

(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
2. Oktober 2014 (02.10.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/154679 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 5/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/055940

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. März 2014 (25.03.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2013 005 198.3 25. März 2013 (25.03.2013) DE

(71) Anmelder: BIOREGENERATION GMBH [DE/DE];
Eichenstr. 15, 82061 Neuried (DE).

(72) Erfinder: BERTHOLDT, Günter; Tulpenstraße 16,
82110 Germering (DE).

(74) Anwalt: PATENTANWÄLTE KEILITZ & SÖLLNER
PARTNERSCHAFT; Niggerstr. 4, 81675 München (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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA,
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,
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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

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

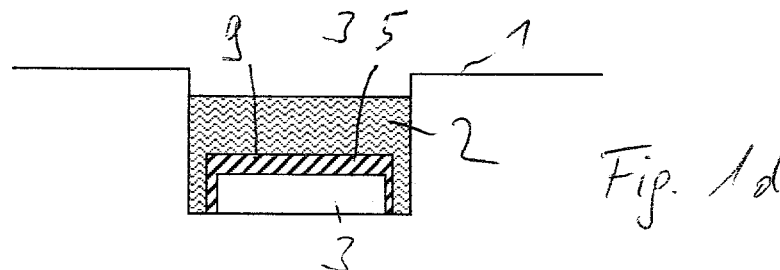
— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PRODUCING A CELL CULTURE OF HUMAN OR ANIMAL CELLS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM HERSTELLEN EINER ZELLKULTUR AUS MENSCHLICHEN
ODER TIERISCHEN ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a cell culture (9) of human or animal cells, more particularly
mammalian cells, for the purpose of implementing medical or pharmacological assays. In accordance with the invention, the method
comprises at least the following steps: inserting a substrate (3) of microbially produced cellulose into a vessel (1); introducing a
nutrient solution (2) into the vessel (1); applying human or animal cells (4) to the substrate (3); conditioning of the vessel contents to
approximately body temperature; and waiting until the substrate (3) is completely covered by a cell lawn (5), i.e. confluence has
been reached. Medical or pharmacological assays can then be carried out on the cell culture (9) thus produced.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen einer Zellkultur (9) aus menschlichen oder tierischen
Zellen, insbesondere Säugetierzellen, zum Durchführen medizinischer oder pharmakologischer Tests. Gemäß der Erfindung umfasst
das Verfahren wenigstens die folgenden Schritte: Einlegen eines Substrats (3) aus mikrobiell hergestellter Zellulose in ein Gefäß (1);
Einfüllen einer Nährstofflösung (2) in das Gefäß (1); Aufbringen von menschlichen oder tierischen Zellen (4) auf das Substrat (3);
Temperieren des Gefäßinhalts auf etwa Körpertemperatur; und Warten, bis das Substrat (3) komplett von einem Zellrasen (5)
bedeckt ist, d.h. Konfluenz erreicht wurde. An der so hergestellten Zellkultur (9) können dann medizinische oder pharmakologische
Tests durchgeführt werden.

WO 2014/154679 A1

Beschreibung

5 Verfahren und Vorrichtung zum Herstellen einer Zellkultur aus menschlichen
oder tierischen Zellen

Stand der Technik

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen einer Zellkultur aus menschlichen oder tierischen Zellen gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1, eine Mikrotiterplatte mit mehreren Nöpfchen, die mit einer Zellkultur befüllt sind, gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 12, sowie eine Verwendung einer Zellkultur gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 14.

Medizinische oder pharmakologische Tests, bei denen die Wirkung bestimmter Wirkstoffe untersucht wird, werden in der Regel an Zellkulturen aus menschlichen oder tierischen Säugetierzellen durchgeführt. Dabei wird die Zellkultur den zu testenden Stoffen ausgesetzt und die Reaktion der Zellen untersucht.

Für medizinische oder pharmakologische Tests werden heute in der Regel Zellkulturen verwendet, bei denen die Zellen auf einer Oberfläche, wie z.B. auf dem Boden eines Zellkulturgefäßes anhaften. Dazu wird eine Suspension aus menschlichen oder tierischen Zellen in ein Gefäß pipettiert, in dem eine Nährlösung enthalten ist. Die Zellen sedimentieren dann in der Nährlösung und setzen sich am Boden des Gefäßes ab. Dort heften sie sich an und teilen sie sich mit einer Teilungsrate, die im Wesentlichen von den in der Nährlösung enthaltenen Wachstumsfaktoren abhängig ist. Nach wenigen Tagen bildet sich am Boden des Gefäßes ein sogenannter Zellrasen, der den Boden vollständig bedeckt. Dieser Zellrasen ist jedoch nur eine begrenzte Zeit stabil. Wenn die Zellen zu lange im Gefäß verbleiben – in der Regel nach einigen Tagen – heben sich die Zellen vom Boden des Gefäßes ab und sterben. Es ist daher erforderlich, in regelmäßigen Abständen eine sogenannte Passage durchzuführen, bei der die Zellen vom Gefäßboden mittels eines Enzyms

abgelöst, gewaschen, vereinzelt und dann in ein anderes Gefäß zur erneuten Zellteilung hinein pipettiert werden. Dieser Prozess wird Passagieren genannt und üblicherweise von Hand durchgeführt. Er ist relativ aufwendig und teuer. Darüber hinaus verändern die Zellen nach jeder Passage, ihren Phänotyp sowie ihre spezifischen Eigenschaften. D.h. sie dedifferenzieren und entwickeln sich von einem differenzierteren Stadium mit ganz spezifischen Eigenschaften, wie z. B. Hautzellen oder Leberzellen, zu unspezifischen und letztlich für Untersuchungen ungeeignete Zellen. Prinzipiell gilt, dass Zellen einer jüngeren Passage (Tochtergeneration) üblicherweise weniger differenziert sind als Zellen einer älteren Passage (Elterngeneration). Nach mehreren Passagen haben die in der Suspension enthaltenen Zellen schließlich völlig andere Eigenschaften als die ursprünglichen Ausgangszellen.

Dies hat zur Folge, dass derselbe medizinische Test, der einmal an einer Zellkultur einer älteren und einmal an einer Zellkultur einer jüngeren Generation durchgeführt wird, unterschiedliche Ergebnisse liefern kann. Deshalb sind die an den bekannten Zellkulturen vorgenommenen Tests nur während eines sehr kurzen Zeitraums von wenigen Tagen reproduzierbar, da sich die Zellkultur im Laufe der Zeit verändert.

Ein weiterer Nachteil von Zellen, die sich ständig teilen ist, dass die Zellen sich damit in einem Zustand befinden, der sich erheblich von der Situation in einem Gewebe eines erwachsenen Organismus unterscheidet. Eine Zellteilung in einem erwachsenen Körper ist ein vergleichsweise sehr seltenes Ereignis. Es tritt zumeist nur nach Gewebeverlust auf und geht in der Regel mit einer Entzündungsreaktion einher. Infolgedessen untersucht man bei diesen Zellen nicht den Normalzustand, sondern eigentlich eine Extremsituation. Diese Tatsache könnte erklären, warum bisher Testergebnisse, die unter Verwendung solcher Zellkulturen gewonnen wurden, oft wenig mit klinischen Befunden übereinstimmen.

Da es bisher nicht möglich war, ruhende Zellen für längere Zeit am Leben zu halten, hat sich im Gegensatz ein Trend entwickelt, besonders teilungsaktive Zellen für pharmakologische Tests zu verwenden und den Beobachtungszeitraum zu verkürzen. Dies führt jedoch dazu, dass die

Ergebnisse noch weniger aussagekräftiger werden, wie man sich unschwer aus dem oben Gesagten erklären kann.

Offenbarung der Erfindung

5

10

15

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Herstellen einer Zellkultur aus menschlichen oder tierischen Zellen zum Durchführen medizinischer und pharmakologischer Tests zu schaffen, mit dem eine Zellkultur hergestellt werden kann, die über einen längeren Zeitraum, insbesondere über mehrere Wochen, stabil ist. Dadurch wird es möglich, medizinische oder pharmakologische Tests im Abstand von mehreren Wochen an derselben Zellkultur durchzuführen. Darüber hinaus ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellte, langzeitstabile Zellkultur zu schaffen, an der dann die gewünschten medizinischen oder pharmakologischen Tests durchgeführt werden können.

20

Die genannten Aufgaben werden gemäß der Erfindung durch die in den unabhängigen Ansprüchen angegebenen Merkmale gelöst. Weitere Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

25

30

35

Gemäß der Erfindung wird ein Verfahren zum Herstellen einer Zellkultur aus menschlichen oder tierischen Zellen, insbesondere aus Säugetierzellen, zum Durchführen medizinischer oder pharmakologischer Tests, vorgeschlagen, das wenigstens folgende Schritte umfasst:

- Einlegen eines Substrats aus mikrobiell hergestellter Zellulose in ein Gefäß;
- Einfüllen einer Nährstofflösung in das Gefäß;
- Aufbringen von menschlichen oder tierischen Zellen auf das Substrat;
- Temperieren des Gefäßinhalts auf eine vorgegebene Temperatur, insbesondere Körpertemperatur;
- Warten, bis das Substrat komplett mit einem Zellrasen bedeckt ist, d.h. dass sich alle Zellen berühren und aufgehört haben, sich zu teilen (das kann, je nach Anfangskonzentration und Zellart wenige Tage bis mehrere Wochen dauern);
- Vorzugsweise wird anhand von Stoffwechsel-Parametern getestet, ob und wann die Zellen den für sie charakteristischen Zustand erreicht haben und

- Zuführen eines zu testenden Wirkstoffs zu der auf dem Substrat befindlichen Zellkultur.

Nach dem Aufbringen der menschlichen oder tierischen Zellen auf das Substrat aus mikrokristalliner Zellulose kommt es zu einem Zellteilungs- und Wachstumsprozess, bei dem das Substrat zunehmend von Zellen bedeckt wird. Dieser Prozess läuft bei Körpertemperatur, also bei etwa 37°C, optimal ab. Während des Zellteilungs- und Wachstumsprozesses wird die Zellkultur daher vorzugsweise auf etwa 37°C gehalten. Wenn die Zellen das Substrat so dicht bedecken, dass die äußeren Membranen der Zellen sich lückenlos gegenseitig berühren, hören die Zellen auf, sich zu teilen. Nach Einstellung des Teilungsprozesses benötigen die Zellen eine gewisse Zeit, sich umzustellen und einen sog. ruhenden Phänotyp zu erreichen. Der Ausdruck „ruhend“ bezieht sich hierbei nur darauf, dass keine dramatischen Formveränderungen wie bei der Zellteilung mehr ablaufen. Biochemisch sind diese Zellen sehr aktiv und produzieren z.B. Faktoren, die für ihren Differenzierungszustand typisch sind. In diesem Zustand ist die Zellkultur auf dem Substrat aus mikrobiell hergestellter Zellulose mindestens über mehrere Wochen stabil.

Bezüglich der einzelnen Verfahrensschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens ist zu betonen, dass diese nicht unbedingt in der angegebenen Reihenfolge ausgeführt werden müssen. So kann beispielsweise das Aufbringen von menschlichen oder tierischen Zellen auf das Substrat auch vor dem Einfüllen einer Nährstofflösung in das Gefäß erfolgen. Wahlweise könnte auch die Nährstofflösung zuerst in das Gefäß eingefüllt und danach erst das Substrat eingelegt werden. Dem Fachmann ist klar, dass er die Abfolge der einzelnen Schritte in einem gewissen Rahmen nach Wunsch festlegen kann.

Die Zellen können zur Lagerung oder für den Transport langsam auf Raumtemperatur von z. B. 15°-30°C, insbesondere 18°-25°C abgekühlt werden. Es ist nicht notwendig, die Zellkultur zur Lagerung oder für den Transport einzufrieren, da sie auch bei Raumtemperatur stabil bleibt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Zellkultur vorzugsweise aus Stammzellen oder aus Zellen hergestellt, die aus Stammzellen gewonnen wurden, wie z. B. Leber-, Herz- oder Nierenzellen, oder Zellen

5
10
anderer Organe, wie z. B. der Haut. Ein medizinischer bzw. pharmakologischer Test kann somit an bekannten, genau definierten Zellen durchgeführt werden. Im Falle von aus Stammzellen gewonnenen Zellen können diese Zellen z. B. mit Hilfe eines Verfahrens hergestellt werden, wie es aus der US 20030161818A1 oder der US 2003 015 45 06 A1 bekannt ist. Hierbei werden die Stammzellen aus menschlichen Nabelschnurgewebe gewonnen. Die Stammzellen befinden sich in der sog. *substantia gelatina funiculi umbilicalis*, einer gelatinösen Matrix, reich an Hyaluronsäuren und Chondroitinsulfaten, auch „Wharton’s Jelly“ genannt. Die Extraktion erfolgt über einen enzymatischen Prozess (z.B. mit Hilfe von Collagenase).

15
Alternativ können natürlich auch solche Zellen verwendet werden, die direkt einem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wurden. Dies geschieht z.B. über eine Biopsie aus dem Knochenmark oder aus dem Fettgewebe. Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung können z. B. Zellen eingesetzt werden, die direkt aus betroffenen Patienten stammen, wodurch eine personalisierte Therapie möglich wird.

20
25
Die auf das Zellulosesubstrat aufgebrachten Zellen sind vorzugsweise solche Zellen, die zuvor nicht bereits passagiert worden sind. Die Zellkultur entsteht also erfindungsgemäß durch einen einmaligen Zellteilungs- und Wachstumsprozess aus originären, sog. primären Zellen, wie z. B. Stammzellen oder daraus gewonnen Zellen, die keinen Dedifferenzierungsprozess durchlaufen haben. D.h., bei den auf das Zellulosesubstrat aufgebrachten Zellen handelt es sich vorzugsweise um Zellen mit einer Passagezahl gleich Null. Wahlweise könnten aber auch Zellen mit einer Passagezahl von kleiner gleich fünf verwendet werden.

30
Für den Transport ist es nicht nötig, die Zellen, wie sonst üblich, einzufrieren; der Transport kann vielmehr bei Umgebungstemperatur erfolgen, wie z. B. zwischen 15°C und 30°C. Die Temperatur kann aber auch höher oder niedriger sein.

35
Wenn die Umgebungstemperatur im gewünschten Bereich liegt, z. B. zwischen 15 °C und 30°C, ist es ausreichend, die Zellkultur einfach abkühlen zu lassen (ohne Verwendung einer Kühleinrichtung). Die Zellkultur könnte aber auch aktiv,

d.h. mittels einer Kühleinrichtung, auf die gewünschte Temperatur herunter gekühlt werden.

5 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Gefäß mit einem hermetischen Verschluss, wie z.B. einer Folie oder einem Deckel versehen. Der hermetische Verschluss soll insbesondere das Eintreten oder Austreten von Medien, wie beispielsweise Flüssigkeit oder Gas aus dem bzw. in das Gefäß verhindern. Das Abdichten des Gefäßes kann prinzipiell vor oder nach dem Abkühlen durchgeführt werden, wird aber vorzugsweise vorher
10 durchgeführt.

15 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Gefäß mit einer Folie abgedichtet, die z.B. mit dem Gefäß verschweißt oder verklebt wird. Alternativ oder zusätzlich könnte auch ein Deckel vorgesehen sein, der das Gefäß abschließt.

20 Das Gefäß mit der darin befindlichen Zellkultur kann schließlich noch verpackt werden, um es anschließend z. B. an ein Labor oder einen Kunden schicken zu können, der dann die medizinischen oder pharmakologischen Tests an der Zellkultur durchführt. Die Verpackung kann beispielsweise eine Schachtel und gegebenenfalls Dämmmaterial umfassen. Die Verpackung kann auch ein Kühlmittel umfassen.

25 Um die Zellkultur nach deren Herstellung insbesondere für einen nachfolgenden Transport per Post, oder allgemein gegen mechanische Belastungen und Stöße zu schützen, wird vorgeschlagen, einen die Viskosität der Nährstofflösung erhöhenden Stoff oder einen Stoff mit einer höheren Viskosität als die Nährstofflösung in das Gefäß hinein zu geben. Gemäß der ersten Alternative kann die Nährstofflösung beispielsweise mit Methylzellulose, Polyethylenglykol
30 oder einem anderen, die Viskosität erhöhenden Stoff, versetzt werden. Gemäß der zweiten Alternative könnte auch eine höher viskose Substanz, wie z. B. eine gelartige Substanz in das Gefäß eingebracht werden. Es könnte aber auch ein Feststoff, wie z. B. ein Körper aus mikrokristalliner Zellulose auf die Zellkultur aufgesetzt werden. Dadurch wird die Zellkultur mechanisch am Boden des
35 Gefäßes festgehalten und kann nur noch schwer zur Seite kippen oder aufschwimmen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Zellen der Zellkultur nicht passagiert, d.h. der Zellrasen wird vorzugsweise nicht abgelöst und die Zellen werden nicht wie im Stand der Technik vereinzelt und danach
5 wieder auf ein anderes Substrat zur erneuten Zellteilung aufgebracht. Die Zellkultur wird vielmehr vorzugsweise durch einen einmaligen Zellteilungs- und Wachstumsprozess aus originären Zellen, d.h. Zellen, die zuvor nicht passagiert worden sind, hergestellt.

10 Die Zellkultur wird vorzugsweise in demselben Gefäß in dem sie gezüchtet worden ist, verpackt und gegebenenfalls an einen Empfänger verschickt. Sie muss also nicht in ein anderes Gefäß umgefüllt werden.

15 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das vorstehend genannte Verfahren an einer Mikrotiterplatte durchgeführt, die eine Vielzahl von Näpfchen aufweist. In jedes der Näpfchen wird ein Substrat aus mikrobiell hergestellter Zellulose eingelegt, eine Nährstofflösung eingefüllt und menschliche oder tierische Zellen auf das Substrat aufgebracht. Danach wachsen und teilen
20 sich die Zellen, bis sie das Substrat wenigstens teilweise bedeckt haben. In den einzelnen Näpfchen der Mikrotiterplatte befindet sich schließlich jeweils ein Teil derselben Zellkultur. Die einzelnen Teilkulturen können dann dazu verwendet werden, denselben oder unterschiedliche medizinische bzw. pharmakologische Tests durchzuführen.

25 Die Lagerung oder der Transport der Zellkultur erfolgt vorzugsweise bei Umgebungstemperatur. Ein Einfrieren der Zellkultur, wie bislang üblich, ist nicht erforderlich.

30 Die gesamte Mikrotiterplatte wird vorzugsweise mit einem hermetischen Verschluss versehen, wie vorstehend beschrieben. Sie kann schließlich noch verpackt und verschickt werden.

35 Die Erfindung betrifft auch eine Mikrotiterplatte mit mehreren Näpfchen, die jeweils mit einem aus mikrobieller Zellulose hergestelltem Substrat, das von einer Zellkultur besiedelt ist, befüllt sind. Die Mikrotiterplatte befindet sich vorzugsweise auf etwa Umgebungstemperatur und wird weder gekühlt noch

erwärmt. Sie könnte zur Aufbewahrung aber auch auf Temperaturen unterhalb der Zimmertemperatur, z. B. auf 5°C bis 10°C abgekühlt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist in den einzelnen
5 Nöpfchen der Mikrotiterplatte ein Stoff enthalten, der auf der Zellkultur angeordnet ist und eine höhere Viskosität aufweist als die Nährstofflösung. Dadurch wird die Zellkultur mitsamt dem Substrat mechanisch am Boden des Gefäßes festgehalten und kann nur noch schwer zur Seite kippen oder aufschwimmen.

10 Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch noch eine Verwendung einer Zellkultur aus menschlichen oder tierischen Zellen, insbesondere Säugetierzellen, die gemäß einem der vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt wurde, zur Durchführung medizinischer oder pharmakologischer Tests.

15 Die Erfindung wird nachstehend anhand der beigefügten Zeichnungen beispielhaft näher erläutert. Es zeigen:

20 Fig. 1a – 1h verschiedene Zustände eines Verfahrens zum Herstellen einer Zellkultur aus menschlichen oder tierischen Zellen gemäß einer Ausführungsform der Erfindung; und

25 Fig. 2 eine Mikrotiterplatte mit mehreren Nöpfchen, in denen sich jeweils eine gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Zellkultur befindet.

30 Die Figuren 1a-1h zeigen verschiedene Zustände eines Verfahrens zum Herstellen einer Zellkultur 9 aus menschlichen oder tierischen Zellen. Die Zellkultur 9 kann später zum Durchführen medizinischer oder pharmakologischer Tests verwendet werden.

35 Zum Herstellen der Zellkultur 9 wird zunächst ein Gefäß 1 mit einer Nährstofflösung 2 befüllt (Fig. 1a). Als Nährlösung 2 kann beispielsweise das im Biochemical Journal 58 von 1954, Seiten 345-352 beschriebene Nährmedium von Schramm und Hestrin verwendet werden. Die Nährlösung kann z.B. aus 20 g Glukose, 5 g Hefeextrakt, 5 g Bactopepton, 2,7 g Natriumphosphat und 1,15 g

Zitronensäure-Monohydrat und 0,5 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat in einem Liter Wasser umfassen. Alternativ können auch andere aus dem Stand der Technik bekannte Nährstofflösungen verwendet werden.

5 Als nächster Schritt wird dann ein aus mikrobieller Zellulose hergestelltes Substrat 3, das beispielsweise die Form eines Plättchens aufweisen kann, in das Gefäß 1 hinein gelegt (Fig. 1b). Die beiden vorstehend beschriebenen Schritte können auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden. Ein Substrat 3 aus mikrokristalliner Zellulose kann beispielsweise mittels eines Verfahrens
10 hergestellt werden, wie es aus der DE 10 2008 056 413.3 oder der WO 2010 052 019 A2 bekannt ist. Andere Herstellungsverfahren zum Herstellen mikrokristalliner Zellulose sind aus dem Stand der Technik hinreichend bekannt.

15 In Fig. 1c wird schließlich eine Suspension aus menschlichen oder tierischen Zellen 4 in das Gefäß 1 eingebracht. Die auf das Substrat 3 aufgebrachten Zellen können z. B. Stammzellen oder Zellen sein, die aus Stammzellen gewonnen wurden, wie z. B. Leber-, Herz- oder Nierenzellen, oder Zellen anderer Organe, wie z. B. der Haut. Die Zellen 4 können z. B. mit Hilfe eines Verfahrens hergestellt werden, wie es aus der US 02013025983A1, US 6410320B1 oder
20 der US 7534607B1 bekannt ist. Alternativ können natürlich auch solche Zellen 4 verwendet werden, die direkt einem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wurden.

25 Die auf das Zellulosesubstrat aufgebrachten Zellen 4 sind vorzugsweise solche Zellen, die zuvor nicht bereits passagiert worden sind. Die Zellkultur 9 entsteht also durch einen einmaligen Zellteilungs- und Wachstumsprozess aus originären Zellen, die keinen Dedifferenzierungsprozess durchlaufen haben. D.h., bei den auf das Zellulosesubstrat 3 aufgebrachten Zellen 4 handelt es sich vorzugsweise um Zellen mit einer Passagezahl gleich Null.

30 Die Zellen 4 sedimentieren dann in der Nährstofflösung 2 und setzen sich auf der Oberfläche des Zellulose-Substrats 3 ab. Bei Temperaturen um die 37°C findet dann ein Teilungs- und Wachstumsprozess statt, wobei sich auf dem Substrat 3 innerhalb weniger Tage ein sogenannter Zellrasen 5 bildet, der das Substrat 3
35 vollständig bedeckt, wie in Fig. 1d zu sehen ist.

Sobald der Zellrasen 5 die gewünschte Größe und Dicke erreicht hat, stoppt der Zellteilungs- und Wachstumsprozess. Das Gefäß 1 einschließlich seines Inhalts wird dann auf eine niedrigere Temperatur abgekühlt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Gefäß auf Raumtemperatur abkühlen gelassen, z. B. auf etwa 18°C bis 25°C. Es hat sich gezeigt, dass die Zellkultur 9 bei diesen Temperaturen über mehrere Wochen hinweg, z. B. über drei, vier oder auch mehr Wochen stabil bleibt und die Zellen insbesondere nicht absterben. An den Zellen können nun je nach Art der Zellen Tests durchgeführt werden, so z.B. Zugabe von Substanzen zur Blutgefäßneubildung an Endothelzellen, die Wirkung möglicher toxischer Substanzen auf Leberzellen, oder die Beeinflussung der Schlagfrequenz von Herzmuskelzellen.

Optional kann in einem weiteren Schritt 1e ein die Viskosität der Nährstofflösung 2 erhöhendes Mittel 10, wie z.B. Methylzellulose oder Polyethylenglykol (PEG) zugefügt werden. Das sich nach dem Hinzufügen des Mittels 10 ergebende Medium ist in Fig. 1f mit dem Bezugszeichen 11 gekennzeichnet.

Anstelle des Mittels 10 oder zusätzlich könnte auch ein Stoff mit einer höheren Viskosität als die Nährstofflösung oder ein Festkörper auf die Zellkultur 9 aufgebracht werden. So könnte z. B. ein weiterer Körper aus mikrokristalliner Zellulose auf die Zellkultur 9 aufgesetzt werden. Dadurch kann verhindert werden, dass sich das Substrat 3 zusammen mit der Zellkultur 9 vom Boden des Gefäßes 1 abhebt und z. B. zur Seite kippt oder aufschwimmt.

In einem weiteren Schritt 1f kann das Gefäß 1 noch mit einem hermetischen Verschluss 6 abgedichtet werden, um das Austreten bzw. Eindringen von Medium zu verhindern. Bei dem hermetischen Verschluss 6 kann es sich beispielsweise um eine Folie handeln, die z.B. mit dem Gefäß 1 verschweißt oder verklebt werden kann. Wahlweise könnte natürlich auch ein Deckel mit einer Dichtung (nicht gezeigt) vorgesehen sein.

Um die Zellkultur 9 einschließlich des Gefäßes 1 zu verschicken, wird das Gefäß 1 in Schritt 1g schließlich noch verpackt. Im dargestellten Ausführungsbeispiel ist das Gefäß 1 in einer Schachtel 12 eingepackt und zusätzlich durch einen Füllstoff 13 gegenüber mechanischen Stößen und Beschädigungen geschützt.

Gemäß der Erfindung wird die Zellkultur 9 vorzugsweise in demselben Gefäß 1 verschickt, in dem sie auch kultiviert worden ist.

5 Aus den einzelnen Verfahrensschritten 1a bis 1g wird deutlich, dass es nicht erforderlich ist, die Zellen der Zellkultur 9 zu passagieren, d.h. der Zellrasen 5 wird nicht vom Substrat 3 abgelöst, und die Zellen werden nicht vereinzelt und danach wieder auf ein anderes Substrat zur erneuten Zellteilung aufgebracht. Die Zellkultur 9 wird vielmehr in einem einzigen Wachstums- und Zellteilungsprozess hergestellt.

10 In Fig. 1h ist schließlich noch dargestellt, wie eine zu testende Substanz 14 auf die Zellkultur 9 aufgebracht wird, während sich die Zellkultur 9 weiterhin auf dem Substrat 3 befindet. Die Reaktion der Zellen auf die Substanz wird dann diagnostiziert.

15 Fig. 2 zeigt eine Mikrotiterplatte 8 mit mehreren Näpfchen 7, die jeweils als Gefäß 1 entsprechend der Figuren 1a bis 1g dienen. In jedem der Näpfchen 7 befindet sich ein Substrat 3 aus mikrokristalliner Zellulose, das von einer Zellkultur 9 besiedelt ist. Die Herstellung der Zellkulturen 9 kann dabei
20 entsprechend der in den Figuren 1a bis 1d gezeigten Verfahrensschritte gleichzeitig hergestellt werden.

Nachdem die einzelnen Zellkulturen 9 die gewünschte Größe erreicht haben, wird die Mikrotiterplatte 8 auf Raumtemperatur abgekühlt und z. B. mittels einer
25 Folie 6 verschlossen, wie in Fig. 1f dargestellt ist. In jedem der Näpfchen 7 befindet sich dann ein Teil derselben Zellkultur.

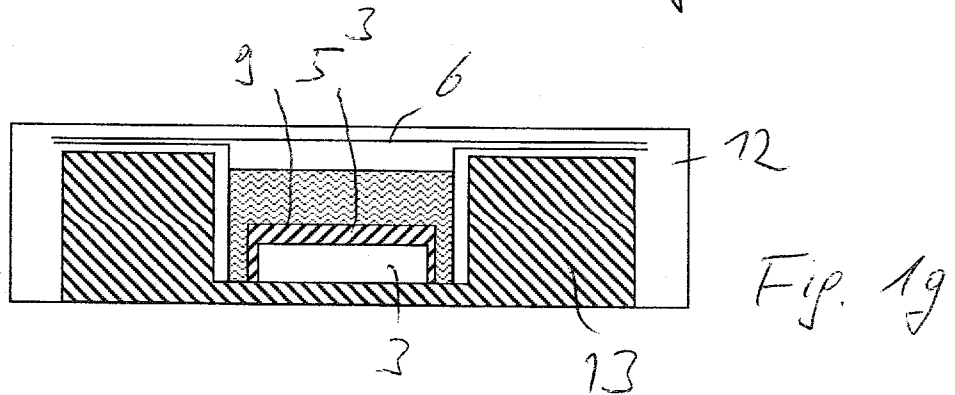
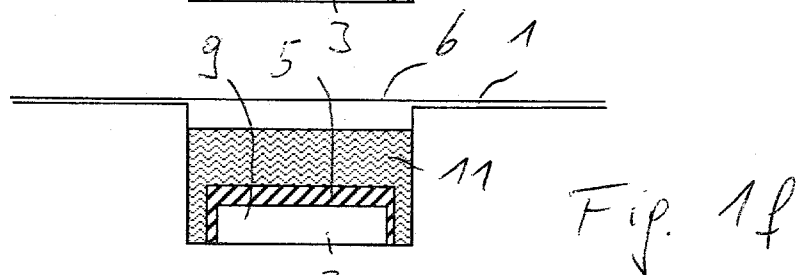
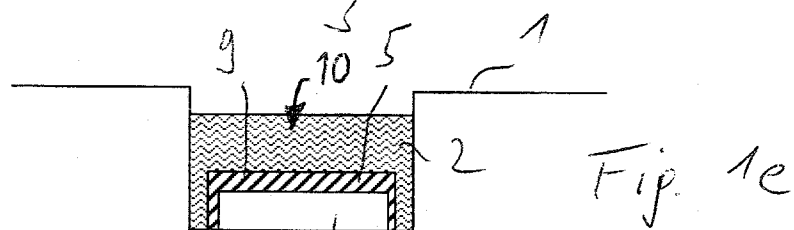
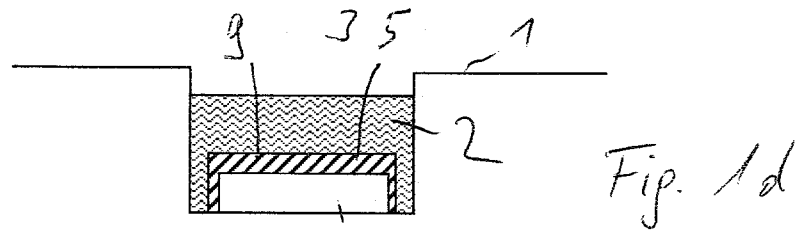
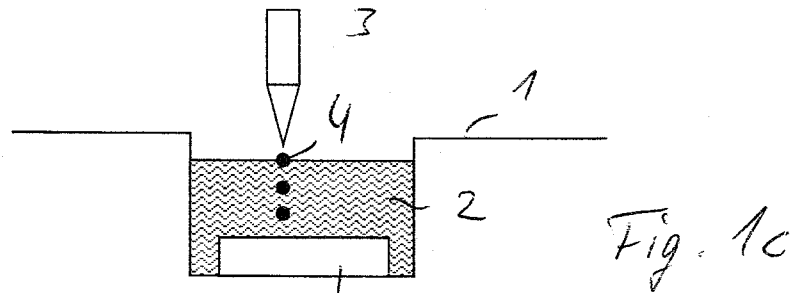
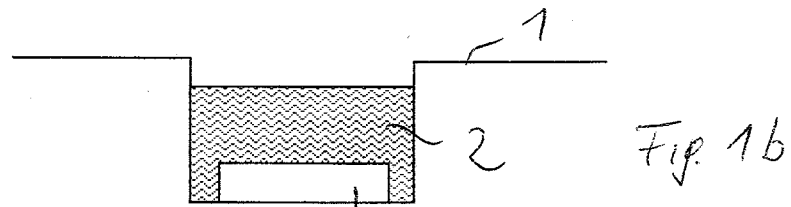
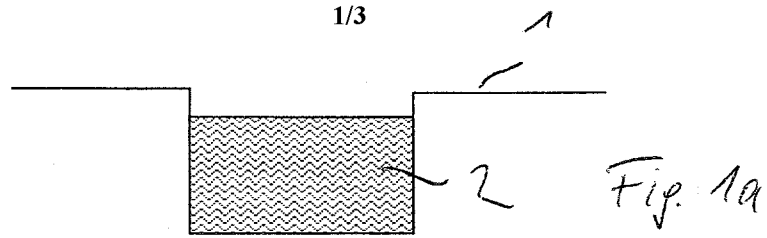
30 Sofern die Mikrotiterplatte 8 verschickt werden soll, wird sie in einem weiteren Schritt entsprechend Fig. 1g verpackt. Der Kunde erhält somit eine Mikrotiterplatte mit einer fertigen, über viele Wochen stabilen Zellkultur 9, an der er die gewünschten medizinischen oder pharmakologischen Tests durchführen kann.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen einer Zellkultur (9) aus menschlichen oder tierischen Zellen, insbesondere Säugetierzellen, zum Durchführen
5 medizinischer oder pharmakologischer Tests, umfassend folgende Schritte:
 - Einlegen eines Substrats (3) aus mikrobiell hergestellter Zellulose in ein Gefäß (1);
 - Einfüllen einer Nährstofflösung (2) in das Gefäß (1);
 - Aufbringen von menschlichen oder tierischen Zellen (4) auf das
10 Substrat (3);
 - Temperieren des Gefäßinhalts auf eine vorgegebene Temperatur, vorzugsweise auf etwa Körpertemperatur; und
 - Warten, bis das Substrat (3) komplett von einem Zellrasen (5) bedeckt ist, die Zellen sich nicht mehr teilen und einen ruhenden Phänotyp
15 angenommen haben.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkultur (9) nach deren Herstellung auf etwa Raumtemperatur abgekühlt wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkultur (9) vor dem Durchführen eines medizinischen oder pharmakologischen Tests nicht eingefroren wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
25 gekennzeichnet, dass die auf das Substrat (3) aufgebrachten Zellen (4) Stammzellen oder aus Stammzellen gewonnene Zellen sind.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
30 gekennzeichnet, dass die auf das Substrat (3) aufgebrachten Zellen (4) zuvor nicht passagiert worden sind oder eine Passagezahl von kleiner gleich fünf und insbesondere kleiner gleich zwei aufweisen.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
35 gekennzeichnet, dass das Gefäß (1) nach der Herstellung der Zellkultur (9) und vor der Durchführung des medizinischen oder pharmakologischen Tests mit einem hermetischen Verschluss versehen wird.

- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen (4) nicht passagiert werden, d.h., der Zellrasen (5) wird nicht vom Substrat (3) abgelöst, und die Zellen (4) werden nicht vereinzelt und danach wieder auf ein Substrat (3) zur erneuten Zellteilung aufgebracht.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkultur (9) in demselben Gefäß (1), in dem sie gezüchtet wurde, verpackt wird.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren an mehreren Gefäßen (1, 7) gleichzeitig durchgeführt wird.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Gefäße Näpfchen (7) einer Mikrotiterplatte (8) sind.
- 25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein die Viskosität der Nährstofflösung (2) erhöhender Stoff (10), oder ein Stoff mit einer höheren Viskosität als die Nährstofflösung (2) zusätzlich in das Gefäß (1,7) eingebracht wird.
- 30 12. Mikrotiterplatte (8) mit mehreren Näpfchen (7), die jeweils mit einem aus mikrobieller Zellulose hergestelltem Substrat (3), das von einer Zellkultur (9) besiedelt ist, befüllt sind, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkultur (9) Zellen umfasst, die zuvor nicht passagiert worden sind, und dass die einzelnen Näpfchen (7) hermetisch abgedichtet sind.
- 35 13. Mikrotiterplatte (8) nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich einen die Viskosität der Nährstofflösung (2) erhöhenden Stoff (10), oder einen Stoff mit einer höheren Viskosität als die Nährstofflösung (2) enthält, der auf der Zellkultur (9) angeordnet ist.
14. Verwendung einer Zellkultur (9) aus menschlichen oder tierischen Zellen (4), insbesondere Säugetierzellen, die gemäß einem vorstehend beanspruchten Verfahren hergestellt wurde, zur Durchführung medizinischer oder pharmakologischer Tests.

1/3



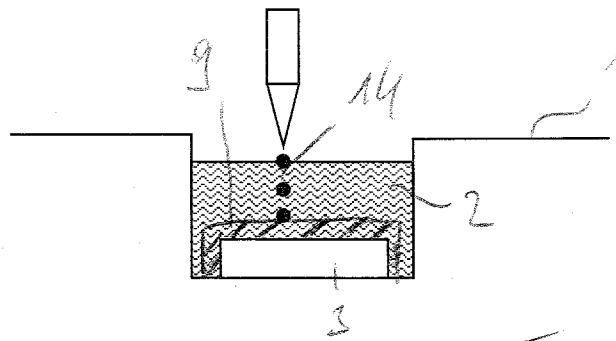


Fig. 1a

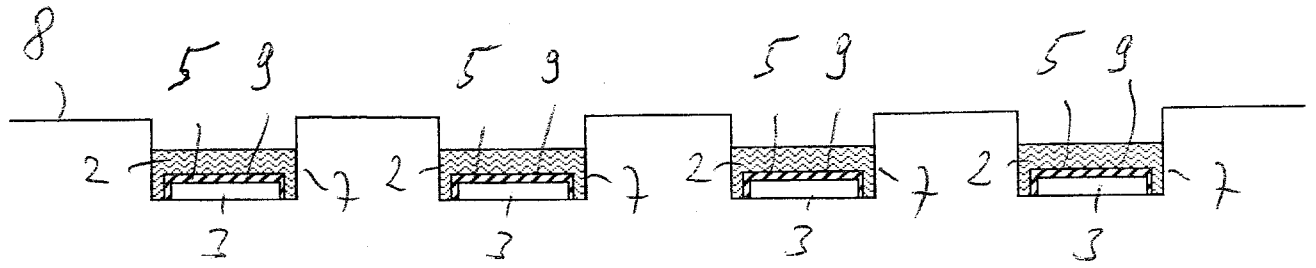


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/00
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)
C12N

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, BIOSIS, EMBASE, 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	WATANABE K ET AL: "A new bacterialcellulosesubstrate for mammalian cellculture: A new bacterialcellulosesubstrate", CYTOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 13, no. 2, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 107-114, XP009178746, ISSN: 0920-9069 abstract page 107, right-hand column, last paragraph page 109, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2 ----- -/--	1-14



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

1 July 2014

Date of mailing of the international search report

15/07/2014

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

Grötzing, Thilo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055940

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/042287 A2 (TUFTS COLLEGE [US]; KAPLAN DAVID L [US]; WONG PETER Y [US]) 20 April 2006 (2006-04-20) abstract page 4, line 3 - line 17 page 13, line 1 - line 25 page 14, paragraph 65 page 19, paragraph 88 page 27; claims 6,7 -----	1-14
A	WO 2010/052019 A2 (BIOREGENERATION GMBH [DE]; BERTHOLDT GUENTER [DE]; WEUSTER-BOTZ DIRK []) 14 May 2010 (2010-05-14) cited in the application abstract page 3, last paragraph -----	1-14
X,P	KARITA YUYA ET AL: "Micropatterning of bacterial cellulose as degradable substrate for cell culture", 2014 IEEE 27TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MICRO ELECTRO MECHANICAL SYSTEMS (MEMS), IEEE, 26 January 2014 (2014-01-26), pages 518-519, XP032579009, DOI: 10.1109/MEMSYS.2014.6765691 [retrieved on 2014-03-11] abstract page 519, left-hand column, paragraphs 2,4 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/055940

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006042287 A2	20-04-2006	US 2008280360 A1 WO 2006042287 A2	13-11-2008 20-04-2006
WO 2010052019 A2	14-05-2010	CN 102239265 A DE 102008056413 A1 EP 2347002 A2 RU 2011122427 A US 2011319607 A1 WO 2010052019 A2	09-11-2011 12-05-2010 27-07-2011 20-12-2012 29-12-2011 14-05-2010

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12N5/00

ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12N

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WATANABE K ET AL: "A new bacterialcellulosesubstrate for mammalian cellculture: A new bacterialcellulosesubstrate", CYTOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, Bd. 13, Nr. 2, 1. Januar 1993 (1993-01-01), Seiten 107-114, XP009178746, ISSN: 0920-9069 Zusammenfassung Seite 107, rechte Spalte, letzter Absatz Seite 109, linke Spalte, Absatz 3 - rechte Spalte, Absatz 2 ----- -/-	1-14



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

1. Juli 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15/07/2014

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

Grötzing, Thilo

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2006/042287 A2 (TUFTS COLLEGE [US]; KAPLAN DAVID L [US]; WONG PETER Y [US]) 20. April 2006 (2006-04-20) Zusammenfassung Seite 4, Zeile 3 - Zeile 17 Seite 13, Zeile 1 - Zeile 25 Seite 14, Absatz 65 Seite 19, Absatz 88 Seite 27; Ansprüche 6,7 -----	1-14
A	WO 2010/052019 A2 (BIOREGENERATION GMBH [DE]; BERTHOLDT GUENTER [DE]; WEUSTER-BOTZ DIRK []) 14. Mai 2010 (2010-05-14) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3, letzter Absatz -----	1-14
X,P	KARITA YUYA ET AL: "Micropatterning of bacterial cellulose as degradable substrate for cell culture", 2014 IEEE 27TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MICRO ELECTRO MECHANICAL SYSTEMS (MEMS), IEEE, 26. Januar 2014 (2014-01-26), Seiten 518-519, XP032579009, DOI: 10.1109/MEMSYS.2014.6765691 [gefunden am 2014-03-11] Zusammenfassung Seite 519, linke Spalte, Absätze 2,4 -----	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/055940

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung	
WO 2006042287	A2	20-04-2006	US	2008280360	A1	13-11-2008			
			WO	2006042287	A2	20-04-2006			

WO 2010052019	A2	14-05-2010	CN	102239265	A	09-11-2011			
			DE	102008056413	A1	12-05-2010			
			EP	2347002	A2	27-07-2011			
			RU	2011122427	A	20-12-2012			
			US	2011319607	A1	29-12-2011			
			WO	2010052019	A2	14-05-2010			
