

(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  
15. August 2013 (15.08.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2013/117193 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
*C12M 3/00* (2006.01) *C12M 1/42* (2006.01)  
*C12M 1/00* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2013/100047
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
11. Februar 2013 (11.02.2013)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2012 101 078.1  
9. Februar 2012 (09.02.2012) DE
- (71) Anmelder: **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.** [DE/DE]; Hansastraße 27c, 80686 München (DE).
- (72) Erfinder: **LAUSCH, Holger**; Semmelweisstraße 31, 07743 Jena (DE). **BRAND, Michael**; Schamhorststraße 2, 07743 Jena (DE). **ARNOLD, Michael**; Mühlthal 29, 07743 Jena (DE).
- (74) Anwalt: **OEHMKE & KOLLEGEN**; Neugasse 13, 07743 Jena (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: STIMULATION CELL AND METHOD FOR IN-VITRO STIMULATION OF CELLS OR TISSUE

(54) Bezeichnung : STIMULATIONSZELLE UND VERFAHREN ZUR IN VITRO STIMULATION VON ZELLEN ODER GEWEBEN

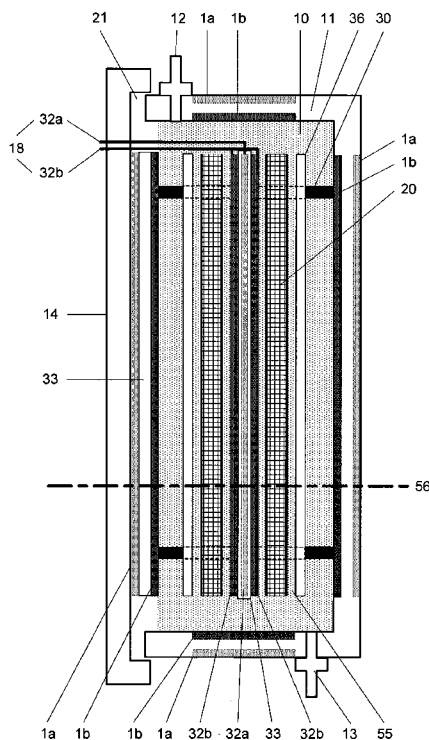


Fig. 10

(57) Abstract: Stimulation cell and method for in-vitro stimulation of cells or tissue in a stimulation cell. In the stimulation cell, a carrier (36) which can be populated at least over regions of the surface thereof by cells or tissue, and at least one actuator which is designed such that, on the surface of the carrier (36), a dosable gradient having an effect that stimulates the growth of the cells or tissue can be topically induced, are present in an interior chamber (10) of the stimulation cell. The method is performed by means of the following steps: introducing a cell substrate (20), which carries the cells or tissue, into an interior chamber (10) of a stimulation cell; inserting a carrier (36), which can be populated or is already populated at least over populatable regions of the surface thereof by the cells or tissue, into a receiving device (30) in the interior chamber (10) of the stimulation cell; introducing a medium (M) for the physiological supply of cells or tissue; and inducing at least one dosable, topical gradient having an effect on the surface of the carrier (36) that stimulates the growth of the cells or tissue.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2013/117193 A1



GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)*

**Veröffentlicht:**

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

— *hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i)*

---

Stimulationszelle und Verfahren zur in vitro Stimulation von Zellen oder Geweben in einer Stimulationszelle. In der Stimulationszelle sind in einem Innenraum (10) der Stimulationszelle ein Träger (36), der wenigstens über Bereiche seiner Oberfläche durch Zellen oder Gewebe besiedelbar ist und mindestens ein Aktor, der so ausgeführt ist, dass durch ihn topisch auf der Oberfläche des Trägers (36) ein dosierbarer Gradient mit einer das Wachstum der Zellen oder Gewebe stimulierenden Wirkung hervorruft, vorhanden. Zur Durchführung des Verfahrens werden die Schritte des Einbringens eines die Zellen oder Gewebe tragenden Zellsubstrats (20) in einen Innenraum (10) einer Stimulationszelle; des Einlegens eines Trägers (36), der wenigstens über besiedelbare Bereiche seiner Oberfläche durch die Zellen oder Gewebe besiedelbar oder bereits besiedelt ist, in eine Aufnahmevorrichtung (30) in dem Innenraum (10) der Stimulationszelle; des Einbringens eines Mediums (M) zur physiologischen Versorgung der Zellen oder Gewebe und des Hervorrufens mindestens eines dosierbaren, topischen Gradienten mit einer das Wachstum der Zellen oder Gewebe stimulierenden Wirkung auf der Oberfläche des Trägers (36), durchgeführt.

Stimulationszelle und Verfahren zur in vitro Stimulation von Zellen oder Geweben

Die Erfindung betrifft eine Stimulationszelle und ein Verfahren zur in vitro Stimulation von Zellen oder Geweben.

Im Rahmen des sogenannten Tissue-Managements wurden seit den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts Bioreaktoren entwickelt, modifiziert und auch patentiert. Diese zeichneten sich vor allem durch die Nutzung der Fluidik bzw. Mikrofluidik aus, die die sonst fehlenden Nähr-, Wirk- und Signalstoff-Versorgung quasi in vitro abzubilden versuchen und somit auch eine Signaltransduktion und Taxien implementierten. Die Fluidik wurde insbesondere für die zelluläre Besiedlung von Scaffolds bedeutsam. Exemplarisch seien hier die DE 39 23 279 und die DE 10 2004 054 125 A1 genannt. Neben der Zuführung von unterschiedlichsten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Genaktivierung / Genexpression) besteht das inhärente Stimulationsprinzip in vom fluidischen Prozess am Scaffold abgeleiteten mechanotransduktiven Effekten.

In J Exp Zool. 1990 Feb; 253(2): 163-76 beschrieben Harris A.K., Pryer N.K. und Paydarfar D. in „Effects of electric fields on fibroblast contractility and cytoskeleton.“ eine nichtfluidische elektrische Feldkammer zur Ausrichtung von Osteoblasten in elektrischen Gleichfeldern. Die Zellen richten sich dabei nach einer gewissen Zeit rechtwinklig zu den Feldlinien aus und elongieren (S. T. Curtze (2006, „Zugkraftmikroskopie an Osteoblasten“, Diss. Humanmedizin, Uni Marburg: 8 ff.). Diese Feldkammer wurde zur Analyse der Mechanotransduktion von Osteoblasten und nicht zum tissue engineering benutzt.

In DE 37 35 702 A1 wird ein Verfahren zur Beeinflussung von Wachstum, Teilung und Differenzierung von Zellen in einem Kulturbehälter vorgestellt, bei dem über das Anlegen von elektrischen Gleichfeldern, veränderbar in Richtung und Stärke, elektrische Dipolmomente der Zellen im Sinne einer spontanen Polarisation genutzt werden. Neben der Veränderung des angelegten Gleichfeldes soll auch das elektrische Oberflächenpotential veränderbar sein. Die Vorrichtung dazu basiert auf zwei parallelen, planaren Plattenelektroden, die gegenüber dem Kulturmedium elektrisch isoliert oder elektrisch leitend sind. Die Fläche der Plattenelektroden entspricht der Grundfläche oder mindestens einer Wandinnenfläche des Kulturbehälters. Die

Vorrichtung dient der Herstellung von biotechnologisch und biomedizinisch bedeutsamen Zellen, Geweben, Organen und Einzellern sowie von Biosensoren. Eine räumlich gerichtete Entwicklung von Zellen oder Geweben sowie eine Besiedelung von degradierbaren und nicht-degradierbaren Implantatoberflächen und Gewebeersatzstoffen ist nicht vorgesehen.

In zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten werden elektrische Anordnungen, z.T. in Gestalt von Kammern, mit Zellen und / oder Mikroorganismen beschrieben, die eine Analyse der entsprechenden Einflüsse von elektrischen Feldern und / oder Strömen zu Gegenstand haben. Ihnen gemeinsam sind in der Regel statische, unveränderliche Anordnungen von Elektroden, die nur durch in ihren elektrischen Parametern (Betrag, Stromrichtung und Frequenz) veränderlich betrieben werden können. Meist werden ein oder zwei parallele Elektrodenpaare, teilweise orthogonal zueinander stehend, verwendet, die entweder im bzw. zum Medium elektrisch leitend (Stromfluss) oder elektrisch isoliert (Spannung / elektrisches Feld) ausgebildet sind. Die Paare befinden sich dabei in der Regel in einer gemeinsamen Ebene und wirken in ihrer Vorzugsrichtung weitgehend planar. Deshalb dienen diese Vorrichtungen nicht einem räumlichen tissue engineering an dreidimensionalen Implantatkörpern, sondern vorrangig der Erforschung des Verhaltens von Zellen und Mikroorganismen unter dem Einfluss definierter Gradienten.

Beispielhaft seien die Arbeiten von Caubet, R. et al (2004, A radio frequency electric current enhances antibiotic efficacy against bacterial biofilms, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*: 4662–4664) und van der Borden, A. et al. (2007, Prevention of pin tract infection in external stainless steel fixator frames using electric current in a goat model, *Biomaterials* 28: 2122–2126) angeführt.

Ebenfalls bekannt sind Schriften zum stimulativen Einfluss von gepulsten elektromagnetischen bzw. magnetischen Feldern auf das Wachstum vorrangig von Knochen-, Knorpel- und Muskelgewebe. So wurde in zwei Übersichtspublikationen von Hungerer, S. et al. (2008, Elektromagnetische Verfahren bei Knochenheilungsstörungen. Evidenz dieser additiven Maßnahme, *Trauma Berufskrankheit* 10 [suppl. 2]: 219–225) und Schmidt-Rohlfing, B. et al. (2010, Elektromagnetische Felder, elektrischer Strom und Knochenheilung: was ist gesichert? *Electromagnetic Fields, Electric Current and Bone Healing – What is the Evidence?*,

Z Orthop Unfall: 1-6) versucht, Ergebnisse von Versuchen zur elektrischen und elektromagnetischen Stimulation in Form von Metaanalysen zusammenzufassen, um eine Aussage über deren Wirksamkeit zu erhalten. Zur Signifikanz und Evidenz der zu untersuchenden Verfahren wird die Evidenz von elektrischen und elektromagnetischen Verfahren zur Knochenheilung anhand vorhandener randomisierter klinischer Studien diskutiert und beurteilt.

Leider wurden die Techniken der Stimulation (DC/AC elektrisch leitend, DC/AC elektrisch isoliert, magnetisch) in diesen Studien als gleichwertig angesehen. Eine Zusammenfassung in dieser Art ist unter Vorbehalt zu betrachten, obwohl eine gute Übersicht über die klinischen Studien gegeben wird. Abgesehen von der Vergleichbarkeit der oben genannten Verfahren, sind bereits die PEMF (PEMF = Pulsed Electro Magnetic Field)-Studien durch die Vielzahl der verschiedenen Stimulationsparameter und unterschiedlichen Behandlungszeiten kritisch zu werten. Vielen der angegebenen Literaturstellen mangelt es an der exakten Angabe von Stimulationsparametern. Es ist oft nicht nachvollziehbar, welche Flussdichten, Frequenzen und Amplituden verwendet wurden.

Die Arbeiten beschäftigten sich mit dem Einfluss der Feldgrößen auf die Wirksamkeit von elektromagnetischen Verfahren und beschrieben vor allem die niederfrequenten kontinuierlich sinusförmigen Signale im Frequenzbereich von unter 120 Hz als wirksam, mit einem Maximum bei 15–30 Hz.

Studien mit einem EBM-Level 1 (EBM = Evidenzbasierte Medizin) und zahlreiche weitere Studien mit niedrigeren EBM-Level sind vorhanden.

Obwohl die Literatur zahlreich ist und sich mit anderen additiven Therapiekonzepten messen kann, wie der Stoßwelle, Ultraschall oder Bone-Matrix-Proteinen, überrascht es nicht, dass die elektromagnetischen Therapieformen bislang keinen Durchbruch erzielt haben. Dem Anwender wird durch die Vielzahl kommerzieller Geräte mit sehr unterschiedlichen Parametern die Wahl des optimalen Geräts nahezu unmöglich gemacht. Zudem fehlen bisher standardisierte Therapieoptionen, da sich einerseits die von den Forscherteams angewandten Felder hinsichtlich ihrer physikalischen Kenngrößen erheblich unterscheiden, und andererseits ein allgemein anerkannter

Wirkmechanismus noch nicht beschrieben wurde. Damit fehlen auch Studienprotokolle für die Behandlung.

Aus der Schrift US 2004/0058434 A1 ist ein Verfahren zur Herstellung eines Implantats bekannt, bei dem ein Implantatkern mit Zelle oder Gewebe besiedelt wird. Eine Differenzierung und ein Wachstum der Zellen oder Gewebe wird durch mechanische Stimuli beeinflusst. Zur Durchführung des Verfahrens wird ein Reaktor verwendet, in dem sich zwei Wände voneinander durch einen Spalt beabstandet gegenüber stehen. Auf mindestens einer der Wände, die durch eine Oberfläche des Implantats gebildet ist, sind Zellen oder Gewebe angesiedelt. Die andere Wand ist elastisch gestaltet und ist in vorbestimmter Weise und Amplitude deformierbar. Die elastische Wand dient der Erzeugung von Druckveränderungen in dem Spalt und damit einer mechanischen Stimulation der auf dem Implantat angesiedelten Zellen oder Gewebe.

Das grundsätzlich auch weitere Möglichkeiten zur Stimulation des Wachstums und der Differenzierung von Zellen oder Geweben möglich sind, ist aus der Schrift DE 100 61 704 A1 zu entnehmen. Auch hier werden Zellen auf einer Basis (Wachstumsgerüst) angesiedelt und stimuliert. Eine Stimulation kann mittels physikalischer Reize, insbesondere mittels elektrischer, chemischer und / oder optischer Reize, erfolgen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zahlreiche suppressive und stimulative Verfahren und Methoden in in vitro und zum Teil auch in in vivo Studien erforscht und mehr oder minder validiert worden sind. Deutlich weniger konnten diese Entwicklungen human in situ bzw. für in situ Anwendungen realisiert werden. Es gibt sehr viele experimentelle Untersuchungen mit zum Teil sehr signifikanten Ergebnissen, aber kaum randomisierte klinische Studien.

Alle vorstehend genannten Erfindungen, publizierten in vitro Anordnungen, Stimulations- und Suppressionsverfahren sowie die in Anwendung befindlichen oder kommerziell vertriebenen Produkte bilden in vitro die in situ Situation von dreidimensionalen Implantatformkörpern nicht ab. Die in situ ablaufende dreidimensionale Zell-/ Gewebeentwicklung/-anpassung als Konduktion und / oder Induktion sowie spaltüberbrückende und gerüstauffüllende Integration durch An- bzw. Heranwachsen bzw. Volumenausfüllung findet so quasi nicht statt. Außerdem wird bei

all diesen Anordnungen der gravitative Aspekt bei der Zell-/ Gewebeentwicklung vernachlässigt bzw. durch Fluidanordnungen aufgehoben, obwohl das atypische „Abflachen“ von kultivierten Zellen auf dem Boden von Kulturschalen bzw. auf nichtorganischen Membranen hinreichend bekannt ist.

Die räumliche Verteilung von Zellen/Geweben inklusive der extrazellulären Matrix (= EZM) auf dreidimensionalen Formkörpern, d. h. die Besiedelung von Implantaten mit vorzugsweise autologen Zellen, sowie deren zeitlichen Abfolgen bezüglich der Schichtbildung, Vernetzung und EZM erfordert im Unterschied zu den oben genannten Techniken, Anordnungen und Verfahren eine Transformation der planaren Stimulations-/Suppressionsmodelle/-anordnungen/-verfahren in den in vitro abgebildeten in situ dreidimensionalen Raum. Dafür muss die Gesamtbesiedlungsfläche daher sinnvollerweise erst topographisch in Teilflächen aufgelöst werden.

Im Unterschied zu den fluidischen Bioreaktoren, die chemotaktische Gradienten in Gestalt von Wachstumsfaktoren einbringen, sowie mittels der fluidikbasierten Mechanotransduktion der Zellen stimulatativ wirken, ist eine in situ nahe Besiedlung von dreidimensional geformten Implantaten bzw. deren in vitro Simulation für eine in situ / in vivo Stimulation und / oder Suppression ohne eine echte, orts- und zeitaufgelöste, variierende Applikation von auch in in situ anwendbaren Gradienten, variabel in Art, Betrag, Richtung und zeitlichem Verlauf, notwendig.

Das Verfahren einer in situ-nahen Besiedlung der Implantatoberfläche mit autologen Zellen senkt zugleich nicht nur das Risiko einer Entzündung (Inflammation) durch die Bildung von Biofilmen auf unbesiedelten, freien Oberflächen sondern beschleunigt auch die Sekundärverankerung der Implantate in situ.

Die Relevanz der Verwendung von autologen Zellen zur Vorbesiedlung der Implantate hat sich in experimentellen Monitoringversuchen zur Evaluierung der Bioaktivität von Implantatoberflächen gezeigt. Die Varianz bzw. Standardabweichung der Adhäsions-, Proliferations-, Migrations- und Differenzierungseigenschaften von patientenspezifischen Zellen mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition bzw. pathologisch bedingten Veränderungen (Stoffwechsel-/Kreislaufkrankungen, Diabetes, Alkohol-, Nikotin-, Drogenmissbrauch etc.) ist dabei gegenüber verschiedenen bioaktiven Implantatoberflächen teilweise dominanter als die Varianz

bzw. Standardabweichung der Bioaktivität unterschiedlicher Implantatoberflächen gegenüber einer immortalisierten Zelllinie.

In der Praxis bedeutet dies, dass es nicht unbedingt nur eine optimale bioaktive Oberfläche z. B. für die Adhäsion humaner Osteoblasten geben muss, sondern patientenindividuell verschiedene bioaktive Oberflächen jeweils optimal sein können. Die mit einer solchen Individualmedizin möglicherweise einhergehende Kostenexplosion der Implantationsmedizin aufgrund einer, zugespitzt formuliert, individuellen Implantatbereitstellung seitens der Industrie bzw. Implantatoberflächenmodifikation seitens der Industrie generell und / oder der Implantologen, lässt eine patientenspezifische bzw. individualmedizinisch indizierte, in vitro evaluierte und validierte Stimulation von autologen, humanen Zellen / Zelllinien in vitro bzw. in situ als kosten- und risikosenkende Alternative erscheinen. Dies trifft auch auf die Nutzung solcher Anordnungen und Verfahren für eine patientenspezifische bzw. individualisierte Stimulation / Suppression von Differenzierungs- / Dedifferenzierungs- sowie Migrations- / Metastaseverhalten / -potentialen von gesunden und karzinogenen Zellen und Geweben in der Onkologie zu.

Die aus der o. g. Patent- und Fachliteratur bekannten und teils auch bereits im praktischen Einsatz befindlichen suppressiven und stimulativen Methoden und Verfahren unterscheiden sich im jeweilig an den Oberflächen, den Grenzflächen oder in den Formkörpern wirkenden Gradienten:

- akustische oder mechanische Stosswellen oder Ultraschall (Mechanotransduktion) inkl. Vibration und Fluidik,
- positive wie negative Gravitation,
- Spaltsituationen (Kohäsion, Adhäsion),
- Oberflächenspannung/-energie an der Grenzfläche,
- elektrische Felder DC/AC (DC = Gleichspannung / AC = Wechselspannung) – isoliert,
- elektrische Felder DC/AC – leitend,

- elektromagnetische und / oder magnetische Gleich- und Wechselfelder,
- Chemotransduktion.

Die stimulativen und suppressiven Gradienten beim Bone- und Soft-Tissue (Knochen- und Weichgewebe) Management sollten sich prinzipiell an den körpereigenen systemimmanenten Gradienten orientieren, welche auch im Organismus auftreten können.

Aus diesem Grund macht es wenig Sinn in vitro Signalarten, -formen und -stärken zu evaluieren und validieren, welche in situ systembiologisch nicht erzeugt werden und prinzipiell auch künstlich topisch nicht eingebracht werden können. Diese Entscheidung begründet sich dadurch, dass das Einbringen von stimulativen und / oder suppressiven Gradienten immer nur als Additive zu den körpereigenen Heilungs- und Wachstumsprozessen verstanden werden müssen. Dieser additive Charakter ist die Prämisse jeder Methode. Das additive Verfahren muss sich immer in den Grenzen des körpereigenen systembiologischen generativen Verfahrens bewegen. Des Weiteren sind im topischen Therapiebereich immer verschiedene Zellentitäten vorhanden, welche sich bei generativen oder regressiven Prozessen gegenseitig bedingen und chemotaktisch beeinflussen. Es macht wenig Sinn nur einen Zelltyp zu stimulieren, wenn andere Zelltypen supprimiert werden. Selbiges trifft auf die Nachbarschaft und die Wechselwirkung von Bone und Soft-Tissue zu.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Möglichkeit für eine topische in vitro Stimulation von Zellen oder Geweben vorzuschlagen, bei der, ausgehend von einem Zellsubstrat, gezielt ein vorhandener Spalt überwachsen wird.

Die Aufgabe wird durch eine Stimulationszelle zur in vitro Stimulation von Zellen oder Geweben gelöst, die einen Korpus beinhaltet, durch den ein Innenraum umfasst ist. Der Korpus weist je ein Oberteil und ein Unterteil auf. Die Stimulationszelle weist außerdem mindestens einen Aktor zum Hervorrufen einer stimulierenden Wirkung auf mindestens einen Anteil der Zellen oder Gewebe auf. Eine erfindungsgemäße Stimulationszelle ist dadurch gekennzeichnet, dass in dem Innenraum eine Aufnahmevorrichtung zur Aufnahme eines Zellsubstrats und eines Trägers angeordnet ist, wobei nach einer Aufnahme des Zellsubstrats und des Trägers durch die Aufnahmevorrichtung ein Spalt

zwischen einander zugewandten Oberflächen des Zellsubstrats und des Trägers verbleibt. Der mindestens eine Aktor ist zur Erzeugung eines elektromagnetischen oder magnetischen Gradienten ausgelegt ist, der sich entlang einer imaginären Ausbreitungslinie eines steuerbaren räumlichen Gradientenfeldes erstreckt und die imaginäre Ausbreitungslinie von dem Zellsubstrat zu dem Träger verläuft.

Unter dem Begriff der Stimulation wird jede Einwirkung auf biologische Vorgänge wie das Wachstum, die Migration oder die Proliferation verstanden. Stimulationen können auch neutral oder negativ (Suppression) wirken. Die Stimulationszelle ist daher auch als Suppressionszelle verwendbar.

Anteile von Zellen oder Geweben können räumlich auf einem Zellsubstrat abgrenzbare Zellen oder Gewebe, z. B. Zellen oder Gewebe, die auf einer bestimmten Teilfläche eines Zellsubstrats getragen sind, sein. Es können auch bestimmte Zell- oder Gewebetypen sein, die stimuliert sind.

Unter einem Aktor sind nachfolgend alle Mittel zu verstehen, durch die mindestens ein Gradient einer stimulierenden Wirkung auf die Zellen oder Gewebe hervorgerufen werden kann. Stimulierende Wirkungen können fördernd (positiv), suppressiv (negativ) oder neutral sein. Stimulierende Wirkungen können vorzugsweise durch elektrische, elektromagnetische, magnetische, chemische oder physikalische Stimuli hervorgerufen werden. Der Aktor ist vorzugsweise so ausgeführt, dass der Gradient der durch ihn hervorgerufene stimulierende Wirkung (Stimuli) räumlich definiert, gerichtet und intensitätsvariabel auf das Wachstum der Zellen und Gewebe einwirkt. Der Gradient kann in seinen Eigenschaften, wie z. B. seiner Signalform, Stärke, Betrag, Intensität, Richtung und Ausdehnung, hervorgerufen und veränderlich (dosierbar) sein.

Unter einem Gradienten wird hier die Veränderung einer physikalischen Größe entlang eines Weges verstanden. Beispielsweise nimmt die Magnetfeldstärke eines Magnetfeldes mit der Entfernung von der Quelle des Magnetfeldes ab. In der Praxis ist ein Gradient nur als ein räumliches Gebilde erzeugbar, dass hier als Gradientenfeld bezeichnet wird. Das Gradientenfeld ist im Idealfall symmetrisch um eine Achse ausgebildet. Diese Achse wird hier zu Zwecken der anschaulicheren Erläuterung der Erfindung als imaginäre Ausbreitungslinie bezeichnet, durch die der oben genannte Weg vereinfacht dargestellt ist. Eine Richtungsangabe des Verlaufs der imaginären

Ausbreitungslinie (z. B. vom Zellsubstrat zum Träger) ist neutral zu verstehen. Ein Gradient kann vom Zellsubstrat in Richtung auf den Träger zu- bzw. abnehmen. Er kann auch als ein wechselnder Gradient ausgebildet sein, d.h. die Richtung seiner Zu- oder Abnahme kann wechselnd sein. Ein erzeugter Gradient wirkt vorzugsweise auch in dem Zellsubstrat, um die dort vorhandenen Zellen und / oder Gewebe zu beeinflussen, z. B. zu stimulieren. Im Folgenden wird zur Vereinfachung lediglich auf jeweils eine imaginäre Ausbreitungslinie Bezug genommen. Es ist den Fachmann klar, dass in einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle eine Mehrzahl von imaginären Ausbreitungslinien vorhanden sein können. Diese können zueinander parallel verlaufend vorhanden sein. Sie können in weiteren Ausführungen der Stimulationszelle auch voneinander verschiedene Raumlagen (nicht parallel zueinander) besitzen.

Der Träger ist vorzugsweise ein Formkörper, z. B. ein Implantatformkörper (Scaffold). Der Träger kann grundsätzlich aus jedem Material bestehen. Vorzugsweise sind Träger aber Formkörper aus mindestens einem biodegradierbaren Material, aus mindestens einem nicht-biodegradierbaren Material oder aus einer Kombination dieser Materialien oder Gewebeersatzstoffe, wobei letzteren eine Form gegeben ist.

Unter der Oberfläche des Trägers ist sowohl eine äußere, einen Umriss des Formkörpers bestimmende, Oberfläche zu verstehen, als auch eine innere Oberfläche, wie sie insbesondere bei Formkörpern aus porösem Material oder bei Formkörpern, aufweisend Vertiefungen und Hohlformen, zu finden ist.

Die Begriffe bio-degradierbar und degradierbar bedeuten, dass das betreffende Material durch biochemische Reaktionen des Gewebes (z. B. enzymatisch) sowie gegebenenfalls in Wechselwirkung mit biophysikalischen Prozessen abbaubar ist.

Das Oberteil und das Unterteil des Korpus können in weiteren Ausführungen der erfindungsgemäßen Stimulationszelle auch gleichartig, z. B. zwei Halbschalen, oder miteinander fest verbunden sein und einen geschlossenen Korpus, z. B. einen Zylinder, bilden. Durch weitere Gestaltungsformen können Unter- und Oberteil anders gestaltet sein, so dass eine klassische Trennung in Unter- und Oberteil aufgelöst ist.

In einer vorteilhaften Ausführung der erfindungsgemäßen Stimulationszelle ist mindestens eine Medienzuführung und mindestens eine Medienabführung an

mindestens einer Seite des Innenraums zur Zu- und Abführung eines Mediums vorhanden.

Durch die Medienzuführung und die Medienabführung ist eine Überwachung der Vorgänge in der Stimulationszelle durch z. B. eine Analyse des zugeführten und des abgeführten Mediums ermöglicht. Das Medium ist vorzugsweise elektrisch leitend und dient der physiologischen Versorgung der Zellen oder Gewebe.

Nachfolgend werden unter dem Begriff des Wachstums von Zellen oder Geweben alle mit einem Wachstum verbundenen Prozesse, wie z. B. Zellmigration, Differenzierung und Proliferation, verstanden. Mit der erfindungsgemäßen Stimulationszelle sind daneben auch Prozesse wie das Absterben und der Abbau von Zellen (Apoptose, Suppression) stimulierbar und, optional, auch analysierbar.

Besonders vorteilhaft an der erfindungsgemäßen Stimulationszelle ist, dass ein gerichtetes Überwachsen des Spalts durch die Zellen bzw. durch das Gewebe bewirkt ist. Es ist ausdrücklich nicht erwünscht, dass der Träger durch Zellen besiedelt wird, die sich ungewollt aus dem Zellsubstrat lösen und zu dem Träger verdriftet werden. Ein sehr günstiger Effekt des gerichteten Überwachens des Spalts liegt darin, dass nur diejenigen Zellen bzw. Gewebe den Spalt tatsächlich überwachsen, die eine Teilungsfähigkeit (Proliferationsfähigkeit) aufweisen. Zellen mit entsprechenden Defekten werden während des Vorgangs des Überwachens des Spalts entlang der imaginären ausgesiebt oder deren Anteil an der Gesamtzahl der überwachsenden Zellen wird zumindest deutlich reduziert. Außerdem sollen die Zellen, die nach dem Überwachsen des Spalts mit dem Träger in Kontakt gelangen, an diesem adhären. Je nach Material und Oberflächenbeschaffenheit sowie der vorliegenden Wachstumsbedingungen in dem Spalt wird auch die Adhäsion nur für einen Teil der Zellen erfolgreich sein. Der Träger ist im Ergebnis nahezu ausschließlich von Zellen besiedelt, die eine gute Teilungsfähigkeit und außerdem eine gute Fähigkeit zu Adhäsion an den betreffenden Träger aufweisen.

Die ermöglicht beispielsweise in vitro zu testen, welcher Träger für einen spezifischen Patienten überhaupt verträglich ist. Dazu kann das Zellsubstrat mit Zellen oder Gewebe des Patienten versehen sein. Es können, beispielsweise in parallel durchgeführten in vitro Test verschiedene Träger verwendet werden und der beste Träger, der dann auch

schon mit patienteneigenen Zellen besiedelt ist, verwendet werden. Es kann dem Patienten auch ein entsprechender neuer, unbesiedelter Träger implantiert werden. Anhand der Ergebnisse der Test kann in vivo eine Besiedlung des Trägers unterstützt werden, indem die bei dem Test als vorteilhaft erkannten Gradienten im Bereich des Spalts zwischen Wundrands und Implantat (Träger) appliziert werden.

Die Zellen oder Gewebe können sowohl auf als auch in einem von dem Träger verschiedenen Zellsubstrat vorhanden sein und werden daher durch das Zellsubstrat getragen. Das Zellsubstrat ist in dem Innenraum der Stimulationszelle angeordnet.

Ein Zellsubstrat kann jedes Material oder jedes Stoffgemisch sein, durch welches Zellen bereitgestellt sind, beispielsweise besiedelte oder beimpfte Nährmedien wie Agarose, Alginat, Mono- und Kokulturen.

Die erfindungsgemäße Stimulationszelle ist auch zur Stimulation von Biofilmen, die beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Algen und Protozoen gebildet sind, verwendbar. Außerdem können Mittel vorgesehen sein, mittels derer die Auswirkungen der Stimulationen erfassbar und analysierbar sind.

Träger und Zellsubstrat können im Verlauf des Wachstums mit einer großen Zahl von Zellen überdeckt werden, zwischen denen sich auch EZM ausbilden oder sich Gewebe differenzieren kann. Nachfolgend ist vereinfachend von Zellen die Rede, wobei aber alle möglichen zellbiologischen Strukturen und Einheiten sowie ein- und mehrzellige Organismen umfasst sein sollen.

In einer bevorzugten Ausführung der erfindungsgemäßen Stimulationszelle sind mindestens zwei Elektroden vorhanden. Diese sind zur Erzeugung räumlich und zeitlich definierter elektrischer und / oder elektromagnetischer Felder mit variabler Form, Betrag, Richtung und Intensität ausgestaltet. Die Elektroden sind ausgewählt aus einer Gruppe, umfassend gegen das Medium elektrisch leitende Elektroden, gegen das Medium elektrisch isolierte Elektroden und aus aus gegen das Medium elektrisch isolierten Elektroden und elektrisch leitenden Elektroden gebildeten Hybridelektroden. Hybridelektroden stellen eine Kombination elektrisch isolierter und elektrisch leitender Elektroden dar, entweder in dem Sinne, dass Teilbereiche der Hybridelektrode gegen das Medium isoliert und andere Teilbereiche nicht isoliert sind oder, dass beide

Elektrodentypen separat vorhanden sind, allerdings im Gegensatz zur separaten Variante der beiden Elektrodentypen nur eine identische Ansteuermöglichkeit für beide Elektrodentypen besteht. Die Elektroden können segmentiert sein.

Es können in weiteren Ausführungen der Stimulationszelle auch Clusterelektroden vorhanden sein, die aus zueinander rasterförmig angeordneten Elektroden und / oder signaltechnisch ansteuerbaren Elektroden gebildet sind.

Es ist ferner möglich, dass der Stimulationszelle mindestens ein Magnetfelderzeuger als einen Aktor zugeordnet ist, so dass die Stimulationszelle mindestens über Bereiche in einem durch den Magnetfelderzeuger erzeugten Magnetfeld angeordnet ist. Der Magnetfelderzeuger kann entlang oder um die Stimulationszelle beweglich sein. Der Magnetfelderzeuger kann beispielsweise eine Magnetspule sein.

Beispielsweise kann der Magnetfelderzeuger als Aktor, aber auch andere Aktoren, gegenüber der Stimulationszelle sowie gegenüber dem Träger beweglich sein, wodurch mittels eines Aktors Gradienten aus wechselnden Richtungen erzeugbar sind oder ein Gradient über die Oberfläche des Trägers führbar ist.

Es ist ferner möglich, dass ein Hybridaktor vorhanden ist, durch den zeitgleich oder aufeinander folgend voneinander verschiedene Gradienten hervorrufbar sind. Beispielsweise können durch einen Piezo-Stack sowohl elektrische als auch mechanische Gradienten hervorgerufen sein. Die Gradienten können gleicher oder verschiedener Natur sein, z. B. kann ein elektrischer Gradient und ein mechanotransduktorisches Gradient durch einen Hybridaktor hervorgerufen sein.

Der Aktor ist vorteilhaft so beschaffen, dass die von dem Aktor hervorgerufene stimulierende Wirkung bestimmten Teilbereichen des Zellsubstrats zugeordnet und auf diese begrenzt ist. Je nach Lage dieser Teilbereiche und Ausprägung der stimulierenden Wirkung, ist eine gerichtete Besiedlung des Trägers nur auf einer Teilfläche einer Oberfläche des Trägers stimuliert.

Zu diesem Zweck können die Elektroden segmentiert ausgebildet sein. Durch eine Segmentierung ist eine Erzeugung von elektromagnetischen oder magnetischen Feldern mit räumlich bestimmter Ausprägung, z. B. des Verlaufs der Feldlinien sowie

der Verteilung der Feldstärken, räumlich wesentlich aufgelöster möglich als mit unsegmentierten Elektroden.

In dem Innenraum kann mindestens eine Aufnahmevorrichtung zur Aufnahme des Trägers oder eines Zellsubstrats angeordnet sein. Vorzugsweise ist die Aufnahmevorrichtung so ausgebildet, dass zwischen einer Oberfläche eines in der Aufnahmevorrichtung befindlichen Trägers und einer Oberfläche eines in der Aufnahmevorrichtung befindlichen Zellsubstrats ein Spalt einstellbar ist, durch den die einander zugewandten Oberflächen des Trägers und des Zellsubstrats voneinander getrennt sind. In einer weiteren Ausführung können auch mindestens zwei Aufnahmevorrichtung so angeordnet sein, dass zwischen einer Oberfläche eines in einer Aufnahmevorrichtung befindlichen Trägers und einer Oberfläche eines in einer anderen Aufnahmevorrichtung befindlichen Zellsubstrats ein Spalt einstellbar ist, durch den die Oberflächen des Trägers und des Zellsubstrats voneinander getrennt sind. Der Träger und das Zellsubstrat können auch gemeinsam in einer entsprechend ausgebildeten Aufnahmevorrichtung gehalten sein. Vorzugsweise ist durch mindestens eine der Aufnahmevorrichtungen eine Positionierung des Trägers und / oder des Zellsubstrats in dem Innenraum ermöglicht.

Eine bevorzugte Ausführung der erfindungsgemäßen Stimulationszelle ist dadurch gegeben, dass der Träger und mindestens ein Gradient relativ zueinander beweglich sind. Dies kann durch Relativbewegungen des Trägers, des Aktors oder als kombinierter Bewegungsablauf beider ermöglicht sein.

In einer weiteren Ausführung der erfindungsgemäßen Stimulationszelle ist der Träger temporär mit mindestens einem magnetischen Körper oder einem magnetisierbaren Körper in mittelbaren oder unmittelbaren Kontakt stehend angeordnet. Dieser magnetische Körper oder magnetisierbare Körper liegt mindestens teilweise im Bereich der Feldlinien eines primären magnetischen Feldes, so dass in dem magnetischen Körper oder dem magnetisierbaren Körper durch das primäre magnetische Feld ein sekundäres magnetisches Feld veränderbar ist. Unter einer Veränderung des sekundären magnetischen Feldes wird auch dessen Erzeugung, z. B. bei einer Magnetisierung eines magnetisierbaren Körpers, verstanden. Das sekundäre magnetische Feld ist beispielsweise als Quelle einer Induktion nutzbar.

Ein Spalt im Sinne dieser Beschreibung ist ein räumlicher Spalt. Dieser liegt vor, wenn Trägerobjekt und Zellsubstrat tatsächlich voneinander beabstandet angeordnet sind. Es ist bevorzugt, dass mindestens eine der Aufnahmevorrichtungen eine Positionierung des Trägers und / oder des Zellsubstrats in dem Innenraum ermöglicht. Der Spalt weist eine Spaltbreite auf, die vorzugsweise bis zu einer Spaltbreite von 3 mm einstellbar ist. Durch den Spalt ist eine in situ Situation zwischen einer Oberfläche eines Trägers, z. B. eines Implantatformkörpers, und einem Zellsubstrat, wie einem Gewebe, nachgebildet.

Um eine Analyse der Vorgänge in der Stimulationszelle zu ermöglichen, können die Elektroden als Messmittel zur Messung elektrischer Größen ausgestaltet sein. Es ist ferner möglich, dass weitere Messmittel zur Messung physikalischer Größen angeordnet sind.

Sehr günstig ist es, wenn eine Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit vorhanden ist, die mit den Elektroden und weiteren Messmitteln verbunden ist. Die Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit kann mit einer Datenbank in Verbindung stehen.

Physikalische Stimuli wie Druck oder Beschleunigungen sind einkoppelbar, wenn in einer vorteilhaften Ausführung die Stimulationszelle mit einem gesteuerten Antrieb verbunden ist, mittels dem die Stimulationszelle gesteuert bewegbar ist.

Die Aufgabe wird ferner durch ein Verfahren zur gerichteten Stimulation des Wachstums von Zellen oder Geweben eines Zellsubstrats in Richtung auf einen von dem Zellsubstrat durch einen Spalt getrennten Träger und zur Stimulation der Adhäsion von über den Spalt gewachsenen Zellen oder Geweben an dem Träger, gelöst. Das Verfahren umfasst die Schritte:

- Einbringen eines die Zellen oder Gewebe tragenden Zellsubstrats in einen Innenraum einer Stimulationszelle;
- Einlegen eines Trägers in eine Aufnahmevorrichtung in dem Innenraum der Stimulationszelle, wobei zwischen den sich zugewandten Oberflächen des Zellsubstrats und des Trägers ein Spalt erhalten wird;
- Einbringen eines Mediums zur physiologischen Versorgung der Zellen oder Gewebe in die Stimulationszelle;
- Hervorrufen mindestens eines dosierbaren, topischen elektromagnetischen oder magnetischen Gradienten mit einer das Wachstum der Zellen oder Gewebe

stimulierenden Wirkung, der sich entlang einer imaginären Ausbreitungslinie eines steuerbaren räumlichen Gradientenfeldes erstreckt und

- Ausrichten der imaginären Ausbreitungslinie derart, dass diese durch den Spalt von dem Zellsubstrat zu dem Träger verläuft.

Die stimulierende Wirkung kann bestimmten Teilbereichen des Zellsubstrats zugeordnet und auf diese begrenzt hervorgerufen werden. Dabei ist es günstig, wenn eine räumlich gerichtete Besiedlung bestimmter Teilbereiche der besiedelbaren Bereiche, z. B. über einen Spalt hinweg, stimuliert ist.

Das Medium kann gesteuert zugeführt werden, um das Medium regelmäßig zu erneuern. Es können verschiedene Medien zugeführt werden.

Die stimulierende Wirkung ist ausgewählt aus der Erzeugung elektromagnetischer Felder, elektrischer Felder, magnetischer Felder und der Einkopplung physikalischer Stimuli.

In einer vorteilhaften Ausführung werden Messgrößen, deren Messwerte infolge von Reaktionen der Zellen und Gewebe auf die stimulierende Wirkung veränderlich sind, erfasst und gespeichert. Es können initiale Messwerte mindestens einer Messgröße zu einem initialen Messzeitpunkt erfasst und gespeichert werden und die initialen Messwerte als Referenzmesswerte für zu späteren Messzeitpunkten erfassten Messwerten verwendet werden.

Es ist ferner möglich, dass aus den Veränderungen der zu verschiedenen Messzeitpunkten erfassten und gespeicherten Messwerten Informationen über das Wachstum der Zellen oder Gewebe abgeleitet werden. Die Messwerte können zeit- oder orts aufgelöst oder zeitlich-örtlich aufgelöst erfasst werden. Zudem können die erfassten Messwerte graphisch dargestellt werden und die Informationen über das Wachstum der Zellen oder Gewebe aus der graphischen Darstellung abgeleitet werden. Ein Abgleich der Informationen mit einer Datenbank ist möglich.

Vorteilhafterweise können auf Grund der Messwerte Steuersignale zur Ansteuerung des Aktors generiert werden, um den Gradienten zu verändern. Dadurch ist es möglich, gezielt auf das Wachstum der Zellen oder Gewebe zu reagieren.

In einer weiteren Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann zwischen dem Zellsubstrat und dem Träger ein Spalt mit einer Spaltbreite eingestellt werden.

Mittels der Erfindung wird eine Testanordnung mit gegenüberliegenden Grenzschichten inklusive Spaltbereich geschaffen, in dem ein mehrdimensionales Verfahren zur Stimulation von *in vitro* Zell-/Gewebewachstum in einer definierbaren Grenzflächensituation zwischen einem gewebeähnlichen Bereich und einem Bereich in Gestalt von degradierbaren bzw. nicht degradierbaren Implantatoberflächen und / oder Gewebeersatzstoffen realisiert werden kann. Prinzipiell sollen damit medizinisch anzuwendende Verfahren auf ihre bioaktiven und / oder antiinflammatorischen Wirkungen bezüglich humaner Zellen (Osteoblasten, Endothelzellen, Plattenepithelzellen, Fibroblasten, etc.) sowie Bakterien, Pilze und anderer mikrobieller Organismen, die einen Biofilm bilden können, simulativ evaluiert und validiert, sowie stimulatив und / oder suppressiv zur biologischen *in vitro* analog zur *in situ* Situation und / oder *in vivo* in der aktuellen *in situ* Situation angewendet werden.

Um der zu simulierenden *in situ* Situation maximal nahe zu kommen, soll die Stimulationszelle:

- in allen räumlichen Dimensionen drehbar sein, um gravitative Aspekte des Zell- und Gewebewachstums auszuschließen,
- definiert wipp-, kipp-, taumel-, ping-pong- und kreisschüttelbar sein, um Zell- und Gewebewachstumsprozesse sowie auch die Biofilmentwicklung unter normalen, alltäglichen und / oder definierten Körperbewegungssituationen, wie beispielsweise bei der Physiotherapie simulieren zu können,
- definierten Gradienten (beispielsweise Druck, Kraft und Oberflächenspannung) aussetzbar sein, die körperlichen Belastungssituationen *in situ* vergleichbar sind,
- über Aufnahme- und Entnahmesysteme in Gestalt von Fassungen, Fixierungen und Aufnahmeräumen für jeweils unterschiedliche, austauschbare Träger, z. B. Implantatformkörper und Gewebeersatzstoffe, sowie für unterschiedliche Mono- und Kokulturen in Gestalt von beispielsweise Alginat- oder Agaroseblöcken besitzen,

- über mindestens eine Medienzuführung und eine Medienabführung für die generelle Versorgung der Zell- und Gewebewachstumsprozesse sowie auch die Biofilmentwicklung mit Nähr- und Sauerstoff für in vitro Langzeittest sowie für ein mikrobiologisches und / oder biochemisches Mikrotröpfchenmonitoring verfügen,
- einen Höhen-, Breiten- bzw. Abstandsverstellmechanismus für unterschiedlich dicke bzw. große, austauschbare Implantate und / oder Gewebeersatzstoffe (Träger) sowie für die Einstellung des definierten Abstands zu einem der Trägeroberfläche gegenüberliegenden Zellsubstrat sowie zu den Aktoren besitzen,
- über definierte fixe und / oder räumlich veränderliche, austauschbare Elektroden- und / oder Spulenanordnungen inklusive zu applizierender Stimulationsprofile (workflows) verfügen
- sowie, gegebenenfalls optional, mittels der erfindungsgemäßen Stimulationszelle ein biophysikalisches, nichttestabbrechendes Monitoring- / Controlling-messverfahren durchführbar sein, welches komplementär und komparativ zu den mikrobiologischen Standardtest- und Prüfverfahren benutzt werden kann, um Bibliotheken zu erstellen und den Verlauf zu dokumentieren, mit dem Ziel, auf zeit- und kostenaufwändige mikrobiologische Testverfahren verzichten zu können.

Hintergrund der Erfindung ist dabei eine in vitro / in vivo / in situ Simulation, Evaluierung und Validierung von Stimulations- und Suppressionsverfahren für die in vitro bzw. beschleunigte in situ Besiedlung von Implantaten mit autologen, humanen Zellen und Geweben, z. B. für eine verbesserte und / oder beschleunigte Ossifikation, Osteogenese und / oder Osseointegration von Trägern unterschiedlicher Entwickler und Hersteller mit möglichst geringem in vivo Einsatz.

Ziel der Erfindung ist es, mittels einer Aktor- und optionalen Sensor-Verfahrensordnung zur Erzeugung und gegebenenfalls Messung biophysikalischer / (bio-)elektrischer / (bio-)magnetischer Parameter eine mehrdimensionale, statische oder dynamische Stimulation mit optionalem Monitoring des Zell-/Gewebe-/mikrobiellen

Wachstums bei in-vitro-Tissue-Management-Prozeduren an bzw. in funktionalen, bioaktiven Trägeroberflächen und / oder Gewebeersatzstoffen zu ermöglichen.

Dazu erfolgt in vitro eine Applizierung topischer Gradienten an humanen, autologen, immortalisierten und / oder veränderten Zellen und Geweben, die in Art, Signalform, Richtung und Betrag sowie im räumlich-zeitlichen Verlauf variierbar sind, vorzugsweise an dreidimensionalen Trägern zur Stimulation des Zell- und Gewebewachstums- sowie von Biofilmbildungsprozessen durch mikrobielle Organismen. Die Zellen oder Gewebe sind dabei bereits auf dem Träger vorhanden oder gelangen in einen Wirkungsbereich eines auf der Oberfläche des Trägers hervorgerufenen Gradienten.

Es erfolgt

- eine in vitro Simulation von physiologischen oder additiv applizierten in vivo Stimulationsprozessen des Zell- und Gewebewachstums sowie der Biofilmbildung durch mikrobielle Organismen,
- eine Evaluierung und Validierung von topischen Gradienten an Oberflächen und / oder in und an Scaffolds in vitro,
- eine Optimierung des Verfahrens und Anpassung der Aktoranordnung in vitro an die in vivo bzw. in situ Situation,
- eine Extrapolation der in vitro Simulation auf die in situ Situation mit, gegebenenfalls auch nachgelagerten, ex vivo und insbesondere nachgelagerten in vivo Verfahrenskomponenten,
- eine definierte Besiedlung von Implantatkörpern beziehungsweise deren Oberflächen beziehungsweise von resorbierbaren und / oder nicht resorbierbaren Scaffolds mit autologen Zellen und Geweben zur individualmedizinischen Optimierung der Primär- und Sekundärverankerung von Implantaten und zur Vermeidung von Inflammationen durch mikrobielle Biofilmbildung auf unbesiedelten Trägerbereichen wie Implantatoberflächen oder Scaffoldinnenräumen,

- eine gezielte Beeinflussung von Adhäsion, Proliferation, Migration oder Differenzierung/ Dedifferenzierung von Zellen, Zellverbänden, Zellschichten sowie der Entwicklung der extrazellulären Matrix und
- eine gezielte Beeinflussung der Gewebsstruktur/-geometrie im Sinne einer definierten Zellausrichtung mit anschließender Ausbildung eines gerichteten Gewebeverbands.

Es ist möglich, eine mittels einer in vitro erfolgten Simulation gefundene Anordnung des Aktors oder mehrerer Aktoren sowie ein workflow auf Situationen und Anwendungen in vivo zu extrapolieren. Insbesondere können solche Anordnungen und workflows auf am Körper tragbare oder implantierbare Vorrichtungen übertragen und angewendet werden.

Anordnungsgemäß ist die äußere Gestalt der Stimulationszelle in ihren Dimensionen und ihre Form sowie deren Aktoranordnung so zu gestalten, dass der Träger in seinen in situ Dimension aufgenommen werden kann. In der Regel ist sie dafür als ein Quader mit Aufnahmevorrichtungen für den Träger ausgebildet. Bei rotationssymmetrischen oder sphärischen Trägern ist eine Zylinder-, Halbkugel- oder Kugelform sowie Kombinationen daraus vorteilhaft.

Anordnungsgemäß ist die äußere Stimulationszelle gegenüber dem innenliegenden Träger fix ausgestaltet. Der von den Wänden der Stimulationszelle umschlossene Träger kann fix oder beweglich gelagert sein. Für besondere Hohlräume kann die Anordnung auch invers ausgebildet sein, d.h. es können Teile der Stimulationszelle in z. B. Hohlräume des Trägers ragen.

Anordnungsgemäß ist der mindestens eine Aktor so angeordnet, dass er die Gesamtoberfläche des Trägers vorzugsweise in Teilflächen zerlegend mit biostimulativen beziehungsweise suppressiven Gradienten definiert in Richtung, Betrag und Signalform erreichen kann, ohne dass auf einzelne, im Innenraum anders liegende Teilbereiche mit abweichenden, weniger biostimulativen beziehungsweise suppressiven oder gar dem erfindungsgemäßen Anwendungsnutzen entgegenwirkenden Gradienten eingewirkt wird. Bei planaren Oberflächen können die Teilbereiche maximal erweitert werden oder zusammenfallen.

Anordnungsgemäß erfolgt in vitro die Applizierung topischer elektrischer, elektromagnetischer und mechanotransduktiver Gradienten / Stimuli über Aktoren innerhalb wie außerhalb der Stimulationszelle, die mindestens in einer Dimension an den Wänden beziehungsweise im Zentrum der Stimulationszelle angeordnet sind. Elektrische Stimuli werden über räumlich und zeitlich Stimulationsbereichen zugeordneten Elektrodenanordnungen eingebracht. Gravitative, mechanotransduktive sowie Beschleunigungsgradienten können über eine entsprechende, vorzugsweise dreh-, kipp- und / oder schwingbare, äußere Lagerung der Stimulationszelle in die Stimulationszelle eingebracht sein. Oberflächenspannungs- sowie Oberflächenenergiegradienten können mittels temporär an oder in dreidimensionalen Implantatformkörpern platzierbaren magnetisierbaren Elementen, z. B. Schichten, Hüllen oder Zylindern, über definiert zugeordnete magnetische Aktoren oder mechanische Belastungseinrichtungen appliziert werden.

In der Regel sind die elektrisch, beziehungsweise elektromagnetisch, wirksamen Aktoren in Gestalt von gegenüber dem leitfähigen Medium innerhalb der Stimulationszelle elektrisch leitenden und / oder elektrisch isolierten Elektroden sowie als Magnetfeldspulen, z. B. paarweise an den Innen- oder Außenwänden der Stimulationszelle sich gegenüberstehend, angeordnet. Die Spulenanordnung kann auch den Innenraum in mindestens einer Ebene umschließend ausgebildet sein. Die Feldgeometrie der von den Magnetfeldspulen hervorgerufenen Magnetfeldern ist variierbar.

Elektroden können als elektrisch leitende, nicht-isolierte Elektroden ausgeführt sein, wodurch ein Stromfluss zwischen mindestens zwei Elektroden und durch das Medium ermöglicht ist. Mittels nicht-isolierter Elektroden sind auf Stromfluss beruhende Messungen durchführbar. Sind die Elektroden elektrisch isoliert gestaltet, können mit diesen elektrische und / oder elektromagnetische Felder in dem Innenraum erzeugt und zur Messung verwendet werden. Die Elektroden können in verschiedenartigen Formen ausgebildet, z. B. streifen-, platten- oder punktförmig oder zu sogenannten Clustern zusammengefasst, sein. Die Elektroden können fest angeordnet oder frei in dem Innenraum positionierbar sein. Dadurch ist vorteilhaft eine hohe Flexibilität bei der Gestaltung der Messanordnungen gegeben. Es können mehrere nicht-isolierte Elektroden, mehrere isolierte Elektroden und Hybridelektroden angeordnet sein. Von

Vorteil ist es, wenn die Form, Anordnung und die Art und Weise der Erzeugung der elektromagnetischen Felder eine orts aufgelöste Erfassung der Messgrößen erlaubt. Die Elektroden können auch segmentiert sein. Dies kann beispielsweise durch eine räumlich definierte Anordnung einer Anzahl von Elektroden erreicht sein, wobei aus den Unterschieden der Messgrößen je Elektrode und der Kenntnis der Anordnung der jeweiligen Elektroden ein Ort der Erfassung der Messgrößen ableitbar ist.

Anordnungsgemäß kann an jeder beliebigen Teilfläche des Zellsubstrats der biostimulative und / oder suppressive Gradient in Gestalt einzelner Gradienten, Gradientenüberlagerungen und / oder Gradientenumlenkung durch Hilfsgradienten/-felder in Betrag, Richtung und Form topisch definiert und appliziert werden.

Anordnungsgemäß ermöglicht die, beispielsweise axial- und / oder planarsymmetrische, Verteilung und Platzierung der Aktoren in mindestens einer und vorzugsweise in allen drei Raumachsen verfahrensgemäß eine topisch definierte Applizierung der (bio-) stimulativen Gradienten an definierten Teilflächen des Trägers. So können bisher bekannte oder neue Stimulationsverfahren, die vorzugsweise in einer Dimension wirksam sind, mittels der Gesamtanordnung sowie einer räumlich-zeitlich topisch transformierenden Signal- und Aktorsteuerung auf dreidimensionale Träger angewendet werden.

Anordnungsgemäß ist über die Fixierung des dreidimensionalen Trägers innerhalb der Stimulationszelle auch über messtechnische Hilfsmittel, die Topographie bzw. deren Teilflächenauflösung des Formkörpers und deren räumliche Zuordnung zur Verteilung und Ausgestaltung der Aktoren zu gewährleisten, indem das Teilkoordinatensystem des Trägers in das Hauptkoordinatensystem der Stimulationszelle in der nachgelagerten Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit integriert und als Dualoberflächensystem (Innenoberfläche der Zelle zur Außenoberfläche des Trägers) berechnet wird.

Anordnungsgemäß kann es sinnvoll sein, dass die Aufnahmevorrichtung des Trägers so ausgestaltet ist, dass der Träger selbst als Teil der Stimulationsaktorik bzw. der optionalen Monitoringsensorik fungiert. Elektrische Stimuli können, beispielsweise unter Nutzung eines leitfähigen Trägers oder eines leitfähigen Teilbereichs des Trägers als Elektrode, eingebracht werden. Gleichmaßen kann der leitfähige Träger oder dessen Teilbereich auch als Messelektrode für das Monitoring dienen. Mechanische Stimuli

können beispielsweise auch durch direkte örtliche Beeinflussung (z. B. durch Bewegungen, Drehungen oder Vibrationen) des Trägers eingebracht werden.

Anordnungsgemäß kann es sinnvoll sein, dass der Träger an seinen Fixationspunkten mit der Stimulationszelle beweglich angeordnet ist, so dass eine Rotation bzw. Verschiebung dessen Oberfläche gegenüber den stimulierenden Feldern möglich ist, mit dem Ziel, einen größeren Teil oder auch die gesamte Oberfläche des Trägers in die Richtung der stimulierenden Felder zu bringen bzw. zu verschiedenen Gradienten dieser Felder ausrichten zu können.

Anordnungsgemäß kann es sinnvoll sein, dass durch den Aktor mehrere Stimuli-Typen gleichzeitig applizierbar sind. So könnten als Elektroden ausgebildete Piezo-Stacks gleichzeitig elektrische und mechanische Stimuli oder magnetisch bewegte Körper oder magnetisierbare Schichten gleichzeitig magnetische und mechanische Stimuli applizieren.

Zur Anregung der Anordnung können sowohl definierte Einzelfrequenzen als auch ganze Bänder von Frequenzen im Sinne eines Frequenzdurchlaufs sowie Gleichsignale verwendet werden. Die anregenden Signale können außerdem in ihren Amplituden und ihrer Signalform variiert werden. Die in der Anordnung vorgesehenen Elektroden können in mehrerlei Hinsicht variiert und unterschieden werden. Zum einen hinsichtlich ihrer Verbindung mit einer leitfähigen Nährlösung / einem Medium in leitende (nasse) und nichtleitende (trockene) Elektroden in Gestalt elektrisch isolierter Elektroden wie auch als elektrisch leitende, galvanische Elektroden, zum anderen hinsichtlich ihrer Geometrie, z. B. in Punkt-, Linien-, und Flächenelektroden, sowie ihrer Anordnung untereinander, z. B. in Einzelelektrodenanordnungen, Rasteranordnungen und freie Anordnungen. Weiterhin lassen sich theoretisch beliebige Kombinationen der vorgesehenen Elektroden zur Anregung verwenden. Vorteilhafterweise werden dazu die Aktoren untereinander oder mit unterschiedlichen Einzelelektroden eines Rasters über der Oberfläche bzw. unter einem besäten Träger (Gradientenerzeuger entlang des Trägers) oder einer Auswahl von Elektroden der Raster realisiert.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und Abbildungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle in einer seitlichen Schnittzeichnung;

Fig. 2 das erste Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Stimulationszelle in der Draufsicht auf das Unterteil der Stimulationszelle;

Fig. 3 das erste Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Stimulationszelle in der Draufsicht auf die Stimulationszelle mit aufgesetztem Oberteil;

Fig. 4 ein erstes Ausführungsbeispiel eines Aktors mit elektrisch isolierten und elektrisch leitenden Elektroden;

Fig. 5 ein zweites Ausführungsbeispiel eines Aktors mit elektrisch isolierten und elektrisch leitenden Elektroden als eine Hybridelektrode;

Fig. 6 ein drittes Ausführungsbeispiel eines Aktors mit elektrisch isolierten und elektrisch leitenden Elektroden als eine Clusterelektrode;

Fig. 7 ein zweites Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Stimulationszelle mit einer vertikal angeordneten Magnetfeldspule;

Fig. 8 ein drittes Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Stimulationszelle mit einer horizontal angeordneten Magnetfeldspule;

Fig. 9 ein viertes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle mit einer horizontal angeordneten Magnetfeldspule;

Fig. 10 ein fünftes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle in einer seitlichen Schnittzeichnung mit Aufnahmevorrichtung;

Fig. 11 ein sechstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle in einer seitlichen Schnittzeichnung mit Aufnahmevorrichtung;

Fig. 12 ein siebentes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle mit einem planaren magnetischem Körper in einer seitlichen Schnittzeichnung;

Fig. 13 ein achttes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle mit einem planaren magnetisierbaren Körper und Spalt in einer seitlichen Schnittzeichnung;

Fig. 14 ein neuntes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle mit einem bogenförmigen magnetisierbaren Körper in einer seitlichen Schnittzeichnung;

Fig. 15 ein zehntes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle mit einem bogenförmigen magnetisierbaren Körper und Spalt in einer seitlichen Schnittzeichnung;

Fig. 16 ein elftes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle in Explosionsdarstellung und

Fig. 17 ein Array von sechs erfindungsgemäßen Stimulationszellen in Explosionsdarstellung.

Eine erste Ausführung einer erfindungsgemäßen Stimulationszelle gemäß Fig. 1 weist als wesentliche Elemente einen aus einem Unterteil 11 und einem Oberteil 14 bestehenden und einen Innenraum 10 umschließenden Korpus, sowie als Aktoren fungierende Elektroden 1, die als elektrisch isolierte Elektroden 1a an Außenseiten der Wände des Unterteils 11 und des Oberteils 14, sowie elektrisch leitende Elektroden 1b an den Innenseiten der Wände des Unterteils 11 und des Oberteils 14 angeordnet sind. Ein als Träger 36 dienender Implantatformkörper (nicht gezeigt) aus einem biodegradierbaren Material ist in dem Innenraum 10 angeordnet. In einer seitlichen Wand des Unterteils 11 ist eine Medienzuführung 12 und in einer anderen Wand eine Medienabführung 13 zur Zu- und Abführung eines elektrisch leitenden Mediums M (nur angedeutet) in und aus dem Innenraum 10 vorhanden. Damit kann die Stimulationszelle an ein Pumpen- und Reservoir- sowie an ein Mikrotröpfchenentnahmesystem (alle nicht gezeigt) angeschlossen werden, um die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Zellen und Gewebe zu gewährleisten. Außerdem ist mit einer solchen Anordnung eine definierte Druck- und Strömungsbelastungssituation im Spaltbereich temporär oder periodisch oder dauerhaft, beispielsweise für mechanotransduktive Simulation von Belastungs- und / oder Bewegungssituationen, erzeugbar.

Aus Fig. 2 ist ersichtlich, dass alle Elektroden 1 rechteckig und planar ausgeführt sind und jeweils über Bereiche der Innen- beziehungsweise Außenwände des Unterteils 11 und des Oberteils 14 (siehe Fig. 3) reichen. In Stoßbereichen der seitlichen Wände des Unterteils 11 sind Sackbohrungen mit je einem Innengewinde 15.1 vorhanden, die eine lösbare Befestigung eines Oberteils 14 (siehe Fig. 3) mittels Schraubverbindungen erlauben. Der Träger 36 ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Die Stimulationszelle mit aufgesetztem Oberteil 14 ist in Fig. 3 gezeigt. Korrespondierend zu den Sackbohrungen mit Innengewinde 15.1 (siehe Fig. 2) sind in dem Oberteil 14 Durchgangsbohrungen 15.2 vorhanden, durch die Schrauben (nicht gezeigt) steckbar und in die Sackbohrungen mit Innengewinde 15.1 eindrehbar sind. Dargestellt sind die elektrisch isolierten Elektroden 1a des Oberteils 14 und der seitlichen Wände des Unterteils 11, sowie Medienzuführung 12 und Medienabführung 13.

In Fig. 4 sind zwei Aktoren gezeigt, die je eine elektrisch isolierte Elektrode 1a und eine elektrisch leitende Elektrode 1b aufweisen. Die elektrisch leitende Elektrode 1b ist von der elektrisch isolierten Elektrode 1a umfassen und gegeneinander elektrisch isoliert. Beide Elektroden 1 sind unsegmentiert und können als globale Elektroden bezeichnet werden. Der quadratische gestaltete Aktor kann beispielsweise in Stimulationszellen gemäß Fig. 1 bis 3 an den Grundflächen des Unterteils 11 und / oder des Oberteils 14 angeordnet sein. Der rechteckig gestaltete Aktor kann an seitlichen Wänden des Unterteils 11 und / oder des Oberteils 14 angeordnet sein.

Eine Hybridelektrode umfasst gemäß des in Fig. 5 gezeigten Ausführungsbeispiels eine gegen das Medium M elektrisch isolierte Elektrode 1a und eine elektrisch leitende Elektrode 1b, die jeweils über Anschlüsse 18 ansteuerbar sind. Eine solche Hybridelektrode kann in dem Innenraum 10 einer Stimulationszelle angeordnet sein, wodurch an den Außenwänden der Stimulationszelle angeordnete Elektroden 1 (siehe z. B. Fig. 1) ersetzbar oder ergänzbar sind.

Eine als Clusterelektrode ausgeführte Elektrode ist in Fig. 6 schematisch dargestellt. Die Clusterelektrode besteht aus einer Anzahl von einzelnen elektrisch leitenden Elektroden 1b, die, jeweils voneinander beabstandet, in einem Array angeordnet sind. Das Array (Clusterelektrodenanordnung) ist von einer äußeren Elektrode 16 (globale

Elektrode) umfassen. Zwischen der äußeren Elektrode 16 und dem Array liegt ein als Umrandung 17 bezeichneter Bereich. Die Umrandung 17 kann entweder als ein elektrisch isolierender Bereich oder als eine Massereferenzelektrode ausgebildet sein. Jede der Elektroden 1 des Arrays und die äußere Elektrode 16 weist je einen Anschluss 18 auf und ist über eine Anschlussleitung 60 mit einer Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit 65 verbunden (vereinfacht dargestellt).

In weiteren Ausführungen der erfindungsgemäßen Stimulationszelle kann das Array auch von elektrisch isolierten Elektroden 1a oder von Hybridelektroden gebildet sein.

Eine Gegenelektrode zu einer Clusterelektrode kann eine weitere Clusterelektrode, eine flächig ausgebildete elektrisch isolierte Elektrode 1a, eine flächig ausgebildete elektrisch leitende Elektrode 1b (globale Elektroden) sowie eine Kombination der vorgenannten Elektroden 1 sein. Mehrere Elektroden einer Clusterelektrode können gemeinsam angesteuert sein.

Die Elektroden 1 können auch in Gestalt von orthogonal isoliert sich kreuzenden Streifenelektroden sowie als Punkt-Ring-Elektrodencluster (nicht gezeigt) angeordnet werden.

Durch die Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit 65 sind die Elektroden 1 einzeln oder in Gruppen ansteuer- und frequenzbasiert anregbar, um die Migration, Adhäsion, Proliferation, Ausdifferenzierung und Ausbildung einer EZM, eine Bildung von Mono- und Multilayern von Zellen, eine Maturierung oder die Biofilmbildung, Suppression sowie weitere zelluläre Prozesse zu stimulieren.

In Fig. 7 ist eine Stimulationszelle gezeigt, der in einer, in vertikaler Richtung der Stimulationszelle verlaufenden, Ebene auf vier Seiten je eine Magnetfeldspule als je ein Magnetfelderzeuger 19 zugeordnet ist. Die Stimulationszelle und die Magnetfelderzeuger 19 sind so zueinander beabstandet, dass die Stimulationszelle mindestens bereichsweise in jedem der durch die Magnetfelderzeuger 19 erzeugten magnetischen Felder liegt.

Entsprechend ist die in Fig. 8 gezeigte Stimulationszelle gestaltet, der Magnetfelderzeuger 19 zugeordnet sind, die in einer, in horizontaler Richtung der Stimulationszelle verlaufenden, Ebene angeordnet sind. Die Magnetfelderzeuger 19

sind durch die Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit 65 (nicht gezeigt) steuerbar. Die magnetischen Felder sind hinsichtlich ihrer Parameter wie Geometrie und / oder Feldstärken gesteuert variierbar.

Eine die Stimulationszelle in einer Ebene vollständig umschließende Anordnung eines Magnetfelderzeugers 19 ist in Fig. 9 gezeigt. Kombinationen der vorgenannten Magnetfelderzeuger 19 sind in weiteren Ausführungen der Stimulationszelle möglich.

Die Stimulationszelle kann mit einem gesteuerten Antrieb (nicht gezeigt) in Verbindung stehen und mittels des gesteuerten Antriebs beweglich sein. Dadurch kann eine relative Bewegung des Trägers 36 zu dem Aktor und einem durch den Aktor erzeugten Gradienten bewirkt sein.

Eine weiterführende Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Stimulationszelle ist in Fig. 10 schematisch gezeigt. In dem Innenraum 10 ist eine Aufnahmevorrichtung 30 zur Aufnahme und Fixierung eines Trägers 36 in dem Innenraum 10 vorhanden. Die Aufnahmevorrichtung 30 ist symmetrisch gestaltet und erlaubt die Aufnahme und Fixierung zweier Träger 36 in Form je eines planaren Formkörpers. Die Aufnahmevorrichtung 30 ist über je einen Verstellbereich entlang aller Raumachsen verstellbar, so dass die Träger 36 innerhalb eines durch die Verstellbereiche gegebenen Raums positionierbar sind. Der Innenraum 10 ist durch ein wannenförmiges, nach einer Seite offenes Unterteil 11, sowie ein die offene Seite des Unterteils 11 überdeckendes Oberteil 14 umschlossen. Aus Gründen der Darstellbarkeit ist die Stimulationszelle hochkant gestellt gezeigt. Zwischen dem Oberteil 14 und dem Unterteil 11 ist ein umlaufender Spalt zum Gasaustausch 21 vorhanden. An einer Wand des Unterteils 11 ist an der Außenseite der Wand eine elektrisch isolierte Elektrode 1a und an der Innenseite eine elektrisch leitende Elektrode 1b vorhanden. Die Aufnahmevorrichtung 30 ragt orthogonal von der Wand des Unterteils 11 in Richtung des Oberteils 14 und durchspannt den Innenraum 10. Entlang dieser Richtung werden nachfolgend die einzelnen Elemente der Stimulationszelle beschrieben. In einem Abstand und parallel zur Wand ist ein Träger 36 gehalten. Auf seiner der Wand abgewandten Seite ist parallel zu dem Träger 36 ein Zellsubstrat 20 vorhanden, das von dem Träger 36 durch einen gleichbleibenden Spalt 55 getrennt ist. Die dem Träger 36 abgewandte Seite des Zellsubstrats 20 ist einer flächig ausgebildeten elektrisch leitenden Mittelelektrode 32b zugewandt und von dieser beabstandet. Die elektrisch

leitende Mittelelektrode 32b ist einer elektrisch isolierten Mittelelektrode 32a zugewandt und von dieser durch eine Isolation 33 getrennt. Der elektrisch isolierten Mittelelektrode 32a folgen eine Isolation 33, eine elektrisch leitende Mittelelektrode 32b, ein Zellsubstrat 20, ein Spalt 55, ein Träger 36, eine elektrisch leitende Elektrode 1b und eine elektrisch isolierte Elektrode 1a, wobei die elektrisch leitende Elektrode 1b und die elektrisch isolierte Elektrode 1a durch eine Isolation 33 getrennt sind. Der beschriebenen Anordnung von Elementen folgt das Oberteil 14. Die elektrisch isolierte Mittelelektrode 32a und die elektrisch leitende Mittelelektrode 32b sind über Anschlüsse 18 ansteuerbar. In den oben und unten dargestellten Wänden des Unterteils 11 sind jeweils eine elektrisch leitende Elektrode 1b und eine elektrisch isolierte Elektrode 1a angeordnet. In der oberen Wand ist außerdem eine Medienzuführung 12 und in der unteren Wand eine Medienabführung 13 vorhanden. Die Aufnahmevorrichtung 30 ist auch in sich verstellbar, so dass eine Spaltbreite des Spalts 55 einstellbar ist. Die Spaltbreite ist im Ausführungsbeispiel bis 350 µm einstellbar, sie kann in weiteren Ausführungen auch bis 3 mm einstellbar sein. Ein Gradient ist entlang einer imaginären Ausbreitungslinie 56 erzeugbar, die senkrecht zur Oberfläche des Zellsubstrat 20 und des Trägers 36 verläuft. Die imaginäre Ausbreitungslinie 56 dient der Veranschaulichung der Ausrichtung des Gradienten und ist daher als Strichlinie gezeigt. Außerdem gibt die Strichlinie lediglich beispielhaft nur eine imaginäre Ausbreitungslinie 56 wieder.

Ein sechstes Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Stimulationszelle weist gemäß Fig. 11 ein nach oben offenes Unterteil 11 auf, an dessen unterer Wand und an den seitlichen Wänden jeweils eine elektrisch isolierte Elektrode 1a und eine elektrisch leitende Elektrode 1b angeordnet ist. Jede seitliche Wand weist eine Medienzuführung 12 und eine Medienabführung 13 auf. In weiteren Ausgestaltungen der Stimulationszelle können auch andere Anzahlen und / oder Anordnungen der Medienzuführung 12 und der Medienabführung 13 vorhanden sein. Der Innenraum 10 ist durch das Oberteil 14 abgeschlossen und über einen horizontal verlaufenden Spalt zum Gasaustausch 21 mit der Umgebung verbunden. Das Oberteil 14 ist ohne Elektroden 1 ausgeführt. Im Bereich der Isolation 33 ist eine als Massereferenzelektrode ausgebildete Umrandung 17 vorhanden. Die Ausgestaltung der Aufnahmevorrichtung 30 und der sonstigen Elemente der Stimulationszelle entspricht Fig. 10. Die imaginäre Ausbreitungslinie 56 verläuft bezüglich der Oberfläche des

Zellsubstrats 20, des Spalts 55 und der Oberfläche des Trägers 36 nicht senkrecht, sondern ist unter einem Winkel ungleich 90°gerichtet.

Der Träger 36 kann in weiteren Ausführungen auch nicht-planar gestaltet sein. Die Spaltbreite des Spalts 55 kann auch über seine Ausdehnung veränderlich sein.

Die Geometrie und Position des Zellsubstrats 20 kann der Geometrie und der Position des Trägers 36 zur Gewährleistung eines definierten Spalts 55 angepasst werden.

Die Geometrie der Stimulationszelle kann in der Gestaltung seines Oberteils 14 und Unterteils 11 der Geometrie und Position der Träger 36 angepasst werden. Die Ober- und Unterteile 14, 11 können eine Quader-, Zylinder-, Kugel- und / oder Halbkugelform sowie alle zusammengesetzten Formen und deren Kombinationen aufweisen.

Die Träger 36 können im Innenraum 10 bezüglich der Ober- und Unterteile 14, 11, beweglich angeordnet sein. Eine dem Träger 36 geometrisch anpassbare Anordnung des Zellsubstrats 20 kann ebenfalls vorteilhaft sein. In der Stimulationszelle können auch mehrere Träger 36 angeordnet sein.

In Fig. 12 ist eine Stimulationszelle, wie sie in Fig. 1 beschrieben ist, mit einer Aufnahmevorrichtung 30 gezeigt, in der voneinander beabstandet zwei Träger 36 in je einer Fixiereinrichtung 31 gehalten sind. Der Innenraum 10 ist mit einem Medium M ausgefüllt. Zwischen den Trägern 36 ist ein magnetischer Körper 34.1 in Form einer magnetischen Platte angeordnet. Der magnetische Körper 34.1 ist durch eine Isolation 33 umschlossen, die einen Kontakt des Mediums M mit dem magnetischen Körper 34.1 verhindert, um mögliche zytotoxische Wirkungen des Materials des magnetischen Körpers 34.1 zu unterbinden. Der oben angeordnet dargestellte Träger 36 dient als Gegenlager für den magnetischen Körper 34.1 und die Isolation 33 und wird nicht besiedelt (passiver Träger 36). Durch die gezeigte Anordnung ist neben einer Stimulation mittels eines magnetischen Feldes auch eine Kraft auf eine Seite der Träger 36 aufzubringen.

In weiteren Ausführungen der Stimulationszelle können beide Träger 36 besiedelt werden und in den Innenraum 10 eingebracht sein.

Fig. 13 zeigt die Stimulationszelle, wie in Fig. 1, mit einer Aufnahmevorrichtung 30 mit Fixiereinrichtungen 31, in der zwischen zwei parallel zueinander ausgerichteten Trägern 36 ein magnetisierbarer Körper 34.2 angeordnet ist. Zwischen den Trägern 36 ist eine Isolation 33 zur elektrischen Isolation sowie zur Unterbindung zytotoxischer Wirkungen des magnetisierbaren Körpers 34.2 vorhanden. Jedem der Träger 36 ist auf der dem magnetisierbaren Körper 34.2 abgewandten Seite je ein, durch je einen Spalt 55 beabstandetes, Zellsubstrat 20 zugeordnet. Die imaginäre Ausbreitungslinie 56 verläuft senkrecht zu der Oberfläche des Zellsubstrats 20, des Spalts 55 und der Oberfläche des Trägers 36.

Je eine Variation der in Fig. 12 gezeigten Stimulationszelle zeigen die Fig. 14 und 15. In Fig. 14 ist ein halbkreisförmig gewölbter Träger 36 der Aufnahmevorrichtung 30 gehalten. Der Träger 36 ist über seine distalen Bereiche in der Fixiereinrichtung 31 gehalten, während unter einem zentralen Bereich des Trägers 36 ein kalottenförmiger, nach oben gewölbter Aufbau mehrerer Schichten vorhanden ist. Unter dem Träger 36 sind ein ebenfalls entsprechend gewölbter magnetisierbarer Körper 34.2, eine elektrisch leitende Mittelelektrode 32b und eine Isolation 33 angeordnet.

In einer Ausführung gemäß der Fig. 15 sind über dem gewölbten, zentralen Bereich des Trägers 36 zusätzlich ein ebenfalls gewölbter Spalt 55 und ein Zellsubstrat 20 vorhanden. Die imaginäre Ausbreitungslinie 56 verläuft wiederum senkrecht zu der Oberfläche des Zellsubstrats 20, des Spalts 55 und der Oberfläche des Trägers 36. Da der Spalt 55 gewölbt ist, sind die imaginären Ausbreitungslinien 56 an verschiedenen Punkten entlang des Spalts 55 bezüglich des Innenraums 10 um entlang eines Kreisausschnitts geschwenkt. Die beispielhaft gezeigten imaginären Ausbreitungslinien 56 sind zueinander nicht parallel.

Wie in den Fig. 14 und 15 dargestellt, kann ein magnetisierbarer Körper 34.2 angeordnet sein. Wird diese Anordnung mit Magnetfelderzeugern 19 kombiniert, so kann mittels magnetischer Felder mit einer definiert variierbaren Feldgeometrie ein magnetischer Gradient erzeugt werden, der, vermittelt über den magnetisierbaren Körper 34.2, auf den Träger 36 wirken kann. Damit können an der Oberfläche des Trägers 36 Spannungszustände bis hin zu Vibrationen erzeugt werden, wenn der magnetisierbare Körper 34.2 sich zumindest in einem partiell nichthomogenen Feldbereich befindet.

In weiteren Ausführungen kann auch ein magnetischer Körper 34.1 oder eine Kombination von mindestens je einem magnetischen Körper 34.1 und einem magnetisierbaren Körper 34.2 angeordnet sein.

In allen Ausführungen der Stimulationszelle können als Elektroden ausgebildete Piezo-Stacks gleichzeitig elektrische und mechanische Stimuli erzeugen.

Wie in den Figuren 16 und 17 dargestellt, kann die Stimulationszelle auch nichtfluidisch als statisches System ausgebildet sein, in dem aber ebenso eine definierte Spaltsituation mit gravitativ positiven wie negativen Gradienten erzeugt werden kann.

Gemäß Fig. 16 wird zwischen einer in einer unteren Aufnahmeeinheit für Träger mit Fixier-/ Konvektionsbereichen 41 platzierten Träger 36 oder ein Träger mit Fixier-/Konvektionsbereichen 42 mit gravitativ positiven Gradienten ein Spalt 55 mit einer Spaltbreite von 350  $\mu\text{m}$  zu einer Aufnahmeeinheit für Zellsubstrat mit Fixier-/Konvektionsbereichen 43, beinhaltend ein Zellsubstrat 44, hergestellt, auf die weiter aufbauend eine Aufnahmeeinheit 48 mit Fixier-/Konvektionsbereichen für horizontal zwei radiale Elektroden 45, die über einen isolierenden Spacer und Verbinder 47 verbunden sind, platziert werden können. Radiale Elektroden 45 sind über vertikale Bohrungen in Fixierbolzen einer Aufnahmeeinheit 48 mittels vertikaler Konnektoren 46 verbunden. Auf vorhandene obere Auflageflächen in der Aufnahmeeinheit 48 wird eine weitere Aufnahmeeinheit für ein Zellsubstrat mit Fixier-/Konvektionsbereichen 43 platziert, durch die über Distanzauflageflächen zu einer Aufnahmeeinheit für Träger mit Fixier-/Konvektionsbereichen 41 platzierten Träger mit Fixier-/Konvektionsbereichen 42 mit gravitativ negativen Gradienten einen Spalt 55 mit 350  $\mu\text{m}$  hergestellt und eine zusammengesetzte Stimulationszelle 49 gebildet ist.

In Figur 17 ist dargestellt, dass in einem gekammerten Unterteil 50 eines Stimulationszellengehäuses (6-well Format) zur Aufnahme von zusammengesetzten Stimulationszellen 49 eine 6-well-formatige Stimulationszellenanordnung 51 realisiert werden kann, die mit einem Oberteil 52 des Stimulationszellengehäuses mit Distanzbereichen für Gasaustausch und Durchleitungsöffnungen für Konnektoren 46 abgeschlossen werden kann. Über die Konnektoren 46 kann jede einzelne der sechs zusammengesetzten Stimulationszellen 49 über Anschlussleitungen 60 mit der Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit 65 (beide nicht gezeigt) in Reihe, parallel oder

einzelnen geschaltet sein. Die Flächen der planaren, oberen wie unteren Träger mit Fixier-/Konvektionsbereichen 42, die Distanzbereiche für den Gasaustausch im Oberteil 52 sowie die Medienvolumina pro well sind analog zu 6-well-Standardkultivierungssystemen parametrisierbar. Damit ist eine Vergleichbarkeit bei der Durchführung von Untersuchungen gewährleistet.

Erfindungsgemäß dient die Stimulationszelle einem nicht dynamischen, mehrdimensionalen Verfahren zur Stimulation von in vitro Zell- oder Gewebewachstum in einer definierbaren Grenzflächensituation zwischen einem gewebeähnlichen Bereich und einem Bereich in Gestalt von degradierbaren oder nicht degradierbaren Trägern 36; mit anderen Worten für die Stimulation von Wachstumsprozessen in einem in situ ähnlichen dreidimensionalen Zell- oder Gewebebereich mit gegenüberliegenden Grenzschichten inklusive eines Spalts 55.

Die Stimulation von Zellwachstumsprozessen in einer in vivo / in situ ähnlichen Situation erfolgt über ortsbezogene Erzeugung und zeitlichen Veränderung elektrischer Parameter einer Anordnung von Aktoren.

## Bezugszeichenliste

1	Elektrode
1a	elektrisch isolierte Elektrode
1b	elektrisch leitende Elektrode
10	Innenraum
11	Unterteil
12	Medienzuführung
13	Medienabführung
14	Oberteil
15.1	Sackbohrung mit Innengewinde
15.2	Durchgangsbohrung
16	äußere Elektrode
17	Umrandung
18	Anschluss
19	Magnetfelderzeuger
20	Zellsubstrat
21	Spalt für Gasaustausch
30	Aufnahmevorrichtung
31	Fixiereinrichtung
32a	elektrisch isolierte Mittelelektrode
32b	elektrisch leitende Mittelelektrode
33	Isolation
34.1	magnetischer Körper
34.2	magnetisierbarer Körper
36	Träger
41	Aufnahmeeinheit für Träger mit Fixier-/Konvektionsbereichen
42	Träger mit Fixier-/Konvektionsbereichen
43	Aufnahmeeinheit für Zellsubstrat mit Fixier-/Konvektionsbereichen
44	Zellsubstrat (für Aufnahmeeinheit 43)
45	radiale Elektroden
46	Konnektor

47	Spacer und Verbinder
48	Aufnahmeeinheit
49	zusammengesetzte Stimulationszelle
50	gekammertes Unterteil
51	Stimulationszellenanordnung
52	Oberteil
55	Spalt
56	imaginäre Ausbreitungslinie
60	Anschlussleitung
65	Auswerte-, Speicher- und Steuereinheit
M	Medium

## Patentansprüche

1. Stimulationszelle zur in vitro Stimulation von Zellen oder Geweben, mit einem einen Innenraum umschließenden Korpus aufweisend je ein Oberteil und ein Unterteil sowie mindestens einen Aktor zum Hervorrufen einer stimulierenden Wirkung auf mindestens einen Anteil der Zellen oder Gewebe, dadurch gekennzeichnet, dass
  - in dem Innenraum (10) eine Aufnahmevorrichtung (30) zur Aufnahme eines Zellsubstrats (20, 44) und eines Trägers (36) angeordnet ist, wobei nach einer Aufnahme des Zellsubstrats (20, 44) und des Trägers (36) durch die Aufnahmevorrichtung (30) ein Spalt (55) zwischen einander zugewandten Oberflächen des Zellsubstrats (20, 44) und des Trägers (36) verbleibt und
  - der mindestens eine Aktor zur Erzeugung eines elektromagnetischen oder magnetischen Gradienten ausgelegt ist, der sich entlang einer imaginären Ausbreitungslinie (56) eines steuerbaren räumlichen Gradientenfeldes erstreckt und die imaginäre Ausbreitungslinie (56) von dem Zellsubstrat (20, 44) zu dem Träger (36) verläuft.
2. Stimulationszelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Medienzuführung (12) und mindestens eine Medienabführung (13) an mindestens einer Seite des Innenraums (10) zur Zu- und Abführung eines Mediums (M) vorhanden ist.
3. Stimulationszelle nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Elektroden (1) als Aktoren vorhanden sind, wobei die Elektroden (1) zur Erzeugung räumlich und zeitlich definierter elektrischer und / oder elektromagnetischer Gradienten mit variabler Form, Betrag, Richtung und Intensität ausgestaltet sind.
4. Stimulationszelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden (1) segmentiert sind.

5. Stimulationszelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Clusterelektroden vorhanden sind, die aus zueinander rasterförmig angeordneten Elektroden (1) und / oder signaltechnisch ansteuerbaren Elektroden (1) gebildet sind.
6. Stimulationszelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Stimulationszelle mindestens ein außerhalb des Innenraums (10) angeordneter Magnetfelderzeuger (19) als ein Aktor zugeordnet ist, so dass die Stimulationszelle mindestens über Bereiche in einem durch den Magnetfelderzeuger (19) erzeugten Magnetfeld angeordnet ist.
7. Stimulationszelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Hybridaktor vorhanden ist, durch den zeitgleich oder aufeinander folgend voneinander verschiedene Gradienten hervorrufbar sind.
8. Stimulationszelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahmevorrichtung (30) so ausgebildet ist, dass der Spalt (55) einstellbar ist, durch den die einander zugewandten Oberflächen des Trägers (36) und des Zellsubstrats (20) voneinander getrennt sind.
9. Stimulationszelle nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der Aufnahmevorrichtungen (30) eine Positionierung des Trägers (36) und / oder des Zellsubstrats (20) in dem Innenraum (10) ermöglicht, so dass neben einer Positionierung des Trägers (36) auch eine relative Bewegung zwischen Träger (36) und Aktor bewirkbar ist.
10. Stimulationszelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger (36) temporär mit mindestens einem magnetischen Körper (34.1) oder einem magnetisierbaren Körper (34.2) in Kontakt steht und dieser mindestens teilweise im Bereich der Feldlinien eines primären magnetischen Feldes liegt, so dass in dem magnetischen Körper (34.1)

oder dem magnetisierbaren Körper (34.2) durch das primäre magnetische Feld ein sekundäres magnetisches Feld veränderbar ist.

11. Stimulationszelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden (1) als Messmittel zur Messung elektrischer Größen ausgestaltet sind.
12. Stimulationszelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Stimulationszelle mit einem gesteuerten Antrieb verbunden ist, mittels dem die Stimulationszelle gesteuert bewegbar ist.
13. Verfahren zur gerichteten Stimulation des Wachstums von Zellen oder Geweben eines Zellsubstrats (20, 44) in Richtung auf einen von dem Zellsubstrat (20, 44) durch einen Spalt (55) getrennten Träger (36) und zur Stimulation der Adhäsion von über den Spalt (55) gewachsenen Zellen oder Geweben an dem Träger (36), mit den Schritten:
  - Einbringen eines die Zellen oder Gewebe tragenden Zellsubstrats (20) in einen Innenraum (10) einer Stimulationszelle;
  - Einlegen eines Trägers (36) in eine Aufnahmevorrichtung (30) in dem Innenraum (10) der Stimulationszelle, wobei zwischen den sich zugewandten Oberflächen des Zellsubstrats (20, 44) und des Trägers (36) ein Spalt (55) erhalten wird;
  - Einbringen eines Mediums (M) zur physiologischen Versorgung der Zellen oder Gewebe in die Stimulationszelle;
  - Hervorrufen mindestens eines dosierbaren, topischen elektromagnetischen oder magnetischen Gradienten mit einer das Wachstum der Zellen oder Gewebe stimulierenden Wirkung, der sich entlang einer imaginären Ausbreitungslinie eines steuerbaren räumlichen Gradientenfeldes erstreckt und
  - Ausrichten der imaginären Ausbreitungslinie derart, dass diese durch den Spalt (55) von dem Zellsubstrat (20, 44) zu dem Träger (36) verläuft.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass Messgrößen, die infolge von Reaktionen der Zellen und Gewebe auf die stimulierende Wirkung veränderlich sind, erfasst und gespeichert werden.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die stimulierende Wirkung bestimmten Teilbereichen des Zellsubstrats (20) zugeordnet und auf diese begrenzt erzeugt wird.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die stimulierende Wirkung ausgewählt ist aus der Erzeugung elektromagnetischer Felder, elektrischer Felder, magnetischer Felder und der Einkopplung physikalischer Stimuli.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass initiale Messwerte mindestens einer Messgröße zu einem initialen Messzeitpunkt erfasst und gespeichert werden und die initialen Messwerte als Referenzmesswerte für zu späteren Messzeitpunkten erfassten Messwerten verwendet werden.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass aus den Veränderungen der zu verschiedenen Messzeitpunkten erfassten und gespeicherten Messwerten Informationen über das Wachstum der Zellen oder Gewebe abgeleitet werden.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Messwerte zeit- und orts aufgelöst erfasst werden.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass aufgrund der Messwerte Steuersignale zur Ansteuerung des Aktors generiert werden, um den Gradienten zu verändern.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem Zellsubstrat (20) und dem Träger (36) ein Spalt (55) mit einer Spaltbreite eingestellt werden kann.

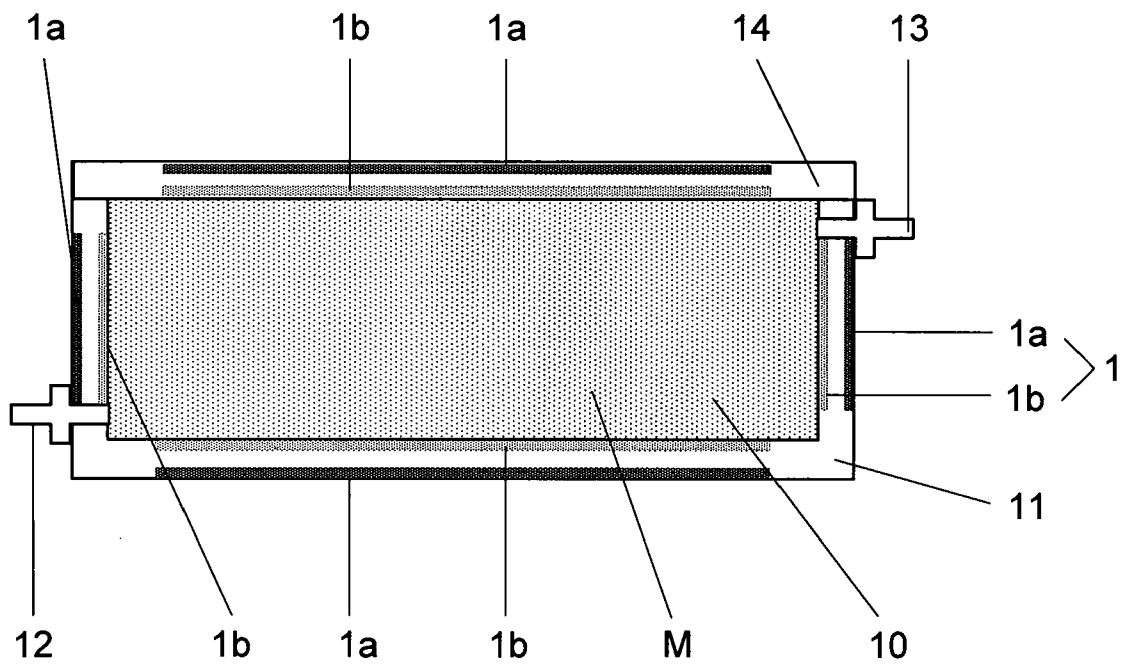


Fig. 1

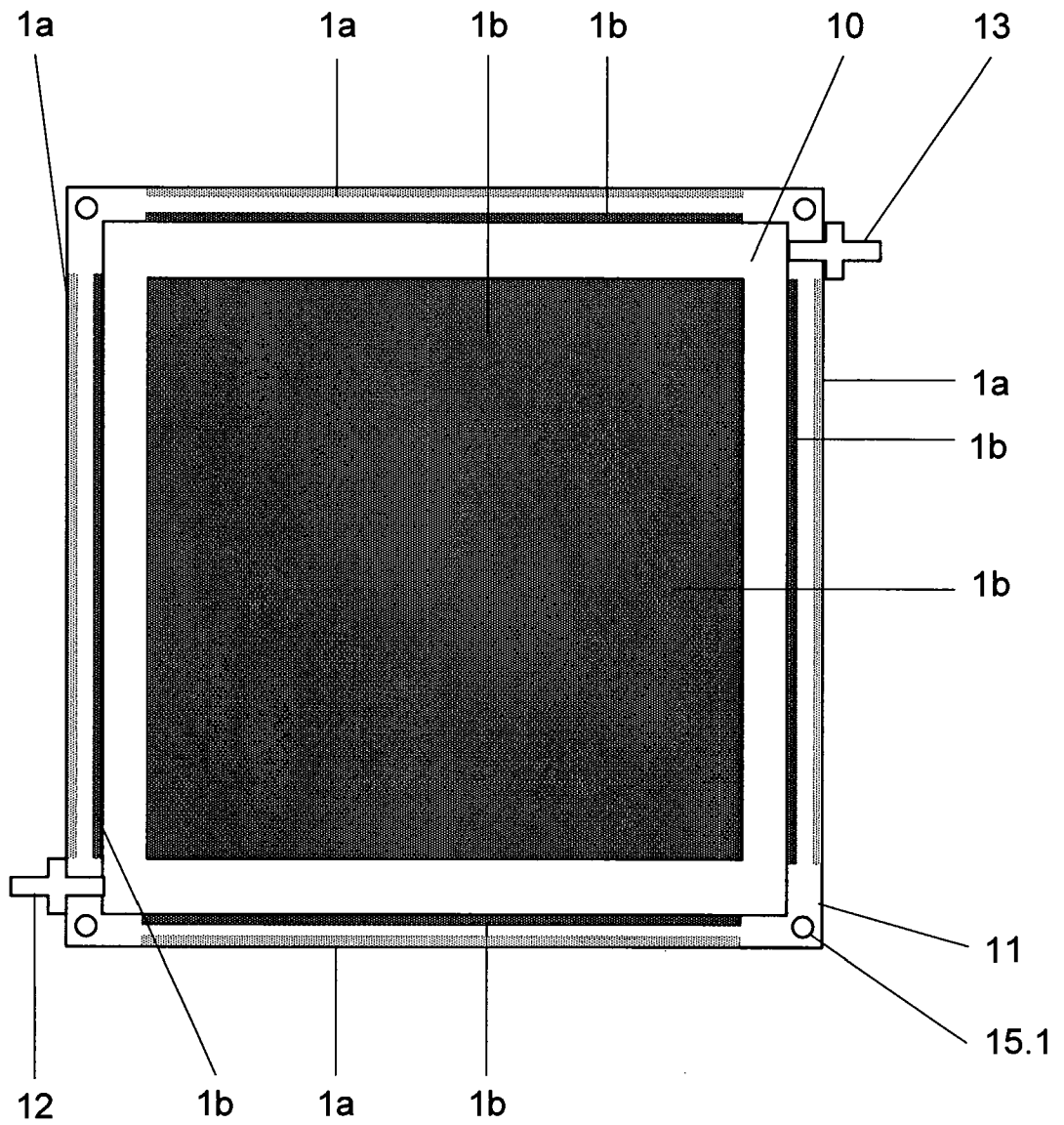


Fig. 2

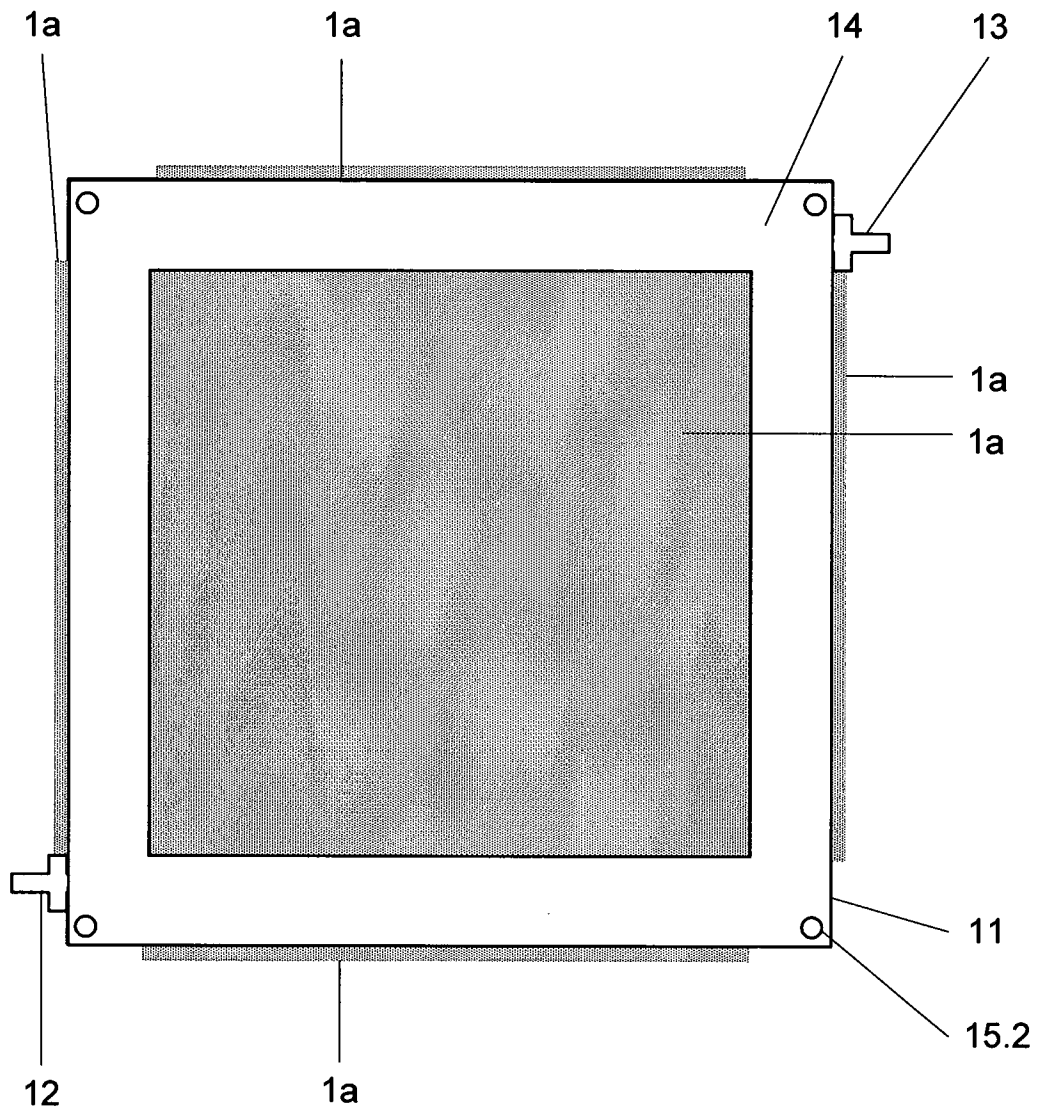


Fig. 3

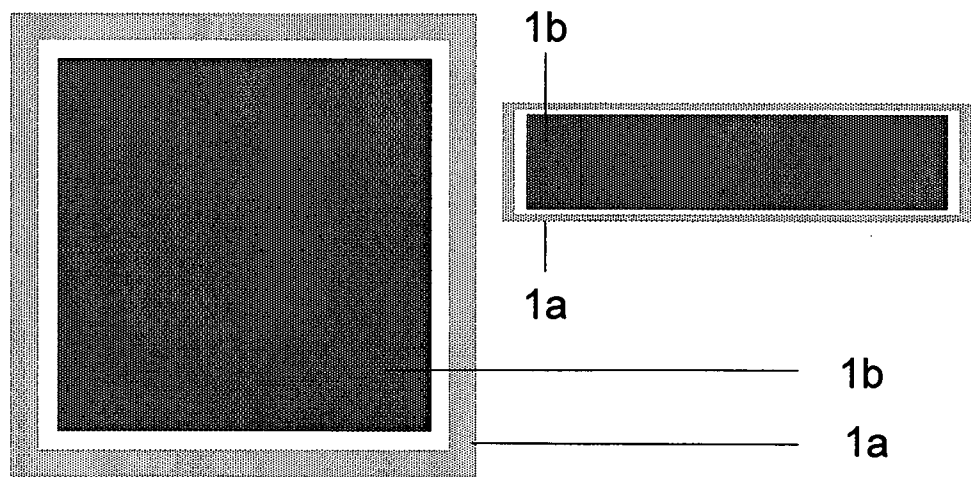


Fig. 4

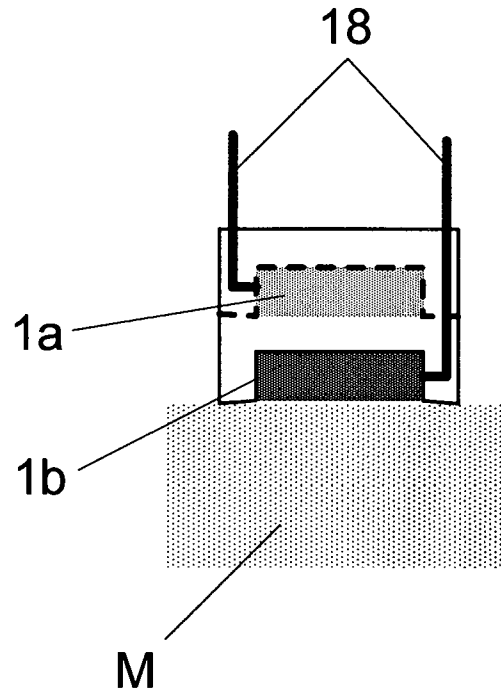


Fig. 5

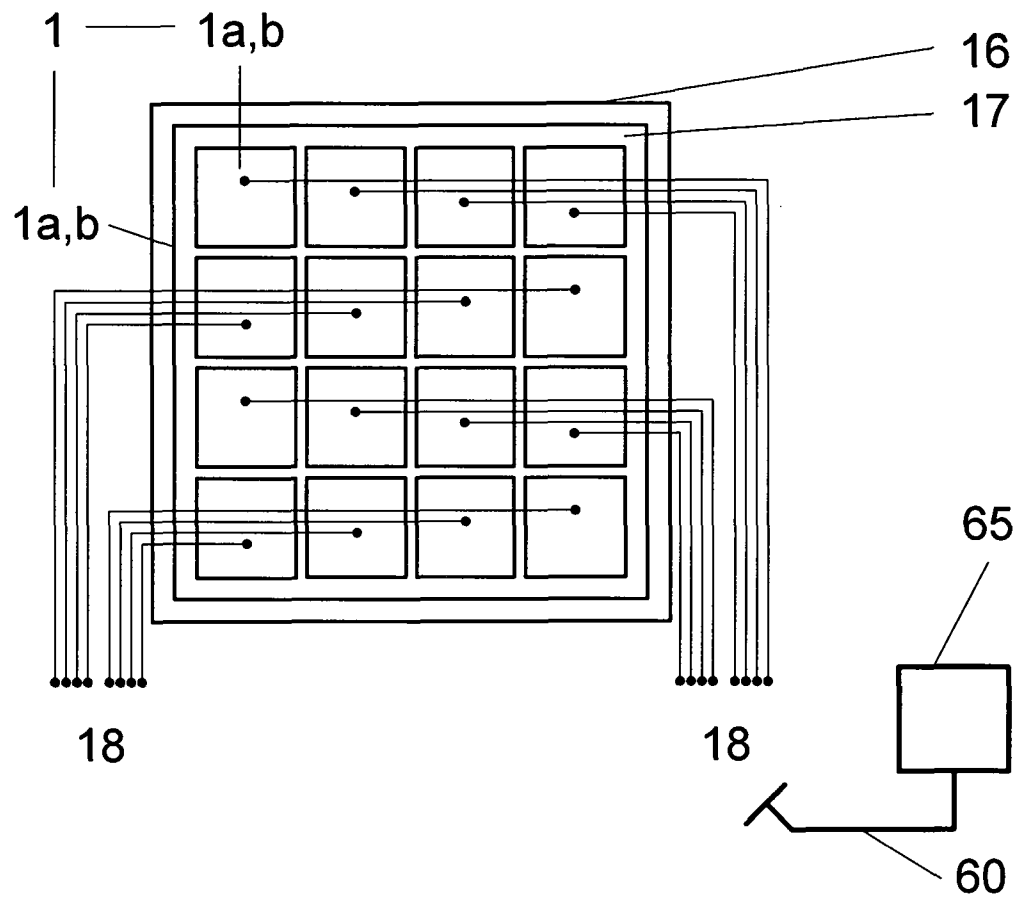


Fig. 6

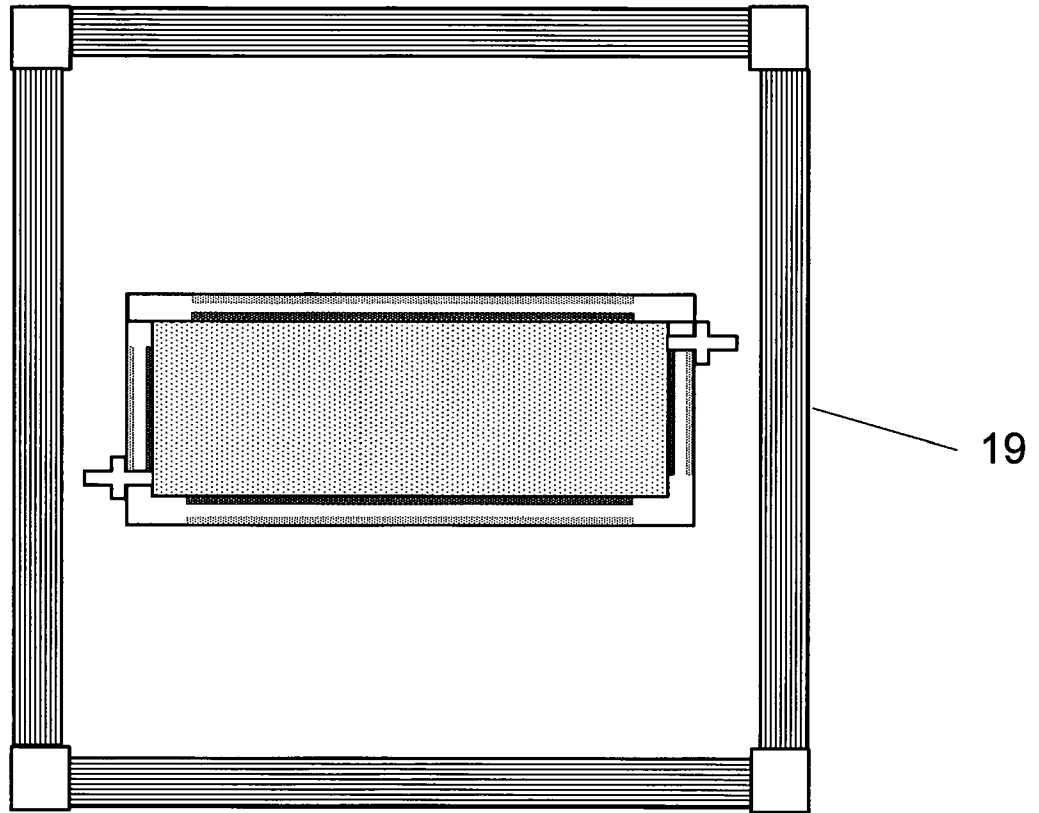


Fig. 7

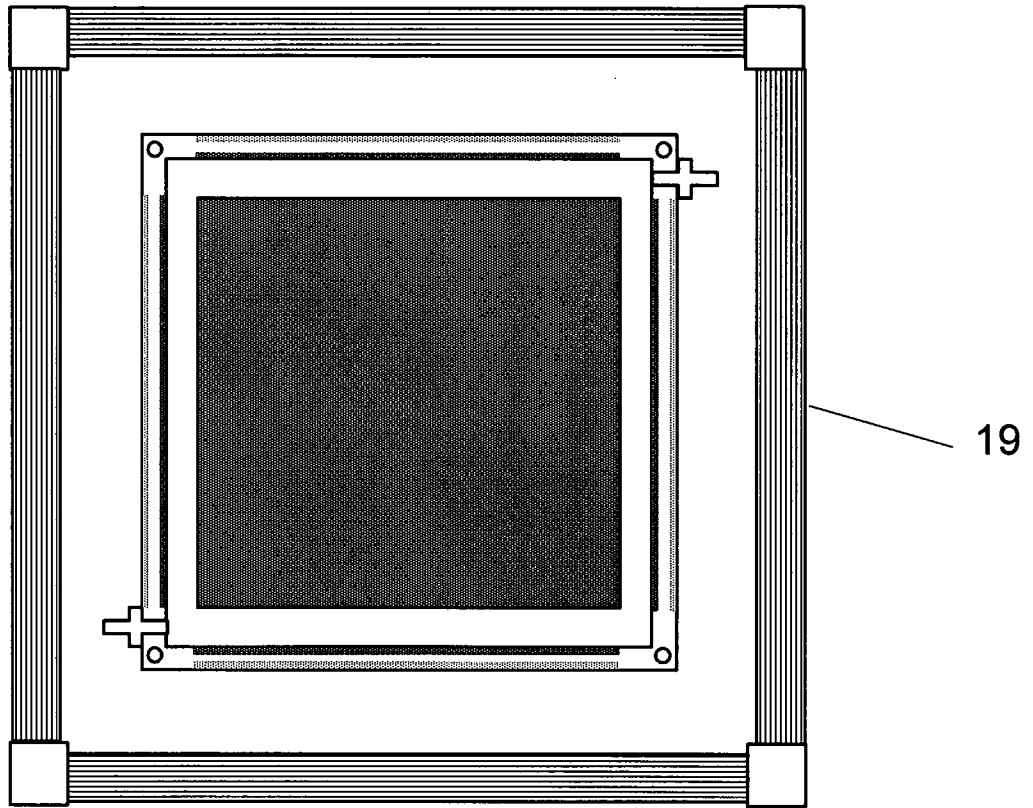


Fig. 8

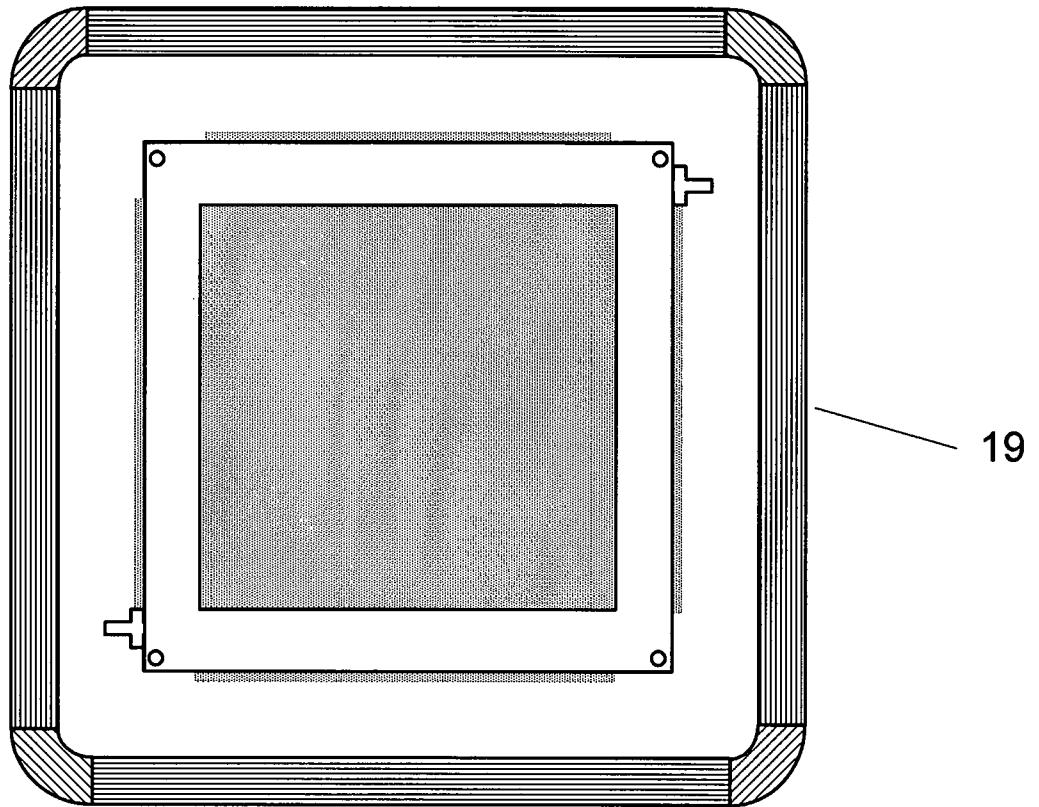


Fig. 9

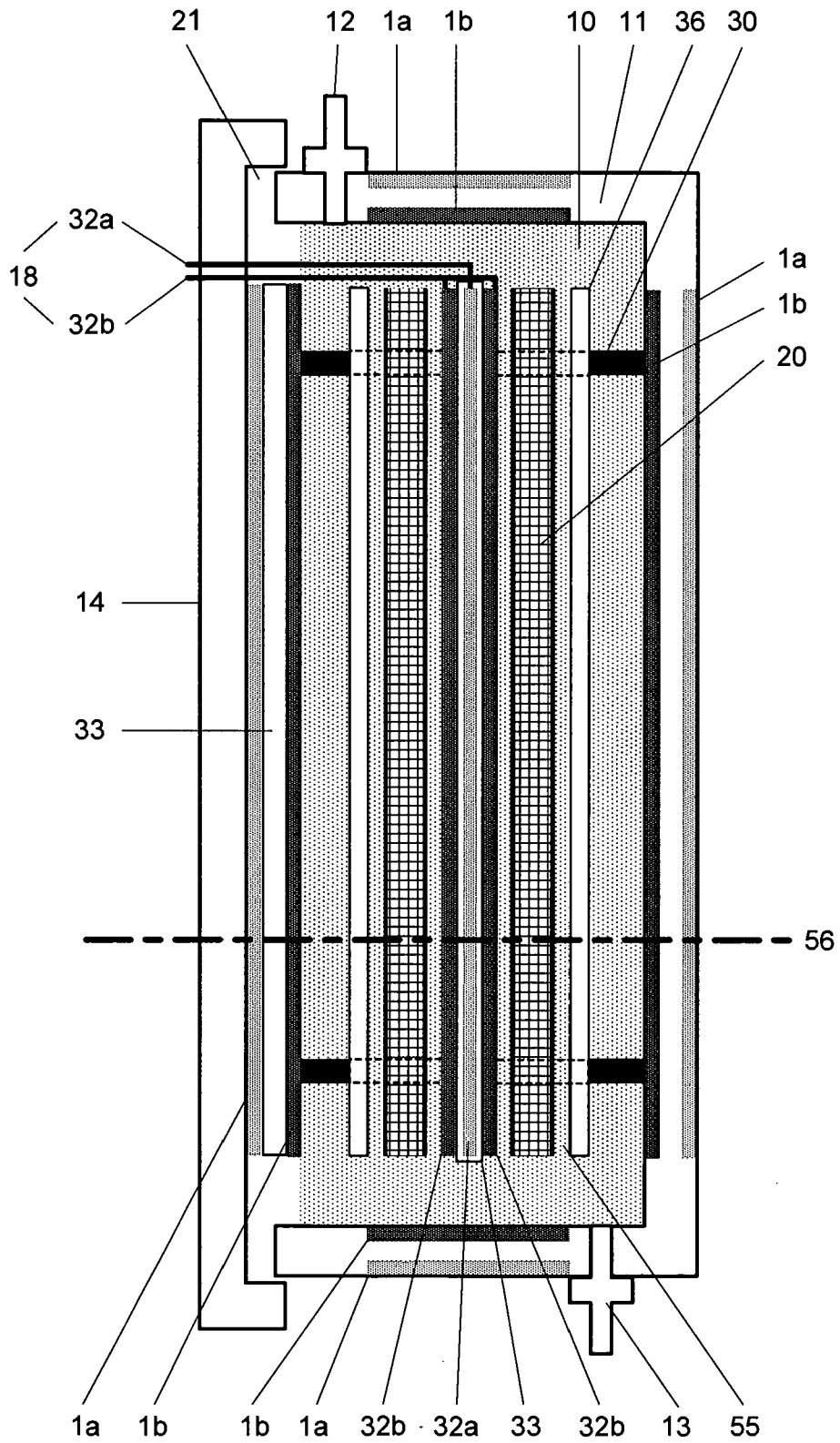


Fig. 10

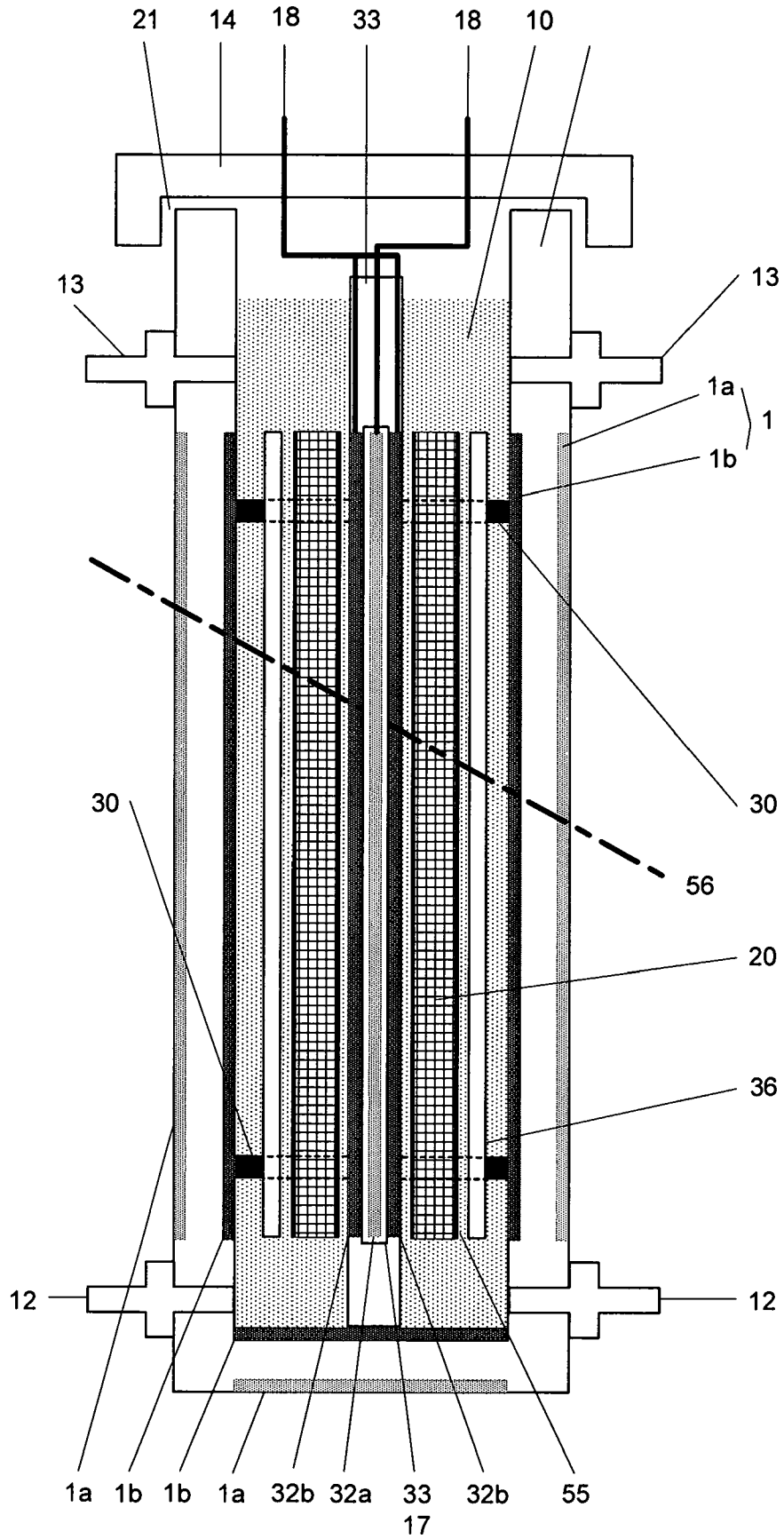


Fig. 11

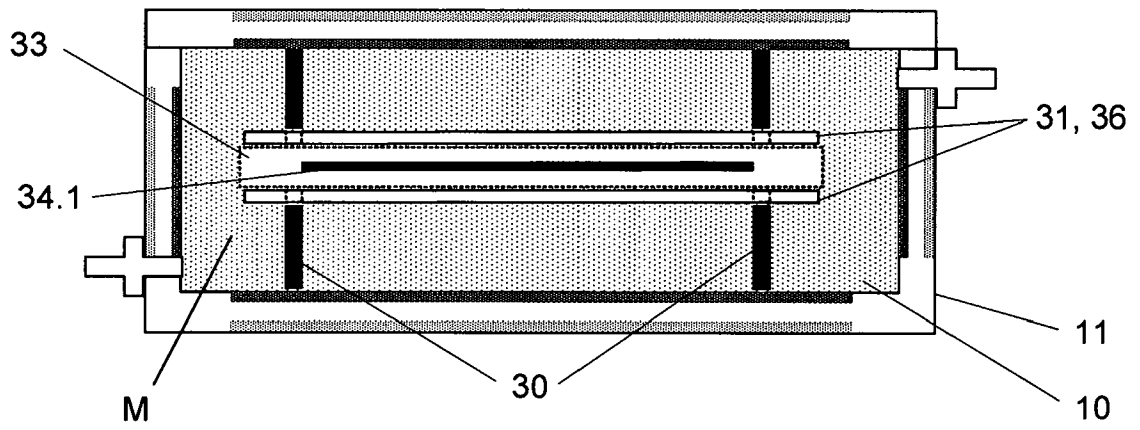


Fig. 12

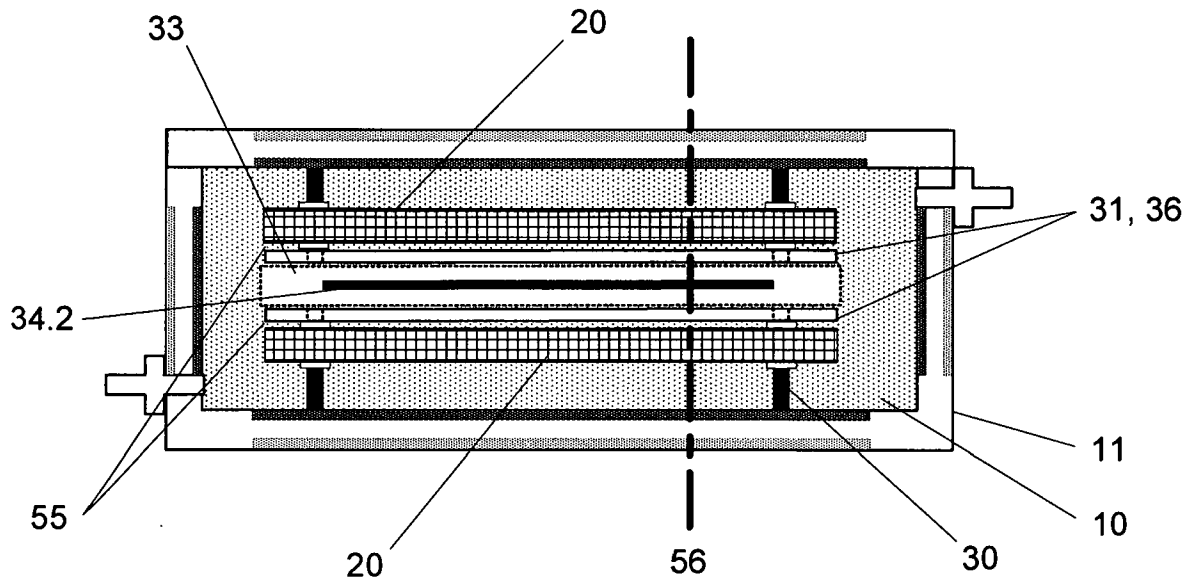


Fig. 13

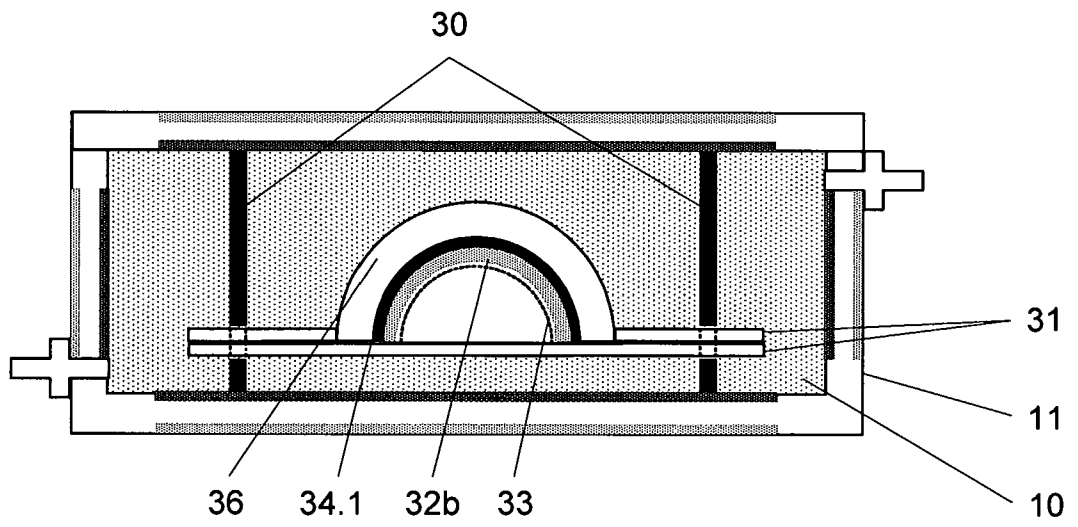


Fig. 14

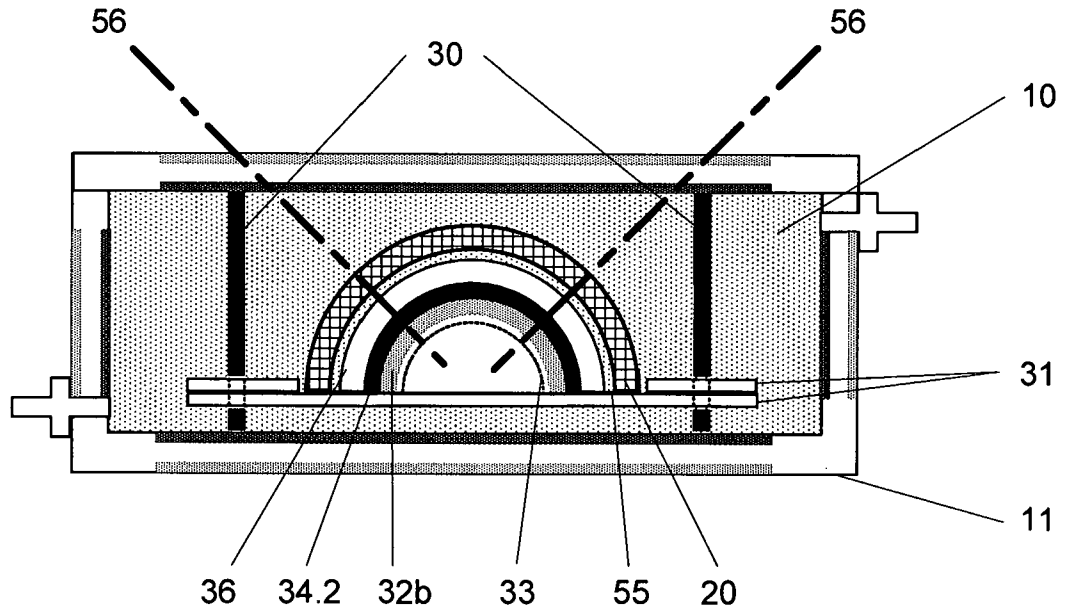


Fig. 15

16/17

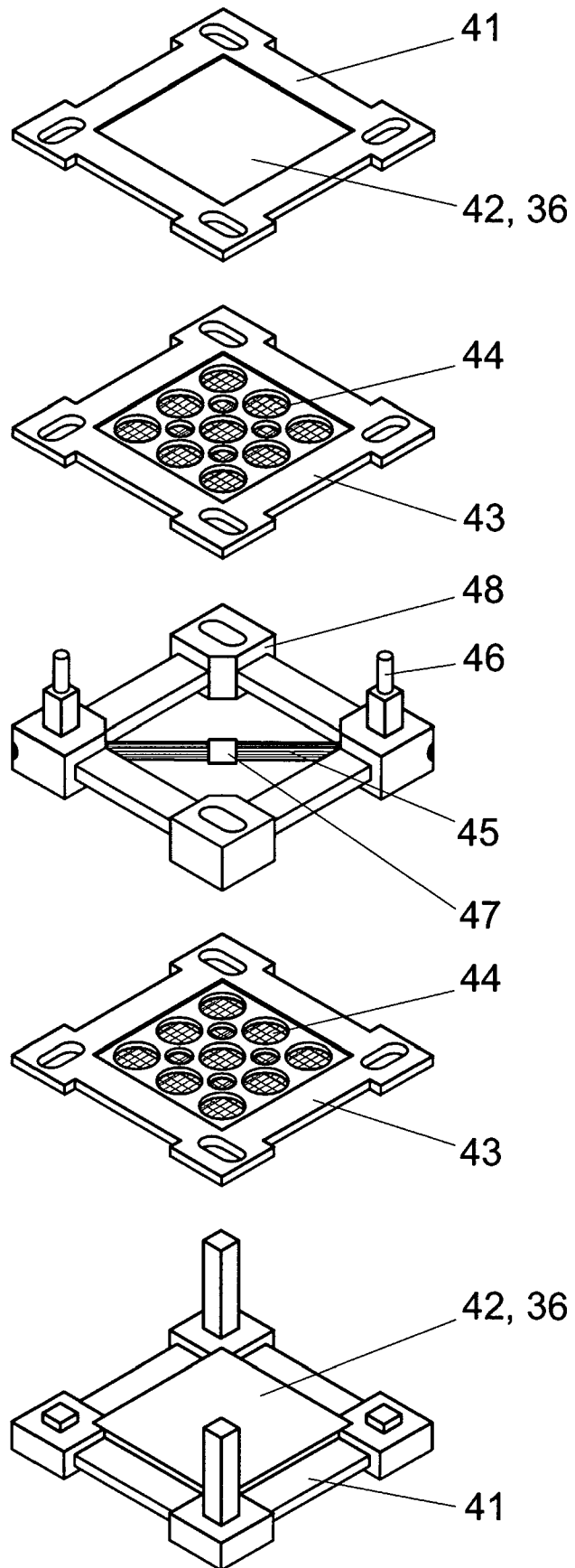


Fig. 16

ERSATZBLATT (REGEL 26)

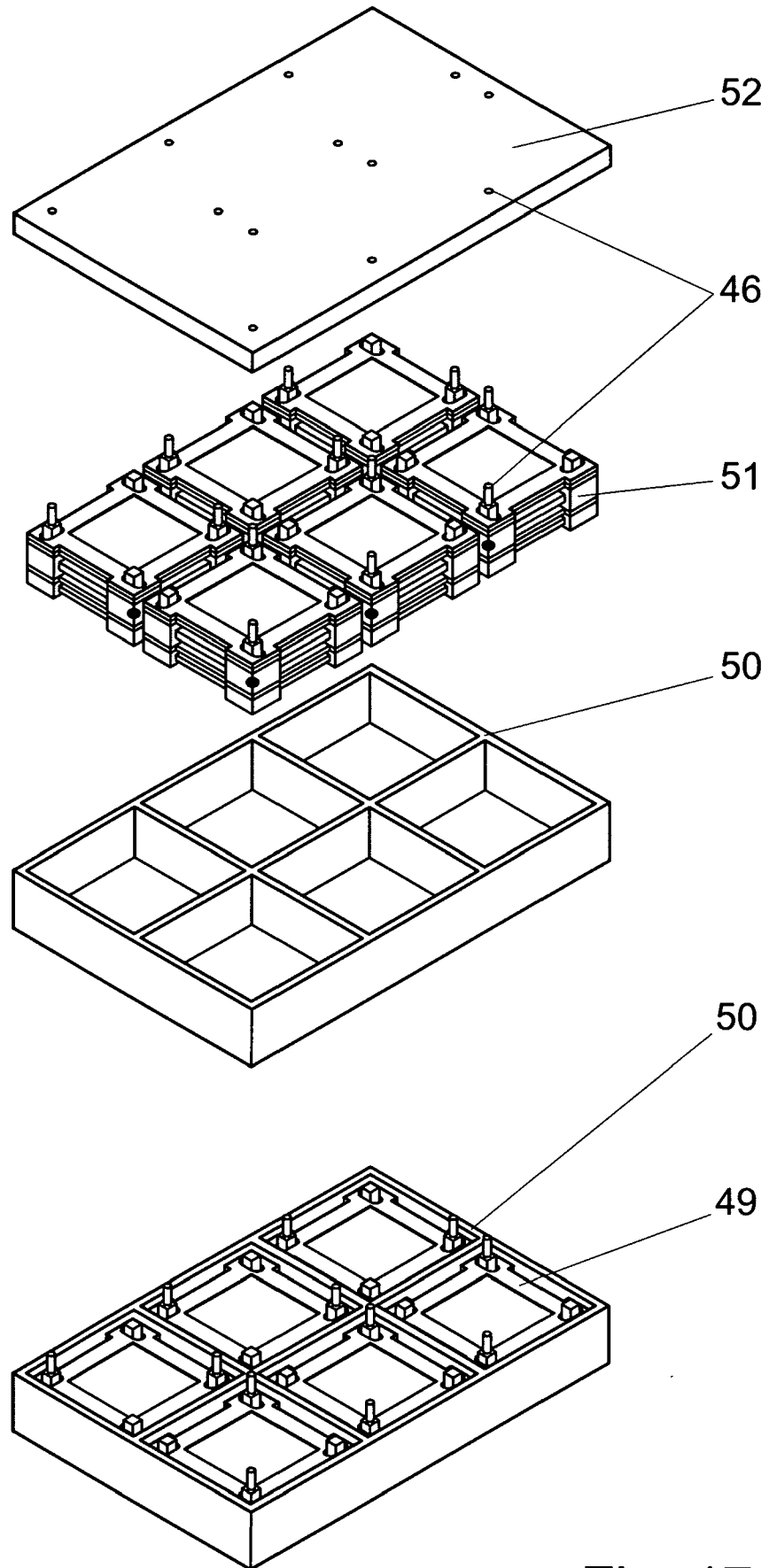


Fig. 17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/DE2013/100047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. C12M3/00 C12M1/00 C12M1/42  
 ADD.  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/129671 A2 (SAYRE CHAUNCEY [US]) 11 November 2010 (2010-11-11)	1,3,8, 11, 13-19,21
Y	pages 4-6 page 10; claims; figure 1	2,6
Y	DE 37 35 702 A1 (ATHENSTAEDT HERBERT DR DR [DE]) 16 March 1989 (1989-03-16) cited in the application	2,6
A	column 4 - column 6; figures	1,13
A	WO 99/45097 A2 (TISSUE ENG INC [US]) 10 September 1999 (1999-09-10) page 2 - page 5 pages 8,11,12 pages 15,17; claims	1,13
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  23 May 2013	Date of mailing of the international search report  03/06/2013
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Böhm, Ingo
--	--------------------------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2013/100047

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 2004 054125 A1 (MINUCELLS AND MINUTISSUE VERTR [DE] MINUCELLS AND MINUTISSUE VERTRIEBS) 11 May 2006 (2006-05-11) cited in the application paragraph [0024]; claims; figure 1 -----	1,13
A	US 2004/058434 A1 (GAULT PHILIPPE [FR]) 25 March 2004 (2004-03-25) cited in the application paragraphs [0001], [0002], [0012], [0016] claim 26 -----	1,13
A	WO 2005/040332 A2 (UNIV LEIPZIG [DE]; SCHULZ RONNY [DE]; BADER AUGUSTINUS [DE]) 6 May 2005 (2005-05-06) pages 9,11 claims; figures -----	1,13
A	WO 2005/102188 A1 (IVIVI TECHNOLOGIES INC [US]; PILLA ARTHUR A [US]; DIMINO ANDRE [US]) 3 November 2005 (2005-11-03) pages 1,5,8 -----	1,13
A	WO 03/002710 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 9 January 2003 (2003-01-09) page 3 claims; figures 1a-1f -----	1,13
A	EP 0 128 565 A2 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH [DE]) 19 December 1984 (1984-12-19) page 4; claims -----	1,13
A	DE 100 61 704 A1 (BAUER HANS JOERG [DE]) 20 June 2002 (2002-06-20) cited in the application paragraphs [0001], [0028], [0029], [0032], [0040], [0044] -----	1,13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2013/100047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010129671 A2	11-11-2010	US 2012129224 A1 WO 2010129671 A2	24-05-2012 11-11-2010
DE 3735702 A1	16-03-1989	NONE	
WO 9945097 A2	10-09-1999	CA 2322831 A1 EP 1086206 A2 JP 2002505098 A US 6066495 A US 6281007 B1 WO 9945097 A2	10-09-1999 28-03-2001 19-02-2002 23-05-2000 28-08-2001 10-09-1999
DE 102004054125 A1	11-05-2006	NONE	
US 2004058434 A1	25-03-2004	BR 0206680 A CA 2439731 A1 CN 1507488 A EP 1366145 A1 FR 2821853 A1 JP 2004528832 A PL 362575 A1 US 2004058434 A1 WO 02072750 A1	10-02-2004 19-09-2002 23-06-2004 03-12-2003 13-09-2002 24-09-2004 02-11-2004 25-03-2004 19-09-2002
WO 2005040332 A2	06-05-2005	CA 2543374 A1 CN 1898375 A DE 10349484 A1 EP 1675939 A2 JP 2007508830 A RU 2370534 C2 WO 2005040332 A2	06-05-2005 17-01-2007 25-05-2005 05-07-2006 12-04-2007 20-10-2009 06-05-2005
WO 2005102188 A1	03-11-2005	AU 2005234749 A1 BR PI0509444 A CA 2563660 A1 CN 1980610 A EP 1740107 A1 JP 2007532284 A KR 20070024533 A NZ 551316 A US 2005251229 A1 US 2010179373 A1 WO 2005102188 A1 ZA 200609524 A	03-11-2005 04-09-2007 03-11-2005 13-06-2007 10-01-2007 15-11-2007 02-03-2007 28-03-2008 10-11-2005 15-07-2010 03-11-2005 27-12-2007
WO 03002710 A2	09-01-2003	AT 340852 T AU 2002345965 B2 CA 2451580 A1 CN 1729285 A DE 60215029 T2 EP 1421172 A2 JP 4115935 B2 JP 2004533837 A MX PA03011923 A US 2003032946 A1 WO 03002710 A2	15-10-2006 14-09-2006 09-01-2003 01-02-2006 25-10-2007 26-05-2004 09-07-2008 11-11-2004 26-03-2004 13-02-2003 09-01-2003
EP 0128565 A2	19-12-1984	DE 3321238 A1	13-12-1984

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2013/100047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		DK 285784 A	12-12-1984
		EP 0128565 A2	19-12-1984
		JP S609491 A	18-01-1985
		JP H0256074 B2	29-11-1990
		US 4784954 A	15-11-1988
		US 4971910 A	20-11-1990
-----			
DE 10061704	A1	20-06-2002	DE 10061704 A1
			EP 1341900 A2
			US 2004096430 A1
			WO 0248317 A2
-----			

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2013/100047

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 INV. C12M3/00 C12M1/00 C12M1/42  
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

**B. RECHERCHIERTER GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 C12M

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2010/129671 A2 (SAYRE CHAUNCEY [US]) 11. November 2010 (2010-11-11)	1,3,8, 11, 13-19,21
Y	Seiten 4-6 Seite 10; Ansprüche; Abbildung 1 -----	2,6
Y	DE 37 35 702 A1 (ATHENSTAEDT HERBERT DR DR [DE]) 16. März 1989 (1989-03-16) in der Anmeldung erwähnt	2,6
A	Spalte 4 - Spalte 6; Abbildungen -----	1,13
A	WO 99/45097 A2 (TISSUE ENG INC [US]) 10. September 1999 (1999-09-10) Seite 2 - Seite 5 Seiten 8,11,12 Seiten 15,17; Ansprüche -----	1,13
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen  Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
23. Mai 2013	03/06/2013

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Böhm, Ingo
--	---

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 10 2004 054125 A1 (MINUCELLS AND MINUTISSUE VERTR [DE] MINUCELLS AND MINUTISSUE VERTRIEBS) 11. Mai 2006 (2006-05-11) in der Anmeldung erwähnt Absatz [0024]; Ansprüche; Abbildung 1 -----	1,13
A	US 2004/058434 A1 (GAULT PHILIPPE [FR]) 25. März 2004 (2004-03-25) in der Anmeldung erwähnt Absätze [0001], [0002], [0012], [0016] Anspruch 26 -----	1,13
A	WO 2005/040332 A2 (UNIV LEIPZIG [DE]; SCHULZ RONNY [DE]; BADER AUGUSTINUS [DE]) 6. Mai 2005 (2005-05-06) Seiten 9,11 Ansprüche; Abbildungen -----	1,13
A	WO 2005/102188 A1 (IVIVI TECHNOLOGIES INC [US]; PILLA ARTHUR A [US]; DIMINO ANDRE [US]) 3. November 2005 (2005-11-03) Seiten 1,5,8 -----	1,13
A	WO 03/002710 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 9. Januar 2003 (2003-01-09) Seite 3 Ansprüche; Abbildungen 1a-1f -----	1,13
A	EP 0 128 565 A2 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH [DE]) 19. Dezember 1984 (1984-12-19) Seite 4; Ansprüche -----	1,13
A	DE 100 61 704 A1 (BAUER HANS JOERG [DE]) 20. Juni 2002 (2002-06-20) in der Anmeldung erwähnt Absätze [0001], [0028], [0029], [0032], [0040], [0044] -----	1,13

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2013/100047

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2010129671 A2	11-11-2010	US 2012129224 A1 WO 2010129671 A2	24-05-2012 11-11-2010
DE 3735702 A1	16-03-1989	KEINE	
WO 9945097 A2	10-09-1999	CA 2322831 A1 EP 1086206 A2 JP 2002505098 A US 6066495 A US 6281007 B1 WO 9945097 A2	10-09-1999 28-03-2001 19-02-2002 23-05-2000 28-08-2001 10-09-1999
DE 102004054125 A1	11-05-2006	KEINE	
US 2004058434 A1	25-03-2004	BR 0206680 A CA 2439731 A1 CN 1507488 A EP 1366145 A1 FR 2821853 A1 JP 2004528832 A PL 362575 A1 US 2004058434 A1 WO 02072750 A1	10-02-2004 19-09-2002 23-06-2004 03-12-2003 13-09-2002 24-09-2004 02-11-2004 25-03-2004 19-09-2002
WO 2005040332 A2	06-05-2005	CA 2543374 A1 CN 1898375 A DE 10349484 A1 EP 1675939 A2 JP 2007508830 A RU 2370534 C2 WO 2005040332 A2	06-05-2005 17-01-2007 25-05-2005 05-07-2006 12-04-2007 20-10-2009 06-05-2005
WO 2005102188 A1	03-11-2005	AU 2005234749 A1 BR PI0509444 A CA 2563660 A1 CN 1980610 A EP 1740107 A1 JP 2007532284 A KR 20070024533 A NZ 551316 A US 2005251229 A1 US 2010179373 A1 WO 2005102188 A1 ZA 200609524 A	03-11-2005 04-09-2007 03-11-2005 13-06-2007 10-01-2007 15-11-2007 02-03-2007 28-03-2008 10-11-2005 15-07-2010 03-11-2005 27-12-2007
WO 03002710 A2	09-01-2003	AT 340852 T AU 2002345965 B2 CA 2451580 A1 CN 1729285 A DE 60215029 T2 EP 1421172 A2 JP 4115935 B2 JP 2004533837 A MX PA03011923 A US 2003032946 A1 WO 03002710 A2	15-10-2006 14-09-2006 09-01-2003 01-02-2006 25-10-2007 26-05-2004 09-07-2008 11-11-2004 26-03-2004 13-02-2003 09-01-2003
EP 0128565 A2	19-12-1984	DE 3321238 A1	13-12-1984

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2013/100047

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
		DK 285784 A	12-12-1984
		EP 0128565 A2	19-12-1984
		JP S609491 A	18-01-1985
		JP H0256074 B2	29-11-1990
		US 4784954 A	15-11-1988
		US 4971910 A	20-11-1990
-----			
DE 10061704	A1	20-06-2002	DE 10061704 A1
			EP 1341900 A2
			US 2004096430 A1
			WO 0248317 A2
-----			