



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 101 30 512 B4** 2007.08.16

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **101 30 512.5**
(22) Anmeldetag: **25.06.2001**
(43) Offenlegungstag: **13.02.2003**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **16.08.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12M 3/04 (2006.01)**
C12M 1/42 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Bionethos Holding GmbH, 04668 Parthenstein, DE

(74) Vertreter:
Heumann, Benz, 64287 Darmstadt

(72) Erfinder:
Bader, Augustinus, 31275 Lehrte, DE

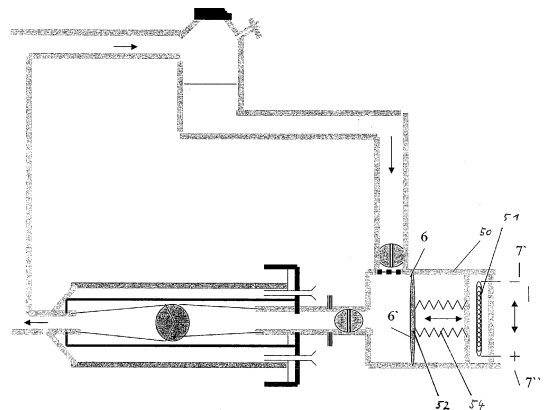
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 198 01 763 C2
DE 195 06 183 C1
DE 38 10 843 C2
DE 199 15 610 A1
DE 100 58 240 A1

DE 39 14 956 A1
DE 37 15 952 A1
DE 36 41 260 A1
US 59 65 433 A
US 45 84 994 A
US 45 57 673 A
US 45 12 726 A
EP 10 27 898 A1
WO 01 04 909 A1
Ae 49-58 sprengen den Rahmen der
Einheitlichkeit
der Anmeldung und waren daher nicht
Gegenstand der
Recherche;

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung zur Druckperfusion für das Züchten und/oder für das Behandeln von Zellen**

(57) Hauptanspruch: Vorrichtung zur Druckperfusion für das Züchten oder Behandeln von Zellen aufweisend eine besagte Zellen enthaltende Bioreaktoreinheit (3, 12) und ein mit dieser in Verbindung stehenden, mit einem in einem Zylinder (50) in dessen Achsrichtung bewegbaren Kolben (2) ausgestatteten Pumpmodul, welches ein in einem Kreislauf strömendes Fluid diskontinuierlich durch den Bioreaktor befördert und stromaufwärts und stromabwärts mit Ventilen (1A, 1B) zur Verhinderung einer Rückströmung versehen ist, dadurch gekennzeichnet, dass das Pumpmodul in oder an der Bioreaktoreinheit integriert ist und so konstruiert ist, dass

(i) der bewegliche Kolben (2) in Form eines ersten Magneten (52) ausgebildet ist, und am Ende des Zylinders (50) ein zweiter Magnet (51) angeordnet ist, der in Zusammenwirken mit dem als Kolben fungierenden ersten Magneten (52) diesen im Zylinder entlang der Zylinderachse hin und her bewegt, oder
(ii) der bewegliche Kolben (2) in Form einer Platte (6) ausgebildet ist, welche mittels Druckluft bewegt wird, wobei...



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für das Züchten und/oder für das Behandeln von Zellen, insbesondere einen Bioreaktor. Weiter betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zum Pumpen eines Fluides durch eine Vorrichtung für das Züchten und/oder für das Behandeln von Zellen, insbesondere durch einen Bioreaktor. In der älteren Anmeldung des Erfinders DE 199 35 643.2 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung der eingangs genannten Art beschrieben.

[0002] Es hat sich nun herausgestellt, dass die Bildung einer Zellschicht und das Zellwachstum deutlich verbessert wird, wenn man die Zellen einer Druckbelastung aussetzt. Hierzu ist es aus der Praxis bereits bekannt, einen Zellkulturraum z.B. durch einen Stempel, wie in US 6,060,306 beschrieben, mechanisch zu belasten. Neben dem hierfür erforderlichen konstruktiven Aufwand entspricht eine derartige Belastung auf Grund der dadurch erzielten heterogenen Druckverteilung nicht in-vivo-Verhältnissen.

[0003] In US 5,928,945 wird hauptsächlich über Scherspannung mittels Kulturmedium eine mechanische Belastung von z.B. Knorpelzellen versucht. Dies ist jedoch unphysiologisch da z.B. in Gelenkbereichen keine derartigen Perfusionen auftreten.

[0004] In US 6,060,306 ist auch ein Apparat beschrieben, in dem ein Knorpelkonstrukt innerhalb einer Kultivierungskammer durch Bewegungen der Außenwände wie in einem Blasebalg bewegt wird. Diese Bewegungsprozesse haben den Nachteil, dass die Bewegungsmuster eine hohe mechanische Belastung der Membranstrukturen bedingen. Dies führt dazu, dass die Membranen nach wenigen Tagen reißen und die Produkte unsteril werden und dadurch für die Implantationen nicht mehr geeignet sind. Weiterhin können die Membranen auf Grund der Bewegungsmuster, die ständig konvex-konkave Verformungen hervorrufen, auch nur entsprechend punktuelle und dadurch inhomogen verteilte Druckverformungen erzeugen. Dadurch kommt es zu Oszillationen im Kulturmediumbereich und Druck-Heterogenitäten im den biologischen Geweben im Bioreaktor.

[0005] Einzelne dieser Vorrichtungen haben gemeinsam, dass die Druckbelastungen bauartbedingt in das Kulturgefäß fest integriert sind. Hierzu zählt z.B. auch der Bioreaktor nach Hostrup et. al. (Tissue Engineering Vol. 6, 1, 2000 pp. 75-79) für Gefäße und Herzklappen. Diese Modelle sind aufwendig in der Konstruktion und teuer im Vertrieb, da das Pumpsystem durch die Integration in den Bioreaktor komplett mit dem zukünftigen Bioimplantat versandt werden muss. Eine steriltechnische Trennung von dem Pumpenkopf ist nicht vorgesehen.

[0006] Alternierende Druckquellen sind in verschied-

den anderen Systemen, wie z.B. in WO 97/49799, vorgesehen, aber nicht näher ausgeführt. In US 5,899,937 wird ein System beschrieben, das mittels eines Exzentrers über einen Stempel eine flüssigkeitsgefüllte Blase komprimieren kann und dadurch eine Entleerung des Beutels und einen Flüssigkeitsstrom bewirkt. Ebenso ist eine Blase vorgesehen in US 5,792, 603 (WO 97/49799). Hierbei handelt es sich jedoch um ein System, bei dem die Gefäße offen in einem Kulturgefäß enden, wobei eine Durchmischung intravasaler und extravasaler Flüssigkeiten erfolgt. Dies ist besonders nachteilig, wenn unterschiedliche Medienzusammensetzung intravasal und extravasal benötigt werden, um z.B. Wachstumsfaktoren und chemotaktische Faktoren gerichtet anbieten zu können. Dies verhindert z.B. die Induktion einer gerichteten Migration von Myofibroblasten von Besiedlungsort zu den Außenseiten und stellt einen erheblichen Nachteil im Besiedlungsprozess dar. Ebenso wird die ortsspezifische Rebesiedlung mit unterschiedlichen Zellpopulationen verhindert. Ebenso kommt es hierdurch zu sofortigem Druckausgleich, wodurch keine Möglichkeit gegeben ist, unterschiedliche Druckprofile im intravasalen und extravasalen Raum zu erzeugen. In dem Bioreaktor nach Laube et. al. ist die Klappenbeweglichkeit selbst beim Anlegen von großen Volumenamplituden bereits dadurch verhindert, dass die Klappenaußenwände durch Annähen an dem Gehäuse fixiert werden müssen.

[0007] In den meisten Fällen jedoch wird der pulsatile bzw. pulsartige Strom über eine peristaltische Pumpe in herkömmlicher Weise erzeugt, wodurch die Druckamplituden hinsichtlich der Volumenveränderungen gering sind, hohe flache Frequenzen aufweisen und durch den andauernden Kneteffekt auch hohe Belastungen für den Schlauch im wochenlangen Betrieb bedeuten. Hierzu zählt z.B. Niklason et. al., Science 4, 1999 vol 284 pp 489-492 oder EP 0320 441. Ferner beschreibt die DE 100 58 240 A1 einen Bioreaktor zur Herstellung biologischer Prothesen und Implantaten, bei welchem mittels einer externen Pumpe ein fließender und pulsierender Medienstrom das Implantat umgibt. Die US 5,965,433 betrifft eine portable Vorrichtung zur Aufbewahrung von transplantierten Organen unter Kühlung in einem durch Pressluft betriebenen Perfusionsverfahren. Die DE 195 06 183 C1 beschreibt eine Fermentationsvorrichtung zur Züchtung von Mikroorganismen. Hierbei werden die Mikroorganismen in ihrer Nährlösung durch pulsierende Bewegung auf- und abwärts bewegt, wobei die Bewegung durch Anheben und Absenken des Fermenterbodens mittels Druckluft und einer Membran erfolgt. Weiterhin sind Vorrichtungen beschrieben, wie z.B. in DE 199 15610 A1, die sich insbesondere für Gefäße und Herzklappen eignen oder als implantierbare Pumpen fungieren (US 4,557,673; US 4,512,726).

[0008] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt

darin, eine Vorrichtung bereitzustellen, welche die oben beschriebenen Nachteile nicht aufweist. Es soll ermöglicht werden, physiologische, homogene einwirkende Druck- und Volumenamplituden in einem Flüssigkeitsvolumenstrom gleichermaßen zu erzeugen. Insbesondere sollen auch in dem bioartificialen Gewebe innerhalb des Bioreaktors in allen Bereichen vollständig homogene Druckverhältnisse erzeugt werden können. Die Vorrichtung soll an die Druck-Volumen-Compliance des zu perfundierenden Systems regelbar adaptierbar sein. Die Vorrichtung soll modular sein, klein, Gewicht sparend, zuverlässig, mit niedrigem Energieverbrauch und an beliebige zu perfundierende Systeme ankopplungsfähig bzw. kombinierbar sein und den Volumenstrom nur minimal mechanisch oder gar nicht belasten, so dass es auch mit Blut oder anderen belastungsempfindlichen Flüssigkeiten mit und ohne biologische Bestandteilen, wie Zellen oder Proteinen, verbunden werden kann.

[0009] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch eine Vorrichtung nach Anspruch 1 gelöst. Die abhängigen Ansprüche enthalten vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung.

[0010] Unter dem Begriff Fluid soll in der vorliegenden Beschreibung nicht nur Flüssigkeiten, insbesondere Blut, Nährlösungen, Öle oder technische Lösungen, sondern auch Gase verstanden werden.

[0011] Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand bevorzugter Ausführungsbeispiele unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen näher erläutert.

[0012] [Fig. 1](#) ist ein Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der als bewegliche Platte **6** ein permanenter Magnet mit einer biokompatiblen bzw. flüssigkeitsdichten oder nicht erosiven Umkapselung mit z.B. einer Kunststoffschicht aus Silikon oder Teflon **6'** zugleich eine Abdichtfunktion übernehmen kann. Ebenso kann eine Ummantelung mit einem weiteren Metall (z.B. Titan, Edelstahl) erfolgen. Hierzu ist ein Dichtring aus z.B. Teflon oder Silikon kombinierbar. Wesentlich ist aber, dass durch Integration einer Stromspule, an der alternierend Minus-Pole **7'** oder Plus-Pole **7''** erzeugt werden, ein abwechselnd anziehendes bzw. abstoßendes Kraftfeld auf den permanenten Magneten erzeugt werden kann. Alternativ können zu der Verwendung von permanenten Magneten auch paramagnetische Partikel in die Platte **6** integriert werden, wodurch eine noch verbesserte Ausrichtung hinsichtlich des Kraftfeldes der Spule **7** erreicht werden kann. Der Vorteil des magnetischen Prinzips ist, dass aufwendige externe Motoren oder Druckluft bzw. Vakuumsysteme, wie in Kombination mit der Perfusientechnik hier noch beschrieben, dabei aber entfallen können. Erst hierdurch wird das gesamte Modul sehr klein, da das Krafterzeugungs- bzw. das auf externe Kräfte reagie-

rende Modul in das Bewegungsmodul integriert ist. Es ist lediglich eine Stromquelle und eine herkömmliche elektronische Steuerung erforderlich.

[0013] In der [Fig. 2](#), welche ein weiteres Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung darstellt, wird gezeigt, dass in die Platte **6** auch eine eigene elektrische Spule **8** integrierbar ist, die mittels elastischer Verbindungskabel an eine alternierend zu **7'** und **7''** gepolte Stromquelle **10'** und **10''** angeschlossen ist.

[0014] In der [Fig. 3](#), welche ein weiteres Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung darstellt, ist gezeigt, wie in den Kreislauf ein Knorpelzell-Knochenzellbioreaktor **12** integriert ist. Hierbei können auch Stammzellen integriert werden. Durch den Einsatz eines Sperrventils **11** ist ein Druckanstieg in dem Bioreaktor gekoppelt mit einem Volumenstrom realisierbar. Dies ist besonders wichtig für die Differenzierung von Knorpel aber auch Knochenstrukturen, sowie von Kombinationen z.B. unter Verwendung von phasenreinen beta-Trikalziumphosphaten als Besiedlungsgrundlage.

[0015] [Fig. 4](#) ist ein Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung und zeigt, dass die Volumenveränderungen in dem Perfusionsmodul auch durch die Verschiebung einer Platte **6** erreicht werden kann, die über zwei Ventile **7A** und **7B** mittels Druckluft und Vakuum alternierend bewegt werden können. Dies hat den Vorteil, dass die klassische und aufwendige Stempeltechnik entfällt. Diese benötigt außerdem einen zusätzlichen äußeren Motor.

[0016] Die [Fig. 5](#), welche ein weiteres Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung darstellt, zeigt ein integratives System, in dem das magnetische Perfusionsprinzip in einen Bioreaktor für die Erstellung von Knorpelstrukturen integriert ist. Die Zellkultur ist hierbei in einem herausnehmbaren Einsatz **13** angebracht. Für die Entnahme des Einsatzes kann der Bioreaktor bei **14** mittels z.B. eines Dreh- oder Klammerverschlusses geöffnet oder geschlossen werden.

[0017] Die [Fig. 6](#), welche ein weiteres Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung darstellt, zeigt den Einsatz des magnetischen Pumpmechanismus, um eine Membran zu bewegen und dadurch einen Volumenstrom zu erzeugen.

[0018] In der [Fig. 7](#), welche ein weiteres Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung darstellt, ist die Verwendung des magnetischen Pumpsystems gezeigt, um Flüssigkeiten, wie z.B. Blut, wässrige Lösungen oder Gase, zu pumpen, ohne dass ein Behandlungsmodul wie z.B. ein Zellkultursystem (z.B. ein Bioreaktor) versorgt wird. Eine Anwendung ist z.B. eine extrakorporale Perfusion bei

Herz-Lungenmaschinen oder zur Unterstützung bei Lebertransplantationsoperationen nach Hepatektomie. Die bisherigen Rotationspumpen führen zu gleichmäßigen Volumenströmen, sind sehr teuer und aufwendig in der Herstellung. Vorteil des Einsatzes des erfindungsgemäßen Pumpprinzips in der extrakorporalen Perfusion ist die Wiederherstellung physiologischer Druckamplituden. Diese sind wichtig für den Erhalt von Organfunktionen und die zelluläre Differenzierung insbesondere beim längerfristigen Einsatz.

[0019] In der [Fig. 8](#), welche ein weiteres Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung darstellt, ist eine doppelseitige Pumpkammer gezeigt. Die Platte **16** bewegt sich oszillierend in der Kammer wobei die mit Klappen gekoppelten Auslassöffnungen **17'** und **17''** jeweils gegensinnig zu den Einlassöffnungen **18'** und **18''** gesteuert sind. In der Mitte befindet sich wieder eine bewegliche Platte mit einem permanenten Magneten, Paramagneten oder durch Magnetismus beeinflussbaren Material oder einer Elektrospule.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Druckperfusion für das Züchten oder Behandeln von Zellen aufweisend eine besagte Zellen enthaltende Bioreaktoreinheit (**3**, **12**) und ein mit dieser in Verbindung stehenden, mit einem in einem Zylinder (**50**) in dessen Achsrichtung bewegbaren Kolben (**2**) ausgestatteten Pumpmodul, welches ein in einem Kreislauf strömendes Fluid diskontinuierlich durch den Bioreaktor befördert und stromaufwärts und stromabwärts mit Ventilen (**1A**, **1B**) zur Verhinderung einer Rückströmung versehen ist,

dadurch gekennzeichnet, dass das Pumpmodul in oder an der Bioreaktoreinheit integriert ist und so konstruiert ist, dass

(i) der bewegliche Kolben (**2**) in Form eines ersten Magneten (**52**) ausgebildet ist, und am Ende des Zylinders (**50**) ein zweiter Magnet (**51**) angeordnet ist, der in Zusammenwirken mit dem als Kolben fungierenden ersten Magneten (**52**) diesen im Zylinder entlang der Zylinderachse hin und her bewegt, oder
(ii) der bewegliche Kolben (**2**) in Form einer Platte (**6**) ausgebildet ist, welche mittels Druckluft bewegt wird, wobei diese durch eine Öffnung am Ende des Zylinders (**50**) mittels eines Ventilsystems (**7A**, **7B**) steuerbar zu- und abgeführt wird.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Magnet (**52**) ein permanenter Magnet ist, und der zweite Magnet (**51**) eine Elektromagnet ist, der durch alternierende Polung ein abwechselnd anziehendes und abstoßendes Kraftfeld auf den Permanentmagneten (**52**) ausübt und diesen in Bewegung versetzt.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Magnet (**52**) ein Elektromagnet ist und der zweite Magnet (**51**) eine Elektromagnet ist, wobei die beiden Magnete alternierende Polung zueinander besitzen.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, dass der Kolben (**2**) elastisch gelagert ist.

5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die elastische Lagerung ein elastischer Balg (**54**) mit Falten, eine Druckfeder oder eine Zugfeder ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, dass der Kolben (**2**) durch Rollen und/oder Führungsschienen verschiebbar gelagert ist.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–6, dadurch gekennzeichnet, dass der Zylinder (**50**) eine Membran (**15**) aufweist, welche den Zylinderraum, in dem sich der Kolben (**2**) bewegt, abdichtet.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–7, dadurch gekennzeichnet, dass die Bioreaktoreinheit (**3**, **12**) ein Sperrventil (**11**) zur Erzeugung eines Druckanstieges besitzt.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–8, dadurch gekennzeichnet, dass ein Reservoir (**4**) für die Nährlösung zur Versorgung der Zellen im Bioreaktor vorhanden ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Pufferbehälter bzw. Druckausgleichsbehälter und/oder vorhanden ist.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–10, dadurch gekennzeichnet, dass ein Sterilfilter (**5**) vorhanden ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–11, dadurch gekennzeichnet, dass der Kolben (**2**) mit Kunststoff oder Metall ummantelt ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–12, dadurch gekennzeichnet, dass die Bioreaktoreinheit mit dem Pumpmodul mittels eines Dreh- oder Klammerverschlusses (**14**) verbunden ist.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Bioreaktoreinheit einen herausnehmbaren Einsatz (**13**) aufweist, in dem sich die zu züchtenden Zellen befinden.

15. Verwendung einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1–14 zur Kultivierung von Zellen –

ausgenommen humane embrjonale Stammzellen –
unter Druckbeaufschlagung.

16. Verwendung nach Anspruch 15 zur Züchtung
von Knorpel – und Knochenzellen.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

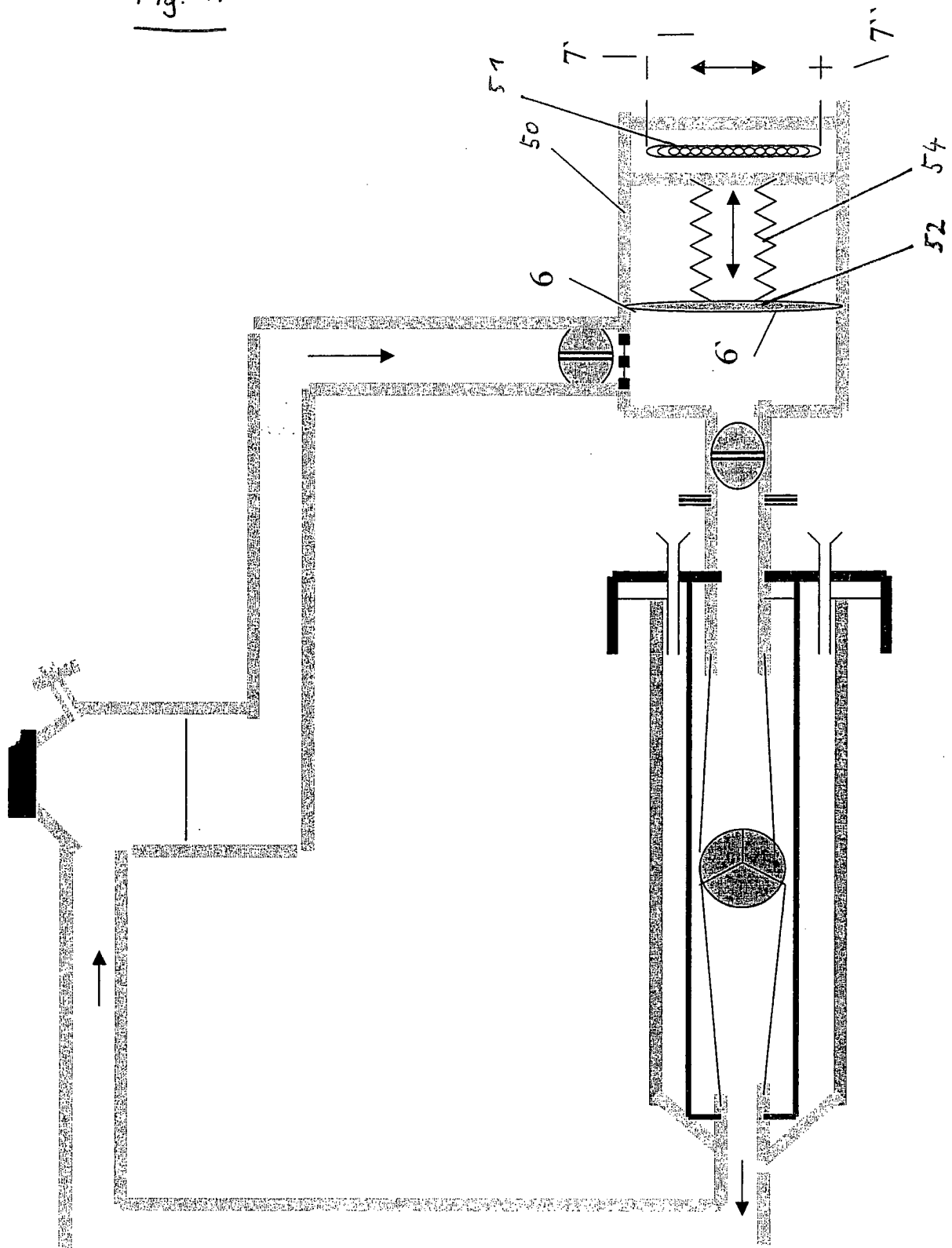


Fig. 2

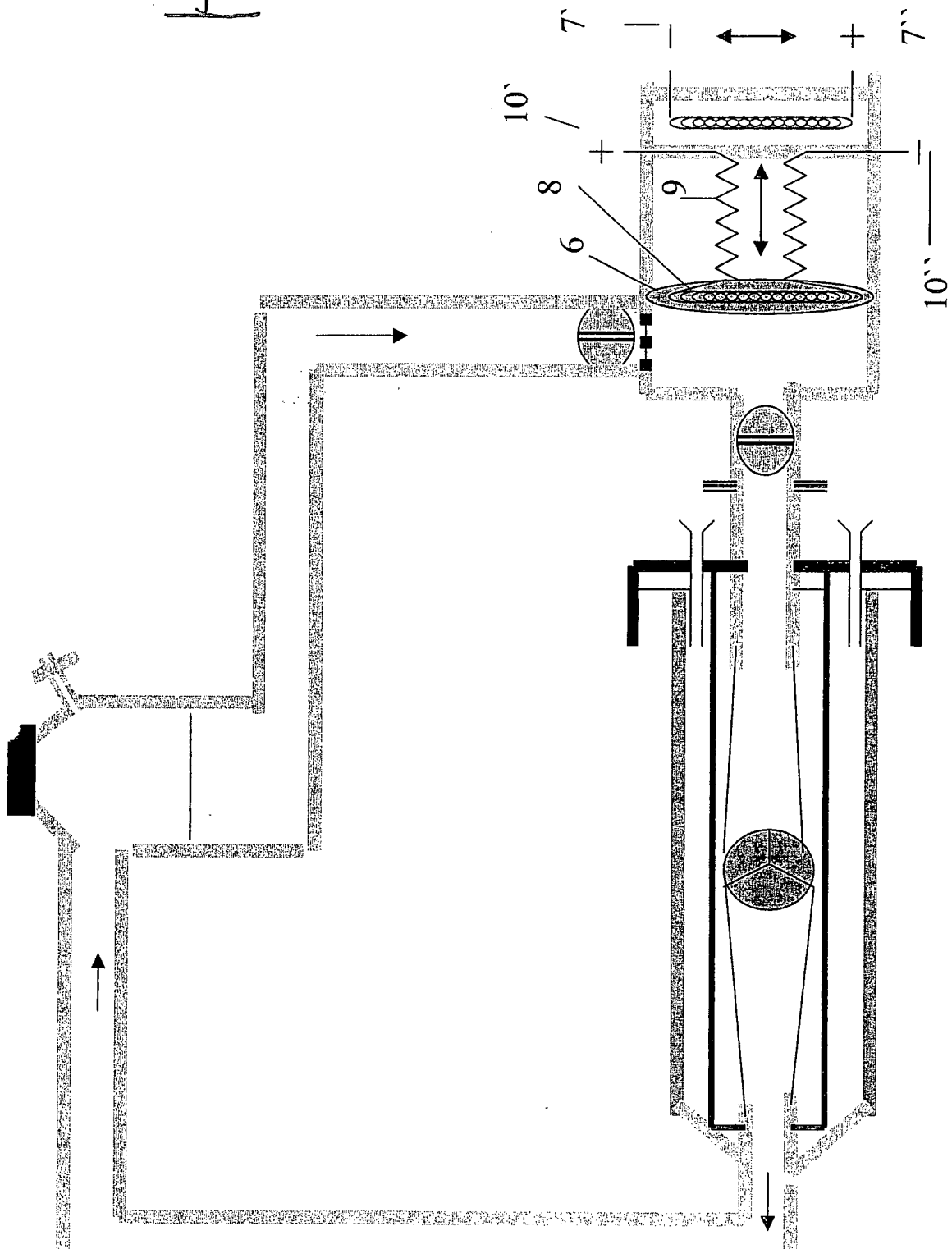


Fig. 3

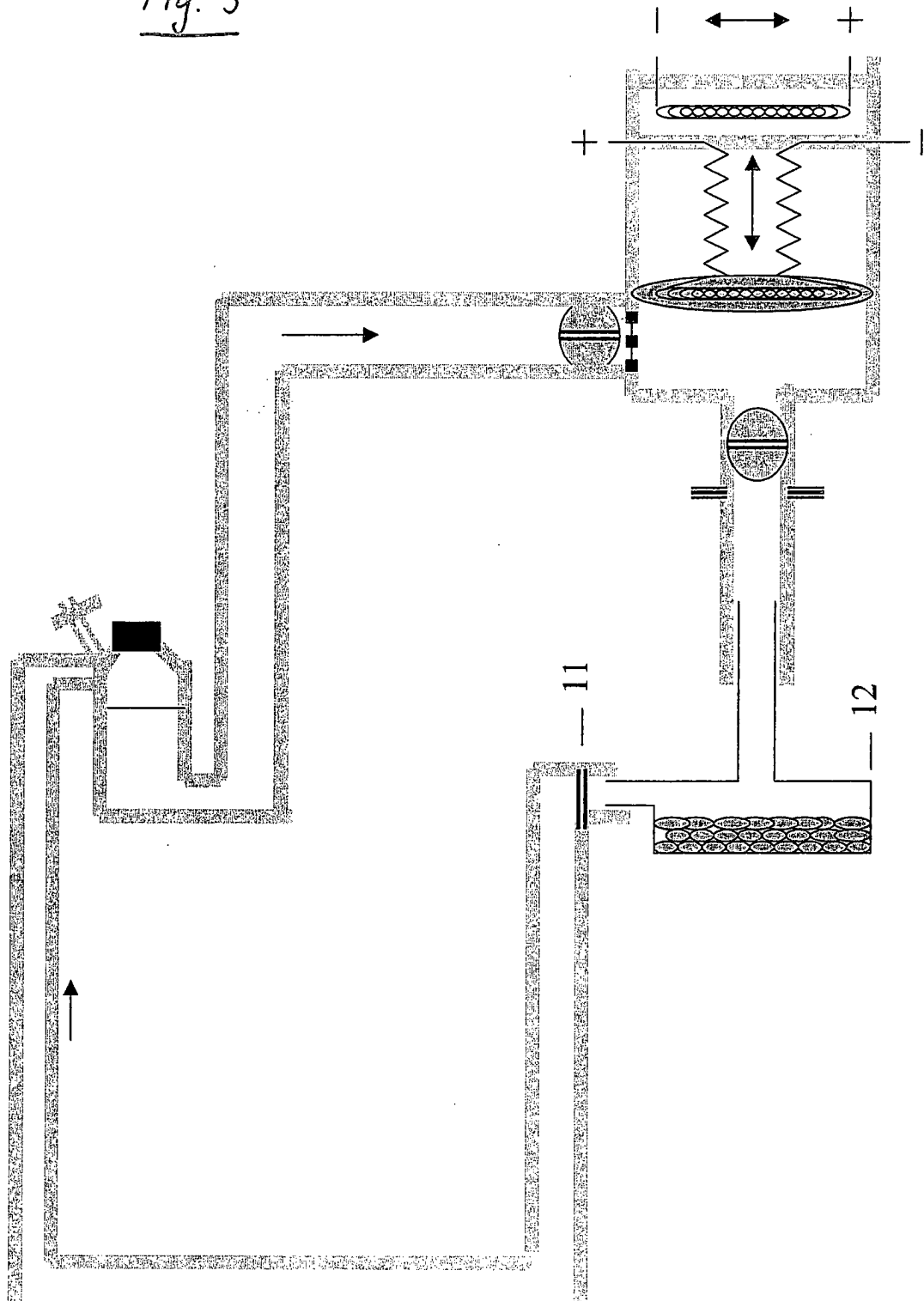


Fig. 4

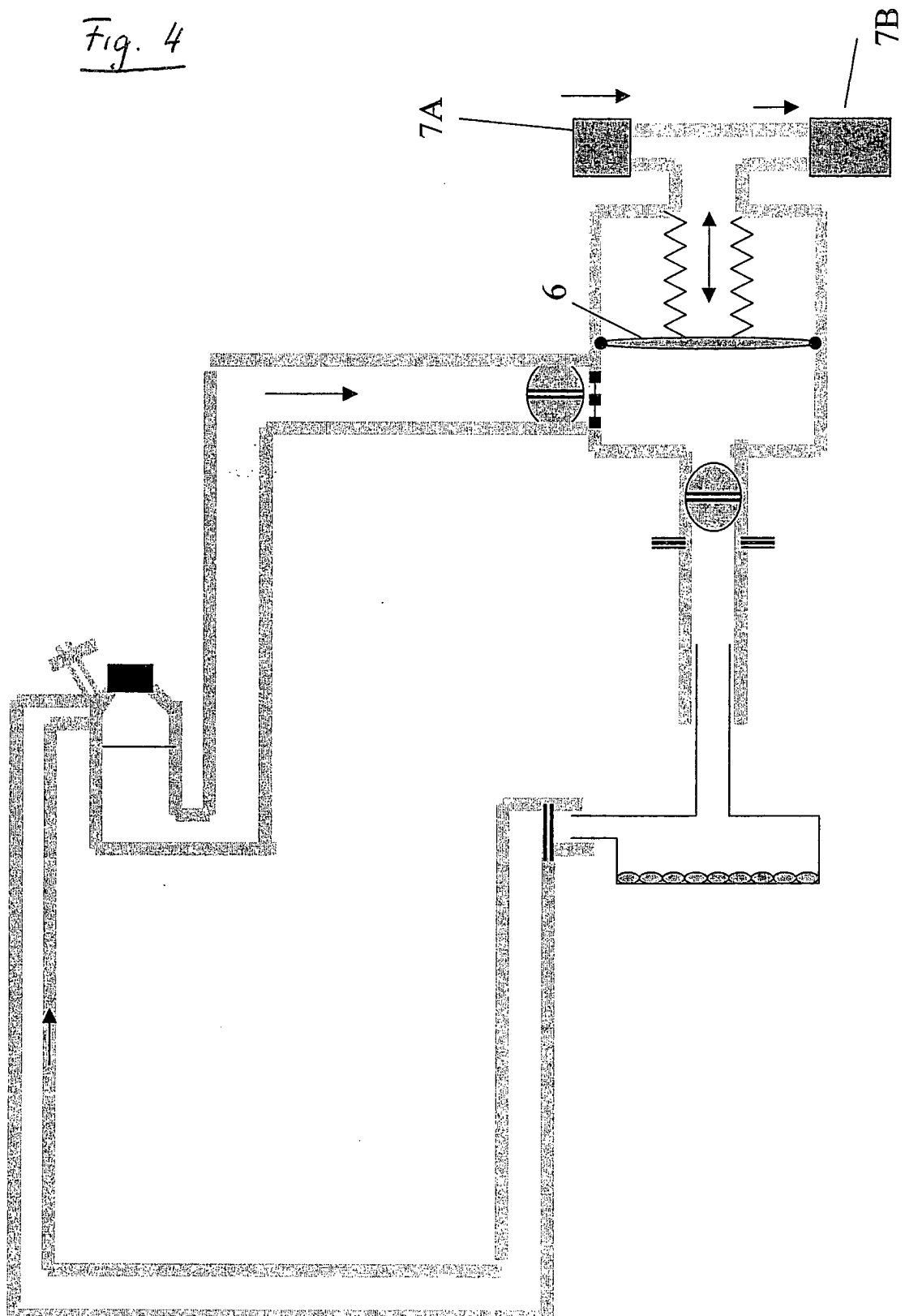


Fig. 5

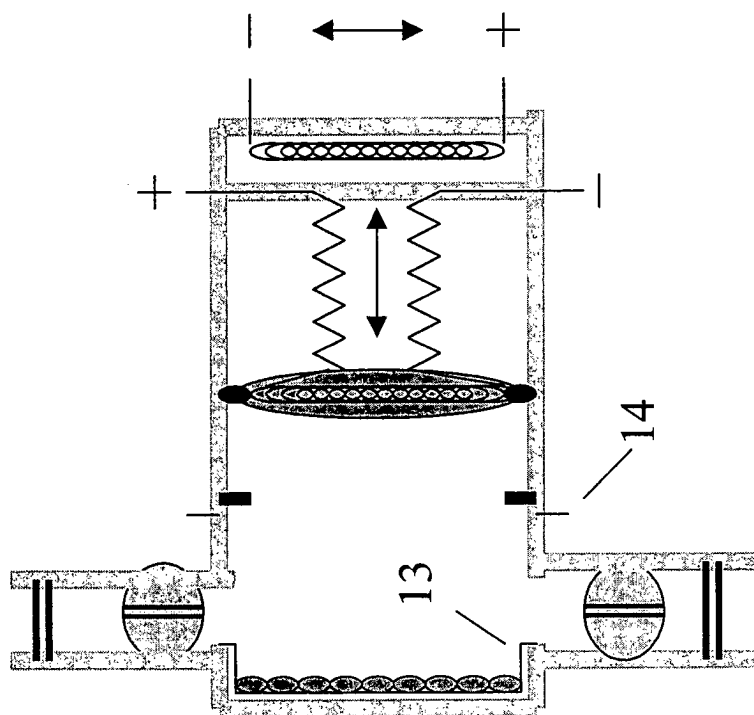


Fig. 6

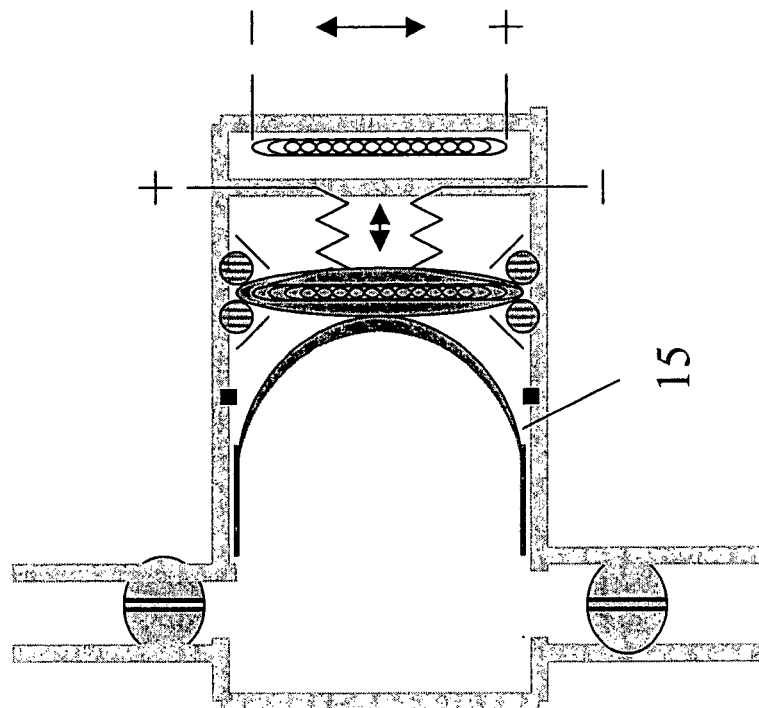


Fig. 7

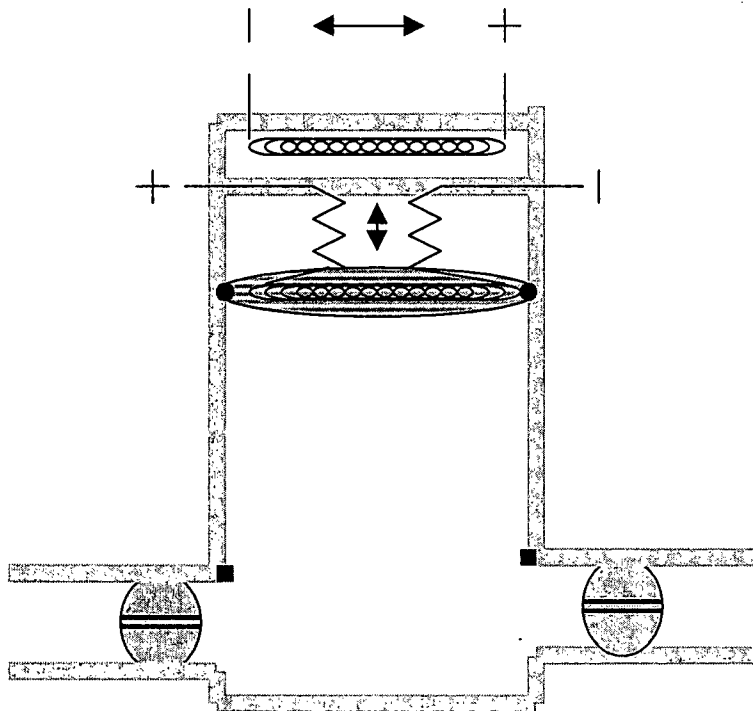


Fig. 8

