

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/92476 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/06, 5/08,
5/10, C12Q 1/00, 1/18, G01N 33/50

(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse
6A, 70469 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06072

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Mai 2001 (29.05.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 26 789.0 31. Mai 2000 (31.05.2000) DE
100 62 626.2 15. Dezember 2000 (15.12.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-
nahme von US): **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT
ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Leonrodstrasse 54,
80636 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DIETERICH,
Christoph** [DE/DE]; Gaensgraben 21, 71364 Winnen-
den (DE). **RUPP, Steffen** [DE/DE]; Oberer Bauern-
waldweg 52, 70195 Stuttgart (DE). **NOLL, Michaela**
[DE/DE]; Abraham-Wolf-Strasse 44, 70597 Stuttgart
(DE). **GRAEVE, Thomas** [DE/DE]; Nauheimerstrasse
17, 70372 Stuttgart (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: INFECTION MODEL

(54) Bezeichnung: INFEKTIONSMODELLE

(57) Abstract: The invention relates to agents and methods for analyzing and diagnosing human or animal infections caused by pathogenic and/or parasitic microorganisms, to agents and methods for analyzing and diagnosing degenerate or genetically modified human or animal cells, to agents and methods for examining and testing anti-infectives and medicaments for combating tumors and to three dimensional *in vitro* organ and tissue test models, especially for tissues which are susceptible to infections, such as intestine, skin, cornea, trachea and mucosa tissues.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zur Analyse und Diagnose von durch pathogene und/oder parasitäre Mikroorganismen hervorgerufenen menschlichen oder tierischen Infektionen, Mittel und Verfahren zur Analyse und Diagnose von entarteten oder gentechnisch veränderten menschlichen oder tierischen Zellen sowie Mittel und Verfahren zur Untersuchung und Testung von Antiinfektiva und Arzneimitteln gegen Tumore sowie dreidimensionale *in vitro*-Organ- und Gewebetestmodelle, insbesondere von für Infektionen anfälligen Geweben, wie Darm, Haut, Cornea, Trachea und Schleimhäuten.



WO 01/92476 A2

Infektionsmodelle

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zur Analyse und Diagnose von durch pathogene und/oder parasitäre Mikroorganismen hervorgerufenen Infektionen und/oder Erkrankungen des menschlichen oder tierischen Körpers, Mittel und Verfahren zur Analyse und Diagnose von entarteten menschlichen und tierischen Zellen, Mittel und Verfahren zur Analyse und Diagnose von gentechnisch veränderten menschlichen und tierischen Zellen sowie Mittel und Verfahren zur Untersuchung und Testung von Antiinfektiva und Arzneimitteln gegen Tumore, insbesondere Cytostatika, sowie dreidimensionale tierische in vitro-Organ- und Gewebemodelle, insbesondere von für Infektionen anfälligen Geweben, wie Darm, Haut, Cornea, Trachea und Schleimhäuten.

Makroorganismen, beispielsweise der Mensch, können von einer Vielzahl von Mikroorganismen befallen werden, zu denen sowohl prokaryontische Organismen, wie Bakterien, als auch eukaryontische Organismen, wie Pilze und Protozoen, sowie im weiteren Sinne auch Viren zählen. Für einen betroffenen Makroorganismus kann dies zu sehr unterschiedlichen Konsequenzen führen. Beispielsweise kann eine Infektion durch Mikroorganismen zur Entstehung einer Infektionskrankheit führen. Andere Mikroorganismen führen in oder auf dem Wirtsorganismus eine parasitische Lebensweise, dass heißt, sie leben auf Kosten ihres

Wirtsorganismus, ohne dass dieser jedoch ernsthaft erkrankt. Andererseits ist von einigen Viren, insbesondere onkogenen Viren, bekannt, dass sie in vi-
vo menschliche oder tierische Zellen neoplastisch
5 transformieren können, wobei einige mit der Entstehung entarteter Zellen und der Tumorphogenese in Verbindung gebracht werden.

Die Infektion eines menschlichen oder tierischen Organismus durch einen Mikroorganismus umfasst mehrere Schritte, wie die Übertragung des Mikroorga-
10 nismus auf seinen Wirtsorganismus, das Haftenbleiben (Adhäsion) des Mikroorganismus an Zellen oder Geweben des Wirtsorganismus, das Eindringen des Mikroorganismus (Invasion oder Penetration) in spe-
15 zifische Zellen oder Gewebe des Wirtsorganismus und die Vermehrung des Mikroorganismus darin. Eine Infektion wird von den infektiösen Eigenschaften, beispielsweise der Übertragbarkeit, der Kontagiosität, der Haftfähigkeit, dem Eindringungsvermögen
20 und der Vermehrungsfähigkeit, sowie den pathogenen Eigenschaften des Mikroorganismus bestimmt. Die Entstehung und der Verlauf einer Infektionskrankheit wird aber auch von der Empfänglichkeit und der Immunität des befallenen Wirtsorganismus bestimmt.
25 In Abhängigkeit vom Mikroorganismus, beispielsweise ob es sich um einen prokaryontischen oder einen eukaryontischen Organismus handelt, und in Abhängigkeit vom betroffenen Wirtsorganismus, beispielsweise welche Organe oder Gewebe befallen werden, sind
30 die Mechanismen einer Infektion sehr unterschiedlich.

Auch die Entstehung und der Verlauf einer Tumorerkrankung hängen neben den Eigenschaften des Virus von der Empfänglichkeit und der Immunität des betroffenen Wirtsorganismus ab. So ist bekannt, dass
5 Viren bevorzugt in immuninkompetenten Organismen zur Bildung von Neoplasien führen.

Dementsprechend unterschiedlich wirken auch die Arzneimittel, die zur Bekämpfung entweder von Infektionskrankheiten oder von Tumoren eingesetzt
10 werden. Gegen Infektionskrankheiten eingesetzte Antitumorkomponenten, die im Körper des befallenen Organismus Mikroorganismen schädigen oder abtöten, zielen auf eine Hemmung der Zellwandsynthese des Mikroorganismus, eine Störung der Permeabilität seiner Cytoplasma-
15 toplasmamembran, eine Blockade seiner Proteinsynthese und/oder eine Unterdrückung seiner Nucleinsäuresynthese ab, ohne jedoch den Wirtsorganismus selbst zu schädigen. Bei durch onkogene Viren verursachten Krebsgeschwülsten hingegen kann der eigentliche Verursacher, das onkogene Virus, derzeit
20 nicht gezielt bekämpft werden, sondern die entartete Zelle wird vernichtet oder in ihrem Wachstum gehemmt, beispielsweise unter Verwendung von Cytostatika.

25 Zur Untersuchung der komplexen Wechselwirkungen zwischen einem menschlichen oder tierischen Wirt und einem Mikroorganismus, die zur Entstehung einer Infektionskrankheit führen, ebenso wie zur Analyse der zur Entstehung von entarteten tierischen Zellen
30 führenden komplexen zellulären und/oder viralen Mechanismen sind in der Vergangenheit vorrangig Versuche an Tieren eingesetzt worden. Auch zur Ent-

-4-

wicklung und Testung von Antiinfektiva oder Cytostatika wurden hauptsächlich Versuche an Tieren durchgeführt, beispielsweise im Rahmen vorklinischer Tests. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sich
5 an Tieren gewonnene Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragen lassen.

Mit der Entwicklung der Zellkulturtechniken wurden auch Versuche an zweidimensionalen in vitro-Zellsystemen durchgeführt, um Tierversuche zu ergänzen oder abzulösen. Beispielsweise wurden an
10 solchen Zellsystemen auch Untersuchungen mit dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* durchgeführt, der *Candida*-Mykosen beim Menschen verursacht und bei immunsupprimierten Patienten zu lebensbedrohlichen Infektionen führen kann (Mitchell, Curr. Opin.
15 Microbiol., 1 (1998), 687-692). Unter anderem wurde ein aus einer Zellart aufgebautes, aus einem Zellmonolayer bestehendes Epidermis-Modell zur Untersuchung der Adhäsion und Penetration von *Candida* entwickelt (Korting et al., J. Infect., 36 (1998),
20 259-267; Zink et al., Infect. Immun., 64 (1996), 5085-5091).

Der Nachteil solcher zweidimensionalen in vitro-Zellsysteme besteht jedoch darin, dass keine Aussagen über einen weitergehenden Infektionsmechanismus oder den genauen Ablauf einer Tumorphagenese getroffen werden können. Bedingt durch ihren Aufbau erlauben diese Systeme keine Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Zelltypen, wie dies zum
25 Beispiel in vivo in vollständigen Organen der Fall ist. Außerdem enthalten diese Systeme keine bindegewebsähnliche Matrix, sondern sind auf syntheti-
30

- 5 -

- schen Membranen aufgebaut. Dadurch bedingt, erlauben es diese Systeme beispielsweise im Falle einer Infektionskrankheit nicht, die komplexen Wechselwirkungen zwischen einem Pathogen, den die Organe oder Gewebe aufbauenden Zelltypen und der festen Bindegewebmatrix genauer zu analysieren. Solche Systeme lassen sich daher auch nur in sehr beschränkten Maße zur Entwicklung und Testung von Antiinfektiva und Cytostatika verwenden.
- 10 Das der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende technische Problem besteht also darin, Mittel und Verfahren zur Analyse und Diagnose von durch pathogene oder parasitäre Mikroorganismen bei menschlichen oder tierischen Wirtsorganismen hervorgeru-
- 15 fenen Infektionen, Mittel und Verfahren zur Analyse und Diagnose von entarteten oder gentechnisch veränderten menschlichen oder tierischen Zellen sowie Mittel und Verfahren zur Untersuchung und Testung von Diagnostika und Therapeutika, insbesondere Antiinfektiva und Arzneimittel gegen Tumore, insbe-
- 20 sondere Cytostatika, zu entwickeln, die die vorstehend beschriebenen Nachteile im Stand der Technik überwinden und die sich insbesondere dazu eignen, die zur Entstehung von Infektionen führenden Wechselwirkungen zwischen pathogenen oder parasitären Mikroorganismen und deren Zielorganen oder -geweben und die zur Tumorbildung führenden zellulären und/oder viralen Mechanismen zu untersuchen, und die auf Grund dessen die Entwicklung und Testung
- 25 spezifischer Diagnostika und Therapeutika, wie Antiinfektiva oder Cytostatika, erlauben.
- 30

Die Erfindung löst das ihr zu Grunde liegende technische Problem durch die Bereitstellung von in vitro-Verfahren zur Differenzierung und/oder Vermehrung isolierter tierischer und humaner Zellen, im Verlaufe derer dreidimensionale tierische oder humane in vitro-Organ- oder Gewebemodelle hergestellt werden. Dafür können erfindungsgemäß insbesondere Primärzellen oder andere Zellen aus für Infektionen anfälligen Geweben oder Organen, wie Darm, Haut, Cornea, Trachea oder Schleimhäuten, aber auch zu überprüfende entartete Zellen, insbesondere der vorstehend genannten Organe und Gewebe, oder zu überprüfende gentechnisch veränderte Zellen, insbesondere der vorstehend genannten Organe und Gewebe, eingesetzt werden. Darauf aufbauend und die vorgenannten Verfahren nutzend stellt die vorliegende Erfindung in vitro-Verfahren zur Cokultivierung der differenzierten und/oder vermehrten Zellen mit pathogenen oder parasitären Mikroorganismen und in vitro-Verfahren zur Untersuchung der Wechselwirkung von Substanzen mit den in vitro kokultivierten differenzierten und/oder vermehrten Zellen und Mikroorganismen bereit. Diese Verfahren erlauben die Analyse von Infektionsabläufen sowie die Bereitstellung von im Bereich der Infektionsmedizin nützlichen Diagnostika und Therapeutika.

Die mit den erfindungsgemäßen Organ-Testsystemen erzielten Ergebnissen können aussagekräftiger als die mit Tierversuchen ermittelten Ergebnisse sein und eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleisten.

- 7 -

Die vorstehend beschriebenen Zellen werden erfindungsgemäß in einer dreidimensionalen, gelartigen, bindegewebsähnlichen Biomatrix kultiviert und können sich dort vermehren. Diese Biomatrix enthält
5 neben den zu kultivierenden Zellen ein aus einer Kollagenlösung konstituiertes Gerüst aus Kollagen, also gewebetypische Matrixproteine. Je nach gewünschtem Gewebetyp können andere Zelltypen, vorzugsweise andere Primärzellen, auf diesem zellhaltigen Kollagengel ausgebracht werden. Unter Verwendung spezifischer Kulturbedingungen und spezifischer Kulturmedien können die in der Biomatrix enthaltenen Zellen und die auf die Biomatrix aufgebracht
10 anderen Zelltypen eine Differenzierung zu einem mehrschichtigen dreidimensionalen tierischen Gewebe- oder Organtestmodell durchlaufen.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Verfahren werden somit dreidimensionale tierische oder humane Gewebe- oder Organtestmodelle erhalten, die aus mehreren gewebetypischen Zellschichten bestehen und sowohl histologisch als auch funktionell weitgehend den nativen Organen oder Geweben entsprechen. Diese Organ-oder Gewebetestmodelle sind daher wesentlich besser zur naturgetreuen Modellierung von Infektionsverläufen bei Tieren und beim Menschen geeignet
20 als die nur aus einer Zellart aufgebauten üblichen in vitro-Systeme und können somit zur gezielten Analyse der Infektions- und Resistenzmechanismen von Bakterien, Pilzen, Viren und Protozoen verwendet
25 werden. So können erfindungsgemäß die erfindungsgemäßen in vitro-Organ- oder Gewebetestmodelle mit einem parasitären oder pathogenen Mikroorganismus beimpft und mit diesem gemeinsam unter geeigneten
30

Bedingungen kultiviert werden. Durch Verwendung unterschiedlicher Primärzellen aus verschiedenen Organen zum Aufbau der tierischen in vitro-Organ- oder Gewebetestsyste-
5 Verhalten eines Erregers an verschiedenen Gewebesystemen studieren.

Die erfindungsgemäße Cokultivierung des erfindungsgemäßen tierischen in vitro-Gewebe- oder Organtestsystems mit einem parasitären oder pathogenen Mikroorganismus bietet die Möglichkeit, sowohl den Infektionsprozess selbst als auch die Abwehrreaktion der entsprechenden organoiden Zellsystemen zu studieren. Beispielsweise können größere Mengen eines infizierten Zellmaterials und des Pathogens selbst
10 gewonnen werden. Das gewonnene Material kann dann mit herkömmlichen histologischen, biochemischen, molekularbiologischen oder immunologischen Verfahren weiter analysiert werden, um beispielsweise morphologische Änderungen infizierter Zellen, die
15 Ausschüttung spezifischer Stoffe durch das Pathogen, wie Toxine oder für auftretende Resistenzen relevante Proteine, oder die Ausschüttung spezifischer Stoffe durch befallene Zellen, wie Interleukine, als Abwehrreaktion genauer zu studieren oder
20 um Transkriptions- und/oder Expressionsprofile zu erstellen, auf deren Basis sich beispielsweise Virulenzfaktoren als Targets für die Entwicklung von Antiinfektiva identifizieren lassen.

Die vorstehend genannte erfindungsgemäße Verfahrensweise erlaubt in bevorzugter Weise das Screenen
30 und die Analyse von potentiellen Diagnostika, mit deren Hilfe zum Beispiel das Vorhandensein bestimm-

ter Symptome einer Infektion nachgewiesen werden kann. Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Identifizierung von Diagnostika oder der Analyse deren Spezifität, wobei im Rahmen der erfindungsgemäß vorgesehenen Cokultivierung der erfindungsgemäßen ein- oder mehrschichtigen in vitro Gewebe- oder Organtestsysteme mit infektiösen Agenzien ein potentiell oder zu testendes Diagnostikum auf seine Fähigkeit, Infektionen oder Infektionsprozesse zu erkennen, getestet wird. Im Rahmen dieser Verfahren können die zu testenden Diagnostika dem erfindungsgemäßen System hinzugegeben werden, wobei anhand morphologischer, physiologischer oder sonstiger Parameter festgestellt werden kann, inwieweit eine Korrelation zwischen dem Infektionszustand und der Markierung beziehungsweise dem Nachweis durch das Diagnostikum vorliegt.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen tierischen und menschlichen in vitro-Gewebe- oder Organtestsysteme und des erfindungsgemäßen Cokultivierungsverfahrens können insbesondere die Wirksamkeit beziehungsweise der Wirkmechanismus und/oder die Nebenwirkungen von Therapeutika, wie Antiinfektiva, wesentlich genauer analysiert werden als bei herkömmlichen Testsystemen, beispielsweise anhand ihrer Wirkungen auf die Genexpression, den Stoffwechsel, die Proliferation, die Differenzierung und die Reorganisation der Zellen eines in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems. Diese Tests von Wirkstoffen, Therapeutika und Diagnostika ebenso wie von Interaktionen zwischen infektiösem Agens und kultivierten Zellen an den erfindungsgemäßen tierischen oder menschlichen in vitro-Gewebetestsystemen können sowohl herkömmliche

- 10 -

morphologische oder histologische Verfahren als auch herkömmliche biochemische, toxikologische, immunologische und/oder molekularbiologische Verfahren umfassen.

- 5 Erfindungsgemäß können die erfindungsgemäßen Verfahren und die in ihnen eingesetzten Mittel, also die ein- und mehrschichtigen in vitro Gewebe- oder Organsysteme zum Screenen von potentiellen Wirkstoffen und zum Untersuchen der Eigenschaften wie
10 Spezifitäten sowie von Interaktionen von Wirkstoffen mit Zielzellen eingesetzt werden. Erfindungsgemäß wird unter dem Begriff Wirkstoff jedweder Stoff, aber auch andere Agenzien, unter anderem auch physikalische Einflussgrößen wie elektromagnetische Strahlen, Radioaktivität, Wärme, Schall oder
15 ähnliches verstanden, welche biologische Zellen oder Teile davon, insbesondere Zellorganellen, beeinflussen oder erkennen können. Derartige Wirkstoffe können insbesondere chemischer Natur sein, zum Beispiel Diagnostika oder Therapeutika. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter Diagnostika jedwede Stoffe verstanden, die spezifisch das Vorhandensein von Zuständen, Prozessen oder Substanzen beziehungsweise deren Abwesenheit erkennen können und insbesondere Rückschlüsse auf Krankheitszustände geben können. Diagnostika weisen häufig erkennende und markierende Funktionen auf. Unter dem Begriff Therapeutika werden insbesondere solche Stoffe verstanden, die entweder prophylaktisch oder krankheitsbegleitend eingesetzt
20 werden können, um Krankheitszustände zu vermeiden, zu lindern oder zu beseitigen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter Krankheiten
- 25
30

- 11 -

auch Zustände wie unnatürliche Gemütszustände, Schwangerschaften, Alterserscheinungen, Entwicklungsstörungen oder ähnliches verstanden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter
5 Therapeutika auch solche Stoffe verstanden, die ausschließlich oder auch kosmetische Wirkungen aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Verfahren eignen sich auch zur Untersuchung der Mechanismen der Tumorphathogenese und/oder zur Untersuchung von Substanzen auf
10 ihre Eignung als Medikament, zum Beispiel gegen einen spezifischen Tumor. Beispielsweise lässt sich ein aus entarteten Zellen, insbesondere der vorstehend genannten Organe oder Gewebe, aufgebautes in
15 vitro-Organ- oder Gewebetestsystem zur Gewinnung größerer Mengen eines entarteten Zellmaterials verwenden. Das gewonnene Material kann dann mit herkömmlichen Verfahren, beispielsweise histologischen, biochemischen, molekularbiologischen oder
20 immunologischen Verfahren, weiter analysiert werden, um beispielsweise morphologische Änderungen entarteter Zellen oder die Ausschüttung spezifischer Stoffe genauer zu untersuchen oder um Transkriptions- und/oder Expressionsprofile zu
25 erstellen. Ebenso kann an einem aus entarteten Zellen aufgebauten in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem die Wirkung von Arzneimitteln oder anderen Substanzen im Hinblick auf deren Fähigkeit zur Hemmung der Zellteilung studiert werden. Andererseits kann
30 ein aus nicht-entarteten Primärzellen aufgebautes in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem mit onkogenen Viren kokultiviert werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann dann zum Beispiel die Vermehrung und/oder

- 12 -

Verbreitung onkogener Viren in den Zellen des in-vitro-Testsystems in An- und Abwesenheit spezifischer Substanzen, die spezifische Funktionen des Virus hemmen können, untersucht werden.

- 5 Die erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich darüber hinaus auch zur Überprüfung gentechnisch veränderter Zellen, insbesondere der vorstehend genannten Gewebe und Organe, verwenden. Beispielsweise können Zellen getestet werden, die im Hinblick auf eine
- 10 Gentherapie zur Ausschaltung genbedingter Fehlfunktionen beziehungsweise Wiederherstellung normaler Genfunktionen bei Erkrankungen der vorstehend genannten Organe gentechnisch modifiziert wurden.

- Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung um-
- 15 fasst die Kultivierung tierischer oder humaner Zellen in einer dreidimensionalen gelartigen Biomatrix zur Vermehrung dieser Zellen und zur Herstellung eines dreidimensionalen tierischen oder humanen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems.

- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Erfindung die Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten in der Biomatrix zur Herstellung eines aus Dermisäquivalent und Epidermisäquivalent bestehenden dreidimensionalen humanen in vitro-
- 25 Hautäquivalentes.

- Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff "Kultivieren von Zellen" ein, vorzugsweise in vitro stattfindendes, Aufrechterhalten der Lebensfunktionen von Zellen, beispielsweise Fibroblasten, in einer geeigneten Umgebung,
- 30

beispielsweise unter Zu- und Abfuhr von Stoffwech-
seledukten und -produkten, insbesondere auch eine
Vermehrung der Zellen. Im Zusammenhang mit der vor-
liegenden Erfindung werden unter dermalen
5 Fibroblasten natürlicherweise vorkommende, insbe-
sondere in der Dermis vorkommende Fibroblasten oder
gentechnisch veränderte Fibroblasten oder deren
Vorläufer verstanden. Fibroblasten stellen die Vor-
läufer dermalen Fibrocyten dar. Die Fibroblasten
10 können tierischer oder menschlicher Herkunft sein.

Die zur Kultivierung der Fibroblasten vorgesehene
Biomatrix enthält die zu kultivierenden
Fibroblasten und ein aus einer, vorzugsweise fri-
schen, Kollagenlösung neu konstituiertes Kollagen-
15 gerüst einer Konzentration von vorzugsweise 3,5 bis
4,5 mg Kollagen pro ml Biomatrix. Das Kollagenge-
rüst wird aus einer, vorzugsweise zellfreien, sau-
ren Lösung von Kollagen I, gewonnen, wobei die Pro-
teinkonzentration der Kollagenlösung vorzugsweise 5
20 bis 7 mg/ml beträgt. Der pH-Wert der Kollagenlösung
beträgt vorzugsweise 3,8. Zur Herstellung der er-
findungsgemäßen Fibroblasten-haltigen Biomatrix
wird die Kollagenlösung vorzugsweise bei 4°C mit
einer Lösung, enthaltend ein, vorzugsweise fünffach
25 konzentriertes, Zellkulturmedium, Puffer, vorzugs-
weise Hepes-Puffer, Serum, vorzugsweise fötales
Kälberserum (FCS), und Chondroitin-(4/6)-sulfat,
und vorzugsweise $1,5 \times 10^5$ /ml Fibroblasten, insbe-
sondere vorkultivierten Fibroblasten, versetzt und
30 gut gemischt. Dieses Gemisch wird durch Erhöhung
der Temperatur auf Raumtemperatur oder 37°C geliert.
Nach dem Gelieren der Gele wird Fibronectin auf die
Gele gegeben. Die Funktion von Fibronectin in vivo

- 14 -

besteht in der Bindung an andere Makromoleküle, beispielsweise Kollagen, und in der Anheftung von Zellen an Nachbarzellen. Die anschließende Kultivierung der Fibroblasten im Kollagengel erfolgt vorzugsweise in Submers-Kultur. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „Submers-Kultur“ ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen verstanden, wobei die Zellen mit einer Nährlösung bedeckt sind. Die Fibroblasten enthaltende Biomatrix wird also mit Zellkulturmedium überschichtet und bei 37°C inkubiert.

Ein bis drei Tage, vorzugsweise zwei Tage, nach der vorstehend beschriebenen Inkubation der Gele werden Keratinocyten auf das Gel ausgesät. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Keratinocyten“ Zellen der Epidermis, die verhornendes Plattenepithel bilden, oder gentechnisch veränderte Keratinocyten oder deren Vorläufer verstanden, die tierischer oder menschlicher Herkunft sein können. Bei den auf das Kollagengel ausgesäten Keratinocyten handelt es sich vorzugsweise um möglichst vor-kultivierte, undifferenzierte Keratinocyten-Stammzellen aus humanem Biopsiegewebe, das heisst Cytokeratin 19- beziehungsweise Integrin β 1-positive basale Stammzellen. Die Aussaat der Keratinocyten auf die Biomatrix erfolgt in einem Zellkulturmedium, vorzugsweise in KBM-Medium (Clonetics), das 5% fötales Kälberserum enthält. Anschließend wird die Biomatrix mit KBM-Medium, enthaltend humanen epidermalen Wachstumsfaktor (0,1 μ g/500 ml Medium) (hEGF), BPE (Rinderhypophysenextrakt) (15 mg Protein/500 ml Medium) und 0,8 mM CaCl_2 , überschichtet und einer 1 - bis 3-tägigen

Submers-Kultivierung unterworfen. Eine vollständige Differenzierung der Keratinocytschichten wird durch eine Airlift-Kultur mit 1,8 mM CaCl_2 enthaltendem KBM-Medium ohne hEGF und BPE erreicht. Im

5 Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „Airlift-Kultur“ eine Kultur verstanden, wobei die Höhe des Nährmedienspiegels genau auf die Höhe der Biomatrix abgestimmt ist, während die Keratinocyten oder die durch die Keratinocyten

10 gebildeten Zellschichten über dem Nährmedienspiegel liegen und vom Nährmedium nicht bedeckt werden, das heisst die Kultivierung erfolgt an der Grenzschicht Luft-Nährmedium, wobei die Kulturen von unten mit Nährstoffen versorgt werden. Nach einer, vorzugs-

15 weise 12- bis 14-tägigen Airlift-Kultur entwickelt sich ein hauttypisches, aus Dermisäquivalent und Epidermisäquivalent bestehendes in vitro-Vollhautmodell, welches für die erfindungsgemäßen Testverfahren vorteilhaft eingesetzt werden kann.

20 Die Erfindung betrifft daher auch ein hauttypisches in vitro-Vollhauttestmodell, insbesondere tierisches oder humanes in vitro-Vollhauttestmodell, das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde und das mindestens 2 bis 4 proliferative, ei-

25 nige differenzierende und mindestens 4 bis 5 verhornte Zellschichten umfasst, wobei das Epidermisäquivalent Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum umfasst und wobei zwischen dem Dermisäquivalent und dem Epider-

30 misäquivalent eine funktionsfähige Basalmembran aus Matrixproteinen enthalten ist. Dieses Modell eignet sich ausgezeichnet als Testsystem für die Untersuchung von potentiellen oder tatsächlichen Wirkstoff-

fen, wie Therapeutika, Diagnostika oder für Untersuchungen zum Ablauf von Infektionsprozessen.

Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst die Kultivierung von Darmfibroblasten in der Biomatrix zur Herstellung eines
5 aus bevorzugt Caco2-Zellen oder auch Darmepithelzellen oder anderer humaner Zelllinien bestehenden dreidimensionalen humanen in vitro-Darmtestsystems.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter Darmfibroblasten natürlicherweise vorkom-
10 mende, insbesondere im Darmgewebe vorkommende Fibroblasten oder gentechnisch veränderte Fibroblasten oder deren Vorläufer verstanden. Die Darmfibroblasten können tierischer oder menschlicher
15 Herkunft sein.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter Darmepithelzellen natürlicherweise vorkommende, insbesondere im Darmgewebe vorkommende Epithelzellen oder gentechnisch veränderte Epithel-
20 zellen oder deren Vorläufer verstanden. Die Darmepithelzellen können tierischer oder menschlicher Herkunft sein.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Darmfibroblasten-haltigen Biomatrix wird die Kollagenlösung im Volumenverhältnis 1:1, vorzugsweise bei
25 4°C, mit einer auch als Gellösung bezeichneten Lösung, enthaltend ein, vorzugsweise 2-fach konzentriertes, Zellkulturmedium, Puffer, vorzugsweise HEPES-Puffer, und Serum, vorzugsweise 10 %iges Serum,
30 und vorzugsweise $1,5 \times 10^5$ /ml Darmfibroblasten,

- 17 -

insbesondere vorkultivierten Darmfibroblasten, versetzt und gut gemischt. Liegt eine x-fach konzentrierte Gellösung vor, wird vorzugsweise die Kollagenlösung im Volumenverhältnis (x-1):1 mit der Gellösung gemischt, wobei x der Konzentrationsfaktor ist. Dieses Gemisch wird durch Erhöhung der Temperatur auf Raumtemperatur oder 37° geliert. Die anschließende Kultivierung der Darmfibroblasten im Kollagengel erfolgt vorzugsweise in Submers-Kultur. Die Fibroblasten enthaltende Biomatrix wird bei 37°C inkubiert.

Vorzugsweise 1 bis 3 Tage nach der Inkubation der Gele werden Darmepithelzellen auf das Gel ausgesät.

Bei den auf das Kollagengel ausgesäten Darmepithelzellen handelt es sich vorzugsweise um möglichst vorkultivierte, undifferenzierte Darmepithelzellen. Die Aussaat der Darmepithelzellen auf die Biomatrix erfolgt in einem Zellkulturmedium, vorzugsweise in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, Cat. Nr. 41966 oder 52100), das 10 % FCS und Glutamin (2 mM) und 1 % nichtessentielle Aminosäuren (MEM, Life Technologies, Cat. Nr. 11140) enthält. Anschließend wird die Biomatrix mit DMEM-Medium, enthaltend 10 % FCS und Glutamin (2 mM) und 1 % nichtessentielle Aminosäuren, überschichtet und einer 10 bis 20-tägigen Submers-Kultivierung unterworfen, bis zu einer vollständigen Differenzierung der Epithelschicht oder Epithelschichten, die für die erfindungsgemäßen Testverfahren vorteilhaft eingesetzt werden kann/können.

Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung umfasst die Cokultivierung eines erfindungsgemäß hergestellten dreidimensionalen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems mit einem pathogenen oder parasitären Mikroorganismus. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „pathogenen oder parasitären Mikroorganismen“, hier auch als infektiöse Agenzien bezeichnet, sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze, Protozoen, Vi-
10 roide, aber auch Prionen oder Viren, verstanden, die einen Makroorganismus, insbesondere einen menschlichen oder tierischen Organismus, befallen und in oder auf Geweben dieses Organismus leben und zu einer Infektion dieses Organismus führen können,
15 jedoch nicht notwendigerweise dazu führen müssen. Im Zusammenhang mit der Erfindung bedeutet der Begriff "Cokultivierung" ein, vorzugsweise in vitro stattfindendes, gleichzeitiges Aufrechterhalten der Lebensfunktionen von tierischen Zellen und Mikroor-
20 ganismen in der gleichen, für beide geeigneten Umgebung, beispielsweise unter Zu- und Abfuhr von Stoffwechseledukten und -produkten, insbesondere auch eine gleichzeitige Vermehrung der Zellen und
25 der Mikroorganismen.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt eine Cokultivierung des humanpathogenen Pilz *Candida albicans* mit dem erfindungsgemäß hergestellten humanen in vitro-Hauttestsystem, um den Infektionsprozess von *Candida* an menschlichem Hautgewebe zu un-
30 tersuchen, und mit dem erfindungsgemäß hergestellten humanen in vitro-Darmtestsystem, um den Infektionsprozess von *Candida* an menschlichem Darmgewebe

- 19 -

zu untersuchen. Die mit *Candida* erzielten Ergebnisse, insbesondere die detaillierte Beschreibung des Infektionsprozesses kann auch auf andere Pathogene übertragen werden.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform be-
trifft die vorliegende Erfindung die Cokultivie-
rung des humanpathogenen Mikroorganismus *Candida*
albicans mit dem humanen in vitro-Hauttestsystem
beziehungsweise dem humanen in vitro-
10 Darmtestsystem, um die erste Stufe des Infektions-
prozesses, nämlich die Adhäsion des Pathogens an
Haut- beziehungsweise Darmzellen, zu untersuchen.
Die Adhäsion des Pathogens wird unter Verwendung
des virulenten *Candida*-Stamms Sc5314 und des aviru-
15 lenten *Candida*-Stamms Can34 untersucht, welche be-
reits in einem Maus-Makrophagen-Modell untersucht
wurden (Lo et al., Cell, 90 (1997), 939-949). Das
in vitro-Hauttestsystem beziehungsweise das in
vitro-Darmtestsystem wird in Submers-Kultur mit je-
20 weils etwa 10^3 pathogenen Organismen inokuliert und
unter Schütteln kultiviert. Zu definierten Zeit-
punkten, beispielsweise alle 30 Minuten (bis maxi-
mal 4 Stunden) werden Aliquots entnommen und auf
Petrischalen mit den entsprechenden Nährböden, zum
25 Beispiel YPD-Vollmedium (Difco) ausplattiert. Nach
entsprechender Inkubationszeit wird die Anzahl der
Kolonien auf den Petrischalen ermittelt. Aufgrund
des Vergleichs zwischen der ermittelten Kolonien-
zahl und der ursprünglich inokulierten Zahl der Pa-
30 thogene läßt sich die Adhäsion der Pathogene an den
in vitro-Organ-testsystemen bestimmen. Mit Hilfe
dieses Verfahrens konnte so gezeigt werden, dass
der virulente Stamm die Fähigkeit zur Adhäsion so-

- 20 -

wohl an Haut- als auch an Darmzellen besitzt, während bei dem avirulenten Stamm nur eine geringfügige Adhäsion nachgewiesen werden konnte.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegenden Erfindung die Cokultivierung des humanpathogenen Mikroorganismus *Candida albicans* mit dem erfindungsgemäß hergestellten humanen in vitro-Hauttestsystem beziehungsweise mit dem erfindungsgemäß hergestellten humanen in vitro-Darmtestsystem, um eine weitere Stufe des Infektionsprozesses, nämlich die Penetration/Invasion des Pathogens in Zellen, zu untersuchen. Dazu werden die organoiden Gewebetestsysteme im Airlift-Verfahren mit den vorstehend beschriebenen avirulenten und virulenten Pathogen-Stämmen cokultiviert. Das Pathogen wird bevorzugt bei einer Zellzahl von $10^3/\text{ml}$ in 1 %-igem Agar fixiert und Agarstücke mit einem Durchmesser von 4 mm werden auf die organoiden Gewebetestsysteme für maximal 98 Stunden aufgelegt. Das Eindringen des Pathogens in die organoiden Strukturen wird nach 16 Stunden, 24 Stunden, 72 Stunden, 86 Stunden und 98 Stunden mittels histologischer Verfahren an Dünnschnitten untersucht, wobei das Färbeverfahren PAS (Mc Manaus, Romeis, 17. Auflage, Seite 393) verwendet wird. Anhand der histologischen Schnitte kann so der Invasionsprozess des virulenten *Candida*-Stammes bis in tiefere Schichten der bindegewebsähnlichen Matrix dokumentiert werden.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, unter Verwendung eines erfindungsgemäß hergestellten in vitro-Organ- oder

Gewebetestsystems und des erfindungsgemäßen Cokultivierungsverfahrens die Wirkung chemischer Substanzen, insbesondere von Antiinfektiva, oder von Agenzien auf den Infektionsprozess beziehungsweise das Wachstum eines pathogenen Mikroorganismus zu untersuchen. Im Zusammenhang mit der Erfindung soll der Begriff „Agens“ insbesondere chemische, biologische oder physikalische Mittel, wie Licht oder Wärme, umfassen, die eine potentielle Wirkung auf lebende Zellen ausüben können. Die Untersuchungen zur Wirkung von Antiinfektiva wurden ebenfalls mit *Candida* durchgeführt. Zur Zeit existieren zwei Substanzklassen, nämlich Azole und Polyene, die bevorzugt als Antimykotika gegen systemische Infektionen eingesetzt werden. Beide Substanzklassen sind mit Nachteilen behaftet. Die Polyene weisen starke Nebenwirkungen auf und gegen Azole entwickeln sich mehr und mehr Resistenzen (DiDomenico, Curr. Opin. Microbiol., 2 (1999), 509-515; Georgopapadakou, Curr. Opin. Microbiol., 1 (1999), 547-557. Aus diesem Grund ist die gezielte Entwicklung neuer Antimykotika dringend erforderlich.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren zur Untersuchung der Adhäsion von *Candida* an dem erfindungsgemäßen in vitro-Darmtestsystem und dem erfindungsgemäßen in vitro-Hauttestsystem dahingehend modifiziert, dass der Cokultivierungsansatz ein Antimykotikum enthält, insbesondere Amphotericin B oder Fluconazol. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte so gezeigt werden, dass beide Antimykotika keinen Einfluß auf die Adhäsion des Pathogens, sondern auf dessen Wachstumsraten, hatten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren zur Untersuchung der Penetration/Invasion von *Candida* an dem in vitro-Darmtestsystem und dem in vitro-Hauttestsystem dahingehend modifiziert, dass der Cokultivierungs-Ansatz Amphotericin B oder Fluconazol enthält. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte so gezeigt werden, dass die Invasion des virulenten Pathogenstammes erst durch eine vollständige Wachstumshemmung unterbunden werden konnte, wobei erfindungsgemäß auch neue Wirkstoffe getestet wurden.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst die Analyse entarteter Zellen. Im Zusammenhang mit der Erfindung umfasst der Begriff „entartet“ alle Veränderungen einer normalen Zelle, beispielsweise Zellpolymorphie, Anisozytose, Kernpolymorphie, Polychromasie, gestörte Kern-Plasma-relation und Aneuploidie, die zu einer gestörten Differenzierung oder zu einer Entdifferenzierung und zu einem deregulierten Wachstum der Zelle führen können, und betrifft insbesondere Zellen maligner Tumore. Aus entarteten Zellen, insbesondere der vorstehend genannten Organe oder Gewebe, wird ein in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem aufgebaut, um größere Mengen des entarteten Zellmaterials zu gewinnen. Das gewonnene Material wird mit herkömmlichen Verfahren, beispielsweise histologischen, biochemischen, molekularbiologischen oder immunologischen Verfahren, weiter analysiert, um die Ausschüttung spezifischer Stoffe zu untersuchen und Transkriptions- und Expressionsprofile zu erstellen. An dem aus entarteten Zellen aufgebauten in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem wird die Wirkung

von Arzneimitteln und von potentiell als Arzneimittel geeigneten Substanzen, insbesondere im Hinblick auf deren Fähigkeit zur Hemmung der Zellteilung, untersucht.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden patientenspezifische entartete Zellen zur Etablierung eines in vitro-
10 Organtestsystems verwendet, um Therapiemöglichkeiten für die spezielle Tumorerkrankung des Patienten zu untersuchen.

- In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist die Überprüfung gentechnisch veränderter Zellen, insbesondere der vorstehend genannten Gewebe und Organe, vorgesehen. Im Zusammenhang mit
15 der vorliegenden Erfindung umfasst der Begriff „gentechnisch veränderte Zellen“ alle Zellen, die mit Hilfe gentechnischer Verfahren manipuliert wurden, wobei entweder Fremd-DNA in die Zelle eingeschleust wurde oder die eigene DNA, beispielsweise
20 durch Deletionen, Inversionen und Anlagerungen, modifiziert wurde. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, im Hinblick auf eine Gentherapie patientenspezifischer Krankheiten gentechnisch veränderte Zellen in vitro zu testen,
25 insbesondere auf deren Funktionalität, wobei ein in vitro-Organotestsystem unter Verwendung solcher gentechnisch veränderter Zellen etabliert wird.

- Die Erfindung betrifft auch eine, vorzugsweise gelartige, Biomatrix, in der die vorgenannten Kultivierungsverfahren durchgeführt werden können, und
30 zwar eine Biomatrix mit Zellen eines Gewebetyps.

Die erfindungsgemäß vorgesehene Kombination aus Biomatrix und darin kultivierten Zellen kann, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung eines in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems verwendet werden.

Unter einer Biomatrix wird eine Gelstruktur verstanden, die Kollagen, Zellkulturmedium, Serum und Puffer, beispielsweise Hepes-Puffer, enthält. Die Kollagenlösung, die für die Herstellung der Biomatrix verwendet wird, ist eine Lösung, die einen hohen Anteil an nicht denaturiertem, nativem Kollagen in saurem, wässrigem Medium enthält, vorzugsweise mit einem pH-Wert von 3,8, beispielsweise in Essigsäure, bevorzugt in 0,1 %iger Essigsäurelösung. Ein hoher Anteil von nicht denaturiertem Kollagen bedeutet einen Anteil am Gesamtkollagen in Lösung von $\geq 50\%$, insbesondere $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ oder $\geq 95\%$, vorzugsweise $\geq 99\%$. In einer bevorzugten Ausführungsform wird dabei kein lyophilisiertes Kollagen verwendet. Der Kollagengehalt der Lösung beträgt vorteilhafterweise 3 mg Kollagen pro ml Lösung bis 8 mg Kollagen pro ml Lösung, bevorzugter 5 mg Kollagen pro ml Lösung bis 7 mg Kollagen pro ml Lösung, am bevorzugtesten 6 mg Kollagen pro ml Lösung. Vorzugsweise wird dabei Kollagen verwendet, das nach Isolierung, beispielsweise aus Rattenschwänzen, in 0,1 %iger Essigsäure drei bis vierzehn Tage bei 4°C unter Rühren inkubiert wurde und wobei nicht gelöste Kollagenanteile abzentrifugiert wurden. Bevorzugte Zellkulturmedien sind DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und M199. Jedoch kann auch jedes andere beliebige Zellkulturmedium verwendet werden, welches die Kultivierung von Zel-

- 25 -

len ermöglicht. Als Serum wird vorzugsweise fötales Kälberserum (FCS) oder humanes antologes Serum verwendet und als Puffer zum Beispiel Hepes-Puffer. Der pH-Wert der Lösung aus Zellkulturmedium, Puffer
5 und Serum beträgt in bevorzugter Ausführung 7,5 bis 8,5, beispielsweise 7,6 bis 8,2, insbesondere 7,8. Selbstverständlich kann die Biomatrix weitere Faktoren, beispielsweise Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmittel, Antibiotika, Selektionsmittel und ähnliche
10 enthalten.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer Zellen enthaltenden Biomatrix, wobei in einem ersten Schritt frisches Kollagen, beispielsweise aus Rattenschwänzen, hergestellt
15 wird, indem aus kollagenhaltigem Gewebe isolierte Kollagenfasern in Pufferlösung gesammelt, in Alkohol oberflächlich desinfiziert und anschließend in Pufferlösung gewaschen und anschließend in eine saure Lösung eines pH-Wertes von 0,1 bis 6,9, vorzugsweise 2,0 bis 5,0, besonders bevorzugt 3,0 bis
20 4,0, insbesondere 3,3, zum Beispiel eine 0,1 %ige Essigsäurelösung, überführt werden. Anschließend wird in einem weiteren Schritt das in der Lösung befindliche Kollagen bei 2 bis 10°C, insbesondere
25 4°C, für einige Tage, zum Beispiel 3 bis 14 Tage, gerührt, die nicht gelösten Kollagenanteile werden abzentrifugiert und eine Kollagenlösung mit einem Kollagengehalt von 3 mg/ml bis 8 mg/ml bei 2 bis 10°C, zum Beispiel 4°C, aufbewahrt. Selbstverständlich
30 lich ist es möglich, die Lösung in gefrorenem Zustand zwischenzulagern, zum Beispiel bei -10°C bis -80°C, insbesondere -20°C. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zellen enthaltenden Biomatrix wird

- 26 -

in einem dritten Schritt eine auch als Gellösung bezeichnete Lösung aus, vorzugsweise mehrfach (x-fach) konzentriertem, Zellkulturmedium, Serum und Puffer mit vorkultivierten und abzentrifugierten Zellen gemischt, wobei vorzugsweise 1×10^5 bis 2×10^5 Zellen pro ml, bevorzugt $1,5 \times 10^5$ Zellen pro ml, verwendet werden. Diese Lösung beziehungsweise Suspension eines pH-Wertes von 7,5 bis 8,5, bevorzugt 7,6 bis 8,2, insbesondere 7,8, wird anschließend, beispielsweise im Verhältnis 1:2, mit der vorgenannten Kollagenlösung bei 2 bis 10°C , insbesondere 4°C , gemischt. Das Mischungsverhältnis (Volumen) von Kollagenlösung zu Gellösung (Puffer, Serum, Zellen, Kulturmedium) beträgt vorzugsweise 1:1, wobei bei x-fach konzentrierter Gellösung ein Volumenverhältnis von $(x-1):1$ Kollagenlösung zu Gellösung bevorzugt wird. Anschließend wird die Gellösung in Kulturgefäße pipettiert und nach Gelieren bei 37°C mit Medium überschichtet. Sodann wird die Biomatrix mindestens 2 Tage kultiviert und anschließend können Zellen anderer Gewebetypen zum Beispiel auch Immunsystemzellen darauf ausgebracht werden.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert.

Figur 1 zeigt einen Längsschnitt des erfindungsgemäß hergestellten in vitro-Darmsystems.

- 27 -

Figur 2 zeigt einen Längsschnitt des erfindungsge-
mäß hergestellten in vitro-Darmsystems mit anhaf-
tenden Zellen des Pilzes *Candida albicans* (Adhäsion
eines virulenten Stammes).

- 5 Figur 3 zeigt einen Längsschnitt des erfindungsge-
mäß hergestellten in vitro-Darmsystems mit penet-
rierten Zellen des Pilzes *Candida albicans* (Invasi-
on eines virulenten Stammes).

- 10 Beispiel 1:

**Herstellung eines dreidimensionalen humanen in
vitro-Hauttestsystems**

Herstellung einer Gellösung

- 20 Teile fünffach konzentriertes M 199-Zellkultur-
15 medium (Life Technologies, 1999, Kat.Nr. 42966 oder
52100; DMEM), 10 Teile HEPES-Puffer (4,76 g in 100
ml PBS-Lösung, pH-Wert 7,3) und 1 Teil Chondroitin-
(4,6)-sulfat (5 mg/ml in PBS) werden gemischt und
der pH-Wert des Gemisches wird auf 7,8 eingestellt.
20 Das Gemisch wird sterilfiltriert und anschließend
mit 10 Teilen fötalem Kälberserum versetzt.

Herstellung einer Kollagenlösung

- Zur Herstellung einer Kollagenlösung wird kollagen-
haltiges Gewebe, wie zum Beispiel Sehnen aus Rat-
25 tenschwänzen, verwendet. Alle Arbeiten werden unter
sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien
durchgeführt. Die Rattenschwänze werden nach Lage-

- 28 -

5 rung bei -20°C mit 70%-igem Alkohol oberflächlich
desinfiziert. Die Haut der Rattenschwänze wird ab-
gezogen und die einzelnen Kollagenfasern werden he-
rausgezogen. Bei Verwendung anderer Ausgangsgewebe
10 können gegebenenfalls vorhandene Zellen schonend
durch mechanische, enzymatische oder chemische Be-
handlung entfernt werden. Die Kollagenfasern werden
in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (pH
7,2) gesammelt, in 70%-igem Alkohol 10 min ober-
15 flächlich desinfiziert und anschließend gründlich
mit PBS gewaschen. Das Gewicht der Fasern wird be-
stimmt und die Fasern werden in eine 0,1%-ige Es-
sigsäurelösung überführt (Endkonzentration etwa 8
bis 12 mg/ml). Dieser Ansatz wird etwa 3 bis 14 Ta-
ge bei 4°C gerührt und anschließend werden die
nicht gelösten Kollagenteile mittels Zentrifugation
(1000 Upm, 1 Stund, 8°C) entfernt. Dadurch liegt
das Kollagen in Lösung und nicht in Faser-, Gerüst-
oder Matrixform vor.

20 Herstellung der dermale Fibroblasten enthaltenden
Kollagengele (Ansatz für 24 Inserts)

16 ml Kollagenlösung werden in ein 50 ml-
Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis gestellt.
Vorkultivierte dermale Fibroblasten werden geernet
25 und ausgezählt. $1,2 \times 10^6$ Fibroblasten werden in 8
ml eiskalte Gellösung aufgenommen, gut suspendiert
und luftblasenfrei in die Kollagenlösung gegeben.
Gellösung und Fibroblasten werden gut gemischt. Je-
weils 600 μl des Gemisches werden vorsichtig in die
30 Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefun-
gen (Durchmesser je Vertiefung 10 mm) gegossen.
Durch eine zweiminütige Inkubation bei 37°C erfolgt

- 29 -

eine Gelierung des Gemisches. Nach dem Gelieren des Gemisches werden jeweils 50 µl Fibronectin (5 µg/ml) auf jedes Insert gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C beziehungsweise einer
5 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird pro Vertiefung 1 ml M199-Medium zugegeben, wobei die Inserts mit dem Medium überschichtet werden. Die im Gel enthaltenen Fibroblasten werden etwa 1 bis 2 Tage dieser Submers-Kultivierung bei 37°C unterwor-
10 fen, wobei jeweils nach 12 Stunden das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht wird.

Aussaat der Keratinocyten und Kultivierung des in vitro-Hauttestsystems

Vor der Aussaat der Keratinocyten wird zunächst
15 vorsichtig das Medium in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte und von den Gelen abgesaugt. Dann werden pro Vertiefung 500 µl KBM-Medium (Clonetics), enthaltend 5% FCS, zugegeben. Die Gele werden mit jeweils 50 µl Fibronectin-Lösung beschich-
20 tet und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann werden pro Gel 100.000 Keratinocyten in 50-100 µl KBM-Medium, enthaltend 5% FCS, ausgesät und 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 500 µl KBM-Medium, enthaltend 5% FCS, 8 mM CaCl₂, hEGF
25 (0,1 µg/500 ml Medium) und BPE (15 mg/500 ml Medium), zugegeben und die Gele werden 1 bis 3 Tage einer Submers-Kultivierung unterworfen, wobei das Medium täglich gegen frisches Medium ausgetauscht wird. Danach werden die Gele weitere 2 bis 3 Tage
30 in jeweils 1 bis 1,5 ml KBM-Medium, enthaltend enthaltend 2% FCS, 8 mM CaCl₂, hEGF (0,1 µg/500 ml Medium) und BPE (15 mg/500 ml Medium), einer Submers-

- 30 -

Kultivierung unterworfen. Danach werden die Gele mit dem sich entwickelnden Hautäquivalent einer Airlift-Kultivierung unterworfen. Dazu werden die Gele in eine Platte mit 6 Vertiefungen umgesetzt und pro Vertiefung werden 1,5 bis 2 ml KBM-Medium mit einem CaCl_2 -Gehalt von 1,88 mM ohne hEGF und BPE zugegeben, wobei der Spiegel des Mediums genau auf die Höhe des Gels abgestimmt wird, während die Keratinocyten oder die durch Keratinocyten gebildeten Schichten nicht vom Medium bedeckt werden. Die Airlift-Kultivierung wird mindestens 12 bis 14 Tge fortgeführt.

Beispiel 2:

Herstellung eines dreidimensionalen humanen in vitro-Darmtestsystems

Herstellung einer Gellösung

77,5 Teile 2-fach konzentriertes DMEM-Zellkulturmedium (Life Technologies, Kat. Nr. 41966 oder 52100, 1999), 20 Teile FCS, 2,5 Teile HEPES-Puffer (71,49 g in 100 ml PBS-Lösung, pH-Wert 7,8) werden gemischt und der pH-Wert des Gemisches wird auf 7,4 eingestellt. Das Gemisch wird sterilfiltriert.

Herstellung der Fibroblasten enthaltenden Kollagen-gele (Ansatz für 24 Inserts)

7,5 ml Kollagenlösung werden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis gestellt. Vorkultivierte Fibroblasten werden geernet und gezählt. $1,2 \times 10^6$ Fibroblasten werden in 7,5 ml

- 31 -

eiskalte Gellösung aufgenommen, gut suspendiert und luftblasenfrei in die Kollagenlösung gegeben. Kollagenlösung und Gellösung mit Fibroblasten werden gut gemischt. Jeweils 300 µl des Gemisches werden
5 vorsichtig in die Vertiefung eines Inserts gegossen. Die Inserts befinden sich in einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen. Durch eine zweiminütige Inkubation bei 37°C erfolgt eine Gelierung des Gemisches. Nach dem Gelieren des Gemisches werden
10 jeweils 1 ml Medium auf und neben jedes Insert gegeben. Die im Gel enthaltenen Fibroblasten werden etwa 1 bis 3 Tage dieser Submers-Kultivierung bei 37°C unterworfen, wobei jeweils nach 48 Stunden das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht wird.

15 Aussaat der Darmepithelzellen und Kultivierung der Darmäquivalente

Vor der Aussaat der Caco2-Zellen wird zunächst vorsichtig das Medium in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte und von den Gelen abgesaugt. Dann werden
20 pro Gel 200.000 Epithelzellen in 200 µl DMEM-Medium (vergleiche vorstehend), enthaltend 10% FCS, ausgesät, neben die Inserts ca. 600 µl Medium gegeben und 10 bis 20 Tage bei 37°C kultiviert. Der Mediumswechsel erfolgt alle 48 Stunden.

25 Ein so hergestelltes Darmäquivalent ist in Figur 1 gezeigt.

- 32 -

Beispiel 3:

Cokultivierung von *Candida albicans* mit dem in vitro-Hauttestsystem beziehungsweise dem im vitro-Darmtestsystem zur Bestimmung der Adhäsion des Pathogens an Zellen

Zur Bestimmung der Adhäsion des Pathogens an Zellen wurden jeweils 12 in Submers-Kultur gehaltene Inserts des humanen in vitro-Hautsystems beziehungsweise jeweils 12 in Submers-Kultur gehaltene Inserts des in vitro-Darmsystems mit jeweils 10^3 pathogenen Organismen des virulenten *Candida*-Stamms Sc5314 oder des avirulenten *Candida*-Stamms Can34 infiziert (Lo et al., Cell 90 (1997), 937-949). Anschließend wurden die Inserts unter Schütteln bei 37°C 30, 60, 90, 120, 150 oder 180 min inkubiert.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand entnommen und auf Petrischalen mit YPD-Nährböden ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurden die Kolonien auf den Petrischalen ausgezählt. Aufgrund des Vergleichs zwischen der ermittelten Kolonienzahl und der ursprünglich inokulierten Zahl der Pathogene wurde ermittelt, dass an dem in vitro-Hautmodell etwa 95% des virulenten Stammes nach 2 Stunden und 10% des avirulenten Stammes anhafteten. Bei dem in vitro-Darmmodell zeigten etwa 95% des virulenten Stammes (Figur 2) und 10% des avirulenten Stammes Adhäsion.

- 33 -

Beispiel 4:

Cokultivierung von *Candida albicans* mit dem in
vitro-Hauttestsystem beziehungsweise dem im vitro-
Darmtestsystem zur Bestimmung der Penetration von
5 Zellen durch das Pathogen

Zur Bestimmung der Penetration des Pathogens wurde
jeweils 12 in Airlift-Kultur gehaltene Inserts des
in vitro-Hautsystems und jeweils 12 in Airlift-
Kultur gehaltene Inserts des in vitro-Darmsystems
10 mit jeweils 10^3 pathogenen Organismen des virulen-
ten *Candida*-Stamms Sc5314 oder des avirulenten *Can-*
dida-Stamms Can34 infiziert. Anschließend wurden
die Inserts bis zu 3 Tage bei 37°C inkubiert.

Das Eindringen des Pathogens in die organoiden
15 Strukturen wird nach etwa 18 bis 24 Stunden mittels
histologischer Verfahren an Dünnschnitten unter-
sucht, wobei sowohl bei dem in vitro-Hautsystem als
auch bei dem in vitro-Darmsystem das PAS-
Färbeverfahren verwendet wird. Anhand der histolo-
20 gischen Schnitte wurde der Invasionsprozess des vi-
rulenten *Candida*-Stammes bis in tiefere Schichten
der bindegewebsähnlichen Matrix dokumentiert (Figur
3). Dabei wurde gezeigt, dass der virulente *Candi-*
da-Stamm sich sternförmig von der Infektionsstelle
25 in das Bindegewebe ausbreitet, wohingegen der avi-
rulente Stamm die Epithelzellen nicht durchdringen
konnte und auch keine Adhäsion zeigte.

- 34 -

Beispiel 5:

Einfluß von Antimykotika auf die Adhäsion von *Candida albicans* an Haut- und Darmzellen in vitro

Zur Bestimmung des Einflusses von Antimykotika auf
5 die Adhäsion von *Candida albicans* an Haut- und
Darmzellen wurde jeweils 12 in Submers-Kultur ge-
haltene Inserts des in vitro-Hauttestsystems und
jeweils 12 Inserts des in vitro-Darmtestsystems mit
jeweils 10^3 pathogenen Organismen des virulenten
10 *Candida*-Stamms Sc5314 oder des avirulenten *Candida*-
Stamms Can34 infiziert. Zu 5 Inserts wurde Amphote-
ricin B in einer Konzentration von 0,1; 0,5; 1,0
und 2,0 µg/µl und zu 5 Inserts wurde Fluconazol in
einer Konzentration von 0,1; 0,5; 1,0 und 2,0 µg/µl
15 gegeben. Anschließend wurden die Inserts unter
Schütteln bei 37°C bis zu 3 Tagen inkubiert.

Nach 16, 24, 72, 86 und 98 Stunden wurden Aliquots
entnommen und auf Petrischalen mit YPD-Nährböden
ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Ta-
20 gen wurden die Kolonien auf den Petrischalen ausge-
zählt. Aufgrund des Vergleichs zwischen der ermit-
telten Kolonienzahl der Proben ohne Zugabe eines
Antimykotikums und der Kolonienzahl bei Proben mit
Zugabe eines Antimykotikums wurde ermittelt, dass
25 die Adhäsion des virulenten *Candida*-Stammes erst
durch Zugabe von Amphoterisin B und Fluconazol und
durch eine Inhibition des Wachstums unterbunden
werden konnte.

Beispiel 6:

Cokultivierung von *Candida albicans* mit dem in vitro-Hauttestsystem beziehungsweise dem in vitro-Darmtestsystem zur Bestimmung der Penetration des Pathogens

Zur Bestimmung des Einflusses von Antimykotika auf die Penetration von *Candida albicans* in Haut- und Darmzellen wurde jeweils 12 in Airlift-Kultur gehaltene Inserts des in vitro-Hautsystems und jeweils 12 Inserts des in vitro-Darmsystems mit jeweils 10^3 pathogenen Organismen des virulenten *Candida*-Stamms Sc5314 oder des avirulenten *Candida*-Stamms Can34 infiziert. Zu 5 Inserts wurde Amphotericin B in einer Konzentration von 0,1; 0,5; 1,0 und 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und zu 5 Inserts wurde Fluconazol in einer Konzentration von 0,1; 0,5; 1,0 und 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gegeben. Anschließend wurden die Inserts unter Schütteln bei 37°C bis zu 3 Tage inkubiert.

Das Eindringen des Pathogens in die organoiden Strukturen wird nach etwa 18 bis 24 Stunden mittels histologischer Verfahren an Dünnschnitten gemäß Beispiel 4 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Amphotericin B und Fluconazol die Invasion des virulenten *Candida*-Stammes offenbar durch Inhibition dessen Wachstums unterbindet.

Ansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung eines einschichtigen
menschlichen oder tierischen in vitro-
Gewebetestsystems, wobei menschliche oder tierische
Zellen in eine dreidimensionale, gelartige Biomatrix,
enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in ge-
10 puffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, eingebettet
und in dieser so kultiviert werden, dass ein
einschichtiges in vitro-Gewebesystem gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Kultivierung
der menschlichen oder tierischen Zellen eine
15 mindestens ein- bis zweitägige Submerskultur umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich
bei den menschlichen oder tierischen Zellen um
nicht-entartete Zellen, entartete Zellen oder ein
20 Gemisch davon handeln kann.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich
bei den menschlichen oder tierischen Zellen um gentechnisch
veränderte Zellen oder ein Gemisch von gentechnisch
unveränderten Zellen und gentechnisch
25 veränderten Zellen handeln kann.
5. Verfahren zur Herstellung eines einschichtigen
menschlichen oder tierischen in vitro-
Gewebetestsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 5,

umfassend das Isolieren von kollagenhaltigem Gewebe, das Überführen des kollagenhaltigen Gewebes in saure Lösung, das Inkubieren des in die saure Lösung überführten Kollagengewebe bei 2 bis 10°C, insbesondere 4°C, das Abzentrifugieren nicht gelöster Kollagenanteile, das Mischen der erhaltenen Kollagenlösung bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, mit einer Lösung, enthaltend die zu kultivierenden menschlichen oder tierischen Zellen, Zellkulturmedium, Serum und Puffer, und das Gelieren der gemischten Lösung durch Erhöhung der Temperatur.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die menschlichen oder tierischen Zellen nach Kultivierung in der dreidimensionalen, gelartigen Biomatrix aus dieser herausgelöst und in höherer Zelldichte weiter kultiviert werden, so dass ein einschichtiges in vitro-Gewebesystem gewonnen wird.

7. Verfahren zur Herstellung eines dreidimensionalen mehrschichtigen menschlichen oder tierischen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems, wobei Zellen eines ersten menschlichen oder tierischen Gewebetyps in eine dreidimensionale, gelartige Biomatrix, enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in gepuffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, eingebettet und in dieser einer mindestens ein- bis zweitägigen Kultivierung unterworfen werden und wobei danach Zellen eines zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps in einem Zellkulturmedium auf der Biomatrix ausgesät und danach weiter kultiviert werden und wobei danach gegebenenfalls in einem optionalen weiteren Schritt Zellen weiterer menschlicher oder tierischer Gewebetypen in Zellkulturmedium ausgesät

- 38 -

und danach weiter kultiviert werden, so dass ein dreidimensionales mehrschichtiges in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem gewonnen wird.

5 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Kultivierung der Zellen des ersten menschlichen oder tierischen Gewebetyps mindestens eine ein- bis zweitägige Submerskultur umfasst.

10 9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei die Kultivierung der Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps mindestens eine 2- bis 6-tägige Submerskultur und mindestens eine 10- bis 14-tägige Airlift-Kultur umfasst.

15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei die Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps und gegebenenfalls die Zellen der weiteren menschlichen oder tierischen Gewebetypen einen hohen Anteil undifferenzierter Stammzellen oder/und von Immunsystemzellen aufweisen.

20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei es sich bei den Zellen des ersten menschlichen oder tierischen Gewebetyps und den Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps sowie den Zellen der gegebenenfalls verwendeten weiteren menschlichen oder tierischen Gewebetypen um
25 nicht-entartete, entartete Zellen oder ein Gemisch davon handeln kann.

30 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei es sich bei den Zellen des ersten menschlichen oder tierischen Gewebetyps und den Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps so-

wie den Zellen der gegebenenfalls verwendeten weiteren menschlichen oder tierischen Gewebetypen um gentechnisch veränderte Zellen oder ein Gemisch von gentechnisch unveränderten Zellen und gentechnisch
5 veränderten Zellen handeln kann.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei es sich bei den Zellen des ersten menschlichen oder tierischen Gewebetyps um dermale Fibroblasten und bei den Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps um Keratinocyten
10 handelt, so dass nach Kultivierung ein dreidimensionales in vitro-Hauttestsystem hergestellt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei es sich bei den Zellen des ersten menschlichen oder tierischen Gewebetyps um Bindegewebszellen des Darms und bei den Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps um Entero-
15 cyten oder Darmepithelzellen handelt, so dass nach Kultivierung ein dreidimensionales in vitro-Darmtestsystem hergestellt wird.
20

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei es sich bei den Zellen des ersten menschlichen oder tierischen Gewebetyps um Cornea-Endothelzellen, bei den Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Gewebetyps um Cornea-Keratinocyten und bei den Zellen eines weiteren, dritten menschlichen oder tierischen Gewebetyps um Cornea-Epithelzellen handelt, so dass nach Kultivierung ein dreidimensionales in vitro-Cornea-
25 Testsystem hergestellt wird.
30

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12,
wobei es sich bei den Zellen des ersten menschli-
chen oder tierischen Gewebetyps um Fibroblasten,
insbesondere Trachea-Fibroblasten und bei den Zel-
5 len des zweiten menschlichen oder tierischen Gewe-
betyps um Trachea-Epithelzellen handelt, so dass
nach Kultivierung ein dreidimensionales in vitro-
Trachea-Testsystem hergestellt wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12,
10 wobei es sich bei den Zellen des ersten menschli-
chen oder tierischen Gewebetyps um Fibroblasten,
insbesondere Schleimhaut-Fibroblasten und bei den
Zellen des zweiten menschlichen oder tierischen Ge-
webetyps um Schleimhaut-Epithelzellen handelt, so
15 dass nach Kultivierung ein dreidimensionales in
vitro-Schleimhaut-Testsystem hergestellt wird.

18. Verfahren zur Herstellung eines dreidimensiona-
len mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebe-
testsystems nach einem der Ansprüche 7 bis 17, um-
20 fassend das Isolieren von kollagenhaltigem Gewebe,
das Überführen des kollagenhaltigen Gewebes in sau-
re Lösung, das Inkubieren des in die saure Lösung
überführten Kollagengewebe bei 2 bis 10°C, insbe-
sondere 4°C, das Abzentrifugieren nicht gelöster
25 Kollagenanteile, das Mischen der erhaltenen Kolla-
genlösung bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, mit ei-
ner Lösung, enthaltend die zu kultivierenden Zellen
eines ersten menschlichen oder tierischen Gewebe-
typs, Zellkulturmedium, Serum und Puffer, das Ge-
30 lieren der gemischten Lösung durch Erhöhung der
Temperatur, das Inkubieren des gelierten Gemisches
bei 37°C und das Aussäen der Zellen des zweiten

-41-

menschlichen oder tierischen Gewebesystems und gegebenenfalls das Aussäen der Zellen der weiteren menschlichen oder tierischen Gewebetypen auf das inkubierte, gelierte Gemisch.

5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die eingebettete menschliche oder tierische Zellen enthaltende Biomatrix hergestellt wird, indem aus einem Gewebe isolierte Kollagenfasern in saurer Lösung 3 bis 14 Tage bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, gerührt, nicht gelöste Kollagenanteile abzentrifugiert und die erhaltene fertige Kollagenlösung mit einem Kollagengehalt von 3 mg/ml bis 8 mg/ml mit einer Lösung, enthaltend die einzubettenden menschlichen oder tierischen Zellen, 10 Zellkulturmedium, Serum und Puffer, bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, gemischt und anschließend bei höherer Temperatur, vorzugsweise bei Raumtemperatur bis 37°C, geliert wird.

20 20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die saure Lösung Essigsäurelösung, insbesondere 0,1%-ige Essigsäurelösung, ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Lösung, enthaltend die Zellen, Zellkulturmedium, Serum und Puffer, in einem Volumenverhältnis von 25 1:1 mit der kollagenhaltigen Lösung gemischt wird.

22. Einschichtiges in-vitro-Gewebetestsystem hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 19 bis 21.

- 42 -

23. Dreidimensionales mehrschichtiges in vitro-Hauttestsystem, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 13 oder 18 bis 21.
- 5 24. Dreidimensionales mehrschichtiges in vitro-Darmtestsystem, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12, 14 oder 18 bis 21.
- 10 25. Dreidimensionales mehrschichtiges in vitro-Cornea-Testsystem, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12, 15 oder 18 bis 21.
- 15 26. Dreidimensionales mehrschichtiges in vitro-Trachea-Testsystem, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12, 16 oder 18 bis 21.
- 20 27. Dreidimensionales mehrschichtiges in vitro-Schleimhaut-Testsystem, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12 oder 17 bis 21.
- 25 28. Verfahren zur Untersuchung des Infektionsprozesses eines pathogenen oder parasitären Mikroorganismus an einem menschlichen oder tierischen Gewebe, umfassend das Inkontaktbringen eines einschichtigen in vitro-Gewebetestsystems gemäß Anspruch 22
- 30 oder eines dreidimensionalen mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems gemäß einem der Ansprüche 23 bis 27 mit einem pathogenen oder parasitären Mikroorganismus und die Kokultivierung des Mikroorganismus mit dem ein- oder mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem unter Bedin-

gungen, die die anschließende oder gleichzeitige Untersuchung des Infektionsprozesses erlauben.

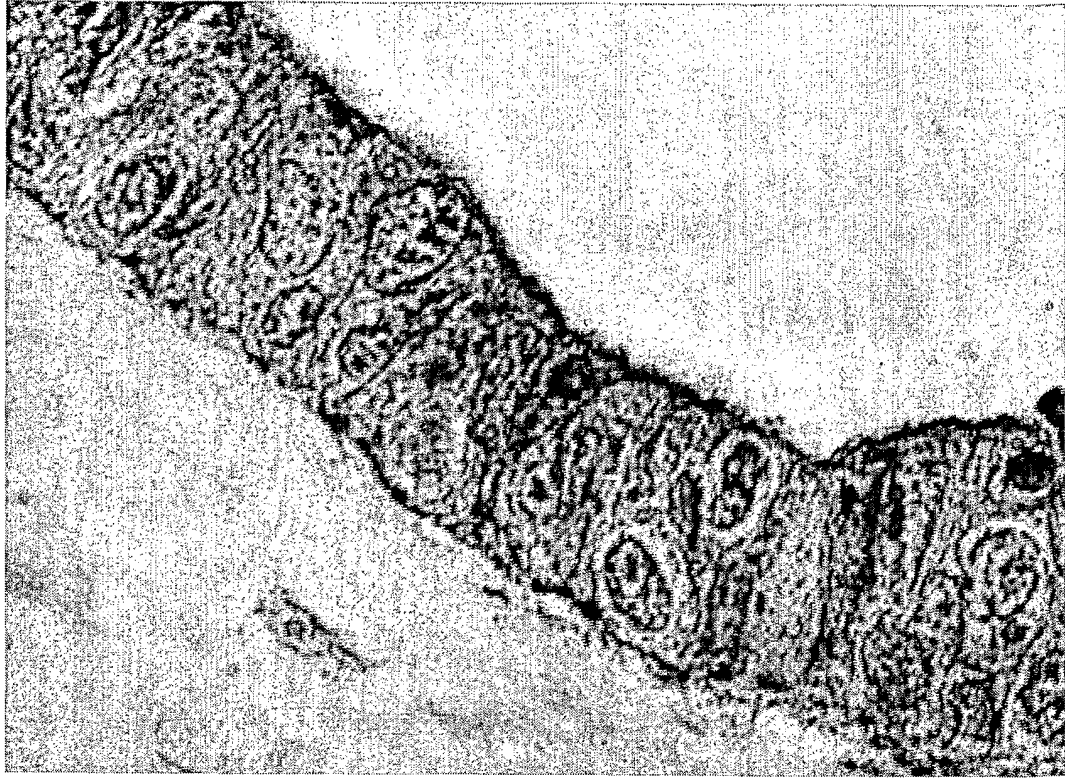
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Cokultivierung in einer Submerskultur erfolgt und die Adhäsion des Mikroorganismus an Zellen des ein- oder mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems ermittelt wird.

30. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Cokultivierung in einer Airlift-Kultur erfolgt und die Penetration des Mikroorganismus in Zellen des ein- oder mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems ermittelt wird.

31. Verfahren zur Bestimmung der Wirkung einer chemischen Substanz oder eines Agens auf den Infektionsprozess eines pathogenen oder parasitären Mikroorganismus an einem menschlichen oder tierischen Gewebe, umfassend das Inkontaktbringen eines einschichtigen in vitro-Gewebetestsystems gemäß Anspruch 22 oder eines dreidimensionalen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystems gemäß einem der Ansprüche 23 bis 27 mit einem pathogenen oder parasitären Mikroorganismus, die Cokultivierung des Mikroorganismus mit dem ein- oder mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem in Ab- und Anwesenheit der zu untersuchenden Substanz oder des Agens und die Bestimmung der Wechselwirkung zwischen dem ein- oder mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem, dem Mikroorganismus und der zu testenden Substanz oder dem zu testenden Agens.

- 44 -

32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei der Einfluss der zu testenden Substanz oder des zu testenden Agens auf die Adhäsion des Mikroorganismus bestimmt wird.
- 5 33. Verfahren nach Anspruch 31, wobei der Einfluss der zu testenden Substanz oder des zu testenden Agens auf die Penetration des Mikroorganismus bestimmt wird.
- 10 34. Verfahren nach Anspruch 31, wobei der Einfluss der zu testenden Substanz oder des zu testenden Agens auf die Wachstumsrate des Mikroorganismus bestimmt wird.
- 15 35. Verfahren zur Bestimmung der Wirkung einer chemischen Substanz oder eines Agens auf nicht-entartete oder entartete menschliche oder tierische Zellen, umfassend das Inkontaktbringen der chemischen Substanz oder des Agens mit einem aus entarteten und/oder nicht-entarteten menschlichen oder tierischen Zellen aufgebauten einschichtigen in vitro-Gewebetestsystem gemäß Anspruch 22 oder einem aus entarteten und/oder nicht-entarteten menschlichen oder tierischen Zellen aufgebauten dreidimensionalen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem gemäß einem der Ansprüche 23 bis 27 und Bestimmung
20 der Wechselwirkung zwischen dem ein- oder mehrschichtigen in vitro-Organ- oder Gewebetestsystem und der chemischen Substanz oder dem Agens.
25



Kontrolle

Fig. 1



Adhäsion

Fig. 2



Invasion

Fig. 3