden Zellen von mindestens 40% erzielt wird, bevorzugt mindestens 50%, stärker bevorzugt mindestens 60%, am meisten bevorzugt mindestens 70%, bestimmt durch die Expression von Aktinin mittels Durchflusszytometrie.
- 20
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, wobei durch das Verfahren ein Anteil an Satellitenzellen von der Menge aller vorliegenden Zellen von mindestens 10% erzielt wird, bevorzugt mindestens 15%, stärker bevorzugt mindestens 20%, am stärksten bevorzugt mindestens 30% erzielt wird, bestimmt durch die Expression von Pax7 mittels Durchflusszytometrie.
- 25
42. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-41, wobei das Verfahren keinen Schritt zur Anreicherung von Skelettmyoblasten enthält, bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Zellselektion, stärker bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Antikörper-basierte Zellselektion.
- 30
43. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-42, wobei die pluripotenten Stammzellen aus Primatenursprung, insbesondere humane pluripotente Stammzellen sind; und/oder wobei die pluripotenten Stammzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen, embryonalen Stammzellen, parthenogenetischen Stammzellen, über
- 35

Kerntransfer hergestellten pluripotenten Stammzellen und über chemische Reprogrammierung hergestellten pluripotente Zellen ausgewählt sind, insbesondere wobei die pluripotenten Stammzellen induzierte pluripotente Stammzellen sind.

- 5 44. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-43, wobei Schritt (i) für 48 bis 132 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 48 bis 120 Stunden, stärker bevorzugt für 60 bis 114 Stunden, noch stärker bevorzugt für 72 bis 108 Stunden, stärker bevorzugt für 84 bis 102 Stunden und am stärksten bevorzugt für etwa 96 Stunden durchgeführt wird.
- 10 45. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-44, wobei in Schritt (i) der GSK3-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CHIR99021, CHIR98014, SB216763, TWS119, Tideglusib, SB415286, 6-bromoindirubin-3-oxime und einem Valproatsalz, bevorzugt wobei der GSK3-Inhibitor CHIR99021 ist; und /oder
- 15 wobei in Schritt (i) der SMAD-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus LDN193189, K02288, LDN214117, ML347, LDN212854, DMH1, ausgewählt ist, bevorzugt wobei der SMAD Inhibitor LDN193189 ist.
- 20 46. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-45, wobei in Schritt (i) die wirksame Menge von FGF2 1-15 ng/ml beträgt, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 10 ng/ml beträgt; und/oder
- 25 der serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von 50-500 mg/l Transferrin, 1-20 mg/l Insulin, 1-30 µg/l Progesteron, 5-50 µg/ml Putrescin und 6-600 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, insbesondere Natriumselenit, in dem Medium bereitstellt, und/oder
- 30 der GSK3-Inhibitor CHIR99021 ist, und die wirksame Menge 4-18 µM beträgt, bevorzugt 5-16 µM, stärker bevorzugt 6-15 µM, noch stärker bevorzugt 7-14 µM, noch stärker bevorzugt 8-13 µM, noch stärker bevorzugt 9-12 µM, noch stärker bevorzugt 9,5-11 µM, und am stärksten bevorzugt etwa 10 µM beträgt; und/oder
- 35 der SMAD-Inhibitor LDN193189 ist, und die wirksame Menge 0,05-5 µM beträgt, bevorzugt 0,1-2,5 µM, stärker bevorzugt 0,2-1 µM, noch stärker bevorzugt 0,25-0,8 µM, noch stärker bevorzugt 0,3-0,75 µM, noch stärker bevorzugt 0,35-0,7 µM, noch stärker bevorzugt 0,4-0,6 µM, noch stärker bevorzugt 0,45-0,55 µM, und am stärksten bevorzugt etwa 0,5 µM beträgt.

47. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-46, wobei der serumfreie Zusatz in Schritt (i) 0,1-10% (v/v) N2-Zusatz, bevorzugt 0,3-7,5% (v/v) N2-Zusatz, stärker bevorzugt 0,5-5% (v/v) N2-Zusatz, stärker bevorzugt 0,75%-2% (v/v) N2-Zusatz, stärker bevorzugt 0,9%-1,2% (v/v) N2-Zusatz, und am stärksten bevorzugt etwa 1% (v/v) N2-Zusatz ist.
48. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-47, wobei das Basalmedium in Schritt (i), Schritt (ii), Schritt (iii) und/oder Schritt (iv) ausgewählt ist aus DMEM, DMEM/F12, RPMI, IMDM, alphaMEM, Medium 199, Hams F-10, Hams F-12, wobei das Basalmedium bevorzugt DMEM ist, insbesondere wobei das Basalmedium mit Pyruvat und/oder nicht-essentiellen Aminosäuren ergänzt ist, und/oder 1 g/l Glukose umfasst.
49. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-48, wobei in Schritt (ii) die Kultivierung in Gegenwart von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) FGF2, und (c) dem serumfreien Zusatz für 36 bis 60 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 42 bis 54 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 48 Stunden durchgeführt wird; und/oder die Kultivierung in Gegenwart von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) FGF2, (c) dem serumfreien Zusatz und (d) HGF für 36 bis 60 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 42 bis 54 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 48 Stunden durchgeführt wird; und/oder die Kultivierung in Gegenwart von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) HGF, (c) dem serumfreien Zusatz, und (d) Knockout serum replacement (KSR) für 72 bis 120 Stunden durchgeführt wird, bevorzugt für 76 bis 114 Stunden, stärker bevorzugt für 84 bis 108 Stunden, noch stärker bevorzugt für 90 bis 102 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 96 Stunden durchgeführt wird.
50. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-49, wobei in Schritt (ii) der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe DAPT, RO4929097, Semagacestat (LY450139), Avagacestat (BMS-708163), Dibenazepine (YO-01027), LY411575, IMR-1, L685458, wobei der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor bevorzugt DAPT ist.
51. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-50, wobei in Schritt (ii) die wirksame Menge von FGF2 15-30 ng/ml beträgt, bevorzugt 17,5-25 ng/ml, stärker bevorzugt 18-22 ng/ml, noch stärker bevorzugt 19-21 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 20 ng/ml beträgt; und/oder

- die wirksame Menge von HGF 1-15 ng/ml beträgt, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 10 ng/ml beträgt; und/oder
- 5 der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor DAPT ist, und die wirksame Menge 1-20 μ M beträgt, bevorzugt 2-19 μ M, stärker bevorzugt 3-18 μ M, noch stärker bevorzugt 4-17 μ M, noch stärker bevorzugt 5-16 μ M, noch stärker bevorzugt 6-15 μ M, noch stärker bevorzugt 7-14 μ M, noch stärker bevorzugt 7,5-13 μ M, noch stärker bevorzugt 8-12 μ M, noch stärker bevorzugt 9-11 μ M, und am stärksten bevorzugt etwa 10 μ M beträgt;
- 10 das KSR in einer Menge von 6-14% (v/v), bevorzugt 7-13% (v/v), stärker bevorzugt 8%-12% (v/v), stärker bevorzugt 9%-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10% (v/v) KSR verwendet wird; insbesondere wobei das KSR in Gegenwart eines Reduktionsmittels wie beta-Mercaptoethanol und/oder alpha-Thioglycerol verwendet wird.
- 15 52. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-49, wobei in Schritt (iii) die wirksame Menge von HGF 1-15 ng/ml beträgt, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 10 ng/ml beträgt;
- 20 das KSR in einer Menge von 5-20% (v/v), bevorzugt 6-17,5% (v/v), stärker bevorzugt 7-15% (v/v), stärker bevorzugt 8%-12% (v/v), stärker bevorzugt 9%-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10% (v/v) KSR verwendet wird; insbesondere wobei das KSR in Gegenwart eines Reduktionsmittels wie beta-Mercaptoethanol und/oder alpha-Thioglycerol verwendet wird.
- 25 53. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-52, wobei Schritt (iii) für 7-11 Tage, bevorzugt 8-10 Tage, und am stärksten bevorzugt für etwa 9 Tage durchgeführt wird.
- 30 54. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-53, wobei in Schritt (iv) der zusätzliche serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von 0,5-50 mg/ml Albumin, 1-100 μ g/ml Transferrin, 0,1-10 μ g/ml Ethanolamin, 17,4-1744 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, insbesondere Natriumselenit, 0,4-40 μ g/ml L-Carnitin, 0,05-5 μ l/ml Fettsäure- Zusatz, 0,0001-0,1 μ g/ml Triod-L-Thyronin (T3) in dem Medium bereitstellt.
- 35 55. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-54, wobei der zusätzliche serumfreie Zusatz in Schritt (iv) 0,1-10 % (v/v) B27, bevorzugt 0,5-8 % (v/v), stärker bevor-

zugt 1-6 % (v/v), sogar stärker bevorzugt 1,5-4% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 2% (v/v) B27 ist.

56. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-55, wobei Schritt (iv) für mindestens 30 Tage, bevorzugt mindestens 35 Tage, stärker bevorzugt für mindestens 40 Tage, und noch stärker bevorzugt für mindestens zu 50 Tage durchgeführt wird.
57. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 39-56, das vor Schritt (i) einen Saatschritt umfasst, in dem die pluripotenten Stammzellen in einem Stammzellmedium in der Gegenwart eines ROCK-Inhibitors ausgesät werden, bevorzugt wobei der Saatschritt 18-30 Stunden vor Schritt (i) ausgeführt wird.
58. Verfahren nach Anspruch 57, wobei der ROCK-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Y27632, H-1152P, Thiazovivin, Fasudil, Hydroxyfasudil, GSK429286A und RKI1447, bevorzugt ist der ROCK-Inhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Y27632, H-1152P, Thiozovivin, Fasudil und Hydroxyfasudil, stärker bevorzugt ist der ROCK-Inhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Y27632 und H-1152P, wobei besonders bevorzugt der ROCK-Inhibitor Y27632 ist.
59. Verfahren nach Anspruch 57 oder 58, wobei der ROCK-Inhibitor Y27632 ist und in einer Konzentration von 0,5-10 μ M, bevorzugt 1-9 μ M, stärker bevorzugt 2-8 μ M, stärker bevorzugt 3-7 μ M, stärker bevorzugt 4-6 μ M, und am stärksten bevorzugt in einer Konzentration von etwa 5 μ M verwendet wird; und/oder wobei das Stammzellmedium iPS-Brew XF ist.
60. Verfahren nach Anspruch 59, wobei das Stammzellmedium 5-20% (v/v), bevorzugt 6-17,5% (v/v), stärker bevorzugt 7-15% (v/v), stärker bevorzugt 8%-12% (v/v), stärker bevorzugt 9%-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10% (v/v) KSR umfasst; und/oder wobei das Stammzellmedium 1-15 ng/ml FGF2 umfasst, bevorzugt 2,5-14 ng/ml, stärker bevorzugt 5-13 ng/ml, noch stärker bevorzugt 7,5-12,5 ng/ml, noch stärker bevorzugt 8-12 ng/ml, noch stärker bevorzugt 9-11 ng/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 10 ng/ml FGF2 umfasst.
61. Künstliches Skelettmuskelgewebe, das multinukleäre reife Skelettmuskelfasern mit Satellitenzellen aufweist, und keine Durchblutung und/oder keine Steuerung über das zentrale Nervensystem aufweist; insbesondere wobei die Gegenwart von Skelettmuskelfasern durch Färbung von Actinin und mit DAPI festgestellt wird.

- 5 62. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach Anspruch 61, wobei das Skelettmuskelgewebe serumfrei ist und/oder kein differenzierungs- oder maturierungsbezogenes Transgen umfasst, bevorzugt wobei das Skelettmuskelgewebe kein myogenes Transgen umfasst, stärker bevorzugt wobei das Skelettmuskelgewebe nicht das Transgen Pax7 oder MyoD umfasst.
- 10 63. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach Anspruch 61 oder Anspruch 62, wobei das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz bei 200 mA mindestens eine Kontraktionskraft von 0,3 Millinewton (mN) erzeugt, bevorzugt mindestens 0,4 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,5 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,6 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,7 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,8 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,9 mN, stärker bevorzugt mindestens 1 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,2 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,3 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,4 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,5 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,6 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,7 mN; stärker bevorzugt mindestens 1,8 mN; stärker bevorzugt mindestens 1,9 mN; und am stärksten bevorzugt mindestens 2 mN erzeugt.
- 20 64. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach einem beliebigen der Ansprüche 61-63, wobei das Skelettmuskelgewebe künstlich geformt ist, bevorzugt wobei es die künstliche Form eines Ringes, eines Bandes, eines Stranges, eines Flickens, eines Beutels, oder eines Zylinders hat, wobei optional einzelne Skelettmuskelgewebe fusioniert werden, insbesondere wobei das Skelettmuskelgewebe die Form eines Ringes aufweist.
- 25 65. Mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen erhalten nach Schritt (i) gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 39, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1(i) oder gemäß Anspruch 39(i), die durch die Expression von den Genen MSGN1 und/oder TBX6 gekennzeichnet sind, wobei die Expression von MSGN1 und/oder TBX6 mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann; und/oder die mRNA *SP5* exprimiert wird, wobei die Expression von *SP5* mittels RNA Sequenzierung bestimmt werden kann.
- 30 66. Myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen erhalten nach Schritt (ii) gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 39, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1(i) bis (ii) oder gemäß Anspruch 39(i) bis (ii), die durch die Expression des Gens PAX3 gekennzeichnet ist, wobei die Expression von PAX3 mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann; und/oder die mRNA *SIM1* expri-
- 35

miert wird, wobei die Expression von *SIM1* mittels RNA Sequenzierung bestimmt werden kann.

- 5 67. Skelettmyoblastenzellen erhalten nach Schritt (iii) gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 39, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1(i) bis (iii) oder gemäß Anspruch 39(i) bis (iii), die durch die Expression von Aktinin gekennzeichnet sind, bevorzugt wobei die Expression von Aktinin mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann.
- 10 68. Satellitenzelle erhalten nach Schritt (iii) gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 39, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1(i) bis (iii) oder gemäß Anspruch 39(i) bis (iii), die durch die Expression des Gens Pax7 gekennzeichnet ist, wobei die Expression von Pax7 mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann, stärker bevorzugt wobei Satellitenzellen ferner Ki67 exprimieren.
- 15 69. Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen gemäß Anspruch 67 und Satellitenzellen gemäß Anspruch 68, wobei ein Anteil an Satellitenzellen von der Menge aller vorliegenden Zellen von mindestens 10% erzielt wird, bevorzugt mindestens 15%, stärker bevorzugt mindestens 20%, noch stärker bevorzugt mindestens 30% erzielt wird, bestimmt durch die Expression von Pax7 mittels Durchflusszytometrie; und/oder wobei ein Anteil an Skelettmyoblasten von der Menge aller vorliegenden Zellen von mindestens 40% erzielt wird, bevorzugt mindestens 50%, stärker bevorzugt mindestens 60%, am meisten bevorzugt mindestens 70%, bestimmt durch die Expression von Aktinin mittels Durchflusszytometrie.
- 20 70. Skelettmyotuben erhalten nach Schritt (iv) gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 39, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1(i) bis (iv) oder gemäß Anspruch 39(i) bis (iv), die durch eine anisotrope Ausrichtung der Aktinin Protein enthaltenen Sarkomerstruktur charakterisiert sind.
- 25 71. Verwendung eines Skelettmuskelgewebes gemäß den Ansprüchen 61-64, und/oder von Zellen gemäß einem beliebigen der Ansprüche 64-68, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Anspruch 70 in einem *in vitro* Arzneimitteltest; insbesondere wobei der Arzneimitteltest ein Toxizitätstest ist, oder ein Test auf die Funktion des Skelettmuskelgewebes unter dem Einfluss von pharmakologischen und gentherapeutischen Wirkstoffkandidaten.
- 30 35

72. Skelettmuskelgewebe gemäß den Ansprüchen 61-64 und/oder Zellen gemäß einem beliebigen der Ansprüche 65-69, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Anspruch 70 zur Verwendung in der Medizin.
- 5 73. Satellitenzellen gemäß dem Anspruch 68 zur Verwendung in der Therapie von geschädigtem Skelettmuskel und/oder in der Behandlung von Skelettmuskelerkrankungen, bevorzugt genetischen Skelettmuskeldefekten, insbesondere von Muskeldystrophie Duchenne und/oder Muskeldystrophie Becker-Kiener, und/oder von lysosomalen Speicherkrankheiten, insbesondere von Morbus Pompe, bevorzugt wobei die Skelettmuskelerkrankung Muskeldystrophie Duchenne ist.
- 10 74. In vitro-Verfahren zum Testen der Wirksamkeit eines Wirkstoffkandidaten auf ein Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte
- 15 (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß einem beliebigen der Ansprüche 60-63,
- (b) gegebenenfalls Zufügen einer Schädigung zu dem Skelettmuskelgewebe, und
- (c) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) oder (b) mit einem Wirkstoffkandidaten;
- 20 bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Kontraktionskraft und/oder der Struktur des Skelettmuskelgewebes und/oder der metabolischen Funktion und/oder molekularer Parameter und/oder proteinbiochemischer Parameter vor und/oder nach Schritt (c) umfasst.
- 25 75. In vitro-Verfahren zum Testen der Toxizität einer Substanz auf ein Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte
- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß einem beliebigen der Ansprüche 61-64,
- (b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einer zu testen-
- 30 den Substanz.
- bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Kontraktionskraft und/oder der Struktur des Skelettmuskelgewebes und/oder der metabolischen Funktion und/oder molekularer Parameter und/oder proteinbiochemischer Parameter vor und/oder nach Schritt (b) umfasst.
- 35 76. In vitro-Verfahren zum Testen der Wirkung von Nährstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln auf die Leistungsfähigkeit von Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß einem beliebigen der Ansprüche 61-64,
(b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einem zu testenden Nährstoff oder Nahrungsergänzungsmittel
5 bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Kontraktionskraft und/oder der Struktur des Skelettmuskelgewebes und/oder der metabolischen Funktion und/oder molekularer Parameter und/oder proteinbiochemischer Parameter vor und/oder nach Schritt (b) umfasst.
- 10 77. In vitro-Verfahren zum Testen der Wirksamkeit eines Wirkstoffkandidaten auf mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder ein Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen, umfassend die Schritte:
- 15 (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß einem beliebigen der Ansprüche 65-70,
(b) gegebenenfalls Zufügen einer Schädigung zu den Zellen aus Schritt (a), und
20 (c) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) oder (b) mit einem Wirkstoffkandidaten,
bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Expression von Aktinin und/oder Pax7 vor und/oder nach Schritt (c) umfasst, wobei die Expression mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann.
- 25 78. In vitro-Verfahren zum Testen der Toxizität einer Substanz auf mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder ein Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen, umfassend die Schritte:
- 30 (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß einem beliebigen der Ansprüche 65-70,
(b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einer zu testenden Substanz,
35 bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Expression von Aktinin und/oder Pax7 vor und/oder nach Schritt (b) umfasst, wobei die Expression mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann.

79. In vitro-Verfahren zum Testen der Wirkung von Nährstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln auf mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder ein Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen, umfassend die Schritte:
- 5 (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß einem beliebigen der Ansprüche 65-70,
- 10 (b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einem zu testenden Nährstoff oder Nahrungsergänzungsmittel,
- 15 bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Expression von Aktinin und/oder Pax7 vor und/oder nach Schritt (b) umfasst, wobei die Expression mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann.
80. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60, wobei das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz mindestens eine Kontraktionskraft von 2 Millinewton (mN) erzeugt, bevorzugt mindestens 2,3 mN, stärker bevorzugt mindestens 2,6 mN, noch stärker bevorzugt mindestens 3 mN, noch stärker bevorzugt mindestens 3,3 mN,
- 20 noch stärker bevorzugt mindestens 3.6 mN, am stärksten bevorzugt mindestens 4 mN.
81. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60 oder 80, wobei das Skelettmuskelgewebe eine Kontraktionsgeschwindigkeit von mindestens 3 mN/sec bei einer Stimulation von 100 Hz aufweist, bevorzugt mindestens 4 mN/sec, stärker bevorzugt mindestens 5 mN/sec, stärker bevorzugt mindestens 6 mN/sec, noch stärker bevorzugt mindestens 6.5 mN/sec, noch stärker mindestens bevorzugt mindestens 7 mN/sec.
- 25 82. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60, 80 oder 81, wobei das Skelettmuskelgewebe eine Relaxationsgeschwindigkeit von mindestens 0.5 mN/sec beim Beenden einer Stimulation von 100Hz aufweist, bevorzugt mindestens 0.7 mN/sec, stärker bevorzugt mindestens 0.9 mN/sec stärker bevorzugt mindestens 1 mN/sec, noch stärker bevorzugt mindestens 1.2 mN/sec, noch stärker bevorzugt mindestens 1.5 mN/sec.
- 30 83. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60 oder 80-82, wobei das BasalmEDIUM in Schritt (iv) eine wirksame Menge von Kreatin und/oder Triiod-L-Thyronin (T3) umfasst.

84. Verfahren nach Anspruch 83, wobei die wirksame Menge von Kreatin im Basalmedium die Kontraktionskraft des künstlichen Skelettmuskels im Vergleich zu einem Maturieren in Schritt (iv) ohne eine wirksame Menge an Kreatin erhöht.
85. Verfahren nach Anspruch 83 oder 84, wobei die wirksame Menge von T3 im Basalmedium die Kontraktionsgeschwindigkeit und/oder Relaxationsgeschwindigkeit des künstlichen Skelettmuskels im Vergleich zu einem Maturieren in Schritt (iv) ohne eine wirksame Menge an T3 verkürzt.
86. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60, oder 80-85, wobei das Basalmedium in Schritt (iv) eine Endkonzentration von 0.1-10 mM Kreatin bereitstellt, bevorzugt 0.2-6 mM Kreatin, stärker bevorzugt 0.4-4 mM Kreatin, noch stärker bevorzugt 0.6-3 mM Kreatin, noch stärker bevorzugt 0.7-2.5 mM Kreatin, noch stärker bevorzugt 0.8-2 mM Kreatin, noch stärker bevorzugt 0.85-1.5 mM Kreatin, noch stärker bevorzugt 0.9-1.2 mM Kreatin, und am stärksten bevorzugt ungefähr 1 mM Kreatin.
87. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60, oder 80-86, wobei das Basalmedium in Schritt (iv) eine Endkonzentration von 0.001-1 μM Triod-L-Thyronin (T3) bereitstellt, bevorzugt 0.005-0.7 μM T3, stärker bevorzugt 0.01-0.35 μM T3, noch stärker bevorzugt 0.04-0.02 μM T3, noch stärker bevorzugt 0.05-0.18 μM T3, noch stärker bevorzugt 0.06-0.15 μM T3, noch stärker bevorzugt 0.08-0.12 μM T3, noch stärker bevorzugt ungefähr 0.1 μM T3.
88. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60, oder 80-87, wobei das Skelettmuskelgewebe die Eigenschaften besitzt, selbst zu regenerieren.
89. Verfahren nach Anspruch 88, wobei die regenerative Eigenschaft durch eine wiedererlangte Kontraktionsfähigkeit und/oder Muskelwiederaufbau gekennzeichnet ist, bevorzugt wobei diese wiedererlangte Kontraktionsfähigkeit und/oder Muskelwiederaufbau nach einer irreversiblen Muskelschädigung mit Kardiotoxin gemessen wird, stärker bevorzugt wobei diese wiedererlangte Kontraktionsfähigkeit und/oder Muskelwiederaufbau 10-30 Tage nach Inkubation mit Kardiotoxin gemessen wird.
90. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1-60 oder 80-89, wobei Schritt (iv) für mindestens 50 Tage durchgeführt wird, stärker bevorzugt mindestens 60 Tage, noch stärker bevorzugt mindestens 70 Tage, noch stärker bevorzugt mindestens 80 Tage.
91. Künstliches Skelettmuskelgewebe hergestellt durch ein Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1-60 oder 80-90.
92. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach einem beliebigen der Ansprüche 61-64 oder 91, wobei das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz mindestens eine Kon-

traktionskraft von 0,6 Millinewton (mN) erzeugt, bevorzugt mindestens 0,7 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,8 mN, stärker bevorzugt mindestens 0,9 mN, stärker bevorzugt mindestens 1 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,2 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,3 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,4 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,5 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,6 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,7 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,8 mN, stärker bevorzugt mindestens 1,9 mN, stärker bevorzugt mindestens 2 mN, stärker bevorzugt mindestens 2,3 mN, stärker bevorzugt mindestens 2,6 mN, noch stärker bevorzugt mindestens 3 mN, noch stärker bevorzugt mindestens 3,3 mN, noch stärker bevorzugt mindestens 3,6 mN, und am stärksten bevorzugt mindestens 4 mN.

93. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach einem beliebigen der Ansprüche 61-64 oder 91-92, wobei das Skelettmuskelgewebe eine Kontraktionsgeschwindigkeit von mindestens 3 mN/sec bei einer Stimulation von 100 Hz aufweist, bevorzugt mindestens 4 mN/sec, stärker bevorzugt mindestens 5 mN/sec, stärker bevorzugt mindestens 6 mN/sec, noch stärker bevorzugt mindestens 6.5 mN/sec, noch stärker bevorzugt mindestens 7 mN/sec.
94. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach einem beliebigen der Ansprüche 61-64 oder 91-93, wobei das Skelettmuskelgewebe eine Relaxationsgeschwindigkeit von mindestens 0.5 mN/sec beim Beenden einer Stimulation von 100Hz aufweist, bevorzugt mindestens 0.7 mN/sec, stärker bevorzugt mindestens 0.9 mN/sec, stärker bevorzugt mindestens 1 mN/sec, noch stärker bevorzugt mindestens 1.2 mN/sec, noch stärker bevorzugt mindestens 1.5 mN/sec.
95. Verwendung eines Skelettmuskelgewebes gemäß den Ansprüchen 61-64 oder 91-94, und/oder von Zellen gemäß einem beliebigen der Ansprüche 65-69, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Anspruch 70 in einem *in vitro* Arzneimitteltest; insbesondere wobei der Arzneimitteltest ein Toxizitätstest ist, oder ein Test auf die Funktion des Skelettmuskelgewebes unter dem Einfluss von pharmakologischen und gentherapeutischen Wirkstoffkandidaten.
96. Skelettmuskelgewebe gemäß den Ansprüchen 61-64 und 91-94, und/oder Zellen gemäß einem beliebigen der Ansprüche 65-69, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Anspruch 70 zur Verwendung in der Medizin.