

Herstellung von Skelettmuskelzellen und Skelettmuskelgewebe aus pluripotenten Stammzellen

Hintergrund der Erfindung

Der menschliche Körper besteht zu 35-40% aus Skelettmuskeln, die die Atmung, Haltung und Bewegung ermöglichen. Ein gesunder Skelettmuskel kann kleine Verletzungen wie Riss- oder Schnittwunden vollständig regenerieren, da die Muskelstammzellen, auch Satellitenzellen (engl.: satellite cells (SCs)) genannt, das verletzte Gewebe vollständig regenerieren können. Jedoch verheilen größere Verletzungen nicht, sodass bleibende Schädigungen zurückbleiben.

Die aktuelle Theorie des „Tissue Engineering“ besteht darin, die benötigten Zelltypen zu erzeugen und sie in einer künstlichen Umgebung zu differenzieren, um ein *in vivo* ähnliches Gewebe zu erzeugen. Beim Tissue Engineering ist zu beachten, dass bei einer Dissoziation von differenzierten Zellen die extrazelluläre Umgebung verloren geht und damit entwicklungsrelevante Informationen verloren gehen können. Beispielsweise werden durch eine Dissoziation die Zell-Zell-Interkonnektivität, die geometrische Zellpositionierung und die Zell-extrazelluläre-Matrix-Konnektivität aufgebrochen. Diese Umgebung muss beim Tissue Engineering neu aufgebaut werden (Zimmermann et al. 2004, Tiburcy et al. 2017). Darüber hinaus besteht ein differenziertes Skelettmuskelgewebe nicht nur aus Skelettmuskelfasern, sondern auch aus Stroma-/ Bindegewebszellen, insbesondere aus Satellitenzellen, die sich gemäß ihrer Umgebung und den chemischen Reizen ausbilden.

Dem Fachmann sind unterschiedliche Tissue Engineering Verfahren in Bezug auf Skelettmuskelzellen bekannt, in denen 2D-Zellkulturen, Kleintiermodelle oder extrahiertes Muskelgewebe von Kleintieren verwendet werden (Beldjilali-Labro et al. (2018) und Khodabukus et al. (2018)). Chal et al. (2016) beschreiben beispielsweise die Herstellung von Muskelfasern in einem 2D-Verfahren.

In der Vergangenheit wurden oft Kleintiermodelle verwendet, um die biologischen Prozesse zu untersuchen. Jedoch haben Tiermodelle im Allgemeinen einige Einschränkungen. Bei Tiermodellen ist grundsätzlich fraglich, ob die Ergebnisse auf Menschen übertragen werden können, speziell in Bezug auf Krankheits-/Heilungsprozesse und die Wirksamkeit von Medikamenten.

Um die Limitierung von Tiermodellen zu überwinden, verspricht die Herstellung von künstlichem Skelettmuskelzellen und/oder Skelettmuskelgeweben einen hohen Nutzen.

Um die Differenzierung von Stammzellen in Skelettmuskelzellen zu unterstützen, wurden Stammzellen in der Vergangenheit oft mit muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren transfiguriert. Rao et al. (2018) beschreiben beispielsweise die Herstellung eines künstlichen Skelettmuskelgewebes, wobei das Transgen Pax7 transient überexprimiert wird. Jedoch ist die Transfektionsrate bei unterschiedlichen Zellen unterschiedlich hoch und kann sich bei jedem

Experiment unterscheiden. Darüber hinaus verwenden viele Forscher Blutserum während der Differenzierungsprotokolle. Jedoch ist oft unklar, welche Faktoren in dem aus Säugern gewonnenen Blutserum enthalten sind und wie sie sich auf die Differenzierung auswirken. Somit weisen Differenzierungsprotokolle bei denen Transgene oder Serum verwendet werden Schwächen auf, da die Reproduzierbarkeit dieser Verfahren erheblich eingeschränkt ist. Daher ist es essentiell ein Verfahren zu entwickeln, bei dem humane pluripotente Stammzellen durch definierte Faktoren in Skelettmuskelzellen und Satellitenzellen oder Skelettmuskelgewebe differenziert und maturiert werden, wobei keine Transgene oder Serum benötigt werden.

Des Weiteren deuten immer mehr Belege darauf hin, dass nicht nur chemische Reize, sondern auch physikalische Reize eine Rolle bei der Skelettmuskelgewebeentwicklung spielen. Somit scheint eine Kombination aus chemischen und physikalischen Stimulationen zusätzlich zur Oberflächentopographie und Strukturzusammensetzung eine Möglichkeit darzustellen, funktionelles Muskelgewebe zuverlässig *in vitro* herzustellen (Liao et al. (2008), Pavesi et al. (2015)). Jedoch bleibt die Chronologie, Dauer und Identität dieser unterschiedlichen Stimulationen während der Differenzierung und Maturierung der Zellen unklar.

Die Entwicklung eines robusten Differenzierungs- und Maturierungsprotokolls ist ein sehr wichtiger Schritt, um eine Herstellung von Skelettmuskelzellen und Satellitenzellen sowie künstlichem Skelettmuskelgewebe zu ermöglichen.

Die Erfinder der Patentanmeldung WO 2017/100498A1 offenbaren ein serumfreies Differenzierungsprotokoll von humanen pluripotenten Stammzellen in Skelettmyoblasten in einem 2D-Verfahren. Bei diesem Verfahren ist jedoch ein Anreicherungsschritt der Skelettmyoblasten mittels Durchflusszytometrie nötig, um nicht differenzierte Zelltypen aus dem Zellpool zu entfernen. Eine Aufreinigung über Durchflusszytometrie erlaubt keine Skalierung, ist mit Infektionsrisiken und einem sehr hohen Zellverlust verbunden und stellt daher eine zentrale Barriere für die kommerzielle Anwendung von Zellprodukten dar.

Es ist bisher nicht gelungen ein Verfahren zur effizienten Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu beschreiben – das transgen und serumsfrei ist - bei welchem kein weiterer Anreicherungsschritt für einen bestimmten Zelltyp nötig ist. Im Speziellen ist es bisher nicht gelungen, ein Verfahren zur effizienten Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in ein Skelettmuskelgewebe zu beschreiben, das die chemischen und physikalischen Reize unter Vermeidung von Transgenen und Serum beschreibt.

Shahriyari et al. (2018) berichten lediglich von der Herstellung eines vorläufigen künstlichen Skelettmuskelgewebes. Jedoch fehlen in Shahriyari et al. Informationen zu essentiellen Merkmalen, die für die Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe der vorliegenden Erfindung notwendig sind. Krämer et al. (2014) beschreibt die Herstellung eines künstlichen Skelettmuskels aus Rattenmyoblasten und nicht aus pluripotenten Stammzellen.

Zusammenfassung der Erfindung

In der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe sowie Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen beschrieben, wobei die verwendeten Medien serumfrei sind und die unterschiedlichen chemischen Substanzen und deren Konzentrationen sowie die physikalische Reizung definiert sind. Darüber hinaus kommt das hierin beschriebene Verfahren ohne Transfektion der humanen Zellen mit Transgenen aus. Die künstlichen Skelettmuskelzellen weisen Myoblasten-spezifische, Myotuben-spezifische oder Satellitenzell-spezifische Genmarker auf, die die effiziente Differenzierung dieser Zelltypen belegt. Das Skelettmuskelgewebe weist obgleich seiner künstlichen Herstellung eine sehr gute Stimulus-abhängige Kontraktionskraft auf und zeigt Kontraktionen in Antwort auf unterschiedliche Stimulationsfrequenzen.

Die Erfindung umfasst Verfahren, in dem pluripotente Stammzellen in Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben sowie Satellitenzellen oder Skelettmuskelgewebe differenziert und maturiert werden. Das Skelettmuskelgewebe ist in einer extrazellulären Matrix dispergiert/eingebettet.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein 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 Triod-L-Thyronin (T3) umfasst;

dadurch Erzeugen von künstlichem Skelettmuskelgewebe.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen aus pluripotenten Stammzellen, umfassend die Schritte

- (i) Induzieren von Mesodermdifferentiation 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) 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) einen serumfreien Zusatz wie in (i), und (c) Knockout serum replacement (KSR), gefolgt von
- (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;
dadurch Erzeugen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen.

Des Weiteren bezieht sich die vorliegende Erfindung auf künstliches Skelettmuskelgewebe, das multinukleäre reife Skelettmuskelfasern mit Satellitenzellen aufweist, und keine Durchblutung und/oder keine Steuerung über das zentrale Nervensystem aufweist. Dabei kann die

Gegenwart von Skelettmuskelfasern durch Färbung von Aktinin und mit DAPI festgestellt werden.

Darüber hinaus ist die vorliegende Erfindung auf mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen gerichtet, die gemäß Schritt (i) hergestellt und erhalten werden, und 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. Diese Zellen exprimieren die mRNA *SP5*, wobei die Expression von *SP5* mittels RNA Sequenzierung bestimmt werden kann.

Außerdem betrifft die Erfindung eine myogen-spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzelle, die gemäß der Schritte (i) bis (ii) hergestellt und erhalten wird, und die durch die Expression des Gens *PAX3* gekennzeichnet ist, wobei die Expression von *PAX3* mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann. Diese Zellen exprimieren die mRNA *SIM1*, wobei die Expression von *SIM1* mittels RNA Sequenzierung bestimmt werden kann.

Ferner bezieht sich die Erfindung auf Skelettmyoblastenzellen, die gemäß der Schritte (i) bis (iii) hergestellt und erhalten werden, und die durch die Expression von Aktinin gekennzeichnet sind, wobei die Expression von Aktinin mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen in Skelettmyoblasten bestimmt werden kann.

Die Erfindung betrifft außerdem Satellitenzellen, die gemäß der Schritte (i) bis (iii) hergestellt und erhalten werden, die durch die Expression des Gens *Pax7* gekennzeichnet sind, wobei die Expression von *Pax7* mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann, stärker bevorzugt wobei Satellitenzellen ferner *Ki67* exprimieren. Erfindungsgemäß ist darüber hinaus ein Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen, 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.

Des Weiteren bezieht sich die vorliegende Erfindung auf Skelettmyotuben, die gemäß der Schritte (i) bis (iv) hergestellt und erhalten werden, und die durch eine anisotrope Ausrichtung der Aktinin-Protein-enthaltenen Sarkomerstruktur charakterisiert sind.

Ferner offenbart ist die Verwendung eines Skelettmuskelgewebes gemäß der Erfindung, und/oder von Zellen gemäß der Erfindung, und/oder von Skelettmyotuben gemäß der Erfindung in einem *in vitro* Arzneimitteltest. Der Arzneimitteltest kann ein Toxizitätstest oder ein Test auf die Funktion des Skelettmuskelgewebes unter dem Einfluss von pharmakologischen und gentherapeutischen Wirkstoffkandidaten sein.

Außerdem betrifft die Erfindung Skelettmuskelgewebe und/oder Zellen, und/oder von Skelettmyotuben gemäß der Erfindung zur Verwendung in der Medizin.

Im Speziellen bezieht sich die Erfindung auf Satellitenzellen gemäß der Erfindung zur Verwendung in der Therapie von geschädigtem Skelettmuskel und/oder in der Behandlung von Skelettmuskelerkrankungen, bevorzugt genetischen Skelettmuskelfekten, 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.

Schließlich betrifft die Erfindung folgende in-vitro-Verfahren:

Ein *in vitro*-Verfahren zum Testen der Wirksamkeit eines Wirkstoffkandidaten auf ein Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß der vorliegenden Erfindung,
- (b) gegebenenfalls Zufügen einer Schädigung zu dem Skelettmuskelgewebe, und
- (c) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) oder (b) mit einem Wirkstoffkandidaten;

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.

Ein *in vitro*-Verfahren zum Testen der Toxizität einer Substanz auf ein Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß der vorliegenden Erfindung,
- (b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einer zu testenden 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.

Ein *in vitro*-Verfahren zum Testen der Wirkung von Nährstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln auf die Leistungsfähigkeit von Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß der vorliegenden Erfindung,
- (b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einem zu testenden Nährstoff oder Nahrungsergänzungsmittel.

bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Kontraktionskraft und/oder der Struktur des Skelettmuskelgewebes und/oder der metabolischen Funkti-

on und/oder molekularer Parameter und/oder proteinbiochemischer Parameter vor und/oder nach Schritt (b) umfasst.

Ein *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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß der vorliegenden Erfindung,
- (b) gegebenenfalls Zufügen einer Schädigung zu den Zellen aus Schritt (a), und
- (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.

Ein *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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß der vorliegenden Erfindung,
- (b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einer zu testenden Substanz,

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.

Ein *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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmy-

oblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß der vorliegenden Erfindung,

- (b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einem zu testenden Nährstoff oder Nahrungsergänzungsmittel,

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 Durchflusssyztometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Offenbarung betrifft ein Verfahren zum Herstellen von künstlichem Skelettmuskelgewebe aus pluripotenten Stammzellen, umfassend die Schritte

- (i) Induzieren von Mesodermindifferenzierung 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.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die pluripotenten Stammzellen aus Primatenursprung, insbesondere humane pluripotente Stammzellen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die pluripotenten Stammzellen ausgewählt aus induzierten pluripotenten Stammzellen, embryonalen Stammzellen, parthenogenetischen Stammzellen, über Kerntransfer hergestellten pluripotenten Stammzellen und über chemische Reprogrammierung hergestellten pluripotente Zellen, insbesondere wobei die pluripotenten Stammzellen induzierte pluripotente Stammzellen sind.

„Pluripotente Stammzellen“ sind in der Lage, sich in jeden Zelltyp des Körpers zu differenzieren. Daher bieten menschliche pluripotente Stammzellen die beachtliche Möglichkeit, beispielsweise Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen zu erhalten. Die derzeit am häufigsten verwendeten pluripotenten Zellen sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) oder embryonale Stammzellen (ESC). Menschliche ESC-Linien wurden erstmals von Thomson et al. hergestellt (Thomson et al., Science 282: 1145-1147 (1998)). Die menschliche ESC-Forschung ermöglicht heutzutage die Entwicklung einer neuen Technologie zur Umprogrammierung von Körperzellen in eine ES-ähnliche Zelle. Diese Technologie wurde 2006 von Yamanaka et al. entwickelt und ist auch auf menschliche Zellen anwendbar (Takahashi & Yamanaka Cell 126: 663-676 (2006) und Takahashi, Kazutoshi et al. Cell, 131:(5)861 – 872(2007)). Die resultierenden induzierten pluripotenten Zellen (iPSC) zeigen ein sehr ähnliches Verhalten wie ESC und sind auch in der Lage, sich in jede Zelle des Körpers zu differenzieren. Darüber hinaus können in einer weiteren Ausführungsform parthenogenetische Stammzellen verwendet werden. Parthenogenetische Stammzellen können bei Säugetieren, bevorzugt bei der Maus als auch beim Menschen, aus Blastozysten gewonnen werden, die sich nach einer *in vitro*-Aktivierung unbefruchteter Eizellen entwickeln. Diese Zellen weisen die Schlüsselmerkmale pluripotenter Stammzellen auf, sodass sie sich *in vitro* in jeden Zelltyp differenzieren können (Espejel S et al. (2014)). Dementsprechend können die pluripotenten Stammzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen, embryonalen Stammzellen und parthenogenetischen Stammzellen ausgewählt werden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die pluripotenten Stammzellen jedoch nicht nach einem Verfahren hergestellt, bei dem die genetische Identität des Menschen in der Keimbahn verändert wird oder bei dem ein menschlicher Embryo für industrielle oder kommerzielle Zwecke verwendet wird. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden induzierte pluripotente Stammzellen ausgewählt.

Um eine gerichtete Zelldifferenzierung der pluripotenten Stammzellen zu Skelettmuskelgewebe zu erzielen, wird die Differenzierung mithilfe von spezifischen Faktoren oder Zusätzen erzielt. Generell werden die erfindungsgemäßen Differenzierungsschritte in Gegenwart eines „Basalmediums“ durchgeführt. Es kann jedes geeignete Basalmedium für das Verfahren ver-

wendet werden. Bevorzugt ist das in den Schritten (i)-(iv) verwendete Basalmedium ausgewählt aus DMEM, DMEM/F12, RPMI, IMDM, alphaMEM, Medium 199, Hams F-10 und Hams F-12. Vorzugsweise ist das in den Schritten (i)-(iv) verwendete Basalmedium DMEM, ergänzt durch Pyruvat. Noch mehr bevorzugt ist das in den Schritten (i)-(iv) verwendete Basalmedium DMEM, ergänzt durch Pyruvat mit 1g/l Glukose. Basalmedien sind kommerziell erhältlich oder können nach öffentlich zugänglichen Rezepturen hergestellt werden, z.B. aus Katalogen des ATCC. In einer stark bevorzugten Ausführungsform ist das Basalmedium DMEM mit 1 g/l Glukose sowie einer Glutaminzubereitung (z.B. L-Alanyl-L-Glutamin oder GlutaMAX™) und besteht aus den Substanzen, die in **Tabelle 3** aufgelistet sind. Wenn es für angemessen erachtet wird, kann das Basalmedium mit einer wirksamen Konzentration an nicht-essentiellen Aminosäuren ergänzt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Basalmedium mit einer einfachen wirksamen Konzentration der nicht-essentiellen Aminosäuren aus **Tabelle 2** ergänzt. Das Basalmedium in den Schritten (ii), (iii) und (iv) kann unabhängig voneinander aus dem in Schritt (i) verwendeten Basalmedium ausgewählt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Basalmedium in den Schritten (i) –(iv) jedoch gleich.

Generell können die verschiedenen Differenzierungsstadien der Schritte (i)-(iv) mithilfe von exprimierten Genen nachgewiesen werden, die für ein bestimmtes Stadium charakteristisch sind. Eine Methode, die die Genexpression messen kann, ist die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq). RNA-Sequenzierung wird auch Transkriptom-Analyse genannt. Als RNA-Sequenzierung wird die Bestimmung der Nukleotidabfolge der RNA bezeichnet, die auf Hochdurchsatzmethoden basiert. Hierfür wird die RNA in cDNA überführt (transkribiert), damit die Methode der DNA-Sequenzierung angewendet werden kann. Dadurch gibt RNA-Sequenzierung Aufschluss darüber, welche mRNAs exprimiert werden und zeichnet sich durch ein geringes Hintergrundrauschen, höhere Auflösung und hohe Reproduktionsraten aus. Dem Fachmann ist die Methode der mRNA-Sequenzierung bekannt und er kann diese ausführen. In Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung werden exemplarische Daten dargestellt, die mithilfe von RNA-Sequenzierung gemessen wurden. Speziell **Abbildung 4** zeigt einen zeitlichen Verlauf der mRNA Expression von unterschiedlichen Genen in einem Zeitfenster von 0 bis 60 Tage während des erfindungsgemäßen Differenzierungsprotokolls.

Charakteristisch für pluripotente Stammzellen ist die mRNA Expression von NANOG, POU5F1 (OCT4) und ZFP42. Das heißt, dass Zellen, die diese Marker exprimieren, pluripotent sind. Während der erfindungsgemäßen Differenzierung von pluripotenten Stammzellen wird in Schritt (i) die „Mesodermaldifferenzierung“ durch spezifische Faktoren/Zusätze induziert. Bei allen bilateralen Tieren (Bilateria), wie auch dem Menschen, ist das Mesoderm eine der drei primären Keimschichten im sehr frühen Embryo. In bilateralen Tieren gibt es drei wichtige Komponenten des Mesoderms: das paraxiale Mesoderm, das Zwischenmesoderm und das

laterale Plattenmesoderm. Aus dem paraxialen Mesoderm entsteht in bilateralen Tieren unter anderem die Skelettmuskulatur. Die Induktion der Mesodermaldifferenzierung wird durch die Genexpression von spezifischen Genen charakterisiert, wie beispielsweise die mRNAs von MSGN1, TBX6 und MEOX1. Eine mRNA-Expression dieser oder anderer Gene, die spezifisch für die Expression von paraxialem Mesoderm sind, können mit Hilfe von RNA-Sequenzierung, wie hierin beschrieben, gemessen werden.

Wie vorstehend ausgeführt, umfasst das Basalmedium von Schritt (i) eine wirksame Menge von (a) FGF2, (b) einem GSK3-Inhibitor, (c) einem SMAD-Inhibitor, und (d) einem serum-freien Zusatz, welcher Transferrin, Insulin, Progesteron, Putrescin und Selen oder ein bioverfügbares Salz davon umfasst. Dem Fachmann ist bekannt, dass eine wirksame Konzentration oder Menge eines Rezeptor/Enzym-Agonisten oder -Inhibitors mit der Verfügbarkeit und biologischen Aktivität der jeweiligen Substanz variiert.

In einer Ausführungsform beträgt die wirksame Menge von FGF2 1-15 ng/ml, 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.

Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase, welche selektiv Phosphat-Reste an die Serin- und Threonin-Reste anderer Proteine anfügt. Die Inhibierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) hilft dabei den Wnt-Signalweg für die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu aktivieren. Der GSK3-Inhibitor im Basalmedium ist beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CHIR99021, CHIR98014, SB216763, TWS119, Tideglusib, SB415286, 6-bromoindirubin-3-oxime und einem Valproatsalz, wobei der GSK3-Inhibitor CHIR99021 bevorzugt ist. Es kann jedoch jeder GSK3-Inhibitor verwendet werden, der für das Verfahren der Erfindung geeignet ist. Wenn der GSK3-Inhibitor CHIR99021 ist, beträgt eine wirksame Menge 1-20 μ M, 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.

Ein SMAD-Inhibitor inhibiert Proteine, die für die Regulierung der Zellentwicklung und des Wachstums von entscheidender Bedeutung sind. Der SMAD-Inhibitor im Basalmedium ist beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus LDN193189, K02288, LDN214117, ML347, LDN212854, DMH1, wobei bevorzugt der SMAD Inhibitor LDN193189 ist. Es kann jedoch jeder SMAD-Inhibitor verwendet werden, der für das Verfahren der Erfindung geeignet ist. Wenn der SMAD-Inhibitor LDN193189 ist, beträgt eine wirksame Menge 0,05-5 μ M, bevorzugt 0,1-2,5 μ M, stärker bevorzugt 0,2-1 μ M, noch stärker bevorzugt 0,25-0,8 μ M, noch stärker bevorzugt 0,3-0,75 μ M, noch stärker bevorzugt 0,35-0,7 μ M, noch stärker be-

vorzugt 0,4-0,6 μM , noch stärker bevorzugt 0,45-0,55 μM , und am stärksten bevorzugt etwa 0,5 μM . Dem Fachmann ist bekannt, dass eine wirksame Konzentration oder Menge eines Inhibitors mit der Verfügbarkeit und biologischen Aktivität der jeweiligen Substanz variiert und dies gilt für alle Substanzen, wie beispielsweise Proteine/Peptide, Nukleotide oder chemische Verbindungen.

In einer Ausführungsform wird der serumfreie Zusatz in den Schritten (i), (ii), (iii) und (iv) des Verfahrens in einer Endkonzentration im Medium bereitgestellt von 50-500 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin (bevorzugt 70-300 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin, stärker bevorzugt 80-200 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin, noch stärker bevorzugt 90-150 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin, am stärksten bevorzugt etwa 100 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin),

1-25 $\mu\text{g/ml}$ Insulin (bevorzugt 2-13 $\mu\text{g/ml}$ Insulin, stärker bevorzugt 3-10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin, noch stärker bevorzugt 4-6 $\mu\text{g/ml}$ Insulin, am stärksten bevorzugt etwa 5 $\mu\text{g/ml}$ Insulin),

0,001-0,1 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron (bevorzugt 0,002-0,05 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron, stärker bevorzugt 0,004-0,01 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron, noch stärker bevorzugt 0,005-0,008 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron, am stärksten bevorzugt etwa 0,0063 $\mu\text{g/ml}$ Progesteron),

5-50 $\mu\text{g/ml}$ Putrescin (bevorzugt 10-35 $\mu\text{g/ml}$ Putrescin, stärker bevorzugt 12-25 $\mu\text{g/ml}$ Putrescin, noch stärker bevorzugt 14-18 $\mu\text{g/ml}$ Putrescin, am stärksten bevorzugt etwa 16 $\mu\text{g/ml}$ Putrescin) und

6-600 nM Selen (bevorzugt 12-300 nM Selen, stärker bevorzugt 20-150 nM Selen, noch stärker bevorzugt 25-50 nM Selen, am stärksten bevorzugt etwa 30 nM Selen) oder ein bioverfügbares Salz davon. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt Selen als Selenit vor, wobei eine wirksame Konzentration davon 1-30 $\mu\text{g/l}$ Selenit (bevorzugt 2-20 $\mu\text{g/l}$ Selenit, stärker bevorzugt 3-10 $\mu\text{g/l}$ Selenit, noch stärker bevorzugt 4-6 $\mu\text{g/l}$ Selenit, am stärksten bevorzugt etwa 5 $\mu\text{g/l}$ Selenit) im Medium beträgt.

Ein serumfreier Zusatz, der die vorstehenden Anforderungen erfüllt, kann im Handel erworben werden. So kann beispielsweise N2-Supplement verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der serumfreie Zusatz N2-Zusatz in einer Konzentration 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. Der N2-Zusatz ist im Handel in 100-facher wirksamer Konzentration erhältlich und die Zusammensetzung ist in **Tabelle 1** aufgelistet. Das bedeutet, dass 1% (v/v) des N2-Zusatzes einer einfachen wirksamen Konzentration entspricht.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird Schritt (i) des Verfahrens für 24 bis 132 Stunden durchgeführt, 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. Die Dauer von Schritt (i) und die Konzentration der Substanzen (a) FGF2, (b) einem GSK3-Inhibitor, (c) einem SMAD-Inhibitor, und

(d) einem serumfreien Zusatz können durch Überwachung der Effizienz der Induktion der Mesodermdifferenzierung optimiert werden. Wie oben beschrieben, kann die Effizienz der Mesodermdifferenzierung durch RNA-Sequenzierung nachvollzogen werden. Die Induktion der Mesodermdifferenzierung ist gegeben, wenn beispielsweise einer oder mehrere der Genmarker MSGN1, TBX6 und MEOX1 einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweisen (bevorzugt einem mindestens 10-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 20-fach höheren Expressionswert, noch stärker bevorzugt einem mindestens 30-fach höheren Expressionswert, am stärksten bevorzugt einen mindestens 50-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung.

In Schritt (ii) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die „myogene Spezifikation“ induziert. Dieses Differenzierungsstadium ist durch die Expression von spezifischen Faktoren charakterisiert. Beispielsweise wird bei der myogenen Spezifikation die mRNA Pax3 exprimiert, deren Expression mittels RNA-Sequenzierung bestimmt werden kann (siehe **Abbildungen 1 und 2** für eine schematische Übersicht; siehe **Abbildung 4** für experimentelle Daten zur Expression von PAX3). Eine myogene Spezifikation ist gegeben, wenn beispielsweise der Genmarker Pax3 einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweist (bevorzugt einem mindestens 10-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 20-fach höheren Expressionswert, noch stärker bevorzugt einem 30-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung.

Wie vorstehend beschrieben schließt Schritt (ii) drei Kultivierungsschritte ein. Insbesondere umfasst Schritt (ii) das Kultivieren der aus Schritt (i) erhaltenen Zellen in Basalmedium in einer wirksamen 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).

Wie in Schritt (i) kann das Basalmedium in Schritt (ii) ausgewählt sein aus DMEM, DMEM/F12, RPMI, IMDM, alphaMEM, Medium 199, Hams F-10 und Hams F-12. Zudem kann das Basalmedium durch nicht-essentielle Aminosäuren und/oder Pyruvat ergänzt werden. Beispielhafte und bevorzugte Ausführungsformen für das Basalmedium in Schritt (ii) können analog zu den beispielhaften und bevorzugten Ausführungsformen in Schritt (i) ausgewählt werden. Das Basalmedium in Schritt (ii) kann unabhängig voneinander aus dem in Schritt (i) verwen-

deten Basalmedium ausgewählt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Basalmedium in den Schritten (i) und (ii) jedoch gleich.

Der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor ist beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DAPT, RO4929097, Semagacestat (LY450139), Avagacestat (BMS-708163), Dibenzazepine (YO-01027), LY411575, IMR-1, L685458, bevorzugt wobei der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor DAPT ist. Es kann jedoch jeder Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor verwendet werden, der für das Verfahren der Erfindung geeignet ist. Wenn der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor DAPT ist, beträgt dessen wirksame Menge 1-20 μM , 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 .

In Schritt (ii) beträgt die wirksame Menge von FGF2 beispielsweise 15-30 ng/ml, 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.

Eine wirksame Menge von HGF ist beispielsweise 1-15 ng/ml, 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.

Dem Fachmann ist bekannt, dass eine wirksame Konzentration oder Menge eines Rezeptor/Enzym-Agonisten oder -Inhibitors mit der Verfügbarkeit und biologischen Aktivität der jeweiligen Substanz variiert.

Wie hierin verwendet, meint der Begriff „Knockout serum replacement“ (KSR) eine wirksame Konzentration von Ascorbinsäure, Insulin, Transferrin und Albumin. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das KSR zusätzlich eine wirksame Konzentration von Selen oder ein biologisch verfügbares Salz davon, Glutathion, und Spurenelemente. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform umfasst das KSR eine wirksame Konzentration der in **Tabelle 5** aufgelisteten Substanzen. In der am stärksten bevorzugten Ausführungsform umfasst das KSR die Substanzen der **Tabelle 5** in der angegebenen Konzentration. Das „Knockout serum replacement“ (KSR) ist im Stand der Technik bekannt und kann gemäß der Rezeptur auf Seiten 27-29 der Patentanmeldung WO 98/30679 hergestellt werden. Alternativ, ist KSR im Handel, z.B. von Gibco, erhältlich.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird 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. In einer stark bevorzugten Ausführungsform wird das KSR in Gegenwart eines Reduktionsmittels verwendet. Jedes geeignete Reduktionsmittel kann verwendet werden und Beispiele für Reduktionsmittel sind beta-Mercaptoethanol und/oder alpha-Thioglycerol. Beta-Mercaptoethanol wird typischerweise in einer Konzentration von 0.02-0.5 mM, stärker bevor-

zugt in einer Konzentration von 0.05-0.02 mM, am stärksten bevorzugt in einer Konzentration von etwa 0.1 mM verwendet. Alternativ kann alpha-Thioglycerol beispielsweise in einer Konzentration von 0.02-0.5 mM, stärker bevorzugt in einer Konzentration von 0.05-0.02 mM, am stärksten bevorzugt in einer Konzentration von etwa 0.1 mM verwendet werden.

In einer Ausführungsform wird die Kultivierung in Schritt (ii) in Gegenwart von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) FGF2, und (c) dem serumfreien Zusatz für 36 bis 60 Stunden durchgeführt, bevorzugt für 42 bis 54 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 48 Stunden durchgeführt; 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, bevorzugt für 42 bis 54 Stunden, und am stärksten bevorzugt für etwa 48 Stunden durchgeführt; 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, 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.

In Schritt (iii) des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Zellen vorteilhafter Weise in Skelettmyoblasten und Satellitenzellen maturiert und expandiert. Skelettmyoblasten zeichnen sich dadurch aus, dass sie fusionskompetent sind und daher in einem weiteren Schritt zu Skelettmyotuben fusionieren können. Satellitenzellen, auch Muskelstammzellen genannt, sind kleine multipotente Zellen. Satellitenzellen sind in der Lage (i) Satellitenzellen oder (ii) differenzierte Skelettmyoblasten hervorzubringen. Genauer gesagt, können nach der Aktivierung Satellitenzellen wieder in den Zellzyklus eintreten, um sich zu vermehren und sich in Myoblasten zu differenzieren. Dieses Differenzierungsstadium des Verfahrens ist durch die Expression von spezifischen Faktoren charakterisiert. Beispielsweise ist die Expression von Pax7 charakteristisch für die Gegenwart von Satellitenzellen. Gleichzeitig ist die Expression von MyoD charakteristisch für Skelettmyoblasten, dessen jeweilige Expression mittels RNA-Sequenzierung bestimmt werden kann (siehe **Abbildungen 1** und **2** für eine schematische Übersicht; siehe **Abbildung 4** für experimentelle Daten zur Expression von MyoD1 und PAX7). Skelettmyoblasten liegen vor, wenn beispielsweise der Genmarker MyoD einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweist (bevorzugt einem mindestens 10-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 15-fach höheren Expressionswert, noch stärker bevorzugt einem 20-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung. Satellitenzellen liegen vor, wenn beispielsweise der Genmarker PAX7 einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweist (bevorzugt einem mindestens 10-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 15-fach höheren Ex-

pressionswert, noch stärker bevorzugt einem 20-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung.

Wie vorstehend beschrieben, umfasst das Basalmedium von Schritt (iii) eine wirksame Menge von (a) HGF, (b) einem serumfreien Zusatz wie in (i), und (c) Knockout serum replacement (KSR). Wie in Schritt (i) und (ii) kann das Basalmedium in Schritt (iii) ausgewählt sein aus DMEM, DMEM/F12, RPMI, IMDM, alphaMEM, Medium 199, Hams F-10 und Hams F-12 und das Basalmedium kann durch nicht-essentielle Aminosäuren und/oder Pyruvat ergänzt werden. Beispielhafte und bevorzugte Ausführungsformen für das Basalmedium in Schritt (iii) können analog zu den beispielhaften und bevorzugten Ausführungsformen in Schritt (i) ausgewählt werden. Das Basalmedium in Schritt (iii) kann unabhängig von dem in Schritt (i) und (ii) verwendeten Basalmedium ausgewählt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Basalmedium in den Schritten (i), (ii) und (iii) jedoch gleich.

Das KSR und das optionale Reduktionsmittel in Schritt (iii) umfassen die gleichen bevorzugten Ausführungsformen wie das KSR und das optionale Reduktionsmittel in Schritt (ii). Somit kann das KSR entweder vom Fachmann selbst hergestellt oder im Handel käuflich erworben werden.

In Schritt (iii) beträgt die wirksame Menge von HGF beispielsweise 1-15 ng/ml, 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

das KSR wird 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; insbesondere wobei das KSR in Gegenwart eines Reduktionsmittels wie beta-Mercaptoethanol und/oder alpha-Thioglycerol verwendet wird.

Dem Fachmann ist bekannt, dass eine wirksame Menge oder wirksame Konzentration eines Rezeptor/Enzym-Agonisten oder -Inhibitors mit der Verfügbarkeit und biologischen Aktivität der jeweiligen Substanz variiert.

In Schritt (iv) des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Zellen vorteilhafter Weise in Skelettmyotuben und Satellitenzellen maturiert. Skelettmyotuben entstehen durch die Fusion von Skelettmyoblasten. Daher sind Skelettmyotuben mehrkernige zelluläre Gebilde, die durch Verschmelzung von reifen Myoblasten zu langen dünnen Myotuben entstehen. Skelettmyotuben werden auch Myozyten oder Muskelfasern genannt. **Abbildung 2** gibt einen schematischen Überblick über die durchlaufenen Entwicklungsstadien des künstlichen Skelettmuskelgewebes und die Bildung von künstlichem Skelettmuskelgewebe ist im Stand der Technik als Myogenese bekannt. Skelettmyotuben (Muskelfasern) sind durch eine anisotrope Ausrichtung der Aktinin enthaltenen Sarkomerstruktur charakterisiert. Neben den fusionierten Ske-

lettmyotuben bildet sich eine regenerations-kompetente Satellitenzellnische aus. Die Satellitenzellnische ist außerhalb der Skelettmyotuben, aber in engem Kontakt mit den Skelettmyotuben. Die Satellitenzellnische ist anatomisch charakteristisch und bildet sich auch in natürlichen Skelettmuskelgeweben aus. Folglich stellt sie zusammen mit den erzeugten Satellitenzellen ein weiteres wünschenswertes Qualitätsmerkmal für das künstlich erzeugte Skelettmuskelgewebe dar. Auch dieses Differenzierungsstadium ist durch die Expression von spezifischen Faktoren charakterisiert. Beispielsweise ist die Expression von Pax7 charakteristisch für die Gegenwart von Satellitenzellen. Gleichzeitig ist die Expression von Myogenin und Aktinin charakteristisch für Skelettmyotuben, dessen jeweilige Expression mittels RNA-Sequenzierung bestimmt werden kann (siehe **Abbildungen 1** und **2** für eine schematische Übersicht; siehe **Abbildung 4** für experimentelle Daten zur Expression von PAX7 (Paired Box 7), ACTN2 (Aktinin Alpha 2), DMD (Dystrophin) und MYH3 (Myosin Heavy Chain 3). Satellitenzellen liegen vor, wenn beispielsweise die mRNA von PAX7 einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweist (bevorzugt einem mindestens 10-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 15-fach höheren Expressionswert, noch stärker bevorzugt einem 20-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung. Skelettmyotuben liegen vor, wenn beispielsweise der Genmarker ACTN2 einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweist (bevorzugt einem mindestens 50-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 100-fach höheren Expressionswert, noch stärker bevorzugt einem 150-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung. Die Genmarker DMD und MYH3 weisen sogar typischerweise einen mindestens 200-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle auf (bevorzugt einem mindestens 500-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 1000-fach höheren Expressionswert).

Wie vorstehend beschrieben sind die in Schritt (iii) erhaltenen Zellen in eine extrazelluläre Matrix dispergiert und werden unter mechanischer Simulation maturiert. Eine mechanische Simulation kann beispielsweise mithilfe einer Streckvorrichtung erfolgen, wie sie im Fachgebiet allgemein bekannt ist und verwendet wird. Vorzugsweise übt die Streckvorrichtung eine statische, phasische oder dynamische Dehnung aus. Somit kann die mechanische Dehnung (a) statisch, (b) phasisch oder (c) dynamisch sein. Ein Beispiel für eine statische Dehnung ist eine isometrische Muskelkontraktion, bei der der Muskel ausschließlich eine Spannungsänderung und keine Längenänderung durchführt. Somit findet bei einer isometrischen Muskelkontraktion keine Verkürzung im Muskel statt. Eine phasische Dehnung kann eine quasi-isotone Muskelkontraktion sein, bei der sich der Muskel bei der Kontraktion verkürzt und die Spannung, die auf den Muskel wirkt, gleich bleibt. Eine dynamische Dehnung kann beispielsweise erfolgen, wenn der Muskel auf flexiblen Halterungen aufgehängt wird und so die auxotone Kontraktion gefördert wird. Bei einer auxotonischen Kontraktion ändert sich sowohl die Mus-

kellänge, als auch die Muskelspannung. Vorzugsweise ist die mechanische Stimulation in Schritt (iv) eine statische mechanische Stimulation, also ein statischer Zug (statische Dehnung). Das bedeutet, dass die Zellen aus Schritt (iii) und die extrazelluläre Matrix unter einer Kraft und einer entgegen gerichteten Kraft (Gegenkraft) stehen.

Wie vorstehend dargelegt umfasst das Basalmedium von Schritt (iv) eine wirksame Menge von (a) einem serumfreien Zusatz wie in Schritt (i) und (b) einen zusätzlichen serumfreien Zusatz, welcher Albumin, Transferrin, Ethanolamin, Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, L-Carnitin, Fettsäurezusatz, und Triod-L-Thyronin (T3).

Beispielhafte und bevorzugte Ausführungsformen für das Basalmedium in Schritt (iv) können analog zu den beispielhaften und bevorzugten Ausführungsformen in Schritt (i) ausgewählt werden.

Der zusätzliche serumfreie Zusatz in Schritt (iv) des Verfahrens wird so formuliert, dass der zusätzliche serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von folgenden Substanzen bereitstellt: 0,5-50 mg/ml Albumin (bevorzugt 1-40 mg/ml, stärker bevorzugt 2-30 mg/ml, noch stärker bevorzugt 3-20 mg/ml, noch stärker bevorzugt 4-10 mg/ml und stärksten bevorzugt 4,5-7,5 mg/ml, wie etwa 5 mg/ml);

1-100 µg/ml Transferrin (bevorzugt 2-90 µg/ml, stärker bevorzugt 3-80 µg/ml, noch stärker bevorzugt 4-70 µg/ml, noch stärker bevorzugt 5-60 µg/ml, stärker bevorzugt 6-50 µg/ml, stärker bevorzugt 7-40 µg/ml, stärker bevorzugt 8-30 µg/ml, stärker bevorzugt 9-20 µg/ml, wie etwa 10 µg/ml);

0,1-10 µg/ml Ethanolamin (bevorzugt 0,2-9 µg/ml, stärker bevorzugt 0,3-8 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,4-7 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,5-6 µg/ml, stärker bevorzugt 0,6-5 µg/ml, stärker bevorzugt 0,7-4 µg/ml, stärker bevorzugt 0,8-3 µg/ml, am stärksten bevorzugt 1-2,5 µg/ml, wie etwa 2 µg/ml);

17,4-1744 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon (bevorzugt 35-850 nM, stärker bevorzugt 70-420 nM, noch stärker bevorzugt 120-220 µg/ml, am stärksten bevorzugt etwa 174 nM);

0,4-40 µg/ml L-Carnitin HCl (bevorzugt 0,5-30 µg/ml, stärker bevorzugt 1-20 µg/ml, noch stärker bevorzugt 2-10 µg/ml, stärker bevorzugt 3-5 µg/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 4 µg/ml);

0,05-5 µl/ml Fettsäure-Zusatz (bevorzugt 0,1-4 µl/ml, stärker bevorzugt 0,2-3 µl/ml, noch stärker bevorzugt 0,3-3 µl/ml, stärker bevorzugt 0,4-2 µl/ml, und am stärksten bevorzugt 0,45-1 µl/ml, wie etwa 0,5 µl/ml); und

0,0001-0,1 µg/ml Triodo-L-Thyronin (T3) (bevorzugt 0,001-0,01 µg/ml, stärker bevorzugt 0,002-0,0075 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,003-0,005 µg/ml, am stärksten bevorzugt etwa 0,004 µg/ml).

Der Fettsäurezusatz kann beispielsweise Linolsäure und/oder Linolensäure umfassen.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der zusätzliche serumfreie Zusatz außerdem

0,1-10 µg/ml Hydrokortison (vorzugsweise 0,2-9 µg/ml, stärker bevorzugt 0,3-8 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,4-7 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,5-6 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,6-5 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,7-4 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,8-3 µg/ml, am stärksten bevorzugt 0,9-2 µg/ml, wie etwa 1 µg/ml). In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform umfasst der zusätzliche serumfreie Zusatz außerdem 0,3-30 µg/ml Insulin (vorzugsweise 0,5-25 µg/ml, stärker bevorzugt 1-20 µg/ml, noch stärker bevorzugt 1,5-15 µg/ml, noch stärker bevorzugt 2-10 µg/ml, am stärksten bevorzugt 2,5-5 µg/ml, wie etwa 3 µg/ml). Ein bioverfügbares Salz von Selen ist beispielsweise Natriumselenit, sodass eine Endkonzentration von 0,003-0,3 µg/ml (vorzugsweise 0,005-0,2 µg/ml, bevorzugter 0,01-0,1 µg/ml, noch bevorzugter 0,02-0,05 µg/ml, und am bevorzugten 0,03 µg/ml, wie etwa 0,032 µg/ml) im Basalmedium bereitgestellt wird.

Darüber hinaus kann der zusätzliche serumfreie Zusatz weiterhin eine oder mehrere Komponenten umfassen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Hydrokortison, Ascorbinsäure Vitamin A, D-Galaktose, Linolensäure, Progesteron und Putrescin besteht. Diese Komponenten sind für die Lebensfähigkeit der Zellen förderlich. Geeignete Konzentrationen der jeweiligen Komponenten sind dem Fachmann bekannt oder können durch Routinemaßnahmen leicht bestimmt werden.

Ein Beispiel eines in Schritt (iv) genannten zusätzlichen serumfreien Zusatzes kann gemäß publizierter Protokolle (siehe auch Brewer et al. 1993) hergestellt werden oder im Handel erworben werden. So kann beispielsweise B27 (**Tabelle 4**) verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der B27-Zusatz in einer Menge von 0,1-10 % B27, vorzugsweise 0,5-8 %, stärker bevorzugt 1-6 %, stärker bevorzugt 1,5-4 %, noch stärker bevorzugt 1,5-4 % und am meisten bevorzugt etwa 2 % B27 verwendet.

Der Erfindung kann vor Schritt (i) ein Saatschritt vorausgehen und das erzielte künstliche Skelettmuskelgewebe wird *bioengineered skeletal muscle* (BSM) genannt. Bei dem Saatschritt werden die pluripotenten Stammzellen in einem Stammzellmedium in der Gegenwart eines ROCK-Inhibitors ausgesät, bevorzugt wobei der Saatschritt 18-30 Stunden vor Schritt (i) ausgeführt wird. Der ROCK-Inhibitor ist beispielsweise ausgewählt 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, Thiazovivin, 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. Es kann jedoch jeder ROCK-Inhibitor verwendet werden, der für das Verfahren der Erfindung geeignet ist. Der Fachmann versteht, dass die Konzentration einer wirksamen Menge eines ROCK-Inhibitors mit der Verfügbarkeit und Inhibitionskonstante des betreffenden Inhibitors variiert. Im Falle von Y27632 kann beispielsweise das im Saatschritt verwendete Medium 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 werden. Bei dem Saatschritt kann ein Stammzellmedium verwendet werden, wobei prinzipiell jedes für das Verfahren geeignete Stammzellmedium verwendet werden kann. Dem Fachmann sind geeignete Stammzellmedien bekannt, wobei das Stammzellmedium iPS-Brew XF besonders bevorzugt ist.

Darüber hinaus können 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. Beim Saatschritt werden die pluripotenten Stammzellen vor Schritt (i) in eine extrazelluläre Matrix dispergiert, sodass die Zellen in der extrazellulären Matrix eingebettet sind und so in einer dreidimensionalen Struktur zu einem künstlichen Skelettmuskelgewebe differenzieren und maturieren können.

Die „extrazelluläre Matrix“ fungiert als Gerüst und bietet eine strukturelle und funktionelle Mikroumgebung für Zellwachstum und Differenzierung. Obwohl die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix für jedes natürliche Gewebe einzigartig ist, sind die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix Kollagene, Fibronectin, Laminin und verschiedene Arten von Glykoaminoglykanen und Proteoglykanen. Proteoglykane bilden eine Klasse besonders stark glykosylierter Glykoproteine, die die Stabilisierung zwischen den Zellen eines Organismus bewerkstelligen. Hier bilden sie große Komplexe, sowohl zu anderen Proteoglykanen, als auch zu Hyaluronsäure, sowie zu Proteinen wie Kollagen – dem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Laminin ist ein kollagenähnliches Glykoprotein. Fibronectin ist auch ein Glykoprotein, das für die extrazelluläre Kollagen-Polymerisierung wichtig ist und unter anderem in der Gewebsreparatur eine wichtige Rolle spielen kann. Der Bestandteil einer extrazellulären Matrix in dem Mastermix ist bevorzugt Kollagen, bevorzugt Typ I Kollagen, stärker bevorzugt aus Rinderursprung, humanen Ursprung oder marinem Ursprung, insbesondere Kollagen aus Rinderursprung. Gegebenenfalls umfasst die extrazelluläre Matrix zusätzlich Laminin und/oder Fibronectin.

Die pluripotenten Stammzellen werden typischerweise in einem Verhältnis von $1-6 \times 10^6$ Zellen/ml und 0,7-1,4 mg/ml Kollagen in Medium ausgesät. In einer Ausführungsform umfasst der Mastermix 5-15% (v/v), bevorzugt 7,5%-12,5% (v/v), stärker bevorzugt 9-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10 % (v/v) eines Exsudats von Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkomzellen als extrazellulären Matrixbestandteil. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Exsudat Matrigel. Der pH-Wert des Mastermixes liegt typischerweise zwischen pH 7,2 und pH 7,8. Matrigel ist dem Fachmann bekannt und ist ferner im Stand der Technik beschrieben (Hughes et al. 2010).

Alternativ zu einem Exsudat von EHS Maus-Sarkomzellen kann der Mastermix Stromazellen umfassen, wobei die Stromazellen die extrazellulären Matrixbestandteile Kollagene, Laminin,

Fibronectin und/oder Proteoglykane erzeugen. Der pH-Wert des Mastermixes liegt typischerweise zwischen pH 7,2 und pH 7,8.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Stammzellmedium nach etwa einer Stunde zu dem Mastermix in der künstlichen Form hinzugefügt und das Stammzellmedium umfasst vorzugsweise eine wirksame Konzentration an KSR und FGF2. Beispielsweise kann 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 umfassen.

Eine wirksame Menge von FGF2 beträgt typischerweise 1-15 ng/ml, 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.

Beim Herstellen von BSM wird Schritt (iii) für 7-11 Tage, bevorzugt für 8-10 Tage, und am stärksten bevorzugt für etwa 9 Tage durchgeführt.

Alternativ können die Skelettmyoblasten und Satellitenzellen in einem zusätzlichen Schritt nach Schritt (iii) und vor Schritt (iv) ausgesät werden und das erzielte künstliche Skelettmuskelgewebe wird *engineered skeletal muscle* (ESM) genannt. Dabei werden die Skelettmyoblasten und Satellitenzellen in der Gegenwart von einem oder mehreren Bestandteilen einer extrazellulären Matrix in einem Mastermix in eine künstliche Form ausgesät. Vorzugsweise ist der Bestandteil einer extrazellulären Matrix in dem Mastermix Kollagen, bevorzugt Typ I Kollagen, stärker bevorzugt aus Rinderursprung, humanem Ursprung oder marinem Ursprung, insbesondere Kollagen aus Rinderursprung, gegebenenfalls wobei die extrazelluläre Matrix zusätzlich Laminin und/oder Fibronectin umfasst. Bei einem Saatschritt nach Schritt (iii) und vor Schritt (iv) werden die Skelettmyoblasten und Satellitenzellen zum Beispiel in einem Verhältnis von $1-10 \times 10^6$ Zellen/ml und 0,7-1,4 mg/ml Kollagen in Medium ausgesät.

In einer Ausführungsform umfasst der Mastermix 5-15% (v/v), bevorzugt 7,5%-12,5% (v/v), stärker bevorzugt 9-11% (v/v), und am stärksten bevorzugt etwa 10 % (v/v) eines Exsudats von Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkomzellen als extrazellulären Matrixbestandteil. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Exsudat Matrigel. Der pH-Wert des Mastermixes liegt typischerweise zwischen pH 7,2 und pH 7,8.

Alternativ zu einem Exsudat von EHS Maus-Sarkomzellen kann der Mastermix Stromazellen umfassen, wobei die Stromazellen die extrazellulären Matrixbestandteile Kollagene, Laminin, Fibronectin und/oder Proteoglykane erzeugen. Der pH-Wert des Mastermixes liegt typischerweise zwischen pH 7,2 und pH 7,8.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach etwa einer Stunde das wie in Schritt (iii) verwendete Basalmedium zum Mastermix in der künstlichen Form hinzugefügt, wobei das Medium zusätzlich eine wirksame Menge eines ROCK-Inhibitors umfasst. Der ROCK-Inhibitor

ist beispielsweise ausgewählt 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, Thiazovivin, 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. Es kann jedoch jeder ROCK-Inhibitor verwendet werden, der für das Verfahren der Erfindung geeignet ist. Der Fachmann weiß, dass die Konzentration einer wirksamen Menge eines ROCK-Inhibitors mit der Verfügbarkeit und Inhibitionskonstante des betreffenden Inhibitors variiert. Im Falle von Y27632 kann beispielsweise das im Saatgutschritt verwendete Medium eine 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 von etwa 5 μM verwendet werden.

Beim Herstellen von ESM wird etwa ein Tag nach dem Saatschritt, der zwischen Schritt (iii) und Schritt (iv) erfolgt, das Medium gegen ein wie in Schritt (iii) verwendetes Medium ausgetauscht, und die Zellen anschließend in diesem Medium für weitere 5-9 Tage, bevorzugt 6-8 Tage, am stärksten bevorzugt etwa 7 Tage weiterkultiviert.

Bei der Herstellung eines BSM oder eines ESM, kann die künstliche Form beispielsweise die Form eines Ringes, eines Bandes, eines Stranges, eines Flickens, eines Beutels, oder eines Zylinders haben, wobei optional einzelne Skelettmuskelgewebe fusioniert werden können. Das bedeutet, dass einzelne und/oder unterschiedliche Geometrien zu einem Skelettmuskelgewebe fusioniert werden und somit unterschiedliche Muskelformen erzielt werden können. Speziell die Form eines Rings, eines Strangs oder eines Bandes ist für Anwendungen in In-Vitro Verfahren z.B. zum Testen der Toxizität nützlich. Normalerweise wird die künstliche Form durch das Gießen des Mastermixes erzielt, sodass generell jede gewünschte gießbare künstliche Form hergestellt werden kann.

Schritt (iv) kann 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, wobei eine längere Kultivierung möglich ist. Eine Kultivierung von 240 Tagen (8 Monaten) konnten die Erfinder bereits durchführen, wobei nichts gegen eine längere Kultivierungsdauer spricht.

Im Unterschied zu vielen im Stand der Technik offenbarten Verfahren umfasst das erfindungsgemäße Verfahren keinen Transfektionsschritt mit einem differenzierungs- oder maturierungsbezogenes Transgen. Vorzugsweise umfasst das Verfahren kein myogenes Transgen und stärker bevorzugt umfasst das Verfahren nicht das Transgen Pax7 oder MyoD. Eine „Transgen“ bezeichnet ein eingeschleustes Gen in eine Zelle. Ein solches Transgen kann in Form von DNA (z.B. in Form eines Plasmids) oder RNA in die Zelle transfiziert werden. Das

Transgen wird dann in der Zelle exprimiert und verändert dadurch die Eigenschaft der Zelle. Zum Beispiel können Transkriptionsfaktoren als Transgene in die Zelle eingeschleust werden, die dann die Expression anderer Gene beeinflussen. So kann ein myogenes Transgen den Anteil an Skelettmyoblasten in einer Zellpopulation erhöhen. Jedoch weisen Transfektionsexperimente mit einem Transgen, wie z.B. Pax7 oder MyoD, je nach Experiment und Zelltyp eine unterschiedliche Transfektionseffizienz auf. Dadurch sind Verfahren, die einen Transfektionsschritt benötigen weniger kontrollierbar und dadurch weniger reproduzierbar. Somit ist ein transgenfreies Verfahren vorteilhaft gegenüber einem Verfahren, das die Transfektion mit einem Transgen benötigt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die pluripotenten Stammzellen in einer anderen Form gentechnisch verändert sind, um beispielsweise ein Krankheitsbild zu simulieren. Außerdem ist das gentechnische Markieren von Zelltypen und/oder Zellfunktionen (z.B. Calcium oder Spannungssignale) oder die Steuerung der Zellfunktion über z.B. optogenetische Mechanismen (z.B. der Kontraktionsfrequenz) nicht ausgeschlossen.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass kein weiterer Selektionsschritt von bestimmten Zelltypen benötigt wird, wie z.B. Skelettmyoblasten. Vorzugsweise enthält das Verfahren keinen Anreicherungsschritt durch Zellselektion, stärker bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Antikörper-basierte Zellselektion. Dies ist vorteilhaft, da die Zellen nicht in einem zusätzlichen Schritt aus ihrer Umgebung extrahiert werden müssen. Eine mögliche Methode der Antikörper-basierten Zellselektion ist die Durchflusszytometrie, die dem Fachmann bekannt ist. Eine solche Zellselektion mittels Durchflusszytometrie ist mit einem erheblichen Zellverlust verbunden. Daher erlaubt eine Aufreinigung über Durchflusszytometrie keine Skalierung, ist mit Infektionsrisiken verbunden und stellt daher eine zentrale Barriere für die kommerzielle Anwendung von Zellprodukten dar. Da die erfindungsgemäßen Verfahren keine Zellselektion erfordern, ist die Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe und der erfindungsgemäßen Zellen skalierbar und für kommerzielle oder medizinische Anwendungen geeignet.

Darüber hinaus ist das Verfahren serumfrei, sodass keine Variabilität in Bezug auf eine andersgeartete Serumcharge besteht. Daraus ergibt sich ein robustes reproduzierbares Protokoll zur Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe, bei dem alle nötigen chemischen und physikalischen Reize definiert sind.

Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein 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);
- (iii) 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), gefolgt von
- (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; dadurch Erzeugen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen.

Die in diesem Verfahren erzeugten Zellen weisen beispielsweise einen Anteil an Skelettmyoblasten von der Menge aller vorliegenden Zellen von mindestens 40% auf, bevorzugt mindestens 50%, stärker bevorzugt mindestens 60%, am meisten bevorzugt mindestens 70%, bestimmt durch die Expression von Aktinin mittels Durchflusszytometrie.

Vorzugweise wird 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.

Die Methode der „Durchflusszytometrie“ ist dem Fachmann bekannt. Bei der Durchflusszytometrie werden physikalische und/oder chemische Eigenschaften einer Zellpopulation nachgewiesen. Für die hierin beschriebene Erfindung kann die Anwesenheit von skelettmuskelspezifischen Proteinen, die für die Differenzierung in Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben oder Satellitenzellen charakteristisch sind, mittels Fluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Insbesondere werden die Proteine sarkomerisches α -Aktinin, Myogenin, Pax7, und MyoD mit

primären Antikörpern inkubiert und dadurch markiert. Mithilfe eines fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpers können die skelettmuskel-spezifischen Zellen nachgewiesen werden.

Ein großer Vorteil des Verfahrens gegenüber dem Stand der Technik ist, dass kein Schritt zur Anreicherung von Zellen, wie z.B. Skelettmyoblasten, nötig ist. Vorzugsweise enthält das Verfahren keinen Anreicherungsschritt durch Zellselektion, stärker bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Antikörper-basierte Zellselektion, wie z.B. Durchflusszytometrie. Das bedeutet, dass das erfindungsgemäße Verfahren keine Zellselektion benötigt, um Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und/oder Satellitenzellen in hoher Reinheit zu erzielen. Methoden zur Zellselektion sind hier lediglich zu analytischen Zwecken offenbart, um die hohe Reinheit der hergestellten Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen zu belegen. (siehe **Abbildung 5**).

Wie vorstehend beschrieben, umfasst das Basalmedium von Schritt (i) eine wirksame Menge von (a) FGF2, (b) einem GSK3-Inhibitor, (c) einem SMAD-Inhibitor, und (d) einem serum-freien Zusatz, welcher Transferrin, Insulin, Progesteron, Putrescin und Selen oder ein bioverfügbares Salz davon umfasst.

Der GSK3-Inhibitor im Basalmedium ist beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CHIR99021, CHIR98014, SB216763, TWS119, Tideglusib, SB415286, 6-bromindirubin-3-oxime und einem Valproatsalz, wobei der GSK3-Inhibitor CHIR99021 bevorzugt ist. Es kann jedoch jeder GSK3-Inhibitor verwendet werden, der für das Verfahren der Erfindung geeignet ist. Wenn der GSK3-Inhibitor CHIR99021 ist, beträgt eine wirksame Menge 4-18 μM , 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 .

Bevorzugte und beispielhafte Ausführungsformen der Schritte (i)-(iii) sind im Verfahren zum Herstellen von künstlichem Skelettmuskelgewebe beschrieben und können analog auf das Verfahren zum Herstellen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen angewendet werden.

Die jeweiligen Differenzierungsstadien können durch einfache experimentelle Nachweise, die dem Fachmann bekannt sind, bestimmt werden. Beispielsweise haben die Erfinder die Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei werden Skelettmuskel-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Pax7, MyoD und Myogenin) immunologisch eingefärbt. Nach Schritt (iii) des Verfahrens zeigen die Fluoreszenzbilder einen hohen Anteil von Zellen mit einer Expression von Pax7, MyoD und Myogenin (**Abbildung 3**). Diese Methode zeigt, dass durch das Verfahren Satellitenzellen (Pax7) sowie Skelettmyoblasten (MyoD und Myogenin) erzeugt werden.

In Schritt (iv) des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Zellen in Skelettmyotuben und Satellitenzellen maturiert. Skelettmyotuben entstehen durch die Fusion von Skelettmyoblasten. Daher sind Skelettmyotuben mehrkernige zelluläre Gebilde, die durch Verschmelzung von reifen Myoblasten zu langen Myotuben entstehen. Wie in Schritt (iv) des Verfahrens zum Herstellen von Skelettmuskelgewebe beschrieben, ist auch dieses Differenzierungsstadium durch die Expression von spezifischen Faktoren charakterisiert. Beispielsweise ist die Expression von Pax7 charakteristisch für die Gegenwart von Satellitenzellen. Gleichzeitig ist die Expression von Myogenin und Aktinin charakteristisch für Skelettmyotuben, dessen jeweilige Expression mittels RNA-Sequenzierung bestimmt werden kann (siehe **Abbildungen 1** und **2** für eine schematische Übersicht; siehe **Abbildung 4** für experimentelle Daten zur Expression von PAX7, ACTN2, DMD und MYH3). Satellitenzellen sind gegeben, wenn beispielsweise der Genmarker PAX7 einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweist (bevorzugt einem mindestens 10-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 20-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung. Skelettmyotuben sind gegeben, wenn beispielsweise der Genmarker ACTN2 einen mindestens 5-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle aufweist (bevorzugt einem mindestens 50-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 100-fach höheren Expressionswert, noch stärker bevorzugt einem 150-fach höheren Expressionswert), gemessen durch „Reads per kilobase million“ mittels RNA-Sequenzierung. Die Genmarker DMD und MYH3 weisen sogar einen mindestens 200-fach höheren Expressionswert im Vergleich zur pluripotenten Stammzelle auf (bevorzugt einem mindestens 500-fach höheren Expressionswert, stärker bevorzugt einem 1000-fach höheren Expressionswert).

Wie vorstehend dargelegt umfasst das Basalmedium von Schritt (iv) 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).

Der zusätzliche serumfreie Zusatz in Schritt (iv) des Verfahrens wird so formuliert, dass der zusätzliche serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von folgenden Substanzen bereitstellt: 0,5-50 mg/ml Albumin (bevorzugt 1-40 mg/ml, stärker bevorzugt 2-30 mg/ml, noch stärker bevorzugt 3-20 mg/ml, noch stärker bevorzugt 4-10 mg/ml und stärksten bevorzugt 4,5-7,5 mg/ml, wie etwa 5 mg/ml);

1-100 µg/ml Transferrin (bevorzugt 2-90 µg/ml, stärker bevorzugt 3-80 µg/ml, noch stärker bevorzugt 4-70 µg/ml, noch stärker bevorzugt 5-60 µg/ml, stärker bevorzugt 6-50 µg/ml, stärker bevorzugt 7-40 µg/ml, stärker bevorzugt 8-30 µg/ml, stärker bevorzugt 9-20 µg/ml, wie etwa 10 µg/ml);

0,1-10 µg/ml Ethanolamin (bevorzugt 0,2-9 µg/ml, stärker bevorzugt 0,3-8 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,4-7 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,5-6 µg/ml, stärker bevorzugt 0,6-5 µg/ml, stärker bevorzugt 0,7-4 µg/ml, stärker bevorzugt 0,8-3 µg/ml, am stärksten bevorzugt 1-2,5 µg/ml, wie etwa 2 µg/ml);

17.4-1744 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon (bevorzugt 35-850 nM, stärker bevorzugt 70-420 nM, noch stärker bevorzugt 120-220 µg/ml, am stärksten bevorzugt etwa 174 nM);

0,4-40 µg/ml L-Carnitin HCl (bevorzugt 0,5-30 µg/ml, stärker bevorzugt 1-20 µg/ml, noch stärker bevorzugt 2-10 µg/ml, stärker bevorzugt 3-5 µg/ml, und am stärksten bevorzugt etwa 4 µg/ml);

0,05-5 µl/ml Fettsäure-Zusatz (bevorzugt 0,1-4 µl/ml, stärker bevorzugt 0,2-3 µl/ml, noch stärker bevorzugt 0,3-3 µl/ml, stärker bevorzugt 0,4-2 µl/ml, und am stärksten bevorzugt 0,45-1 µl/ml, wie etwa 0,5 µl/ml); und

0,0001-0,1 µg/ml Triiodo-L-Thyronin (T₃) (bevorzugt 0,001-0,01 µg/ml, stärker bevorzugt 0,002-0,0075 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,003-0,005 µg/ml, am stärksten bevorzugt etwa 0,004 µg/ml).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der zusätzliche serumfreie Zusatz außerdem 0,1-10 µg/ml Hydrokortison (vorzugsweise 0,2-9 µg/ml, stärker bevorzugt 0,3-8 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,4-7 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,5-6 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,6-5 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,7-4 µg/ml, noch stärker bevorzugt 0,8-3 µg/ml, am stärksten bevorzugt 0,9-2 µg/ml, wie etwa 1 µg/ml). In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform umfasst der zusätzliche serumfreie Zusatz außerdem 0,3-30 µg/ml Insulin (vorzugsweise 0,5-25 µg/ml, stärker bevorzugt 1-20 µg/ml, noch stärker bevorzugt 1,5-15 µg/ml, noch stärker bevorzugt 2-10 µg/ml, am stärksten bevorzugt 2,5-5 µg/ml, wie etwa 3 µg/ml). Ein bioverfügbares Salz von Selen ist beispielsweise Natriumselenit, sodass eine Endkonzentration von 0,003-0,3 µg/ml (vorzugsweise 0,005-0,2 µg/ml, bevorzugter 0,01-0,1 µg/ml, noch bevorzugter 0,02-0,05 µg/ml, und am bevorzugten 0,03 µg/ml, wie etwa 0,032 µg/ml) im Basalmedium bereitgestellt wird.

Darüber hinaus kann der zusätzliche serumfreie Zusatz weiterhin eine oder mehrere Komponenten umfassen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Vitamin A, Hydrokortison, D-Galaktose, Linolensäure, Progesteron und Putrescin besteht. Diese Komponenten sind für die Lebensfähigkeit der Zellen förderlich. Geeignete Konzentrationen der jeweiligen Komponenten sind dem Fachmann bekannt oder können durch Routinemaßnahmen leicht bestimmt werden.

Der in Schritt (iv) genannte zusätzliche serumfreie Zusatz ist ebenfalls im Handel erhältlich. So kann beispielsweise B27 verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der B27-Zusatz in einer Menge von 0,1-10 % B27, vorzugsweise 0,5-8 %, vorzugsweise 1-6

%, stärker bevorzugt 1,5-4 %, noch stärker bevorzugt 1,5-4 % und am meisten bevorzugt etwa 2 % B27 verwendet.

Darüber hinaus kann Schritt (iv) dieses Verfahrens für mindestens 30 Tage, bevorzugt mindestens 35 Tage, stärker bevorzugt für mindestens 40 Tage, und noch stärker bevorzugt für mindestens zu 50 Tage durchgeführt.

Schritt (i) dieses Verfahrens kann ein Saatschritt vorausgehen, bei 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, bevorzugt 20-28 Stunden, stärker bevorzugt 22-26 Stunden, noch stärker bevorzugt 23-25 Stunden und am stärksten bevorzugt etwa 24 Stunden. Der ROCK-Inhibitor ist beispielsweise ausgewählt 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, Thiazovivin, 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. Es kann jedoch jeder ROCK-Inhibitor verwendet werden, der für das Verfahren der Erfindung geeignet ist. Der Fachmann versteht, dass die Konzentration einer wirksamen Menge eines ROCK-Inhibitors mit der Verfügbarkeit und Inhibitionskonstante des betreffenden Inhibitors variiert. Im Falle von Y27632 kann beispielsweise das im Saatgutschritt verwendete Medium eine 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 von etwa 5 μM verwendet werden. Bei dem Saatschritt kann ein Stammzellmedium verwendet werden, wobei prinzipiell jedes für das Verfahren geeignete Stammzellmedium verwendet werden kann. Dem Fachmann sind geeignete Stammzellmedien bekannt, wobei das Stammzellmedium iPS-Brew XF besonders bevorzugt ist. Das Stammzellmedium umfasst vorzugsweise eine wirksame Konzentration an KSR und FGF2. Insbesondere umfasst das Stammzellmedium beispielsweise 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; und/oder

1-15 ng/ml FGF2, 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.

Wie auch im Verfahren zum Herstellen von Skelettmuskelgewebe können die Differenzierungsstadien der Schritte (i)-(iv) des Verfahrens zum Herstellen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen mithilfe exprimierter Gene nachgewiesen werden, die für ein bestimmtes Stadium charakteristisch sind. Die Methode der RNA-Sequenzierung wird in diesem Verfahren analog zum Verfahren zum Herstellen von Skelettmuskelgewebe ange-

wendet. Entsprechend können die gleichen exprimierten Gene (also MSGN1, TBX6, MEOX1, PAX3, PAX7, MYOD1, ACTN2, DMD, MYH3) in Abhängigkeit des Differenzierungsstadiums nachgewiesen werden.

Die im Stand der Technik offenbarten traditionellen Verfahren zur Gewinnung von Skelettmuskelzellen erfordern oft umfangreiche Verdauprotokolle und/oder Zellselektionsschritte mittels Durchflusszytometrie. Durch Verdauprotokolle werden die Zellen in eine andere Umgebung transferiert und verlieren dadurch ihre Zell-Zell-Konnektivität sowie die Zell-Matrix Konnektivität. Dadurch wird die während der Entwicklung gebildete extrazelluläre Umgebung und räumliche Verteilung der Zelltypen zerstört und dies kann eine schwer zu kontrollierende hemmende Wirkung auf den Skelettmuskeldifferenzierungsprozess haben. Die vorliegende Erfindung minimiert die Anzahl der Verdauschritte und benötigt keine Zellselektion, um z.B. Skelettmyoblasten anzureichern, da das ausgefeilte Protokoll eine hohe Reinheit an Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen erzeugt (Exemplarisch sind in den Beispielen Zellpopulation gezeigt, die mindestens 70% Aktinin positiv und mindestens 30% PAX7 positiv sind, siehe auch **Abbildung 5**).

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann ein künstlich hergestelltes Skelettmuskelgewebe mit vorteilhaften Eigenschaften erhalten werden. Im künstlich hergestellten Skelettmuskelgewebe kann die Gegenwart von Skelettmyotuben durch Färbung von Aktinin nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 8**). Insbesondere umfasst das Skelettmuskelgewebe kein Differenzierungs- oder maturierungsbezogenes Transgen, bevorzugt wobei das Skelettmuskelgewebe kein myogenes Transgen umfasst, stärker bevorzugt wobei das Skelettmuskelgewebe nicht das Transgen Pax7 oder MyoD umfasst. Im Vergleich zu natürlichem Skelettmuskelgewebe weist das künstliche Skelettmuskelgewebe, z.B. das BSM oder ESM, keine Durchblutung oder Steuerung über das zentrale Nervensystem auf. Das zentrale Nervensystem ist dem Fachmann bekannt besteht bei Wirbeltieren aus Gehirn und Rückenmark. Beispielsweise weist das künstliche Skelettmuskelgewebe auch keine Innervation durch Nervenzellen auf. Mit Durchblutung ist eine Vaskularisierung des Muskels gemeint, die den Muskel mit Blut versorgt. Ein weiterer Unterschied zum natürlichen Skelettmuskelgewebe ist, dass das künstliche Skelettmuskelgewebe keine muskuloskeletale Aufhängung über Sehnenanteile oder Knochen besitzt und sich vollständig *ex vivo* zu einem künstlichen Skelettmuskel entwickelt. Somit ist das künstliche Skelettmuskelgewebe klar vom natürlichen Skelettmuskelgewebe unterscheidbar. Trotz seiner artifiziellen Herstellung weist das erfindungsgemäße Skelettmuskelgewebe viele Eigenschaften eines nativen Skelettmuskels auf. Darunter fallen morphologische Merkmale eines Syncytiums aus fusionierten Myozyten (Muskelfasern, mehrkernige Skelettmyotuben) und kontraktile Leistung (positives Kraft-Frequenz-Verhältnis und tetanische Kontraktionen). Anders als in Geweben im Stand der Technik bilden sich Satellitenzellnischen in direktem Kontakt zu den Skelettmuskelfasern aus. Zudem weist das erfindungsgemäß

hergestellte Skelettmuskelgewebe die typischen Fasern der quergestreiften Skelettmuskulatur auf, wobei das Skelettmuskelgewebe aus vielen Muskelfasern (Synzytien) besteht. Dem Fachmann ist bekannt, dass natürliches Skelettmuskelgewebe multinukleäre Skelettmuskelfasern aufweist, wobei jede Skelettmuskelfaser aus aneinandergereihten Sarkomeren besteht. Daher sind multinukleäre Skelettmuskelfasern bei Aktinfärbung oder Aktininfärbung durch ihr charakteristisches quergestreiftes Skelettmuskulaturmuster zu erkennen, da das Aktin/Aktinin innerhalb der Sarkomere eingefärbt wird. Die Sarkomere haben einen strengen, regelmäßigen Aufbau, sie sind hintereinander gereiht und bilden zusammen eine multinukleäre Muskelfaser. Das bedeutet, dass ein charakteristisches quergestreiftes Skelettmuskulaturmuster belegt, dass sich multinukleäre Skelettmuskelfasern ausgebildet haben. Die charakteristische Skelettmuskelgewebestruktur (Skelettmuskelfasern mit Satellitenzellnischen) lassen sich per Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung für Aktinin oder Aktin und Pax7 darstellen. In der vorliegenden Erfindung haben die Erfinder das Strukturprotein Aktin im künstlichen Skelettmuskelgewebe eingefärbt und die Fluoreszenzbilder in **Abbildung 8** zeigen beispielhaft das charakteristische Streifenmuster.

Ein entscheidendes funktionelles Merkmal für künstliche Skelettmuskelgewebe ist, dass das Gewebe in Antwort auf elektrische Stimulation kontrahiert, sodass es krafterzeugend ist. Dieser krafterzeugende Charakter kann beispielsweise durch Messung der kontraktile Leistung festgestellt werden. Diese Kontraktionsexperimente messen die Kontraktionsfrequenz und die Kontraktionskraft des künstlichen Skelettmuskelgewebes in Antwort auf elektrische Stimulation. Das Skelettmuskelgewebe in Form eines Ringes wurde in Organbädern (Föhr Medical Instruments) mit Tyrode-Lösung (z.B. in mmol/L: 120 NaCl, 1 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 5,4 KCl, 22,6 NaHCO₃, 4,2 NaH₂PO₄, 5,6 Glucose und 0,56 Ascorbat) bei 37°C und ständiger Begasung mit 5% CO₂ und 95% O₂ getestet. Das künstliche Skelettmuskelgewebe wird mechanisch gedehnt und die maximale Kraftamplitude (Kontraktionskraft; engl.: force of contraction=FOC) wird typischerweise bei elektrischen Feld-Stimulationsfrequenzen im Bereich von 1-100 Hz (4 ms Rechteckimpulse; 200 mA) gemessen. Beispielhafte Messmethoden für das erfindungsgemäße Gewebe sind in den **Abbildungen 6B, 6C, 7B und 7C** dargestellt. Diese Kontraktionsexperimente zeigen, dass das künstliche Skelettmuskelgewebe besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweist, wenn es in Antwort auf elektrische Stimulation Kraft erzeugt. Die künstlichen Skelettmuskelgewebe zeigen eine reproduzierbare Kontraktionsfrequenz und Kontraktionskraft in Antwort auf Stimulationsfrequenzen zwischen 1 Hz und 100 Hz. Typischerweise dauert bei einer Einzelstimulation von 1 Hz eine Kontraktion und vollständige Relaxation ungefähr 0.5 Sekunden. Da die Kontraktions- und Relaxationszeit ungefähr 0.5 Sekunden dauert, bildet sich bei höheren Stimulationsfrequenzen ein beginnender oder vollständiger Tetanus aus. Auch in natürlichen Skelettmuskelgeweben wird bei einer erhöhten Stimulationsfrequenz ein Tetanus ausgebildet, sodass sich das künstliche Skelettmuskelgewebe selbst in dieser Hinsicht analog zu natürlichem Skelettmuskelgewebe verhält.

Des Weiteren können die Erfinder zeigen, dass die Kontraktionskraft des Muskelgewebes mit zunehmender Kontraktionsfrequenz steigt (positives Kraft-Frequenz-Verhältnis). Diese Eigenschaften sind im Einklang mit nativem Skelettmuskelgewebe, das auch Einzelkontraktionen und tetanische Kontraktionen sowie eine positive Kraft-Frequenz-Verhältnis als Reaktion auf elektrische Stimulation zeigt. Im Unterschied zu dem künstlichen Skelettmuskelgewebe entstehen bei natürlichen Muskelgeweben die elektrischen Impulse durch die Aktionspotenziale der Nervenzellen, wobei das künstliche Skelettmuskelgewebe spontan und in Antwort auf elektrische Stimulation kontrahieren kann.

Wie in den **Abbildungen 6B, 6C, 7B, 7C und 8** beispielhaft gezeigt, weist das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte künstliche Skelettmuskelgewebe eine charakteristische Ausbildung von multinukleären Muskelfasern (Skelettmyotuben) auf und erzeugt in Antwort auf elektrische Stimulation Kraft. Typischerweise kann das künstliche Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz bei 200 mA mindestens eine Kontraktionskraft von 0,3 Millinewton (mN) erzeugen, 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 erzeugen.

Das künstliche Skelettmuskelgewebe kann prinzipiell jede gewünschte Form aufweisen. Beispielsweise kann es die künstliche Form eines Ringes, eines Bandes, eines Stranges, eines Flickens, eines Beutels, oder eines Zylinders haben, wobei optional einzelne Skelettmuskelgewebe fusioniert werden können. In den Beispielen hierin wies das Skelettmuskelgewebe beispielsweise die Form eines Ringes auf. Jedoch können auch einzelne und/oder unterschiedliche Geometrien zu einem Skelettmuskelgewebe beliebig fusioniert werden, wodurch viele weitere unterschiedliche Muskelformen erzielt werden können. Speziell die Form eines Rings, eines Strangs, eines Flickens oder eines Bandes ist für Anwendungen in In-Vitro Verfahren z.B. zum Testen der Toxizität oder für eine therapeutische Applikation zur Muskelreparatur in vivo nützlich. Normalerweise wird die künstliche Form bereits durch das Gießen des Mastermixes erzielt, sodass generell jede gießbare künstliche Form hergestellt werden kann.

Des Weiteren umfasst die Erfindung mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen erhalten nach Schritt (i) der Erfindung, 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. Diese

Zellen sind auch dadurch gekennzeichnet, dass sie die mRNA von *SP5* exprimieren, wobei die Expression von *SP5* mittels RNA Sequenzierung bestimmt werden kann.

Außerdem betrifft die Erfindung myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen erhalten nach Schritt (ii) der Erfindung, hergestellt durch die Schritte (i) und (ii) der Erfindung, die durch die Expression des Gens *PAX3* gekennzeichnet sind, wobei die Expression von *PAX3* mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann. Diese Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die mRNA von *SIM1* exprimieren, wobei die Expression von *SIM1* mittels RNA Sequenzierung bestimmt werden kann.

Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf Skelettmyoblastenzellen erhalten nach Schritt (iii) der Erfindung, hergestellt durch die Schritte (i) bis (iii) der Erfindung, die durch die Expression von Aktinin gekennzeichnet sind, wobei die Expression von Aktinin mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen in Skelettmyoblasten bestimmt werden kann.

Ferner werden durch die vorliegende Offenbarung Satellitenzellen bereitgestellt, die nach Schritt (iii) der hierin offenbarten Verfahren erhalten und durch die Schritte (i) bis (iii) der hierin offenbarten Verfahren hergestellt werden können, die durch die Expression des Gens *Pax7* gekennzeichnet sind. Dabei kann die Expression von *Pax7* mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden. Satellitenzellen sind durch einen aktiven oder aktivierbaren Zellzyklus gekennzeichnet und exprimieren dann *Pax7* und *Ki67*. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform exprimieren die Satellitenzellen daher darüber hinaus *Ki67*. Die Zellzyklusaktivierung in künstlichem Skelettmuskelgewebe wird vermehrt nach Gewebeschädigung (z.B. durch Druckverletzung, Cardiotoxin-Behandlung, Bestrahlung oder Erfrierung) beobachtet und führt zu einer Reparatur der Gewebeschädigung im Sinne einer endogenen Regeneration.

Außerdem wird ein Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen offenbart, 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.

Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf Skelettmyotuben erhalten nach Schritt (iv) der Erfindung, hergestellt durch die Schritte (i) bis (iv) der Erfindung, die durch eine anisotrope Ausrichtung der Aktinin Protein enthaltenen Sarkomerstruktur charakterisiert sind.

Vorteilhafterweise können das künstliche Skelettmuskelgewebe, die mesodermal differenzierten Skelettmyoblastenvorläuferzellen, die myogen spezifizierten Skelettmyoblastenvorläuferzellen, die Skelettmyoblastenzellen, die Satellitenzellen und/oder die Skelettmyotuben in einem *in vitro* Arzneimitteltest verwendet werden. Der Arzneimitteltest ist vorzugsweise ein Toxizitätstest oder ein Test auf die Funktion des Skelettmuskelgewebes unter dem Einfluss von pharmakologischen und gentherapeutischen Wirkstoffkandidaten. Pharmakologische Wirkstoffkandidaten sind typischerweise Arzneimittelkandidaten, die niedermolekulare Substanzen sowie proteinbasierte Moleküle umfassen. Gentherapeutische Wirkstoffkandidaten verändern üblicherweise das Genom des Skelettmuskelgewebes durch Einschleusen von entsprechenden Nukleinsäuren.

Des Weiteren können das künstliche Skelettmuskelgewebe, die mesodermal differenzierten Skelettmyoblastenvorläuferzellen, die myogen spezifizierten Skelettmyoblastenvorläuferzellen, die Skelettmyoblastenzellen, die Satellitenzellen und/oder die Skelettmyotuben in der Medizin verwendet werden.

Von besonderer Bedeutung sind hier die Satellitenzellen. Sie werden zur Verwendung in der Therapie von geschädigtem Skelettmuskel und/oder in der Behandlung von Skelettmuskelerkrankungen in Betracht gezogen, bevorzugt bei genetischen Skelettmuskelfekten, 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. Dem Fachmann ist aus dem Stand der Technik bekannt, dass Satellitenzellen bereits in klinischen Studien in der Therapie von muskulären Dystrophien angewendet wurden (Tedesco FS et al. 2010). Darüber hinaus kommen Satellitenzellen zur Verwendung in der Behandlung von Skelettmuskelerkrankungen, wie zum Beispiel amyotrophen Lateralsklerose, Myasthenia gravis oder Myotonien in Betracht. Myotonien fassen verschiedene Muskelerkrankungen zusammen, die eine verzögerte Entspannung und dadurch krankhaft verlängerte, tonische Muskelanspannung aufweisen. Satellitenzellen sind besonders für die Therapie von geschädigtem Skelettmuskel und/oder für die Behandlung von Skelettmuskelerkrankungen geeignet, da sie das Skelettmuskelgewebe kontinuierlich regenerieren. Mit dem Begriff „geschädigtes Skelettmuskelgewebe“ sind Verletzungen und Verwundungen eines Gewebes gemeint, die durch Gewalteinwirkung von außen entsteht. Humane Satellitenzellen, die nach Schritt (iii) oder (iv) des erfindungsgemäßen Verfahrens gewonnen werden, weisen den charakteristischen Marker Pax7 auf. Daher sind die erfindungsgemäßen Satellitenzellen vielversprechende Kandidaten für die zellbasierte Therapie bei geschädigtem Skelettmuskelgewebe, da Satellitenzellen zu einer

gesteigerten Regeneration von Skelettmuskelgewebe führen (Yin et al. (2013)). Ebenso sind erfindungsgemäße künstliche Skelettmuskelgewebe vielversprechende Kandidaten für die zellbasierte Therapie bei geschädigtem Skelettmuskelgewebe; besonders für die Behandlung großer Muskeldefekte. Speziell bei einem Trauma oder einer massiven Muskelzerstörung ist eine direkte Implantation von Ersatzgewebe, wie beispielsweise einem künstlichen Skelettmuskelgewebe, ein vielversprechender Ansatz. Skelettmuskelimplantate können über elektrische Stimulation oder optogenetische Aktivierung funktionell integriert und steuerbar sein und so die Muskelfunktion wieder herstellen oder therapeutisch unterstützen. Durch den Satellitenzellanteil in künstlichem Skelettmuskelgewebe wird die endogene Regenerationsfähigkeit des Skelettmuskels langfristig sichergestellt.

Das künstliche Skelettmuskelgewebe, sowie die mesodermal differenzierten Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierten Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben, oder ein Gemisch aus Skelettmyoblasten und Satellitenzellen, sind zudem geeignete Modellsysteme für die Untersuchung von zellulären Mechanismen, die für die Differenzierung und Maturierung wichtig sind. Sie stellen somit wichtige wissenschaftliche Werkzeuge für die Grundlagenforschung dar. Somit können beispielsweise chemische Substanzen und gegebenenfalls physikalische Reize, wie Dehnung oder Schädigung außerhalb des menschlichen Körpers an menschlichen Zellen oder an künstlichem Skelettmuskelgewebe getestet werden. Die erfindungsgemäßen Zellen, Skelettmyotuben und das künstliche Skelettmuskelgewebe ermöglicht pharmakologische Sicherheits- und Wirksamkeitsexperimente, wobei die Wirkung auf Zellen und Gewebe getestet werden kann. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber Tierexperimenten (z.B. Maus- oder Rattengewebe/-zellen), da die pharmakologische Wirkung auf z.B. menschlichem Gewebe und in einer besonderen Ausführungsform auf Patienten-spezifische Gewebe getestet werden kann. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu natürlichem Skelettgewebe lässt sich das gemäß dem vorstehend offenbarten Verfahren hergestellte Skelettgewebe vorteilhafter Weise in diversen *in vitro*-Verfahren einsetzen.

Eine solche Anwendungsmöglichkeit ist ein *in vitro*-Verfahren zum Testen der Wirksamkeit eines Wirkstoffkandidaten auf ein Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß der hierin beschriebenen Erfindung,
- (b) gegebenenfalls Zufügen einer Schädigung zu dem Skelettmuskelgewebe, und

(c) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) oder (b) mit einem Wirkstoffkandidaten;

bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Kontraktionskraft und/oder der Struktur des Skelettmuskelgewebes und/oder der metabolischen Funktion und/oder molekularer und/oder proteinbiochemischer Parameter vor und/oder nach Schritt (c) umfasst.

Die Kontraktionskraft und/oder die Struktur des Skelettmuskelgewebes kann durch die hierin beschriebenen Kontraktionsexperimente und durch die hierin beschriebenen Fluoreszenzmikroskopie-Experimente gemessen werden. Die metabolische Funktion kann beispielsweise durch mit Hilfe eines Seahorse Metabolic Flux Analyzers gemessen werden, der dem Fachmann bekannt ist. Ein Seahorse Metabolic Flux Analyzers misst beispielsweise den Sauerstoffverbrauch und die extrazelluläre Säurebildungsrate lebender Zellen und kann darüber hinaus wichtige Zellfunktionen wie die mitochondriale Atmung und Glykolyse messen. Molekulare Parameter (Marker) können beispielsweise über Transkriptomanalysen (PCR oder RNA-Sequenzierung) gemessen werden. Proteinbiochemische Parameter (Marker) können beispielsweise über Massenspektrometrie oder gängige klinisch chemische Messmethoden (z.B. ELISA oder andere Antikörper und/oder chromatographische und/oder elektrophoretische und/oder Affinitäts-basierte Methoden) gemessen werden. Diese molekularen und proteinbiochemischen Parameter werden auch Marker oder Biomarker genannt und gängige Biomarker in Bezug auf Skelettmuskeln sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise sind Kreatinkinase (auch als Creatin-Kinase CK, CPK, oder Creatin-Phosphokinase bekannt) und L-Lactatdehydrogenase (LDH) solche Biomarker.

Wirkstoffkandidaten umfassen pharmakologische Wirkstoffkandidaten wie Arzneimittelkandidaten, die niedermolekulare Substanzen sowie proteinbasierte oder nukleinsäurebasierte Moleküle umfassen. Des Weiteren umfassen Wirkstoffkandidaten auch gentherapeutische Wirkstoffkandidaten, die üblicherweise das Genom der erfindungsgemäßen Zellen durch Einschleusen von entsprechenden Nukleinsäuren verändern. Darüber hinaus können Wirkstoffkandidaten auch körpereigene Substanzen sein, sodass die Wirkung von z.B. Hormonen oder hormonartige Signalstoffe getestet werden kann. Beispiele für hormonartige Signalstoffe sind Myokine, wie beispielsweise Myostatin, Follistatin, Irisin, Visfatin und Myonectin

Ein weiteres *in vitro*-Verfahren wird zum Testen der Toxizität einer Substanz auf ein Skelettmuskelgewebe in Betracht gezogen, umfassend die Schritte

(a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß der hierin beschriebenen Erfindung,

(b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einer zu testenden 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 und/oder proteinbiochemischer Parameter vor und/oder nach Schritt (b) umfasst.

Die Kontraktionskraft und/oder die Struktur des Skelettmuskelgewebes kann durch die hierin beschriebenen Kontraktionsexperimente und durch die hierin beschriebenen Fluoreszenzmikroskopie-Experimente gemessen werden. Die metabolische Funktion kann beispielsweise durch mit Hilfe eines Seahorse Metabolic Flux Analyzers gemessen werden, der dem Fachmann bekannt ist.

Die Substanzen, die beim Testen der Toxizität verwendet werden, können beispielsweise Wirkstoffkandidaten sein, sind aber nicht darauf begrenzt. Vielmehr kann jede Substanz getestet werden, deren Toxizität bewertet werden soll.

Andere Anwendungsmöglichkeiten betreffen ein *in vitro*-Verfahren zum Testen der Wirkung von Nährstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln auf die Leistungsfähigkeit von Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte

(a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß der hierin beschriebenen Erfindung,

(b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einer zu testenden Nährstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln.

bevorzugt wobei das Verfahren des Weiteren das Bestimmen der Kontraktionskraft und/oder der Struktur des Skelettmuskelgewebes und/oder der metabolischen Funktion und/oder molekularer und/oder proteinbiochemischer Parameter vor und/oder nach Schritt (b) umfasst.

Dieses *in vitro*-Verfahren bietet die Möglichkeit die Auswirkungen von Nährstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln auf das Skelettmuskelgewebe in klinisch relevanten Konzentrationen zu messen. Von besonderem Interesse ist dieses Verfahren, wenn die Auswirkungen dieser Substanzen beim Muskelaufbau, bei Kachexie oder bei Diabetes mellitus gemessen werden. Unter Kachexie versteht man eine krankhafte, sehr starke Abmagerung. Viele Patienten mit chronischen Krankheiten wie Krebs oder Autoimmunerkrankungen leiden an der Zusatzkrankung Kachexie. Das *in vitro*-Verfahren bietet die Möglichkeit die Auswirkung der Substanzen auf Skelettmuskelgewebe außerhalb des Körpers zu messen.

Gleichsam können jedoch auch die nach dem hierin offenbarten Verfahren hergestellten unterschiedlichen Zellen in solchen *in vitro* Verfahren verwendet werden. So wird beispielsweise ein *in vitro*-Verfahren zum Testen der Wirksamkeit eines Wirkstoffkandidaten auf mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblasten-

vorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder ein Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen hierin beschrieben, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß der hierin beschriebenen Erfindung,
- (b) gegebenenfalls Zufügen einer Schädigung zu den Zellen aus Schritt (a), und
- (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.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit betrifft ein *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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß der hierin beschriebenen Erfindung,
 - (b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einer zu testenden Substanz,
- 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.

Eine zusätzliche Anwendungsmöglichkeit betrifft ein *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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß der hierin beschriebenen Erfindung,
- (b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einem zu testenden Nährstoff oder Nahrungsergänzungsmittel,

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 Durchflussszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz eine Kontraktionskraft von mindestens 0,6 Millinewton (mN) erzeugen, 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. Die Kontraktionskraft wird typischerweise oberhalb der Reizschwelle gemessen. Dem Fachmann sind geeignete Methoden zur Bestimmung einer Reizschwelle bekannt. Beispielsweise kann die Kontraktionskraft bei einer elektrischen Feldstimulation mit 200 mA aufgezeichnet werden (siehe Abbildungen 6, 7, 9 und 10). In einer stärker bevorzugten Ausführungsform kann das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz mindestens eine Kontraktionskraft von 2 Millinewton (mN) erzeugen, 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, am stärksten bevorzugt mindestens 4 mN. Dies geschieht typischerweise, wenn Schritt (iv) des Verfahrens für mindestens 50 Tage, wie z.B. 56 Tage durchgeführt wird. Eine typische Eigenschaft des hier beschriebenen künstlichen Skelettmuskelgewebes ist, dass die Kontraktionskraft mit der Dauer der Maturierung zunimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das Skelettmuskelgewebe eine Kontraktionsgeschwindigkeit von mindestens 3 mN/sec bei einer Stimulation von 100 Hz auf, 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. Die Kontraktionsgeschwindigkeit kann z.B. bei einer Stimulation von 100 Hz mit 200 mA (5 ms, mono- oder biphasisch) aufgezeichnet werden. Die Kontraktionsgeschwindigkeit, auch Kraftbildungsgeschwindigkeit genannt, ist die Zeit, die ein das künstliche Skelettmuskelgewebe benötigt, um einen Spannungsbetrag aufzubauen bzw. die Geschwindigkeit des Spannungsanstiegs. Die Kontraktionsgeschwindigkeit wird als Zeitpunkt der maximalen Zunahme der Kontraktionskraft ($+dFOC/dt$) im Rahmen eines isometrischen Kontraktionsexperimentes bestimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das Skelettmuskelgewebe eine Relaxationsgeschwindigkeit von mindestens 0,5 mN/sec beim Beenden einer Stimulation von 100 Hz auf, 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. Die Relaxationsgeschwindigkeit wird in der Entspannungsphase des Skelettmuskels als Zeitpunkt der maximalen Abnahme der Kontraktionskraft ($-dFOC/dt$) im Rahmen eines isometrischen Kontraktionsexperimentes bestimmt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann das Basalmedium in Schritt (iv) eine wirksame Menge von Kreatin und/oder Triod-L-Thyronin (T3) umfassen. Wenn beispielsweise Kreatin in einer wirksamen Menge im Basalmedium des Maturierungsmediums vorhanden ist, kann sich die Kontraktionskraft des künstlichen Skelettmuskels im Vergleich zu einem Maturieren in Schritt (iv) ohne eine wirksame Menge an Kreatin erhöhen. Eine solche Erhöhung der Kontraktionskraft ist in Beispiel 4 und Abbildung 9 mit experimentellen Daten gezeigt. Eine wirksame Menge von Kreatin als Endkonzentration im Basalmedium von Schritt (iv) ist beispielsweise 0.1-10 mM Kreatin. Stärker bevorzugte Konzentrationen sind zum Beispiel 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.

Des Weiteren kann das Maturierungsmedium in Schritt (iv) auch eine erhöhte Menge an T3 aufweisen. Eine solche erhöhte Menge von T3 kann die Kontraktionsgeschwindigkeit und/oder Relaxationsgeschwindigkeit des künstlichen Skelettmuskels im Vergleich zu einem künstlichen Skelettmuskelgewebe, das ohne eine erhöhte Menge an T3 in Schritt (iv) hergestellt wurde, verkürzen. Beispielfhafte erhöhte Mengen an T3 im Basalmedium in Schritt (iv) sind 0.001-1 μ M Triod-L-Thyronin (T3), bevorzugt 0.005-0.7 μ M T3, stärker bevorzugt 0.01-0.35 μ M T3, noch stärker bevorzugt 0.04-0.02 μ M T3, noch stärker bevorzugt 0.05-0.18 μ M T3, noch stärker bevorzugt 0.06-0.15 μ M T3, noch stärker bevorzugt 0.08-0.12 μ M T3, noch stärker bevorzugt ungefähr 0.1 μ M T3. Außerdem zeigt Beispiel 4 sowie Abbildung 10 den vorteilhaften Effekt mit experimentellen Daten einer erhöhten Konzentration von T3.

In einer besonders stark bevorzugten Ausführungsform kann das Basalmedium in Schritt (iv) eine wirksame Menge von Kreatin und/oder eine erhöhte Menge von Triod-L-Thyronin (T3) für einen bestimmten Zeitraum der Maturierung umfassen. Wie in Beispiel 4 gezeigt kann ein solcher Zeitraum 4 Wochen zum Beispiel von Woche 1 bis Woche 5 in Schritt (iv) oder Woche 5 bis Woche 9 in Schritt (iv) sein. Jedoch können auch andere Zeiträume, wie zum Beispiel 1-9 Wochen, während einer beliebigen Maturierungsdauer gewählt werden. Beispielsweise kann dieser Zeitraum mindestens eine Woche sein, bevorzugt mindestens 2 Wochen, stärker bevorzugt mindestens 3 Wochen, stärker bevorzugt mindestens 4 Wochen, noch stärker bevorzugt mindestens 5 Wochen, noch stärker bevorzugt mindestens 6 Wochen, noch stärker bevorzugt mindestens 7 Wochen, noch stärker bevorzugt mindestens 8 Wo-

chen. Des Weiteren kann diese Zeitraum beispielsweise höchstens 9 Wochen sein, bevorzugt höchstens 8 Wochen, stärker bevorzugt höchstens 7 Wochen, noch stärker bevorzugt höchstens 6 Wochen, noch stärker bevorzugt höchstens 5 Wochen, noch stärker bevorzugt höchstens 4 Wochen. Im Lichte der vorliegenden Offenbarung kann der Fachmann die beispielhaften Zeitraumendpunkte frei kombinieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besitzt das Skelettmuskelgewebe, das durch das hier beschriebene Verfahren hergestellt wurde, eine regenerative Eigenschaft. Die regenerative Eigenschaft zeichnen sich dadurch aus, dass eine natürliche Wiederherstellung des zuvor bestehenden Zustandes herbeigeführt wird. Zum Beispiel kann die Kontraktionsfähigkeit eines künstlichen Skelettmuskelgewebes wieder hergestellt werden. Es kann also eine Kontraktionsfähigkeit wiedererlangt werden und/oder der Muskel wieder aufgebaut werden. In einer stark bevorzugten Ausführungsform ist die regenerative Eigenschaft durch eine wiedererlangte Kontraktionsfähigkeit und/oder Muskelwiederaufbau gekennzeichnet, bevorzugt wobei die Fähigkeit zur Wiedererlangung der Kontraktionsfähigkeit und/oder Muskelwiederaufbau nach einer 24-stündigen Exposition mit Kardiotoxin und/oder Muskelwiederaufbau gemessen wird, stärker bevorzugt wobei diese wiedererlangte Kontraktionsfähigkeit und/oder Muskelwiederaufbau 10-30 Tage nach einer Kardiotoxin Exposition gemessen wird. Kardiotoxin ist eine Polypeptidtoxin und zerstört Skelettmuskelzellen durch die Auslösung einer Dauerdepolarization. Funktionell zeigt sich nach Inkubation mit Kardiotoxin ein Verlust der Kontraktionsfähigkeit künstlicher Skelettmuskel. Strukturell zeigt sich eine irreversible Zerstörung ausgebildeter Myotuben in künstlichem Skelettmuskel. Selbst nach beispielsweise 2 Tagen konnten im hier beschriebenen Beispiel 5 keine Kontraktionen aufgezeichnet werden. Wie in Abbildung 11 gezeigt, kann ein künstliches Skelettmuskelgewebe mit regenerativer Eigenschaft diese Kontraktionsfähigkeit wiedererlangen. Wie in Beispiel 5 beschrieben, kann ein Muskel beispielsweise 21 Tage nach Kardiotoxinbehandlung erneut kontrahieren. Ein mit Gamma-Strahlung (Röntgenstrahlung) behandelter künstlicher Skelettmuskel weist jedoch keine regenerative Eigenschaft auf und kann auch z.B. 21 Tage nach Kardiotoxininkubation nicht kontrahieren. Dieses Beispiel zeigt das in künstlichem Skelettmuskelgewebe bei irreversibler Zerstörung der Skelettmuskelzellen, Skelettmuskelzellvorläuferzellen mit regenerativer Kapazität erhalten bleiben und durch Zellteilung und Ausdifferenzierung in neu gebildete Skelettmuskelzellen die Skelettmuskelstruktur mit kontraktile Funktion in künstlichem Skelettmuskelgewebe wieder regenerieren bzw. aufbauen können. Wie in Abbildung 11 gezeigt, kann ein künstliches Skelettmuskelgewebe mit regenerativer Eigenschaft diesen Muskelwiederaufbau vollziehen. In Abbildung 11 B ist die Regeneration der Kontraktionskraft und in Abbildung 11 C (oben) die strukturelle Regeneration des Skelettmuskels dargestellt. Ein Ausbleiben der Regeneration nach gamma-Bestrahlung belegt, dass für die Regeneration

zellteilungskompetente Skelettmuskelvorläuferzellen (z.B. Satellitenzellen) die Kardiotoxin Behandlung überlebt haben.

Wie im Beispiel 4 gezeigt kann Schritt (iv) des Verfahrens über mehrere Wochen verlängert werden. In einer stark bevorzugten Ausführungsform wird Schritt (iv) für mindestens 50 Tage durchgeführt, stärker bevorzugt mindestens 60 Tage, noch stärker bevorzugt mindestens 70 Tage, noch stärker bevorzugt mindestens 80 Tage. Nach derzeitigem Wissenstand der Erfinder gibt es keine Obergrenze für den Zeitraum des Schritts (iv). Beispielsweise kann eine maximale Dauer des Schritts (iv) 365 Tage vorgesehen sein, bevorzugt 300 Tage, stärker bevorzugt 250 Tage. Der Fachmann kann im Lichte der vorliegenden Offenbarung die beispielhaften Zeitraumgrenzen des Schritts (iv) frei miteinander kombinieren.

Darüber hinaus umfasst die vorliegende Erfindung ein künstliches Skelettmuskelgewebe, das durch ein Verfahren wie hierin beschreiben hergestellt wurde. In einer bevorzugten Ausführungsform erzeugt das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz mindestens eine Kontraktionskraft von 0,6 Millinewton (mN), 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 4mN. Die Kontraktionskraft kann z.B. bei einer Stimulation mit 200mA aufgezeichnet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist das Skelettmuskelgewebe eine Kontraktionsgeschwindigkeit von mindestens 3 mN/sec bei einer Stimulation von 100 Hz auf, 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. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das Skelettmuskelgewebe eine Relaxationsgeschwindigkeit von mindestens 0.5 mN/sec beim Beenden einer Stimulation von 100 mN/sec auf, 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.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsformen näher beschrieben:

1. Verfahren zum Herstellen von künstlichem Skelettmuskelgewebe aus pluripotenten Stammzellen, umfassend die Schritte

- (i) Induzieren von Mesodermdifferentenzierung 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 Ausführungsform 1, 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.
3. Verfahren nach Ausführungsform 1 oder 2, 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.

4. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-3, 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.
5. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-4, 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.
6. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-5, 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.

7. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-6, 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.
8. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-7, 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.
9. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-8, 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, bevorzugt wobei der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor DAPT ist.
10. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-9, 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 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 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; 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.

11. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-10, 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 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.
12. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-11, wobei in Schritt (iv) der zusätzliche serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von 0,5-50 mg/ml Albumin, 1-100 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin, 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ Ethanolamin, 17.4-1744 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, insbesondere Natriumselenit, 0,4-40 $\mu\text{g/ml}$ L-Carnitin, 0,05-5 $\mu\text{l/ml}$ Fettsäure- Zusatz, 0,0001-0,1 $\mu\text{g/ml}$ Triod-L-Thyronin (T3) in dem Medium bereitstellt.
13. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-12, 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.
14. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-13, wobei in Schritt (iv) die mechanische Stimulation ein statischer Zug oder eine dynamische Stimulation oder eine auxotone Stimulation ist, bevorzugt wobei die mechanische Stimulation ein statischer Zug ist.
15. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-14, 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.

16. Verfahren nach Ausführungsform 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, Thiazovivin, 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.
17. Verfahren nach Ausführungsform 15 oder 16, 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 wobei das Stammzellmedium iPS-Brew XF ist.
18. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 15-17, 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.
19. Verfahren nach Ausführungsform 18, 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 Rinderursprung, gegebenenfalls wobei die extrazelluläre Matrix zusätzlich Laminin und/oder Fibronectin umfasst.
20. Verfahren nach Ausführungsform 19, 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.
21. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 18-20, 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.

22. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 18-20, 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.
23. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 18-22, wobei das Stammzellmedium nach etwa 1 Stunde zu dem Mastermix in der künstlichen Form hinzugefügt wird, wobei das Stammzellmedium KSR und FGF2 umfasst.
24. Verfahren nach Ausführungsform 23, 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.
25. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 18-24, wobei Schritt (iii) für 7-11 Tage, bevorzugt für 8-10 Tage, und am stärksten bevorzugt für etwa 9 Tage durchgeführt wird.
26. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-17, 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.
27. Verfahren nach Ausführungsform 26, 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.
28. Verfahren nach Ausführungsform 27, wobei die Skelettmyoblasten und Satellitenzellen in einem Verhältnis von $1-10 \times 10^6$ Zellen/ml und 0,7-1,4 mg/ml Kollagen in Medium ausgesät werden.
29. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 26-28, 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.

30. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 26-28, 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.
31. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 26-30, 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.
32. Verfahren nach Ausführungsform 31, 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.
33. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 26-32, 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.
34. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 18-33, 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.
35. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-34, 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.

36. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-35, 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.
37. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-36, wobei das Verfahren keinen Schritt zur Anreicherung von Skelettmyoblasten enthält, bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Zellselektion, stärker bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Antikörper-basierte Zellselektion.
38. Verfahren zum Herstellen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen aus pluripotenten Stammzellen, umfassend die Schritte
 - (i) Induzieren von Mesodermdifferentiation der pluripotenten Stammzellen durch Kultivieren von pluripotenten Stammzellen in einem Basalmedium, umfassend einer wirksamen 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 einer wirksamen 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 einer wirksamen Menge von (a) einem Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor, (b) HGF, (c) einem serumfreien Zusatz wie in (i), und (d) Knockout serum replacement (KSR);
 - (iii) Maturieren der Zellen in Skelettmyoblasten und Satellitenzellendurch Kultivieren der in Schritt (ii) erhaltenen Zellen in einem Basalmedium, umfassend einer wirksamen Menge von (a) HGF, (b) einem serumfreien Zusatz wie in (i), und (c) Knockout serum replacement (KSR), gefolgt von
 - (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, Ethanol-

min, Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, L-Carnitin, Fettsäurezusatz, und Triiod-L-Thyronin (T3) umfasst;
dadurch Erzeugen von Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen.

39. Verfahren nach Ausführungsform 38, 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.
40. Verfahren nach Ausführungsform 38 oder 39, 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.
41. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-40, wobei das Verfahren keinen Schritt zur Anreicherung von Skelettmyoblasten enthält, bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Zellselektion, stärker bevorzugt keinen Anreicherungsschritt durch Antikörper-basierte Zellselektion.
42. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-41, 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.
43. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-42, 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.
44. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-43, 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.

45. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-44, 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 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 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 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.
46. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-45, 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.
47. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-46, 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.

48. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-47, 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.
49. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-48, wobei in Schritt (ii) der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe DAPT, RO4929097, Semagacestat (LY450139), Avagacestat (BMS-708163), Dibenzazepine (YO-01027), LY411575, IMR-1, L685458, wobei der Gamma-Sekretase/NOTCH Inhibitor bevorzugt DAPT ist.
50. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-49, 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 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 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.

51. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-50, 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;
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.
52. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-51, wobei Schritt (iii) für 7-11 Tage, bevorzugt 8-10 Tage, und am stärksten bevorzugt für etwa 9 Tage durchgeführt wird.
53. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-52, wobei in Schritt (iv) der zusätzliche serumfreie Zusatz eine Endkonzentration von 0,5-50 mg/ml Albumin, 1-100 µg/ml Transferrin, 0,1-10 µg/ml Ethanolamin, 17,4-1744 nM Selen oder ein bioverfügbares Salz davon, insbesondere Natriumselenit, 0,4-40 µg/ml L-Carnitin, 0,05-5 µl/ml Fettsäure- Zusatz, 0,0001-0,1 µg/ml Triod-L-Thyronin (T3) in dem Medium bereitstellt.
54. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-53, 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.
55. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-54, 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.
56. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 38-55, 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.

57. Verfahren nach Ausführungsform 56, 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, Thiazovivin, 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.
58. Verfahren nach Ausführungsform 56 oder 57, 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 wobei das Stammzellmedium iPS-Brew XF ist.
59. Verfahren nach Ausführungsform 58, 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.
60. 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 Aktinin und mit DAPI festgestellt wird.
61. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach Ausführungsform 60, 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.
62. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach Ausführungsform 60 oder Ausführungsform 61, 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.

63. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach einem beliebigen der Ausführungsformen 60-62, 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.
64. Mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen erhalten nach Schritt (i) gemäß Ausführungsform 1 oder Ausführungsform 38, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Ausführungsform 1(i) oder gemäß Ausführungsform 38(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.
65. Myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen erhalten nach Schritt (ii) gemäß Ausführungsform 1 oder Ausführungsform 38, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Ausführungsform 1(i) bis (ii) oder gemäß Ausführungsform 38(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* exprimiert wird, wobei die Expression von *SIM1* mittels RNA Sequenzierung bestimmt werden kann.
66. Skelettmyoblastenzellen erhalten nach Schritt (iii) gemäß Ausführungsform 1 oder Ausführungsform 38, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Ausführungsform 1(i) bis (iii) oder gemäß Ausführungsform 38(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.
67. Satellitenzelle erhalten nach Schritt (iii) gemäß Ausführungsform 1 oder Ausführungsform 38, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Ausführungsform 1(i) bis (iii) oder gemäß Ausführungsform 38(i) bis (iii), die durch die Expression des Gens *Pax7* ge-

kennzeichnet ist, wobei die Expression von Pax7 mittels Durchflusszytometrie und/oder Immunfärbungen bestimmt werden kann, stärker bevorzugt wobei Satellitenzellen ferner Ki67 exprimieren.

68. Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen gemäß Ausführungsform 66 und Satellitenzellen gemäß Ausführungsform 67, 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.
69. Skelettmyotuben erhalten nach Schritt (iv) gemäß Ausführungsform 1 oder Ausführungsform 38, hergestellt durch ein Verfahren gemäß Ausführungsform 1(i) bis (iv) oder gemäß Ausführungsform 38(i) bis (iv), die durch eine anisotrope Ausrichtung der Aktinin Protein enthaltenen Sarkomerstruktur charakterisiert sind.
70. Verwendung eines Skelettmuskelgewebes gemäß den Ausführungsformen 60-63, und/oder von Zellen gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 64-68, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Ausführungsform 69 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.
71. Skelettmuskelgewebe gemäß den Ausführungsformen 60-63 und/oder Zellen gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 64-68, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Ausführungsform 69 zur Verwendung in der Medizin.
72. Satellitenzellen gemäß dem Ausführungsform 67 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.

73. In vitro-Verfahren zum Testen der Wirksamkeit eines Wirkstoffkandidaten auf ein Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte
- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 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;
- 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.
74. In vitro-Verfahren zum Testen der Toxizität einer Substanz auf ein Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte
- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 60-63,
 - (b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einer zu testenden 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.
75. In vitro-Verfahren zum Testen der Wirkung von Nährstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln auf die Leistungsfähigkeit von Skelettmuskelgewebe, umfassend die Schritte
- (a) Bereitstellen eines Skelettmuskelgewebes gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 60-63,
 - (b) In-Kontakt-Bringen des Skelettmuskelgewebes aus Schritt (a) mit einem zu testenden Nährstoff oder Nahrungsergänzungsmittel.
- 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.
76. 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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 64-69,
- (b) gegebenenfalls Zufügen einer Schädigung zu den Zellen aus Schritt (a), und
- (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.

77. 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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 64-69,
- (b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einer zu testenden Substanz, 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.

78. 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:

- (a) Bereitstellen von mesodermal differenzierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, myogen spezifizierte Skelettmyoblastenvorläuferzellen, Satellitenzellen, Skelettmyoblastenzellen, Skelettmyotuben oder einem Gemisch aus Skelettmyoblastenzellen und Satellitenzellen gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 64-69,
- (b) In-Kontakt-Bringen der Zellen aus Schritt (a) mit einem zu testenden Nährstoff oder Nahrungsergänzungsmittel,

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. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59, wobei das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz mindestens eine Kontraktionskraft 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, und am stärksten bevorzugt mindestens 2 mN erzeugt.
80. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59 oder 79, 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, noch stärker bevorzugt mindestens 3,6 mN, am stärksten bevorzugt mindestens 4 mN.
81. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59, 79 oder 80, wobei das Skelettmuskelgewebe eine Kontraktionsgeschwindigkeit von mindestens 3 mN/sec bei einer Stimulation von 100Hz 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.
82. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59 oder 79-81, 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.
83. Verfahren nach einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59 oder 79-82, wobei das Basalmedium in Schritt (iv) eine wirksame Menge von Kreatin und/oder Triiod-L-Thyronin (T3) umfasst.

84. Verfahren nach Ausführungsform 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 Ausführungsform 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 einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59, oder 79-85, 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 einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59, oder 79-86, 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 einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59, oder 79-87, wobei das Skelettmuskelgewebe die Eigenschaft besitzt, selbst zu regenerieren.
89. Verfahren nach Ausführungsform 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 einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59 oder 79-89, 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 einer beliebigen der Ausführungsformen 1-59 oder 79-90.
92. Künstliches Skelettmuskelgewebe nach einer beliebigen der Ausführungsformen 60-63 oder 91, wobei das Skelettmuskelgewebe bei einem Stimulus von 100 Hz mindestens

eine Kontraktionskraft 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 einer beliebigen der Ausführungsformen 60-63 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 einer beliebigen der Ausführungsformen 60-63 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 Ausführungsformen 60-63 oder 91-94, und/oder von Zellen gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 64-68, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Ausführungsform 69 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 Ausführungsformen 60-63 und 91-94, und/oder Zellen gemäß einer beliebigen der Ausführungsformen 64-68, und/oder von Skelettmyotuben gemäß Ausführungsform 69 zur Verwendung in der Medizin.

Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 1. Schema des Differenzierungsprotokolls in 2D-Zellkultur. Differenzierungsprotokoll für die gerichtete Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen (hPSC) in Skelettmyoblasten und Satellitenzellen in 2D. Die hPSCs werden am Vortag ausgesät. Für die mesodermale Induktion werden die Zellen von Tag 0 bis Tag 4 in mesodermalem Induktionsmedium (DMEM mit 1 g/l Glukose ergänzt mit Pyruvat) mit CHIR-99021, LDN193189 und FGF-2 kultiviert. Für die myogene Spezifikation werden die Zellen von Tag 4 bis Tag 6 in Medium mit DAPT und FGF-2 kultiviert, gefolgt von einer Kultivierung von Tag 6 bis Tag 8 in Medium mit DAPT, FGF-2 und HGF, gefolgt von einer Kultivierung von Tag 8 bis Tag 12 in einem Medium mit DAPT, HGF und „Knockout-serum replacement“ (KSR). Für die myogene Expansion und Maturierung werden die Zellen von Tag 12 bis Tag 21 in Medium mit HGF und KSR kultiviert. Für die myogene Maturierung werden die Zellen ab Tag 21 in Medium mit Albumin, Transferrin, Ethanolamin, Selen, Carnitin, Fettsäuren und T3 kultiviert. Zusätzlich umfasst das Medium von Tag 0 bis Tag 21 den serumfreien Zusatz N-2.

Abbildung 2. Schema der Zelldifferenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Myotuben und Satellitenzellen. Schematische Darstellung der Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in Myotuben, die folgende Stadien umfasst: (i) pluripotente Stammzellen, (ii) presomitische mesodermale Zellen, (iii) Myoblasten mit Satellitenzellen, (iv) Myotuben mit Satellitenzellen, und (v) Myotuben mit Satellitenzellnische. Darüber hinaus ist die Expressionsabfolge von Markergenen während der verschiedenen Differenzierungsstadien dargestellt. Die Expression von Oct4 ist charakteristisch für pluripotente Stammzellen. Die Expression von MSGN1 und Tbx6 sind für presomitische mesodermale Zellen charakteristisch. Pax3 wird hauptsächlich während dem Übergang von presomitischen mesodermalen Zellen zu Myoblasten exprimiert. Die Expression von Pax7 ist charakteristisch für das Vorhandensein von Satellitenzellen und wird am Ende des presomitischen mesodermalen Stadiums und am Anfang des Myoblastenstadiums erstmals exprimiert. Während die Pax7 Expression im Myoblastenstadium am höchsten ist, flacht die Pax7 Expression bis zum Myotubenstadium ab, bleibt jedoch als Zeichen einer Satellitenzellnischenbildung erhalten. Die Expression von MyoD ist am stärksten in Myoblasten vorhanden und ist auch in Myotuben nachweisbar. Die Expression von Myogenin und Aktinin ist charakteristisch für Myotuben und wird kaum in Myoblasten exprimiert. Myotuben bilden Satellitenzellnischen aus, die Muskelstammzellnische. Satellitenzellnischen sind Pax7 positiv und ruhend. Der Zellzyklus wird bei Muskelschäden aktiviert, wobei die Zellen dann auch Ki67 positiv sind.

Abbildung 3. Fluoreszenzmikroskopie der Skelettmuskelzellen und Satellitenzellen. Immunfärbung von myogenen Zellen in repräsentativer Zellkultur nach 21 Tagen (Beispiel 1). Die Fluoreszenzbilder zeigen die Expression skelettmuskelspezifischer Transkriptionsfaktoren PAX7 (obere Zeile links), MyoD (mittlere Zeile links) und Myogenin (untere Zeile

links). PAX7 weist Satellitenzellen nach; MyoD und Myogenin weisen Skelettmyoblasten und/oder Skelettmyotuben nach. Des Weiteren zeigen die Fluoreszenzbilder Zellkerne (Nuclei, rechte Spalte) und die Expression von Actin (mittlere Spalte). Maßstab: 100 µm.

Abbildung 4. Genexpressionsmuster während der Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen (hPSC) in Skelettmuskelzellen analysiert durch RNA-Sequenzierung. Die gerichtete Differenzierung zeigt Genexpressionsmuster wie bei der embryonalen Skelettmuskelentwicklung. Expressionswerte („Reads per kilobase million, RPKM“) von Genen, die typisch für eine Pluripotenz und ein paraxiales Mesoderm sind, sind über die Zeit der Differenzierung und Maturierung graphisch dargestellt (Abbildung 4A und 4B). Bei der RNA-Sequenzierung zeigen Gene, die typisch für Pluripotenz sind, wie NANOG, POU5F1 und ZFP42, an den Tagen 0 und 1 eine hohe Expression. NANOG und POU5F1 zeigen die höchste Expression an Tag 0; ZFP42 zeigt die höchste Expression an Tag 1. Gene, die typisch für das paraxiale Mesoderm sind, wie MSGN1, TBX6 und MEOX1, zeigen an den Tagen 1-8 eine hohe Expression. MSGN1 zeigt die höchste Expression an Tag 1; TBX6 zeigt die höchste Expression an Tag 4; und MEOX zeigt die höchste Expression an Tag 8. Expressionswerte („Reads per kilobase million, RPKM“) von typischen Genen für skelettmuskelspezifische Transkriptionsfaktoren und Sarkomere über die Zeit der Differenzierung und Maturierung graphisch dargestellt (Abbildung 4C und 4D). Skelettmuskelspezifische Transkriptionsfaktoren, wie PAX3, PAX7 und MYOD1, zeigen an den Tagen 8, 29, bzw. 60 die höchste Expression. Gene, die typisch für Sarkome sind, wie ACTN2, DMD und MYH3, zeigen am Tag 60 die höchste Expression.

Abbildung 5. Analyse der Effizienz bei gerichteter Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen (hPSC) zu Skelettmuskelzellen. Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils von Muskelzellen (Aktinin-, sowie Myogenin oder MyoD-positiv) sowie Satellitenzellen (PAX7-positiv) von vier unabhängigen pluripotenten Stammzelllinien (iPSC (WT 1), iPSC (WT 2), DMD iPSC, korrigierte DMD iPSC). Der Anteil der Aktinin-positiven Zellen liegt zwischen 71 und 77.6% in den vier Zelllinien; der Anteil der Myogenin-positiven Zellen liegt zwischen 41.4% und 60.4% in den vier Zelllinien; der Anteil der MyoD-positiven Zellen liegt zwischen 40% und 54.1% in den vier Zelllinien; der Anteil der PAX7-positiven Zellen liegt zwischen 33.4% und 43.8% in den vier Zelllinien.

Abbildung 6. Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe (engl: Engineered Skeletal Muscle, ESM) aus Skelettmyoblasten, die aus hPSCs abgeleitet sind. (A) Schema des ESM-Kultivierungsprotokolls. Der 21 Tage alte Zellpool aus Beispiel 1 wird in eine extrazelluläre Matrix (Kollagen/Matrigel) gegossen und für 7 Tage in ringförmigen Formen (linkes Bild) unter Expansionsbedingungen kultiviert. Die geformten Ringe werden da-

rauffolgend auf Dehnapparaturen überführt (Bild in der Mitte) und unter Maturierungsbedingungen weiterkultiviert. Nach weiteren 4 Wochen wird die Funktion des ESM in Organbädern (rechtes Bild) gemessen; Maßstab: 5 mm. **(B)** Repräsentative Kontraktionskraftkurven des künstlichen Skelettmuskelgewebes bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen: 1 Hz (Strichlinie: acht Einzelkontraktionen mit einer einzelnen Dauer von ungefähr 500 ms mit einer Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) von jeweils ungefähr 0.5 Millinewton), 10 Hz (durgezogene Linie: beginnender Tetanus mit einer Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) von ungefähr 1 Millinewton, einzelne Kontraktionen graphisch unterscheidbar), 100 Hz (Strichpunktlinie: voll ausgebildeter Tetanus mit einer Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) von ungefähr 2.2 Millinewton). **(C)** Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) in Millinewton (mN) des Skelettmuskelgewebes in Abhängigkeit der elektrischen Stimulationsfrequenz; n=3. Bei einem Stimulus von 1 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.5 Millinewton; bei einem Stimulus von 10 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.9 Millinewton; bei einem Stimulus von 20 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.1 Millinewton; bei einem Stimulus von 40 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.4 Millinewton; bei einem Stimulus von 60 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.55 Millinewton; bei einem Stimulus von 80 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.6 Millinewton; bei einem Stimulus von 100 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 2.1 Millinewton.

Abbildung 7. Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe (engl.: Bioengineered Skeletal Muscle, BSM) aus hPSC. (A) Schema des BSM-Kultivierungsprotokolls. Humane induzierte pluripotente Stammzellen werden in ein Kollagen/Matrigel Hydrogel in ringförmige Formen gegossen und in 3D in Skelettmuskelgewebe differenziert. Die geformten Ringe werden an Tag 21 auf Dehnapparaturen überführt und unter Maturierungsbedingungen weiterkultiviert. Nach weiteren 4 Wochen wird typischerweise die Funktion der BSM in Organbädern gemessen. Im Einzelnen werden die humanen induzierten pluripotenten Stammzellen dafür zunächst in einem Kollagen/Matrigel Hydrogel dispergiert und für 24 h in Brew XF mit Y-27632 und KSR konditioniert (Tag -1). Die Zellen werden dann von Tag 0 bis Tag 4 in Medium mit CHIR-99021, LDN193189 und FGF-2 kultiviert. Die Zellen werden von Tag 4 bis Tag 6 in Medium mit DAPT und FGF-2 kultiviert, gefolgt von einer Kultivierung von Tag 6 bis Tag 8 in Medium mit DAPT, FGF-2 und HGF, gefolgt von einer Kultivierung von Tag 8 bis Tag 12 in einem Medium mit DAPT, HGF und „Knockout-serum replacement“ (KSR). Die Zellen werden von Tag 12 bis Tag 21 in Medium mit HGF und KSR kultiviert. Von Tag 21 bis Tag 50 werden die Zellen in Maturierungsmedium auf statischen Dehnapparaturen kultiviert, d.h. unter mechanischer Dehnung. Zusätzlich umfasst das Medium von Tag 0 bis Tag 50 den serumfreien Zusatz N-2. **(B)** Repräsentative Kontraktionskraftkurven des künstlichen Skelettmuskelgewebes bei unterschiedlichen Stimulusfrequenzen: 1 Hz (Strichli-

nie: acht Einzelkontraktionen mit einer einzelnen Dauer von ungefähr 600 ms mit einer Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) von jeweils ungefähr 0.7 Millinewton) und 100 Hz (durchgezogene Linie: voll ausgebildeter Tetanus mit einer Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) von ungefähr 1.1 Millinewton). **(C)** Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) in Millinewton (mN) des Skelettmuskelgewebes in Abhängigkeit der elektrischen Stimulationsfrequenz; n=3. Bei einem Stimulus von 1 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.3 Millinewton; bei einem Stimulus von 10 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.5 Millinewton; bei einem Stimulus von 20 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.55 Millinewton; bei einem Stimulus von 40 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.6 Millinewton; bei einem Stimulus von 60 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.65 Millinewton; bei einem Stimulus von 80 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.72 Millinewton; bei einem Stimulus von 100 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.9 Millinewton.

Abbildung 8. Fluoreszenzmikroskopie des Skelettmuskelgewebes hergestellt durch ESM und BSM-Verfahren. Immunfärbung von Aktin und DNA in repräsentativen Skelettmuskelgeweben hergestellt durch das ESM- (Beispiel 1 und 2) und BSM- (Beispiel 3) Verfahren. Die Fluoreszenzbilder zeigen multinukleäre, reife Skelettmuskelfasern, gekennzeichnet durch das charakteristische Streifenmuster (gefärbtes Aktin). Maßstab: 50 μm (ESM) und 10 μm (BSM).

Abbildung 9. Steigerung der ESM-Funktion durch Kreatinbehandlung. A) Experimentelles Verfahren der ESM-Reifung über 5 oder 9 Wochen mit zusätzlicher Gabe von 1 mM Kreatin über 4 Wochen. B) Kontraktionskraft (Force of Contraction: FOC) als Reaktion auf 100 Hz elektrische Feldstimulation in ESM nach 5 und 9 Wochen in Kultur; die Kultur erfolgte wie in A dargestellt mit (rechte Balken) oder ohne (linke Balken) Zugabe von Kreatin; n=3 pro Gruppe; *p<0,05 durch Student's t-Test.

Abbildung 10. Steigerung der ESM-Funktion durch Schilddrüsenhormonbehandlung. A) Experimentelles Schema der ESM-Reifung über 5 oder 9 Wochen mit zusätzlicher Gabe von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ Triiodo-L-Thyronin (T3) über 4 Wochen. B) Maximale Geschwindigkeit der Anspannung (+dFOC/dt) und Entspannung (-dFOC/dt) bei und nach 100 Hz elektrischer Feldstimulation mit repräsentativen Kurven. Vergleich von mit (grau) und ohne (schwarz) T3 behandelten ESM in Woche 5 (Tag 56) und Woche 9 (Tag 84); n=4-11 pro Gruppe; *p<0,05 mittels Student's t-Test. C) Proteingehalt von Myosinschwerkettenprotein 2 (MYH2; schnelle Isoform), Myosinschwerkettenprotein 7 (MYH7; langsame Isoform) und Myosinschwerkettenprotein 3 (MYH3; embryonale Isoform) in 9 Wochen ESM Kulturen mit (graue Balken) und ohne T3 (schwarze Balken); n=3 pro Gruppe; *p<0.05 mittels Student's t-Test.

Abbildung 11: Regenerationsfähigkeit von künstlichem Skelettmuskel. A) RNA Nachweis mittels RNA-Sequenzierung (in *Reads per Kilobase Million*, RPKM) von Skelettmuskel-Vorläuferzell/Stammzell-Markern in 2D Kultur an Kulturtag 22 und 60 sowie in ESM an Kulturtag 60 (ESM wurden aus 2D Kulturen an Tag 22 hergestellt). * $p < 0,05$ durch 1-Way-ANOVA und Tukey's multiplem Vergleichstest. B) Immunfluoreszenzfärbung von Skelettmuskelzellvorläuferzellen (Pax7) in ESM: Pax7 (helle Kerne), Laminin, f-Actin (langgestreckte Muskelzellkörper) und Kern in ESM (links) und 2D (rechts) Kulturen an Kulturtag 60; Balken: 20 μm . Vergrößerungen stellen Satellitenzellnischen (Skelettmuskelzellvorläufer) in ESM und 2D Kultur dar. C) Versuchsschema für Kardiotoxin (CTX)-Verletzungen. ESM wurden mit 25 $\mu\text{g/ml}$ CTX für 24 Std. inkubiert. Die bestrahlte Gruppe wurde 24 Stunden vor der CTX-Verletzung mit 30 Gy (gamma-Bestrahlung) zur Hemmung der Zellproliferation und damit assoziierter Regeneration behandelt. D) Kontraktionskraft (FOC) bei 100 Hz Tetanus der ESM ohne (linke Balken) oder mit gamma-Bestrahlung (rechte Balken) zu den angegebenen Zeitpunkten nach CTX-Verletzung (25 $\mu\text{g/ml}$) oder Vehikelbehandlung (Veh.); $n=3-4$, * $p < 0,05$ vs. Kontrolltag+2, * $p < 0,05$ durch 1-Way-ANOVA und Tukey's multiplem Vergleichstest. E) Immunfärbung von sarkomerischem Aktinin und Kernen in ESM 21 Tage nach der CTX-Verletzung in den Gruppen mit und ohne gamma-Bestrahlung gemäß Schema in A – Muskelaufbau in der unbestrahlten Kontrollgruppe ist auf Proliferation und Ausdifferenzierung von neuen Muskelzellen aus Muskelzellvorläufern in ESM zurückzuführen. Balken: 50 μm

BEISPIELE

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter veranschaulichen, aber nicht darauf beschränken. Die Beispiele beschreiben technische Merkmale, und die Erfindung bezieht sich auch auf Kombinationen der in diesem Abschnitt vorgestellten technischen Merkmale. Methoden und Materialien, die in allen Beispielen verwendet wurden sind nach den Beispielen beschrieben.

Beispiel 1: Gerichtete Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen (hPSC) in Skelettmuskelzellen und Satellitenzellen in 2D-Zellkultur.

Für die gerichtete Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen in Skelettmuskelzellen und Satellitenzellen in 2D-Zellkultur wurde ein Verfahren entwickelt. Das hier beschriebene Verfahren ist transgen- und serumfrei. Durch dieses Verfahren können humane Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen in hoher Reinheit erzeugt werden. Bei diesem Verfahren wurde eine bestimmte zeitliche Abfolge von Wirkstoffen (kleine Moleküle sowie Inhibitoren und Stimulatoren) verwendet, die die Differenzierung der humanen pluripotenten Stammzellen induzieren. In unterschiedlichen Differenzierungsstadien von pluripotenten Stammzellen wurden unterschiedliche Gene exprimiert. Die typische Genex-

pression während einer Differenzierung werden auch Genexpressionsmuster genannt. Diese Genexpressionsmuster werden ebenfalls bei einer embryonalen Skelettmuskelentwicklung im menschlichen Körper durchlaufen. Das Schema des Differenzierungsprotokolls ist in **Abbildung 1** abgebildet, und es zeigt die Abfolge der unterschiedlichen Wirkstoffe, die dem Medium beigemischt werden. Darüber hinaus zeigt **Abbildung 1** die Differenzierungsstadien, die während der Differenzierung zu Skelettmyoblasten/Myotuben und Satellitenzellen durchlaufen werden, d.h. die Induzierung der Mesoderm differenzierung, die Induzierung der myogenen Spezifikation, die (myogene) Expansion und die Maturierung zu Skelettmyoblasten und Satellitenzellen und die Maturierung zu Skelettmyotuben und Satellitenzellen.

Um das Verfahren durchzuführen wurden die humane pluripotente Stammzellen am Vortag bei einer Dichte von 1.7×10^4 Zellen/cm² auf Matrigel beschichteten Platten ausplattiert und in der Gegenwart von 12 ml StemMACS™ iPS-Brew XF Medium mit 5 µM Rock Inhibitor (Stemolecule Y27632) kultiviert (Verfahren zum Beschichten von Zellkulturplatten mit Matrigel am Ende von Beispiel 1), sodass die Zellkultur am darauffolgenden Tag (Tag 0) ungefähr 30% konfluent war. Die optimale Zellzahl für das Ausplattieren muss jedoch für jede Zelllinie individuell bestimmt werden.

Durch das Kultivieren in N2-FCL Medium wurde die Mesoderm differenzierung der pluripotenten Stammzellen induziert. An den Tagen 0, 1, 2 und 3 wurde das Medium jeweils durch 15 ml N2-FCL Medium ersetzt und täglich gewechselt. N2-FCL Medium: DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% serumfreier Zusatz N-2 (100x) (Thermo Scientific), 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (100x) (MEM-NEAA, Invitrogen), 10 ng/ml rekombinates bFGF (Peprotech), 10 µM CHIR-99021 (Stemgent), 0.5 µM LDN193189 (Stemgent)).

Durch das Kultivieren in den Medien N2-FD, N2-FHD und N2-HKD wurde die myogene Spezifikation induziert. An den Tagen 4 und 5 wurde das Medium durch N2-FD Medium ersetzt und täglich gewechselt. N2-FD Medium: DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% serumfreier Zusatz N-2 (100x) (Thermo Scientific), 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (100x) (MEM-NEAA, Invitrogen), 20 ng/ml rekombinates bFGF (Peprotech), 10 µM DAPT (TOCRIS).

An den Tagen 6 und 7 wurde das Medium durch N2-FHD Medium ersetzt und täglich gewechselt. N2-FHD Medium: DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% serumfreier Zusatz N-2 (100x) (Thermo Scientific), 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (100x) (MEM-NEAA, Invitrogen), 20 ng/ml rekombinates bFGF (Peprotech), 10 µM DAPT (TOCRIS), 10 ng/ml rekombinates HGF (Peprotech).

An den Tagen 8, 9, 10 und 11 wurde das Medium durch N2-HKD Medium ersetzt und täglich gewechselt. N2-HKD Medium: DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% serumfreier Zusatz N-2 (100x) (Thermo Scientific), 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (100x) (MEM-NEAA, Invitrogen), 0.1 mM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen), 10 µM DAPT (TOCRIS), 10 ng/ml rekombinantes HGF (Peprotech), 10% Knockout serum replacement (Life Technologies).

Durch das Kultivieren in N2-HK Medium wurden die Zellen zu Skelettmyoblasten und Satellitenzellen myogen expandiert und maturiert. An den Tagen 12 bis 20 wurde das Medium durch N2-HK Medium (Expansionsmedium) ersetzt und jeden zweiten Tag gewechselt. N2-HK Medium: DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% serumfreier Zusatz N-2 (100x) (Thermo Scientific), 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (100x) (MEM-NEAA, Invitrogen), 0.1 mM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen), 10 ng/ml rekombinantes HGF (Peprotech), 10% Knockout serum replacement (Life Technologies).

Ab Tag 21 wurden die Zellen entweder auf Zellkulturplatten weiterkultiviert, eingefroren oder in dem Verfahren von Beispiel 2 verwendet. Wenn die Zellen weiterkultiviert wurden, wurde das Medium durch Differenzierungsmedium (Maturierungsmedium) ausgetauscht. Maturierungsmedium: DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% serumfreier Zusatz N-2 (Thermo Scientific), 1% B27-serumfreier Zusatz (Invitrogen). Durch Weiterkultivieren auf Zellkulturplatten werden Skelettmyoblasten, Skelettmyotuben und Satellitenzellen erzeugt.

Um die gerichtete Differenzierung während den beschriebenen Kultivierungsschritten nachzuvollziehen, wurden die Genexpressionsmuster der Zellen über einen Zeitraum von 60 Tagen mit Hilfe von RNA-Sequenzierung bestimmt. Mit Hilfe von RNA-Sequenzierung wurden das Ansteigen und das Absinken der Expression von spezifischen Genen bestimmt, d.h. der Eintritt und Austritt in bestimmten Differenzierungs- oder Maturierungsphasen wurde analysiert.

Im Speziellen wurden die Expression spezifischer Gene für Pluripotenz, paraxiales Mesoderm, skelettmuskelspezifische Transkriptionsfaktoren und Sarkomere gemessen. Gene, die für die Pluripotenz typisch sind, wie NANOG, POU5F1 und ZFP42, zeigen an den Tagen 0 und 1 (am Tag nach dem Saatschritt und dem darauffolgenden Tag) eine hohe Expression (**Abb. 4a**). NANOG und POU5F1 zeigen die höchste Expression an Tag 0; ZFP42 zeigt die höchste Expression an Tag 1 (**Abb. 4a**). Gene, die für das paraxiale Mesoderm typisch sind, wie MSGN1, TBX6 und MEOX1, zeigen an den Tagen 1-8 eine hohe Expression (**Abb. 4b**). MSGN1 zeigt die höchste Expression an Tag 1; TBX6 zeigt die höchste Expression an Tag 4;

und MEOX zeigt die höchste Expression an Tag 8 (**Abb. 4b**). Skelettmuskelspezifische Transkriptionsfaktoren, wie PAX3, PAX7 und MYOD1, zeigen an den Tagen 8, 29, bzw. 60 die höchste Expression (**Abb. 4c**). Gene, die für Sarkomere typisch sind, wie ACTN2, DMD und MYH3, zeigen am Tag 60 die höchste Expression (**Abb. 4d**). Darüber hinaus zeigen die Genexpressionsmuster vor allem während den ersten 21 Tagen einen steilen Anstieg oder Abfall der unterschiedlichen Marker. Beispielsweise wird TBX6 und MEOX1 nur an den Tagen 4 bzw. 8 stark exprimiert, wohingegen die Expression an den anderen Tagen mindestens 4-fach schwächer ist (**Abb. 4d**). Dieser zeitliche Ablauf deutet auf einen homogenen Verlauf des Differenzierungsprozesses hin.

Um die Differenzierung mit Hilfe einer zweiten unabhängigen Methode festzustellen, haben die Erfinder die Zellen nach dem 21-tägigen Differenzierungsverfahren mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurde DNA der Zellen mit Hoechst gefärbt und Aktin sowie Skelettmuskel-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Pax7, MyoD und Myogenin) immunologisch eingefärbt. Nach 21 Tagen zeigen die Fluoreszenzbilder einen hohen Anteil von Zellen mit einer Expression von Pax7, MyoD und Myogenin (**Abbildung 3**). Somit wurde mit Hilfe einer weiteren Methode gezeigt, dass durch das Differenzierungsprotokoll eine Zellpopulation von myogenen Zellen erzeugt wurde.

Um die Differenzierung mit Hilfe einer dritten unabhängigen Methode festzustellen, wurden die Zellen mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Durchflusszytometrie, wie hier verwendet, wird die Expression von skelettmuskel-spezifischen Faktoren mit Hilfe von Immunfärbung gemessen. Im Speziellen wurde der Anteil von Skelettmyoblasten und Skelettmyotuben (Expression der Marker Aktinin, Myogenin, MyoD) sowie Satellitenzellen (Expression des Markers PAX7) in vier unabhängigen pluripotenten Stammzelllinien bestimmt (iPSC (WT 1), iPSC (WT 2), DMD iPSC, korrigierte DMD iPSC) (**Abb. 5**). Der Anteil der Aktinin-positiven Zellen betrug zwischen 71 und 77.6% in den vier Zelllinien; der Anteil der Myogenin-positiven Zellen betrug zwischen 41.4% und 60.4% in den vier Zelllinien; der Anteil der MyoD-positiven Zellen betrug zwischen 40% und 54.1% in den vier Zelllinien; der Anteil der PAX7-positiven Zellen betrug zwischen 33.4% und 43.8% in den vier Zelllinien (**Abb. 5**). Auch die Durchflusszytometrie zeigt, dass die analysierten Zellen Skelettmyoblasten- und Skelettmyotuben-spezifische sowie Satellitenzellen-spezifische Marker in hoher Reinheit erzeugt wurden (>70% Aktinin-positive und >30% PAX7 positive Myozyten).

Somit wurde mit drei unterschiedlichen Methoden gemessen, dass die pluripotenten Stammzellen in einen skelettmyoblasthaltigen Zellpool differenziert wurden und somit die mesodermale Induktion, die myogene Spezifikation und die myogene Maturation durchlaufen haben.

Materialen und Methoden

Folgende pluripotente Stammzelllinien wurden verwendet: TC1133 (iPSC WT1; Baghbaderani et al. Stem Cell Reports 2015), iPSC WT2, DMD iPSC (DMD Del; Long et al. Sci Adv 2018), korrigierte DMD iPSC (Long et al. Sci Adv 2018). Bei der Stammzelllinie DMD iPSCs ist das X-chromosomale Dystrophin Gen (DMD) mutiert, das bei der Krankheit Muskeldystrophie Duchenne (DMD) ebenfalls mutiert ist und die Krankheit verursacht.

Für die Herstellung von Matrigel beschichteten Zellkulturplatten wurde BD Matrigel (Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced) in einem Verhältnis von 1:30 in eiskaltem PBS verdünnt und umgehend bei 4°C gelagert. Um Matrigel-beschichtete Platten vorzubereiten, wurde eine 1:120 Matrigel-Verdünnung mit eiskaltem PBS hergestellt. 0.1 ml/cm² der Verdünnung wurde in die Zellkulturflaschen gegeben. Die Flaschen wurden mindestens über Nacht und maximal für 2 Wochen bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Platten mindestens für eine halbe Stunde in den 37°C Inkubator gestellt.

Für das Passagieren (z.B. zum Ablösen der Zellen für die Kryopräservierung) wurden die Zellen einmal mit 3 ml TrypLE (Invitrogen) gewaschen, gefolgt von einer Inkubation in 5ml TrypLE für ungefähr 7 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das TrypLE ausgewaschen und die Verdauung wurde mit 10 ml N2-HK Medium mit 5µM Rock Inhibitor gestoppt. Um Klumpen auszulösen, wurden die Zellsuspension mit Hilfe einer 10 ml-Pipette pipettiert. Die Abtrennung der Zellen muss behutsam genug sein, um die Zellviabilität nicht zu verringern. Die Zellen wurden mit Hilfe eine CASY Zählers gezählt (durch Zugabe von 20 µl der Zellsuspension in 10 ml CASY Puffer). Zellen wurden bei 100 x g für 10 min bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet wurde behutsam in N2-HK Medium mit 5µM Rock Inhibitor resuspendiert. Die Zellen wurden auf Matrigel-beschichteten Platten bei einer Dichte von 60-70 000 Zellen/cm² in N2-HK Medium mit 5 µM Rock Inhibitor ausplattiert. Ab dem nächsten Tag wurde an jedem zweiten Tag das N2-HK Medium für 9 Tage ausgewechselt.

Für das Einfrieren von Zellen (z.B. an Tag 21, Kryopräservierung) wurden die Zellen einmal mit 3 ml TrypLE (Invitrogen) gewaschen und dann in 5 ml TrypLE für ungefähr 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das TrypLE ausgewaschen und die Verdauung wurde mit 10 ml N2-HK Medium mit 5 µM Rock Inhibitor gestoppt. Um Klumpen auszulösen, wurden die Zellsuspension mit Hilfe einer 10 ml-Pipette pipettiert. Die Abtrennung der Zellen muss behutsam genug sein, um die Zellviabilität nicht zu verringern. Die Zellen wurden mit Hilfe eine CASY Zählers gezählt (durch Zugabe von 20 µl der Zellsuspension in 10 ml CASY Puffer). Zellen wurden bei 100 x g für 10 min bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet wurde behutsam in N2-HK Medium mit 5 µM Rock Inhibitor und 10% DMSO (Sigma) bei 4°C resuspendiert. 10 x 10⁶ Zellen wurden in 2 ml pro

Kryovial mit Hilfe von Mr Frosty (Thermo) über Nacht bei -80 °C eingefroren. Danach wurden die Zellen auf -150 °C transferiert.

Für die RNA-Extraktion wurden in Trizol-Reagenz (Thermo Fisher) eingebettete Zelllysate durch Verwirbelung homogenisiert. Pro 1 ml Trizol-Reagenz wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt (AppliChem). Reagenzgefäße wurden fest geschlossen und fünfmal umgedreht gefolgt von 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden dann bei 10,000-12,000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase, die RNA enthält, wurde in frische Reagenzgefäße überführt, gefolgt von dem Hinzufügen von 500 µl Isopropanol (Roth), um die RNA zu präzipitieren. Die Reagenzgefäße wurden verwirbelt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach für weitere 10 Minuten bei 12,000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 1 ml 70% EtOH/Diethylpyrocabonate (DEPC) H₂O wurde hinzugegeben, um das Pellet zu waschen. Nach vorsichtigem Antippen des Reagenzgefäßes, um das Pellet zu lösen und zu waschen, wurden die Proben ein weiteres Mal für 5 Minuten bei 12,000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Pellets wurden 5-10 Minuten offen stehen gelassen, bis die restliche Flüssigkeit verdunstet war, und die RNA wurde in DEPC H₂O resuspendiert. Die RNA-Konzentration und Qualität wurde unter Verwendung eines Nanodrop ND-1000 bestimmt. Vor der Sequenzierung wurden die Qualität und RNA-Integrität mit dem Fragment Analyzer von Advanced Analytical weiter analysiert (Standard Sensitivität RNA-Analyse Kit (DNF-471)). Die Generierung von RNA-Seq-Bibliotheken erfolgte unter Verwendung eines modifizierten strangspezifischen, massiv-parallelen cDNA-Sequenzierungsprotokolls (RNA-Seq) (Illumina: TruSeq Stranded Total RNA (Cat. No. RS-122-2301)). Das Protokoll wurde optimiert, um den rRNA-Gehalt im Datensatz unter 5% zu halten (RiboMinus™ Technologie). Das restliche gesamte Transkriptom RiboMinus™ RNA ist für die direkte Sequenzierung geeignet. Der Ligationsschritt wurde optimiert, um die Ligationseffizienz zu erhöhen (>94%), und die PCR-Protokolle wurden für ein optimales Endprodukt der Bibliothek angepasst. Für die genaue Quantifizierung von cDNA-Bibliotheken, einem fluorometrisch basierten System, wurde das quantiFluor™dsDNA System von Promega verwendet. Die Größe der endgültigen cDNA-Bibliotheken wurde mit dem dsDNA 905 Reagent Kit (Fragment Analyzer von Advanced Bioanalytical) bestimmt, wobei die Größe durchschnittlich 300 bp aufweist.

Die Bibliotheken wurden auf einem Illumina HiSeq 4000 (Illumina) gepoolt (zusammengeführt) und sequenziert und erzeugten 50 bp Single-End-Reads (30-40x 10⁶ Reads/Sample). Sequenzbilder wurden mit der Illumina-Software BaseCaller in BCL-Dateien umgewandelt, die mit bcl2fastq v2.17.1.14 zu fastq-Dateien demultiplext wurden. Die Qualität wurde mit FastQC Version 0.11.5 (Andrews, 2014) evaluiert. Sequenzreads wurden der Humangenom-Referenzbibliothek zugeordnet (UCSC-Version hg19 mit Bowtie 2.0 (Langmead und Salzberg, 2012)). Dann wurde die Anzahl der abgebildeten Reads für jedes identifizierte Gen gezählt

und die Software DESeq2 wurde zur Beurteilung der differentiellen Genexpression verwendet (Anders und Huber, 2010). Die Reads pro Kilobase Transkript pro Million (RPKM) wurden auf der Grundlage der Ensembl-Transkriptlänge berechnet, die von biomaRt (v2.24) extrahiert wurde.

Für die Durchflusszytometrie wurden Einzelzellensuspensionen durch Verdauung der Zellen mit TrypLE Select (Thermo Fisher) hergestellt. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert, 5 Minuten lang bei 300 g zentrifugiert und in 4% Formalin fixiert (Histofix, Roth). Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut zentrifugiert und im Blockpuffer resuspendiert (PBS mit 1 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich), 5% FCS (Thermo Fisher) und 0,1% Triton 100X (Sigma)). Nach 10 Minuten des Blockierens wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und im Blockpuffer mit primären Antikörpern (sarkomerisches α -Aktinin 1:4,000 (Sigma- Aldrich); Pax7 1:50 (DSHB); MyoD 1:100 (DAKO); Myogenin 1:50 (DSHB)) oder entsprechende IgG1-Isotypkontrolle für 45 min bei 4°C resuspendiert.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, gefolgt von einem Waschschrift in Blockpuffer und anschließender Inkubation in sekundärem Antikörper (1:1000 Anti-Maus 488 [A-11001] oder 633 [A-21052], Thermo Fisher) und Hoechst (10 ng/ml; Thermo Fisher) für 30 Minuten bei 4°C. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und schließlich in PBS zur Analyse resuspendiert. Pro Probe wurden 10 000 lebende Zellereignisse analysiert. Die Messungen wurden an einem LSRII SORP-Zytometer durchgeführt und mit der DIVA-Software (BD Biosciences) analysiert.

Beispiel 2: Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe aus Skelettmyoblasten und Satellitenzellen, die aus pluripotenten Stammzellen abgeleitet wurden (Zellen aus Beispiel 1) (engl.: Engineered Skeletal Muscle, ESM)

Für den Aufbau von künstlichem Skelettmuskelgewebe wurden die in Beispiel 1 erhaltenen Zellen (Zellen von Tag 21) als Ausgangsmaterial verwendet und mit einer extrazellulären Matrix gemischt. Durch das Mischen mit einer extrazellulären Matrix werden die Zellen in eine Matrix dispergiert, um ein dreidimensionales Skelettmuskelgewebe zu erzeugen. Auch dieses Verfahren ist serumfrei und transgenfrei. Somit wird die Reproduzierbarkeit zum Herstellen von Skelettmuskelgewebe erhöht, da alle benötigten Substanzen und deren Konzentration definiert wurden. Durch dieses Verfahren kann ein krafterzeugendes Skelettmuskelgewebe erzeugt werden, das in Antwort auf einen elektrischen Stimulus kontrolliert kontrahiert. Es wird eine bestimmte zeitliche Abfolge von Wirkstoffen und physikalischen Reizen eingesetzt, die in der **Abbildung 6A** schematisch dargestellt und im Folgenden detailliert beschrieben sind.

Um das künstliche Skelettmuskelgewebe aufzubauen wurde die Zellen aus Beispiel 1 (Zellen von Tag 21) mit einer extrazelluläre Matrix gemischt und in Ringformen gegossen, um die Selbstorganisation der Zellen in einen kontraktilem Skelettmuskel zu unterstützen. Das bedeutet, dass die Zellen entweder (a) aus einer differenzierten Zellkultur nach Beispiel 1 dissoziiert wurde oder (b) eingefrorene Zellen aus Beispiel 1 verwendet wurden. (Detaillierte Beschreibung zum Auftauen von Zellen siehe unten).

Um die Zellen aus Beispiel 1 mit der extrazellulären Matrix zu mischen wurde ein Mastermix in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf Eis gemischt. Eine 2 ml Pipette wurde zum Hinzufügen des Kollagens verwendet. Folgende exakte Pipettierfolge wurde eingehalten:

ESM Anzahl (250 µl pro ESM)	4	8	16
Alle Volumen sind in µl angegeben			
Bovines Kollagen (6.5 mg/ml)	144	288	575
2xDMEM Serumfrei	144	288	575
NaOH 0.1 N	27	55	109
Matrigel	100	200	400
Zellsuspensionsvolumen	630	1260	2545
Zellzahl ($\times 10^6$)	5	10	20
Gesamtes Volumen	1050	2100	4200

Alternativ wurde der Mastermix nach folgenden Volumina pipettiert:

ESM Anzahl (180 µl pro ESM)	1	8	48
Alle Volumen sind in µl angegeben			
Bovines Kollagen (6.84 mg/ml)	35	280	1680
2xDMEM Serumfrei	35	280	1680
NaOH 0.1 N	5	40	240
Matrigel	19	152	912
Zellsuspensionsvolumen	100	800	4800
Zellzahl ($\times 10^6$)	1	8	48
Gesamtes Volumen	194	1552	9312

Der Mastermix wurde in die Ringformen gegossen und die Ringformen wurden vorsichtig in einen Inkubator überführt, um das Gemisch für 1 Stunde bei 37°C ruhen zu lassen. Nach der Inkubationszeit wurden vorsichtig 8 ml Expansionsmedium mit 5 µM Rock Inhibitor pro Form hinzugefügt (**Abb. 6A, Bild links**). Expansionsmedium (N2-HK Medium): DMEM mit 1 g/l

Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% serumfreier Zusatz N-2 (Thermo Scientific), 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (MEM-NEAA, Invitrogen), 0.1 mM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen), 10 ng/ml rekombinates HGF (Peprotech), 10% Knockout serum replacement (Life Technologies).

Die Zellen wurden so für 7 Tage in Expansionsmedium kultiviert. An den Tagen 1, 3 und 5 wurde das Medium durch frisches Expansionsmedium (N2-HK Medium; ohne Rock Inhibitor) ersetzt. Nach dem Gießen komprimierte sich das Gemisch in der Ringform, sodass das Gemisch nach 24 Stunden vollständig komprimiert war.

Nach 7 Tagen wurden die geformten Ringe auf Dehnapparaturen in 6-Well-Platten überführt (**Abb. 6A, Bild in der Mitte**). Somit wurden die Zellen unter einem physikalischen Stimulus, d.h. einer mechanischen Dehnung, weiterkultiviert. Außerdem wurde die Maturierung der Zellen durch Maturierungsmedium induziert, indem 5 ml Maturierungsmedium pro Well hinzugefügt wurden. Maturierungsmedium: DMEM mit 1 g/l Glukose und L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™) ergänzt mit Pyruvat (Gibco), 1% Pen/Strep (Invitrogen), 1% N serumfreier Zusatz N-2 (Thermo Scientific), 2% B27 serumfreier Zusatz (Invitrogen).

Um die Zellen in Skelettmyotuben und Satellitenzellen zu maturieren, wurde das Maturierungsmedium an jedem zweiten Tag der darauffolgenden 6 Wochen der Maturierung gewechselt.

Um die Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe experimentell zu testen, wurde das erzeugte Skelettmuskelgewebe mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das charakteristische Streifenmuster belegt, dass sich multinukleäre Skelettmuskelfasern ausgebildet haben, um einen krafterzeugenden Skelettmuskel zu erzeugen.

Die Erfinder haben das Strukturprotein Aktin des eukaryotischen Zytoskeletts mithilfe einer Immunfärbung sichtbar gemacht und die DNA in den Zellkernen wurde mit dem Farbstoff DAPI eingefärbt. Die Fluoreszenzbilder zeigen das charakteristische Streifenmuster, was belegt, dass multinukleäre, reife Skelettmuskelfasern durch das Verfahren ausgebildet wurden (**Abb. 8A**). Durch die Immunfärbung wurde gezeigt, dass das künstliche Skelettmuskelgewebe die Architektur von reifen multinukleären Muskelfasern aufweist.

Um darüber hinaus das künstlich erzeugte Muskelgewebe auch funktionell zu testen, haben die Erfinder Kontraktionsexperimente durchgeführt (**Abb. 6A, Bild rechts**). Diese Kontraktionsexperimente in Organbädern messen die Kontraktionsfrequenz und die Kontraktionskraft des hergestellten Skelettmuskelgewebes in Antwort of elektrische Stimulation.

Dazu wurde das Skelettmuskelgewebe in Form eines Ringes isometrisch in Organbädern (Föhr Medical Instruments) mit Tyrode-Lösung (in mmol/L: 120 NaCl, 1 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 5,4 KCl, 22,6 NaHCO₃, 4,2 NaH₂PO₄, 5,6 Glucose und 0,56 Ascorbat) bei 37°C und kontinuierlicher Begasung mit 5% CO₂ und 95% O₂ überführt. Die ESMs wurden im Abstand von 125 µm mechanisch gedehnt, bis die maximale Kraftamplitude (Kontraktionskraft; engl.: force of contraction=FOC) beobachtet wurde. Die FOC-Messungen wurden bei elektrischen Feld-Stimulationsfrequenzen im Bereich von 1-100 Hz (4 ms Rechteckimpulse; 200 mA) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Kontraktionsexperimente sind in **Abbildungen 6B** und **6C** dargestellt. **Abbildung 6B** zeigt repräsentative Kontraktionskraftkurven des künstlichen Skelettmuskelgewebes bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen. Bei einer Stimulation von 1 Hz (Strichlinie) wurden acht Einzelkontraktionen mit einer einzelnen Dauer von ungefähr 0.5 Sekunden aufgezeichnet; bei einer Stimulation von 10 Hz (durgezogene Linie) wurde ein beginnender Tetanus gemessen und bei einer Stimulation von 100 Hz (Strichpunktlinie) wurde ein voll ausgebildeter Tetanus festgestellt. **Abbildung 6C** zeigt die Kontraktionskraft des künstlichen Skelettmuskelgewebes in Abhängigkeit der Stimulusfrequenz. Die Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) wurde in Millinewton (mN) des Skelettmuskelgewebes in Abhängigkeit der elektrischen Stimulationsfrequenz (n=3) gemessen. Bei einem Stimulus von 1 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.5 Millinewton; bei einem Stimulus von 10 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.9 Millinewton; bei einem Stimulus von 20 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.1 Millinewton; bei einem Stimulus von 40 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.4 Millinewton; bei einem Stimulus von 60 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.55 Millinewton; bei einem Stimulus von 80 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 1.6 Millinewton; bei einem Stimulus von 100 Hz beträgt die Kontraktionskraft im Durchschnitt 2.1 Millinewton.

Die getesteten Skelettmuskelgewebe zeigten eine reproduzierbare Kontraktionsfrequenz und Kontraktionskraft in Antwort auf Stimulationsfrequenzen zwischen 1 Hz und 100 Hz. Bei einer Einzelstimulation von 1 Hz dauerte eine Kontraktion und vollständige Relaxation ungefähr 0.5 Sekunden. Da die Kontraktions- und Relaxationszeit ungefähr 0.5 Sekunden dauert, wurde bei höheren Stimulationsfrequenzen ein beginnender oder vollständiger Tetanus aufgezeichnet. Auch in natürlichen Skelettmuskelgeweben wird bei einer erhöhten Stimulationsfrequenz ein Tetanus ausgebildet, sodass sich das künstliche Skelettmuskelgewebe in dieser Hinsicht analog zu natürlichem Skelettmuskelgewebe verhält. Des Weiteren konnten die Erfinder zeigen, dass die Kontraktionskraft des Muskelgewebes mit zunehmender Kontraktionsfrequenz steigt. Diese Eigenschaften sind im Einklang mit nativem Skelettmuskelgewebe, das auch Einzelkontraktionen und tetanische Kontraktionen sowie eine positive Kraft-Frequenz-Verhältnis als Reaktion auf elektrische Stimulation zeigt. Im Unterschied zu dem künstlichen

Skelettmuskelgewebe werden bei natürlichen Muskelgeweben die elektrischen Impulse durch einen Neurotransmitterstimulus (Acetylcholin) der motorischen Endplatte ausgelöst.

Somit wurde durch das beschriebene Verfahren ein künstliches Muskelgewebe erzeugt, das eine charakteristische Ausbildung von multinukleären Muskelfasern (Myotuben) zeigt und das in Antwort auf elektrische Stimulation Kraft erzeugt.

Materialien und Methoden

Für das Dissoziieren der Zellen aus einer Zellkultur (Volumenangaben für eine T75 Zellkulturflasche) wurden die Zellen einmal mit 3 ml TrypLE (Invitrogen) gewaschen und dann in 5 ml TrypLE für ungefähr 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das TrypLE wurde ausgewaschen und der Verdau mit 10 ml Expansionsmedium mit 5 μ M Rock Inhibitor gestoppt. Um Klumpen auszulösen, wurden die Zellsuspension mit Hilfe einer 10 ml-Pipette trituriert. Die Abtrennung der Zellen muss behutsam genug sein, um die Zellviabilität nicht zu verringern. Die Zellen wurden mit Hilfe eine CASY Zählers gezählt (durch Zugabe von 20 μ l der Zellsuspension in 10 ml CASY Puffer). Die Zellen wurden bei 100 x g für 10 min bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet wurde behutsam im entsprechenden Volumen von Expansionsmedium mit 5 μ M Rock Inhibitor resuspendiert, anhängig von der Anzahl der ESMs (siehe Mastermix). Die Zellsuspension wurde auf Eis gestellt.

Für das Auftauen von Zellen wurde ein Vial aus dem -152 °C Gefrierschrank entnommen. Die Zellen wurden schnell in einem Wasserbad bei 37 °C für 2 Minuten aufgetaut. Das Vial wurde mit Alkohol eingesprüht und unter die Zellkulturhaube transferiert. Der Inhalt des Cryovials wurde mit Hilfe einer 2 ml serologischen Pipette in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Cryovial wurde mit 1 ml Expansionsmedium bei Raumtemperatur mit 5 μ M Rock Inhibitor gewaschen und das Expansionsmedium wurde tröpfchenweise zu den Zellen hinzugegeben, um einen osmotischen Schock zu vermeiden. Weitere 8 ml Expansionsmedium mit 5 μ M Rock Inhibitor wurden langsam hinzugegeben. Die Suspension wurde nicht mehr als zweimal vor der Zellzählung auf- und abpipettiert, um eine Zellschädigung zu vermeiden. Die Zellen wurden mit Hilfe eine CASY Zählers gezählt (durch Zugabe von 20 μ l der Zellsuspension in 10 ml CASY Puffer). Die Zellen wurden bei 100 x g für 10 min bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde entnommen, und das Pellet wurde behutsam im entsprechenden Volumen von Expansionsmedium mit 5 μ M Rock Inhibitor resuspendiert, abhängig von der Anzahl der ESMs wurde ein definiertes Volumen der Zellsuspension vorbereitet (siehe Mastermix). Die Zellsuspension wurde auf Eis gestellt.

Beispiel 3: Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe aus pluripotenten Stammzellen (engl.: Bioengineered Skeletal Muscle, BSM)

Für den Aufbau von künstlichem Skelettmuskelgewebe (BSM) werden in diesem Beispiel pluripotente Stammzellen und eine extrazelluläre Matrix verwendet. Im Unterschied zu Beispiel 1 und 2 fand beim Herstellen von BSM kein Übergang von Matrigel beschichteten Zellkulturplatten zu einer extrazellulären Matrix statt. Anstatt dessen wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen direkt in eine definierte extrazelluläre Matrix dispergiert/eingebettet. Die Selbstorganisation von pluripotenten Stammzellen zu einem Skelettmuskelgewebe wurde in der extrazellulären Matrix in Gegenwart von chemischen und physikalischen Stimuli unterstützt. Auch dieses Verfahren ist serumfrei und transgenfrei, sodass alle benötigten Substanzen und deren Konzentration definiert waren. Somit wurde die Differenzierung und Maturierung der humanen pluripotenten Stammzellen zu Skelettmyotuben und Satellitenzellen (Skelettmuskelfasern) gesteuert.

Das Schema des Differenzierungsprotokolls ist in **Abbildung 7A** abgebildet und zeigt die Abfolge der unterschiedlichen Wirkstoffe, die dem Medium beigemischt werden, sowie die physikalische Stimulierung auf Dehnappaturen. Während des in **Abbildung 7A** dargestellten Verfahrens wurde die Mesodermindifferenzierung induziert (Tag 0-4), die myogenen Spezifikation induziert (Tag 4-12), die Zellen zu Skelettmyoblasten und Satellitenzellen maturiert (Tag 12-21) und schließlich in Skelettmyotuben und Satellitenzellen maturiert (Tag 21-50).

Um das Verfahren durchzuführen wurden die induzierten pluripotenten Stammzellen am Vortag aus einer Zellkultur dissoziiert, gezählt und das Pellet behutsam in einem angemessenen Volumen von Medium (iPS-Brew XF mit 5 uM Rock Inhibitor, 10% KO serum replacement (Life Technologies) mit 10 ng/ml bFGF (Peprotech)) resuspendiert. Die Stammzellen wurden als Zellsuspension auf Eis gestellt.

Um die humanen pluripotenten Stammzellen mit Kollagen/Matrigel zu mischen und in Ringformen zu gießen, wurden der Mastermix in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf Eis gemischt. Eine 2 ml Pipette wurde zum Hinzufügen des Kollagens verwendet und folgende exakte Pipettierfolge wurde eingehalten.

BSM Anzahl (180 µl pro BSM)	4
Alle Volumen sind in µl angegeben	
Bovines Kollagen (6.5 mg/ml)	125
2xDMEM Serum-frei	125
NaOH 0.1 N	24
Matrigel	96
Zellsuspensionsvolumen	448
Zellzahl ($\times 10^6$)	3.2
Gesamtes Volumen	818

Der Mastermix wurde in die Ringformen gegossen. Die Ringformen wurden vorsichtig in einen Inkubator überführt, um das Gemisch für 1 Stunde bei 37°C ruhen zu lassen. Nach der Inkubationszeit wurden vorsichtig 8 ml Medium pro Form (iPS-Brew XF mit 5 µM Rock Inhibitor, 10% KO serum replacement (Life Technologies) mit 10 ng/ml bFGF (Peprotech)) hinzugefügt.

Durch das Kultivieren in N2-FCL Medium wurde die Mesodermdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen induziert. 24 Stunden nach dem Gießen wurde das Medium durch N2-FCL-Medium ersetzt. An den Tagen 1, 2 und 3 wurde das Medium täglich durch frisches N2-FCL-Medium ersetzt. (Zusammensetzung siehe Beispiel 1).

Durch das Kultivieren in den Medien N2-FD, N2-FHD und N2-HKD wurde die myogene Spezifikation induziert. An den Tagen 4 und 5 wurde das Medium durch N2-FD Medium ersetzt und täglich gewechselt (Zusammensetzung siehe Beispiel 1). An den Tagen 6 und 7 wurde das Medium durch N2-FHD Medium ersetzt und täglich gewechselt. (Zusammensetzung siehe Beispiel 1). An den Tagen 8, 9, 10 und 11 wurde das Medium durch N2-HKD Medium ersetzt und täglich gewechselt (Zusammensetzung siehe Beispiel 1).

An den Tagen 12 bis 20 wurde das Medium durch N2-HK Medium (Expansionsmedium) ersetzt und jeden zweiten Tag gewechselt (Zusammensetzung siehe Beispiel 1). Durch das Kultivieren in Expansionsmedium wurden die Zellen zu Skelettmyoblasten maturiert.

An Tag 21 wurden die geformten Ringe auf Dehnapparaturen in 6-Well-Platten überführt und unter Maturierungsbedingungen weiterkultiviert. Somit wurden die Zellen unter einem physikalischen Stimulus, d.h. einer mechanischen Dehnung, weiterkultiviert. Außerdem wurde die Maturierung der Zellen durch Maturierungsmedium induziert, indem 5 ml Maturierungsmedium pro Well hinzugefügt wurden (Zusammensetzung des Maturierungsmedium siehe Beispiel 2). Um die Zellen in Skelettmyotuben und Satellitenzellen zu maturieren, wurde das Maturierungsmedium an jedem zweiten Tag der darauffolgenden 4 Wochen der Maturierung gewechselt.

Um die Herstellung von künstlichem Skelettmuskelgewebe aus induzierten pluripotenten Stammzellen experimentell zu testen, wurde das erzeugte Skelettmuskelgewebe, wie in Beispiel 2, mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Wie in Beispiel 2 wurde das Strukturprotein Aktin des eukaryotischen Zytoskeletts mithilfe einer Immunfärbung sichtbar gemacht und die DNA in den Zellkernen wurde mit dem Farbstoff DAPI eingefärbt. Die Fluoreszenzbilder zeigten, wie in Beispiel 2, das charakteristische Streifenmuster, was die Ausbildung von

multinukleäre, reife Skelettmuskelfasern zeigt (**Abb. 8b**). Somit weist auch das BSM multinukleäre reife Skelettmuskelfasern auf, die durch das Verfahren ausgebildet wurden.

Um darüber hinaus das künstlich erzeugte Muskelgewebe auch funktionell zu testen, haben die Erfinder Kontraktionsexperimente, wie in Beispiel 2, durchgeführt. Diese Kontraktionsexperimente in Organbädern messen die Kontraktionsfrequenz und die Kontraktionskraft des hergestellten Skelettmuskelgewebes in Antwort of elektrische Stimulation.

Die Ergebnisse der Kontraktionsexperimente sind in **Abbildungen 7B** und **7C** dargestellt.

Abbildung 7B zeigt repräsentative Kontraktionskraftkurven des künstlichen Skelettmuskelgewebes bei unterschiedlichen Stimulusfrequenzen. Bei einer Stimulation von 1 Hz (Strichlinie) wurden acht Einzelkontraktionen mit einer einzelnen Dauer von ungefähr 0,5 Sekunden aufgezeichnet; bei einer Stimulation von 100 Hz (durgezogene Linie) wurde ein voll ausgebildeter Tetanus festgestellt. **Abbildung 7C** zeigt die Kontraktionskraft des künstlichen Skelettmuskelgewebes in Abhängigkeit der Stimulusfrequenz. Die Kontraktionskraft („Force of contraction, FOC“) wurde in Millinewton (mN) des Skelettmuskelgewebes (n=3) gemessen. Bei einem Stimulus von 1 Hz betrug die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.3 Millinewton; bei einem Stimulus von 10 Hz betrug die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.5 Millinewton; bei einem Stimulus von 20 Hz betrug die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.55 Millinewton; bei einem Stimulus von 40 Hz betrug die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.6 Millinewton; bei einem Stimulus von 60 Hz betrug die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.65 Millinewton; bei einem Stimulus von 80 Hz betrug die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.72 Millinewton; bei einem Stimulus von 100 Hz betrug die Kontraktionskraft im Durchschnitt 0.9 Millinewton.

Diese Kontraktionsexperimente zeigen, dass auch das BSM in Antwort auf elektrische Stimulation Kraft erzeugt. Die getesteten Skelettmuskelgewebe zeigten eine reproduzierbare Kontraktionsfrequenz und Kontraktionskraft in Antwort auf Stimulationsfrequenzen zwischen 1 Hz und 100 Hz und die Kontraktions- und Relaxationszeit nach einem Einzelstimulus betrug ungefähr 0.6 Sekunden. Darüber hinaus zeigen das ESM und das BSM gleiche Eigenschaften in Bezug auf Tetanusbildung und Steigerung der Kontraktionskraft. Wie auch das in Beispiel 2 beschriebene ESM, bildet das BSM bei einer erhöhten Stimulationsfrequenz, wie z.B. 100 Hz, einen Tetanus aus. Ebenfalls wie in Beispiel 2, steigt die Kontraktionskraft des BSM bei steigender Stimulusfrequenz.

Beide Eigenschaften sind analog zu einem Kontraktionsverhalten zu natürlichem Muskelgewebe, da in natürlichen Skelettmuskeln ebenfalls bei einer erhöhten Häufigkeit der Stimulation ein Tetanus ausgebildet wird und die Kontraktionskraft steigt. Ähnlich wie natürliche Skelettmuskeln zeigten die künstlichen Skelettmuskelgewebe Einzelkontraktionen und tetanische

Kontraktionen sowie eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung als Reaktion auf elektrische Stimulation.

Somit verhalten sich künstlichen Skelettmuskelgewebe aus Beispiel 2 und 3 (ESM und BSM) in Antwort auf elektrische Stimulation analog zu natürlichem Skelettmuskelgewebe.

Beispiel 4 – Steigerung der Funktion des künstlichen Skelettmuskelgewebes

Um die Funktion des künstlichen Skelettmuskels weiter zu steigern, kann z.B. die Kontraktionskraft durch die Hinzugabe von bestimmten Molekülen erhöht werden. In diesem Beispiel wurde speziell die Steigerung der Kontraktionskraft, sowie der Kontraktions- und Relaxationszeiten in Antwort auf die Zugabe von Kreatin und einer erhöhten Konzentration von Schilddrüsenhormon T3 (Triiod-L-Thyronin (T3); von 3 auf 100 nmol/L im Maturierungsmedium in Schritt iv) getestet. Hierbei wurde zuerst das Verfahren gemäß Beispiel 1 und 2 durchgeführt. Im Unterschied zu Beispiel 2 wurde das Maturierungsmedium entweder zwischen Tag 28 und 56 oder zwischen Tag 56 und 84 des Verfahrens mit Kreatin oder einer erhöhten Konzentration von T3 ergänzt.

Ergänzung durch Kreatin: Bei einer Ergänzung des Maturationsmediums mit 1 mM Kreatin ab Tag 28 des Verfahrens bis Tag 56 erhöhte sich die Kontraktionskraft (Force of contraction; FOC) bei einer tetanischen Kontraktion bei 100 Hz Stimulation von 1.8 mN auf 2.5 mN (**Abbildung 9B** oben). Dieser Medienzusatz erhöhte die Kontraktionskraft also um 39%. Des Weiteren wurde eine mögliche Steigerung der Kontraktionskraft bei einem verlängerten Verfahren getestet. Dazu wurde das Verfahren wie in Beispiel 2 beschrieben um 4 weitere Wochen verlängert und das Medium in dieser Zeit mit 1 mM Kreatin ergänzt. Bei einer Ergänzung des Maturationsmediums mit 1 mM Kreatin ab Tag 56 des Verfahrens bis Tag 84 erhöhte sich die Kontraktionskraft (Force of contraction; twitch tension) bei einer tetanischen Kontraktion bei 100 Hz Stimulation von 4.0 mN auf 5.2 mN (**Abbildung 9B** unten). Dieser Medienzusatz erhöhte die Kontraktionskraft also um 30%.

Daraus folgt, dass die Hinzugabe von Kreatin im Maturationsmedium die Kontraktionskraft in beiden Versuchen signifikant gesteigert hat.

Ergänzung durch T3: Bei einer Ergänzung des Maturationsmediums mit 0.1 μ M T3 ab Tag 28 des Verfahrens bis Tag 56, verringerte sich die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten signifikant, wie durch einen Student's T test bestimmt (**Abbildung 10B**). Des Weiteren verringerten sich die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten bei einer Verlängerung des Verfahrens, wie in Beispiel 2 beschrieben, wobei das Medium zwischen dem Tag 56 und 84 mit 0.1 μ M T3 ergänzt wurde (**Abbildung 10B**). Somit reagieren die künstlichen Skelettmuskeln auf eine tetanische Stimulation schneller und entspannen sich schneller nach Beendigung der Stimulation.

Es ist davon auszugehen, dass ein Maturierungsmedium mit erhöhter T3 Konzentration grundsätzlich zu einer Verbesserung der Skelettmuskelkontraktilität im Sinne einer Beschleunigung der Anspannungs- und Entspannungszeiten führt.

Um die molekulare Ursache dieser verbesserten Muskelfunktionen zu betrachten, wurde die Expression unterschiedlicher Proteine mit Hilfe von Western Blots analysiert. MYH2 ist die schwere Kette des schnellen Myosins (MYH2; fast myosin heavy chain); MYH7 ist die schwere Kette des langsamen Myosins (MYH7; slow myosin heavy chain); MYH3 ist die schwere Kette des embryonalen Myosins (MYH3; embryonic myosin heavy chain). Die Proteinexpression wurde an Tag 84 analysiert. Wie in **Abbildung 10C** gezeigt ist die Proteinexpression von MYH2 bei einer vierwöchigen Zugabe von 0.1 μM T3 signifikant erhöht. Basierend auf drei unabhängigen Experimenten ist die Expression mindestens 5-fach erhöht. Die Expression von MYH7 blieb unverändert durch eine Zugabe von 0.1 μM T3. Die Expression von MYH3 wurde im Durchschnitt ungefähr um die Hälfte reduziert. Diese Proteinexpressionsdaten unterstützen die Funktionsdaten aus den **Abbildungen 10B**, da sich die verkürzte Reaktionszeit des künstlichen Skelettmuskels durch eine durch T3 gesteigerte Expression der schnellen Myosin (MYH2) Isoform erklären lässt.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Zugabe von Kreatin und/oder T3 während der Maturierung die Funktion des künstlichen Skelettmuskels erhöht. Im Speziellen konnte gezeigt werden, dass eine Hinzugabe von Kreatin die Kontraktionskraft stark erhöht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Hinzugabe von T3 die Reaktionsgeschwindigkeit des künstlichen Skelettmuskels erhöht. Diese Steigerung der Funktion wird durch die erhöhte Expression von MYH2 unterstützt.

Es ist außerdem davon auszugehen, dass die Funktionssteigerung des künstlichen Skelettmuskels in gleicher Form eintritt, wenn ein künstliches Skelettmuskelgewebe gemäß Beispiel 3 (BSM) hergestellt wird und dann Kreatin und/oder T3 dem Maturierungsmedium hinzugegeben wird.

Beispiel 5 – Regenerationsfähigkeit künstlicher Skelettmuskelgewebe

Um künstliches Skelettmuskelgewebe beispielsweise als Implantat oder als Modell für die Testung von Regeneration- oder Muskelwachstums-induzierenden Arzneistoffen verwenden zu können, hat das künstliche Skelettmuskelgewebe idealerweise eine regenerative Eigenschaft. Diese regenerative Eigenschaft zeichnet sich dadurch aus, dass Verletzungen des künstlichen Skelettmuskelgewebes repariert werden können. Für diesen Reparaturprozess benötigt ein künstliches Skelettmuskelgewebe Zellen mit regenerativen Eigenschaften, zum Beispiel Satellitenzellen (Skelettmuskelvorläuferzellen). In **Abbildung 11A** wurde die Proteinexpression von in Skelettmuskelzellvorläufern exprimierten Markern analysiert (PAX7, PAX3, MYF5 und BARX2). Im Gegensatz zu 2D Kulturen, waren alle vier Marker in ESM an Kulturtag 60 des Verfahrens deutlich exprimiert. Des Weiteren war PAX3, MYF5 und BARX2 in künstlichen

Skelettmuskel stärker exprimiert als in Skelettmuskelzellen, die in einer 2D-Platte kultiviert wurden. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass in künstlichem Skelettmuskelgewebe im Gegensatz zu parallelen 2D Kulturen Skelettmuskelzellvorläufern erhalten bleiben und sich dazu vermehren. In **Abbildung 11B** sind dann auch gut differenzierte Satellitenzellnischen in ESM dargestellt; vereinzelt und weniger ausdifferenziert waren Satellitenzellnischen auch in 2D Kulturen analog zu dem hier beschriebenen Verfahren zu erkennen.

Um die regenerative Eigenschaft zu testen, wurde künstlichen Skelettmuskelgewebe (60 Tage alt) mit dem Muskelgift Cardiotoxin (25 µg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Die Kontraktionskraft wurde 2 und 21 Tagen nach Inkubation gemessen (**Abbildung 11C**). Wie in **Abbildung 11D** gezeigt, zeigten künstliche Skelettmuskelgewebe 2 Tage nach Inkubation mit CTX keine Kontraktionen, 21 Tage nach Inkubation kontrahierten die künstlichen Skelettmuskel wieder mit einer Kontraktionskraft von 1 mN. Somit ist der künstliche Skelettmuskel regenerationsfähig. Im Vergleich dazu erholte sich ein zusätzlich mit gamma-Strahlung (30 Gy) behandelter Skelettmuskel von der Inkubation mit CTX nicht. Dies deutet darauf hin, dass die Regeneration künstlicher Skelettmuskel von einer Aktivierung der enthaltenen Skelettmuskelzellvorläuferzellen abhängig ist. Durch Bestrahlung werden diese und alle anderen Zellen mit Zellteilungsaktivität gehemmt. Dieses Experiment zeigt darüber hinaus, dass die molekular und mikroskopisch nachweisbaren Skelettmuskelzellvorläuferzellen (**Abbildung 11A-B**) funktionell sind. **Abbildung 11E** zeigt dann auch im Vergleich den Muskelwiederaufbau in nicht-bestrahlten ESM im Vergleich zu bestrahlten ESM mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der Nachweis von Zellen mit sarkomerischem Aktinin an Tag 21 nach CTX-induzierter Muskelzellzerstörung belegt die Muskelwiederaufbau in ESM über die Aktivierung mit Zellteilung und Differenzierung von Skelettmuskelzellvorläuferzellen. In bestrahlten ESM konnte keine regenerative Aktivität nachgewiesen werden. Diese morphologischen Beobachtungen decken sich mit den funktionellen Beobachtungen in **Abbildung 11D**. Diese zeigen, dass künstliche Skelettmuskeln 21 Tage nach CTX-vermittelter Muskelzellzerstörung wieder mit ungefähr 1 mN kontrahieren.

Methoden zu den Beispielen 4 und 5

Maturierungsbedingungen

Das Maturierungsmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und unter mechanischen Dehnung bis zu 9 Wochen kultiviert. Das Maturierungsmedium umfasste DMEM, mit niedriger Glukose, GlutaMAX™ Supplement, Pyruvat (Thermo Fisher Scientific), 1% N-2 Supplement (Thermo Fisher Scientific), 2% B-27 Supplement (Thermo Fisher Scientific) und wahlweise Antibiotika (z.B. 1% Pen/Strep - Thermo Fisher Scientific). 0,1 µM T3 (Sigma-Aldrich) oder 1 mM Kreatinmonohydrat (Sigma-Aldrich) wurde dem Reifemedium für einen vierwöchigen Zeitraum hinzugegeben, sofern angegeben (z.B. Tag 28-56 oder Tag 56-84).

Isometrische Kraftmessungen

Die kontraktile Funktion des künstlichen Skelettmuskelgewebes wurde unter isometrischen Bedingungen in einem Organbad gefüllt mit begaster (5% CO₂ /95% O₂) Tyrode-Lösung (enthaltend in mmol/L): 120 NaCl, 1 MgCl₂, 0,2 CaCl₂, 5,4 KCl, 22,6 NaHCO₃, 4,2 NaH₂PO₄, 5,6 Glucose und 0,56 Ascorbat) bei 37°C gemessen. Um die Kraft-Längen-Beziehung zu überprüfen, wurde - während die ESMs bei 1 Hz mit 5 ms Rechteckimpulsen von 200 mA elektrisch stimuliert wurden - die Muskellänge durch mechanische Dehnung in Intervallen von 125 µm erhöht, bis die maximale Kontraktionskraft beobachtet wurde. Bei der Länge der maximalen Krafterzeugung wurde die tetanische Kontraktionskraft unter definierten Stimulationsfrequenzen bewertet (4-Sekunden lange Stimulation bei 10, 20, 40, 60, 80 und 100 Hz).

Modell der Kardiotoxin-Verletzung

Die Kontroll-künstlichen Skelettmuskeln wurden parallel zu den bestrahlten ESM einer Kardiotoxin-Verletzung (CTX) ausgesetzt. Um eine Verletzung zu induzieren, wurde das Gewebe 24 Stunden lang in Maturierungsmedium mit 25 µg/ml CTX (Latoxan) gehalten (Tiburcy et al., 2019). Anschließend wurde das verletzte Gewebe gespült und in einem Expansionsmedium bestehend aus DMEM, niedriger Glukose, GlutaMAX[™] Supplement, Pyruvat (Thermo Fisher Scientific), 1% N-2 Supplement (Thermo Fisher Scientific), 1% MEM nicht-essentielle Aminosäurenlösung (Thermo Fisher Scientific), 10 ng/ml HGF (Peprotech) und 10% Knock-out-Serumersatz (Thermo Fisher Scientific) für 1 Woche kultiviert und anschließend in Maturierungsmedium aus DMEM, niedriger Glukose, GlutaMAX[™] Supplement, Pyruvat (Thermo Fisher Scientific), 1% N-2 Supplement (Thermo Fisher Scientific), 2% B-27 Supplement (Thermo Fisher Scientific) und 1 mM Kreatinmonohydrat (Sigma-Aldrich) für weitere 2 Wochen der Regeneration kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag aufgefrischt. Wahlweise können Antibiotika (z.B. 1% Pen/Strep - Thermo Fisher Scientific) zugegeben werden.

ESM Bestrahlung

ESM wurden 24 Stunden vor CTX Behandlung in der Kulturschale in einen STS Biobeam 8000 Gammabestrahler gelegt und 10 Minuten lang einer Einzeldosis von 30 Gy Bestrahlung ausgesetzt (Tiburcy et al., 2019).

Immunfärbung und konfokale Bildgebung

2D-Zellkulturen wurden in Formaldehyd 4% (Carl Roth) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei Raumtemperatur für 15 min fixiert. Künstliche Skelettmuskeln wurden in 4% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C über Nacht fixiert. Nach der Fixierung wurden die künstlichen Skelettmuskeln für 1 min in 70%igem Ethanol (Carl Roth) getaucht und dann in 2%iger Agarose (peqGOLD) in 1X Tris Acetat-EDTA (TAE)-Puffer eingebettet. Mit einem Leica Vibrotome (LEICAVT1000S) wurden die Schnitte bei 400 µm geschnitten und in kaltem 1X PBS

aufbewahrt. Vor der Färbung wurden sowohl 2D-Zellkulturen als auch ESM-Schnitte mit 1X PBS gewaschen. Um eine Blockierung und Permeabilisierung zu induzieren, wurden die Proben in Blockierungspuffer inkubiert (1X PBS mit 5% fötalem Rinderserum, 1% Rinderserumalbumin (BSA) und 0,5% Triton-X). Alle primären und sekundären Antikörperfärbungen wurden in der gleichen Blockierungslösung durchgeführt. Die folgenden Antikörper wurden für die Primärfärbung in RT für 4 h oder bei 4 °C für 24-72 h eingesetzt: Pax3 (1:100, DSHB), Pax7 (1:100, DSHB), MyoD (1:100, Dako) und Myogenin (1:10, DSHB). Sarkomerisches α -Aktinin (1:500, Sigma-Aldrich), Laminin (1:50, Sigma-Aldrich). Nach 3x PBS-Waschung wurden die geeigneten Alexa-Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper (1:1000, Thermo Fisher Scientific) bei Raumtemperatur für 2 h appliziert. Parallel zu den Sekundärantikörpern wurden Alexa 633-konjugiertes Phalloidin (1:100, Thermo Fisher Scientific) und Hoechst 33342 (1:1000, Molecular Probes) für die f-Aktin- bzw. Kernfärbung verwendet. Nach 3 Waschungen mit PBS wurden die Proben in Fluoromount-G (Southern Biotech) eingefärbt. Alle Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop Zeiss LSM 710/NLO aufgenommen. Um die markierten Zellen zu quantifizieren, wurden 3 zufällige Fokalebenen pro Probe aus 3 verschiedenen Experimenten für die Analyse mit dem ImageJ Cell Counter Tool ausgewählt.

Western-Blot-Analyse

Zur Proteinisolierung wurde künstlicher Skelettmuskel in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dem künstlichen Skelettmuskel wurden 150 μ l eiskalter Proteinlysatzpuffer (2,38 g HEPES, 10,20 g NaCl, 100 ml Glycerin, 102 mg $MgCl_2$, 93 mg EDTA, 19 mg EGTA, 5 ml NP-40 in einem Gesamtvolumen von 500 ml ddH₂O) mit 1/10 Phosphatase-Inhibitor (Roche) und 1/7 Protease-Inhibitor (Roche) zugesetzt. Eine 7-mm-Edelstahlkugel (Qiagen) wurde in das Eppendorf-Röhrchen gegeben und die Probe wurde unter Verwendung des TissueLyser II (Qiagen) für 30 Sekunden bei 30 Hz und 4°C homogenisiert und anschließend 2 Stunden auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten lang bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Proteinprobe gesammelt, und die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Proteinassay gemessen. 30 μ g der Proteinprobe wurden auf ein 4 bis 15 %iges Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gel (Bio-Rad) aufgetragen, etwa 2,5 Stunden bei 100 V elektrophoretisch getrennt und anschließend bei 30 V in einer mit Eis gefüllten Box, die über Nacht im Kühlraum steht, auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Um das Gesamtprotein sichtbar zu machen, wurde die PVDF-Membran mit Ponceau Red angefärbt. Die Färbung mit primären Antikörpern (4 Std. in Raumtemperatur) und sekundären Antikörpern (1 Std. in Raumtemperatur) wurde in einer Blockierungslösung durchgeführt, die 5% Milch in 1x Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) und 0,1% Tween 20 enthielt. Die Proteinexpression in ESM wurde mit Western Blot unter Verwendung der folgenden primären Antikörper analysiert: monoklonaler schwere Kette 3 des embryonalen Myosins (1:500, F1.652, DSHB), schwere Kette 7 des langsamen Myosin-

Typs (1:500, A4.951, DSHB) und schwere Kette 2 des schnellen Myosin-Typs (1:100, A4.74, DSHB). Die Proteinbeladung wurde durch Vinculin (VCL)-Antikörper (1:5000, V3131, Sigma-Aldrich) kontrolliert. Die Membran wurde 5 Minuten lang mit 1x Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) und 0,1% Tween 20 gewaschen. Für die Sekundärfärbung wurde mit Meerrettichperoxidase konjugierter Ziegen-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:10000, P0260, Dako) verwendet. Nach 5-minütigem Waschen der Membran mit 1x Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) und 0,1% Tween 20 wurde der Blot mit Femto LUCENTTMLuminol Reagenz (Gbiosciences) abgedeckt und die Proteinbanden mit dem BIO-RAD ChemDocTMMP-System abgebildet. Die Proteinquantifizierung aus dem Western Blot wurde mit ImageJ durchgeführt.

Quantitative realtime PCR

Die Gesamt-RNA wurde aus 2D-Zellkulturen und künstlichen Skelettmuskeln unter Verwendung von Trizol-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) isoliert. Trizol wurde den 2D-Zellen in der Kulturplatte zugegeben, die Zellen wurden abgeschabt und das Zelllysat durch Vortexen homogenisiert. Der künstliche Skelettmuskel wurde in ein Polypropylen-Röhrchen (Eppendorf) gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 1 ml Trizol wurde dem künstlichen Skelettmuskel in Gegenwart einer 7-mm-Edelstahlkugel (Qiagen) hinzugefügt, und die Probe wurde unter Verwendung des TissueLysers II (Qiagen) für 2 min bei 30 Hz und 4°C lysiert. Die RNA-Isolierung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. Gemäß der Weisung des Herstellers wurde 1 µg der RNA-Probe mit DNase I (Roche) behandelt und anschließend wurde die Probe mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in komplementäre DNA (cDNA) rücktranskribiert. Die quantitative PCR wurde mit dem Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) und dem AB7900 HT Fast Real-Time PCR-System (Applied Biosystems) durchgeführt. Wahlweise wurde die Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung über eine Illumina Plattform durchgeführt.

Verwendete Materialien in allen Beispielen

Die hierin verwendeten Materialien sind im Handel erhältlich, soweit nicht anders angegeben. So sind beispielsweise Penicillin/Streptomycin, B27-serumfreier Zusatz, essentielle Aminosäuren (MEM-NEAA) und 2-Mercaptoethanol von Invitrogen erhältlich. Der Name der Firma ist bei den verwendeten Materialien jeweils angegeben.

Die Stammlösungen der N2- und B27- serumfreien Zusatzlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Wenn sie einmal aufgetaut wurden, wurden sie zum Medium hinzugegeben und maximal eine Woche bei 4°C gelagert. Die Knockout Serum Replacement-Stammlösungen wurden

auch bei -20 °C gelagert. Wenn sie einmal aufgetaut wurden, wurden sie maximal zwei Wochen bei 4°C gelagert. Die LDN193189-Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 mM in DMSO und wurde bei -20 °C gelagert. Die DAPT-Stammlösung hatte eine Konzentration von 20 mM in DMSO und wurde bei -20 °C gelagert. Die bFGF-Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 µg/ml in PBS mit 0.1 % humanes rekombinantes Albumin und wurde bei -20 °C gelagert. Die HGF-Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 µg/ml in PBS mit 0.1 % humanes rekombinantes Albumin und wurde bei -20 °C gelagert. Der Rock-Inhibitor hatte eine Konzentration von 10 mM in DMSO und wurde bei -20 °C gelagert.

Wenn die Stammlösungen der Wachstumsfaktoren und kleinen Moleküle einmal aufgetaut wurden, wurden sie maximal eine Woche bei 4°C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung des serumfreien Zusatzes N-2 in 100x wirksamer Konzentration (flüssige Form), d.h. 1% (v/v) entspricht einer einfachen (1x) wirksamen Konzentration

Bestandteile	Molekulargewicht	Konzentration (µg/ml)	Konzentration (mM)
Humanes Transferrin (Holo)	10000.0	10000.0	1.0
Insulin, rekombinante Vollkette	5807.7	500.0	0.0860926
Progesteron	314.47	0.63	0.0020033708
Putrescin	161.0	1611.0	10.006211
Selenit	173.0	0.52	0.0030057803

Tabelle 2: Zusammensetzung der Nicht-essentielle Aminosäuren in 100x wirksamer Konzentration (100x)

Bestandteile	Molekulargewicht	Konzentration (mg/L)	Konzentration (mM)
Glycin	75.0	750.0	10.0
L-Alanin	89.0	890.0	10.0
L-Asparagin	132.0	1320.0	10.0
L-Asparaginsäure	133.0	1330.0	10.0
L-Glutaminsäure	147.0	1470.0	10.0
L-Prolin	115.0	1150.0	10.0
L-Serin	105.0	1050.0	10.0

Tabelle 3: DMEM, niedriger Glukosegehalt mit 1 g/l, GlutaMAX™, ergänzt mit Pyruvat (Gibco, Katalognummer: 10567014)

Bestandteile	Molekulargewicht	Konzentration (mg/L)	Konzentration (mM)
<u>Aminosäuren</u>			
Glycin	75.0	30.0	0.4
L-Alanyl-Glutamin	217.0	862.0	3.9723501
L-Arginin-Hydrochlorid	211.0	84.0	0.39810428
L-Cystin	313.0	48.0	0.15335463
L-Histidin-Hydrochloride-H ₂ O	210.0	42.0	0.2
L-Isoleucin	131.0	105.0	0.8015267
L-Leucin	131.0	105.0	0.8015267
L-Lysin-Hydrochloride	183.0	146.0	0.7978142
L-Methionin	149.0	30.0	0.20134228
L-Phenylalanin	165.0	66.0	0.4
L-Serin	105.0	42.0	0.4
L-Threonin	119.0	95.0	0.79831934
L-Tryptophan	204.0	16.0	0.078431375
L-Tyrosin	181.0	72.0	0.39779004
L-Valin	117.0	94.0	0.8034188
<u>Vitamine</u>			
Cholinchlorid	140.0	4.0	0.028571429
D-Kalziumpantothenat	477.0	4.0	0.008385744
Folsäure	441.0	4.0	0.009070295

Bestandteile	Molekulargewicht	Konzentration (mg/L)	Konzentration (mM)
Niacinamid	122.0	4.0	0.032786883
Pyridoxinhydrochlorid	206.0	4.0	0.019417476
Riboflavin	376.0	0.4	0.0010638298
Thiaminhydrochlorid	337.0	4.0	0.011869436
i-Inositol	180.0	7.2	0.04
<u>Anorganische Salze</u>			
Kalziumchlorid (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	147.0	264.0	1.7959183
Eisen-III-Nitrat (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404.0	0.1	2.4752476 E-4
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	246.0	200.0	0.8130081
Kaliumchlorid (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Natrium-Bicarbonat (NaHCO ₃)	84.0	3700.0	44.04762
Natriumchlorid (NaCl)	58.0	6400.0	110.344826
Natriumphosphat monobasisch (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	156.0	141.0	0.90384614
<u>Andere Bestandteile</u>			
D-Glukose (Dextrose)	180.0	1000.0	5.5555553
Phenolrot	376.4	15.0	0.039851222
Natriumpyruvat	110.0	110.0	1.0

Tabelle 4: Zusammensetzung des zusätzlichen serumfreien Zusatzes B27 in 50x wirksamer Konzentration (flüssige Form)

10 ml des 50X B27 Zusatzes per 500 ml Medium entspricht 2% (v/v)

Bestandteile	Konzentration in 50x B27
	µg/ml
BSA fraction V IgG free Fatty Acid Poor	125000
Catalase	125
Glutathion reduziert	50
Humanes Insulin	156,25
Superoxid Dismutase	125
Humanes Holo-Transferin	250
T3	0,1
L-carnitin	100
Ethanolamin	50
D+-galactose	750
Putrescin	805
Natrium-Selenit	0,625
Corticosterone	1
Linolsäure	50
Linolensäure	50
Progesteron	0,315
Retinylacetat	5
DL -alpha tocopherol (Vit E)	50

DL-alpha tocopherol Acetat	50
Biotin	125

Tabelle 5: Zusammensetzung des Knockout Serum Replacement (KSR)

Substanz	Konzentration im Zusatz (µg/ml)	Substanz	Konzentration im Zusatz (µg/ml)
Glycin	150	Ag ⁺	0.0006
L-Histidin	940	Al ³⁺	0.0007
L-Isoleucin	3400	Ba ²⁺	0.008
L-Methionin	90	Cd ²⁺	0.03
L-Phenylalanin	1800	Cr ³⁺	0.003
L-Prolin	4000	Ge ⁴⁺	0.003
L-Hydroxyprolin	100	Se ⁴⁺	0.02
L-Serin	800	Br ⁻	0.004
L-Threonin	2200	I ⁻	0.0007
L-Tryptophan	440	Mn ²⁺	0.0004
L-Tyrosin	77	F ⁻	0.010
L-Valin	2400	Si ⁴⁺	0.01
Thiamin	33	V ⁵⁺	0.003
Reduziertes Glutathion	10	Mp ⁶⁺	0.006
Ascorbinsäure -2-PO ₄ (Mg-Salz)	330	Ni ²⁺	0.0002
Transferrin	55	Rb ⁺	0.005
Insulin	100	Sn ²⁺	0.0002
Natrium-Selenit	0.07	Zr ⁴⁺	0.01
AlbuMAX	83 000		
AgNO ₃	0.0009	KBr	0.0006
AlCl ₃ 6H ₂ O	0.006	KI	0.0009
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	0.01	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.002
CdSO ₄ 8H ₂ O	0.08	NaF	0.02
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.01	Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	1
Cr ₂ (SO ₄) ₃ 1H ₂ O	0.003	NaVO ₃	0.006
GeO ₂	0.003	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.06
Na ₂ SeP ₃	0.007	RbCl	0.007
H ₂ SeO ₃	0.02	SnCl ₂	0.0003
		ZrOCl ₂ 8H ₂ O	0.02

REFERENZEN

WO 98/30679

WO 2017/100498 A1

WO 2018/170180 A1

Baghbaderani BA, Tian X, Neo BH, Burkall A, Dimezzo T, Sierra G, Zeng X, Warren K, Kovarcik DP, Fellner T, Rao MS. cGMP-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Available for Pre-clinical and Clinical Applications. *Stem Cell Reports*. 5(4):647-59.

Beldjilali-Labro M, Garcia Garcia A, Farhat F, Bedoui F, Grosset J, Dufresne M, Legallais C. Biomaterials in Tendon and Skeletal Muscle Tissue Engineering: Current Trends and Challenges. *Materials* 2018 (11) 1116

Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. and Price, P. J. (1993), Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.*, 35: 567-576. doi:10.1002/jnr.490350513

Chal J et al. "Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro", *Nature Protocols*, Vol. 11 No. 10, 2016 S.1833-1846

Espejel S, Eckardt S, Harbell J, Roll GR, McLaughlin KJ, Willenbring H. Brief report: Parthenogenetic embryonic stem cells are an effective cell source for therapeutic liver repopulation. *Stem Cells*. 2014 Jul;32(7):1983-8. doi: 10.1002/stem.1726.

Hughes, C. S., Postovit, L. M. and Lajoie, G. A. (2010), Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10: 1886-1890. doi:10.1002/pmic.200900758

James E. Hudson, Gary Brooke, Chris Blair, Ernst Wolvetang, and Justin John Cooper-White. *Tissue Engineering Part A*. Sep. 2011

Khodabukus A, Prabhu N, Wang J, Bursac N. In Vitro Tissue-Engineered Skeletal Muscle Models for Studying Muscle Physiology and Disease. *Adv. Healthcare Mater.* 2018 (7) 1701498

Krämer et al. "Tissue engineered muscle to investigate skeletal muscle regeneration in vitro", *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, (February 2014) Vol. 387, Supplement 1 S. S59, Abstract Number: 235

Liao IC, Liu JB, Bursac N, Leong KW. Effect of Electromechanical Stimulation on the Maturation of Myotubes on Aligned Electrospun Fibers. *Cell Mol Bioeng.* 2008 Sep 1;1(2-3):133-145.

Long C, Li H, Tiburcy M, Rodriguez-Caycedo C, Kyrychenko V, Zhou H, Zhang Y, Min YL, Shelton JM, Mammen PPA, Liaw NY, Zimmermann WH, Bassel-Duby R, Schneider JW, Olson EN. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Sci Adv.* 2018 Jan 31;4(1):eaap9004.

Pavesi A, Adriani G, Rasponi M, Zervantonakis IK, Fiore GB, Kamm RD. Controlled electromechanical cell stimulation on-a-chip. *Sci Rep.* 2015 Jul 2;5:11800.

Rao L, Qian Y, Khodabukus A, Ribar T, Bursac N. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nature Communications.* 2018; 9(126)

Shahriyari et al. "Engineered human skeletal muscle from pluripotent stem cell-derived myoblasts: a novel pharmaceutical tool", Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, (February 2018) Vol. 391, Supp. Supplement 1, S. S8, Abstract Number: 25.

Takahashi, Kazutoshi et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007; 131(5), 861 - 872

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug 25; 126(4):P663-676

Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(1):11-19.

Thomson J, Itskovitz-Eldor, Shapiro et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 06 Nov 1998. 282(5391), 1145-1147

Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, Schlick S, Meyer T, Chang Liao ML, Levent E, Raad F, Zeidler S, Wingender E, Riegler J, Wang M, Gold JD, Kehat I, Wettwer E, Ravens U, Dierickx P, van Laake LW, Goumans MJ, Khadjeh S, Toischer K, Hasenfuss G, Couture LA, Unger A, Linke WA, Araki T, Neel B, Keller G, Gepstein L, Wu JC, Zimmermann WH. Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation*. 2017 May 9;135(19):1832-1847.

Tiburcy, M, Markov, A, Kraemer, LK, et al. Regeneration competent satellite cell niches in rat engineered skeletal muscle. *FASEB BioAdvances*. 2019; 1: 731- 746.

Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*. 2013;93(1):23-67.

Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagen T. Engineered Heart Tissue for Regeneration of Diseased Hearts. *Biomaterials* (2004) 25:1639-1647