



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 61 898 A1** 2005.07.14

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 61 898.8**

(22) Anmeldetag: **15.12.2003**

(43) Offenlegungstag: **14.07.2005**

(51) Int Cl.7: **C12M 1/40**

(71) Anmelder:

**fzmb Forschungszentrum für Medizintechnik und
Biotechnologie e.V., 99947 Bad Langensalza, DE**

(74) Vertreter:

**Bieber, B., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 07745
Jena**

(72) Erfinder:

**Hornung, Michael, 99089 Erfurt, DE; Ludwig,
Maria, Dr.-Ing., 99610 Sömmerda, DE; Schmauder,
Hans-Peter, Prof. Dr., 07745 Jena, DE; Wilke, Ingo,
Dr., 37133 Friedland, DE; Ponomarev, Igor, 99867
Gotha, DE**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Träger für Zellkulturen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Träger für Zellkulturen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Träger für Zellkulturen anzugeben, der die Nachteile der bekannten Träger vermeidet und eine universelle Applikation der mit Zellkulturen bewachsenen Träger ermöglicht, wird dadurch gelöst, dass dieser Träger aus mikrobieller Zellulose besteht.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einen Träger für Zellkulturen.

Stand der Technik

[0002] Tierische Zellkulturen wachsen in der Regel in Monolayer-Schichten auf der Oberfläche von Trägermaterialien, an denen die Zellen durch adsorptive Prozesse fixiert werden. Derartige Techniken der Oberflächenkultur kommen für die Kultur tierischer oder menschlicher Zellen zum Einsatz, wobei die Festigkeit der physikalischen Bindung durch spezifische Eigenschaften der Trägersubstanzen definiert werden. Diese Festigkeit wird oftmals durch äußere Faktoren, z.B. pH – Wert-Verschiebungen, Änderungen in der Ionenstärke der eingesetzten Medien, deutlich beeinflusst. Besonders für das Gebiet des Tissue Engineering, in dem besonderer Wert auf strukturierte dreidimensionale Ausprägung der Kulturen gelegt wird, spielen Eigenschaften des eingesetzten Trägers eine besondere Rolle.

[0003] Die für das Tissue Engineering eingesetzten Materialien stammen meist aus natürlichen Quellen. Sie müssen daher in der Reinheit den Ansprüchen des "Medical Grade" genügen. Häufig sind sie chemisch modifiziert zur besseren Adsorption der Zellen. Sie dürfen aber nicht toxisch bzw. zytotoxisch und sollten im Idealfall biologisch abbaubar sein. Diese Bedingungen müssen zumindest teilweise erfüllt sein, so dass mit den Materialien gute bis hervorragende zelluläre Interaktionen möglich sind. Je nach zu untersuchendem bzw. zu gewinnendem Gewebe müssen diese Materialien zudem bestimmte Voraussetzungen erfüllen.

[0004] Beispiele für bisher eingesetzte derartige Trägermaterialien sind zum einen als Polymer die Kollagene von Typ I mit heterotrimerer helikaler Struktur. Als häufigstes Polymer von Säugern (Sehnen, Haut, Knochen) ist es relativ leicht zugänglich muss aber sehr gründlich gereinigt werden, um jegliche Kontamination mit BSE-Erregern oder anderen Problemstoffen zu vermeiden. Das Material ist relativ leicht chemisch zu vernetzen bzw. durch partiellen Abbau modifizierbar. Es ist hervorragend zur Zellkultivierung geeignet, aber im allgemeinen zu schnell abbaubar. Es wird auch in der Medizin und Chirurgie verwendet, beispielsweise als Tamponade bzw. bei Milzrupturen, in der Kieferorthopädie.

[0005] Zum anderen werden Glykosaminoglykane als natürliche Polymere verwendet. Sie bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die überwiegend uronsäurehaltig sind. So werden beispielsweise Chondroitinsulfat und Dermatansulfat verwendet. Auch diese Substanzklasse ist leicht durch Veresterung chemisch modifizierbar. Sie besitzt eine

hohe Wasserbindung. Allerdings erfordert der Einsatz im Tissue Engineering und als Unterlage zur Zellkultur einen sehr hohen Reinigungsaufwand. Die Uronsäuregruppen sind leicht mit Calcium komplexierbar, so dass beispielsweise auch Gele, Membranen, Schläuche, Hülsen und Partikel zugänglich sind. Im Gegensatz zu den Kollagenen besitzen die Glykosaminoglykane nur geringe antigene und inflammatorische Eigenschaften, aber geringere adhäsive Eigenschaften.

[0006] Als dritte natürliche Gruppe sind die Chitose zu nennen, die Gruppe partiell oder vollständig deacetylierter Chitine. Gewonnen wird es aus Krustaceen-Skeletten. Aufgrund der positiv geladenen Aminogruppe ist es adsorptionsaktiv und des Weiteren chemisch modifizierbar.

[0007] An synthetische Polymere werden analoge Bedingungen gestellt wie an die Naturstoffe. Die Basis sind meist natürliche Hydroxysäuren, wie Glykol-, Milch-, und Kapronsäuren, die eine hohe Variabilität der mechanischen Eigenschaften in den Polymeren erreichen lassen. Diese Produkte bilden beispielsweise die Basis zur Herstellung von Filmen, Schläuchen oder Vliesen. Sie sind leicht extrudierbar. Weiterhin ist eine Mischung zwischen den Grundmischungen möglich.

[0008] (Minuth, W. W., Strehl, R., Schumacher, K.: Zukunftstechnologie Tissue Engineering – Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. 1. Ed. – 2003, XII, 348 S., ISBN 3-527-30793-1, Wiley-VCH, Weinheim)

[0009] Alle diese Materialien bedürfen eines Reinigungsaufwandes, da sie bei den Verfahren, in denen sie gewonnen werden, nicht als reines Entprodukt vorliegen bzw. nicht allein in den Quellen auftreten, aus denen sie zugänglich gemacht werden. Des Weiteren ist vor allem bei den chemisch-synthetischen Materialien oder bei den chemisch partiell veränderten Polymeren ein hoher Reinigungsaufwand notwendig, um eventuell störende Begleitstoffe abzutrennen und antigene und inflammatorische Eigenschaften auszuschließen.

[0010] Aus der Schrift WO 0161026 A1 und deren Patentfamilie ist bekannt, dass geformte Biomaterialien auf der Basis biosynthetisch gebildeter bakterieller Zellulose in Zylinderform als Blutgefässersatz, zur Ummantelung von Nervenbahnen oder als Teilersatz von Hohlorganen eingesetzt werden können und dass dieses Material sich in Tierexperimenten bewährt hat. Es ist beschrieben, dass sich an der Innenseite Endothelzellen anlagern können. Die Abmessungen dieser geformten Zelluloseformkörper sind allerdings nur mit inneren Durchmessern von 1–3 mm oder kleiner angegeben. Des Weiteren ist die Besiedlungsfähigkeit nur für Endothelzellen aus Tierversu-

chen beschrieben.

Aufgabenstellung

[0011] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen Träger für Zellkulturen anzugeben, der die vorgenannten Nachteile der bekannten Träger vermeidet und eine universelle Applikation der mit Zellkulturen bewachsenen Träger ermöglicht.

[0012] Überraschenderweise stellt sich ein Träger, bestehend aus mikrobiell gebildete Zellulose, als ein sehr gut geeignetes Trägermaterial für Zellkulturen und zur universellen Applikation dieser dar.

[0013] Das Biopolymer mikrobielle Zellulose ist stark hydratisiert, hat durch die im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen sehr gute Anheftmöglichkeiten zur Ausbildung stabiler, zumeist physikalischer Bindungsstellen sowohl für die Zellen als auch für benötigte Medienbestandteile und ist gegenüber Abbau stabil. Aufgrund der hohen Hydratisierung durch die Einlagerung von wässrigen Systemen zwischen die Polymerketten ist eine ideale Grundlage für Zellkulturen gegeben.

[0014] Überraschenderweise konnte weiterhin gefunden werden, dass diese biosynthetisch gebildete, nach Wunsch speziell geformte, homogen strukturierte und hochreine Zellulose aufgrund dieses hohen Hydratisierungsgrades als idealer Träger für die meisten zu kultivierenden Zellen menschlicher und/oder tierischer Herkunft geeignet ist.

[0015] Die nach DE 100 22 751 C2, DE 101 16 602 A1 und WO 02/081725 A1 gewonnene Zellulose wird nach dem Waschen im Autoklav sterilisiert, in benötigte Formen und Größen gebracht und bei Bedarf mit sterilem Nährmedium versetzt. Diese Nährmedien penetrieren in die wässrige Phase der bakteriellen Zellulose und ermöglichen eine homogene Verteilung der Nährstoffe über die gesamte Fläche. Medien mit geringerem Diffusionsvermögen aufgrund ungünstiger Viskositäten oder physikalischer Bindungen lassen sich durch Schütteln, Mischen oder andere Labortechnologien eintragen.

[0016] Die Zellkulturen werden auf üblichem Wege inokuliert auf die Zelluloseträger und bei Temperaturen zwischen 25 und 40°C, vorzugsweise zwischen 32 und 38°C, im Brutschrank bei 75–95%, vorzugsweise 85–92% Feuchtigkeit bebrütet. Es ist prinzipiell jeder Brutschrank geeignet. Als besonders günstig haben sich Brutschränke mit geregelter CO₂-Gehalt, günstigstenfalls im Bereich von 5%, erwiesen. Bereits nach wenigen Tagen setzte das Wachstum ein und nach 9–14 Tagen waren je nach Zelltyp die Monolayer ausgebildet. Bei etwas längerem Wachstum bildeten sich unter den optimierten Bedingungen auch mehrlagige Schichten aus.

[0017] Mikrobielle Zellulose ist ein Trägermaterial für alle Typen von Zellkulturen. Besonders gut geeignet sind Kulturen der Epithelzellen der Haut, humane Keratinozyten, HaCaT-Zellen, Humane Osteoblasten, SAOS-2, Osteoblasten des Menschen, Osteoblasten vom Pferd, Chondrozyten vom Pferd und multipotente mesenchymale Stammzellen (MSC), z.B. vom Pferd.

Ausführungsbeispiel

[0018] Nachfolgend wird die Erfindung anhand von drei Ausführungsbeispielen der Verwendung von durch *Glucacetobacter xylinum* nach DE 100 22 751 A1 gebildeter Zellulose als Träger von Zellkulturen beschrieben.

1. Ausführungsbeispiel

[0019] Es werden rechteckig präparierte, 1–1,5 mm dicken Zelluloseschichten mit einer Fläche von ca. 150 × 75 mm hergestellt und mit einer Kulturlösung Ham's F 12 enthaltend 10% FCS, 50 µg Ascorbinsäure/ml, 30 µg Ketoglutarinsäure/ml, 100 U Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml versetzt. Auf diese Zelluloseträger werden 4 · 10⁵ multipotente mesenchymale Stammzellen/cm² übertragen und anschließend dieser beschichtete Zelluloseträger im Brutschrank bei 90% Feuchtigkeit und 5% CO₂ bei 37°C bebrütet. Nach 10 Tagen werden zelluläre Monolayerschichten ausgebildet, die sich im Verlauf ihres weiteren Wachstums zu Bilayerschichten weiterentwickeln.

2. Ausführungsbeispiel

[0020] Es werden Epidermiszellen, entnommen von gesunden Pferden, unter den in Beispiel 1 genannten Bedingungen angezogen bis sich eine stabile mehrschichtige Epidermiszellschicht auf dem Zelluloseträger (Hautstruktur) gebildet hat. Diese Hautstruktur wird anschließend auf schlecht heilende Wunden am Bein eines Pferdes übertragen. Die übertragene Schicht wächst schnell an und deckt die Wunde ab.

3. Ausführungsbeispiel

[0021] Es werden humane Keratinozyten, sogenannte HaCaT-Zellen, auf Träger aus Bakteriencellulose aufgetragen und wie in Beispiel 1 beschrieben kultiviert. Diese Zellen werden zur Ermittlung der Biokompatibilität von Testsubstanzen angezogen. Die so gewonnenen Zellen sind ausgezeichnete und sehr empfindliche Markerzellen zur Ermittlung der Biokompatibilität. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der in vitro kultivierten Zellen wird anhand von Markeraktivitäten der Zellen die Beeinflussung der Stoffwechselaktivitäten durch die zugesetzten Testsubstanzen ermittelt. Markeraktivitäten sind beispielsweise

- Zellzahl-Bestimmung nach 24 und 48
- ATP-Bestimmung
- NMP-41-Bestimmung
- Morphologische Bestimmungen

[0022] Durch Anpassung der Formen des Zellulose-trägers an die Bedingungen der Testung können derartige Biokompatibilitätsuntersuchungen ökonomischer und zeiteffektiver gestaltet werden.

Patentansprüche

1. Träger zum Aufwachsen von Zellkulturen bestehend aus mikrobieller Zellulose.

2. Verwendung des Trägers nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturen durch multipotente mesenchymale Stammzellen gebildet sind.

3. Verwendung des Trägers nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturen durch Keratinozyten gebildet sind.

4. Verwendung des Trägers nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturen durch Epidermiszellen gebildet sind.

5. Verwendung des Trägers nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturen durch Osteoblasten gebildet sind.

6. Verwendung des Trägers nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturen durch Chondrozyten gebildet sind.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen