

(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
8. Oktober 2009 (08.10.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/121868 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/053789
- (22) Internationales Anmeldedatum:
31. März 2009 (31.03.2009)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2008 017 765.2 3. April 2008 (03.04.2008) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): TECHNISCHE UNIVERSITÄT ILMENAU [DE/DE]; Ehrenbergstrasse 29, 98693 Ilmenau (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHOBER, Andreas [DE/DE]; Hornschuchpromenade 2, 90762 Fürth (DE). AUGSPURGER, Caroline [DE/DE]; Hüttenholzstrasse 36, 98693 Ilmenau (DE). WEISE, Frank [DE/DE]; Ziolkowskistrasse 22, 98693 Ilmenau (DE). FERNEKORN, Uta [DE/DE]; Am Bachholz 2, 99094 Erfurt (DE). HILDMANN, Christian [DE/DE]; Am Leipziger Platz 13, 99085 Erfurt (DE). HAMPL, Jörg [DE/DE]; Julius-Leber-Ring 37, 99087 Erfurt (DE).
- (74) Anwalt: ENGEL, Christoph K.; ENGEL, Marktplatz 6, 98527 Suhl (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Erklärungen gemäß Regel 4.17:
— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

- (54) Title: MICROBIOREACTOR AND MICROTITER PLATE COMPRISING A PLURALITY OF MICROBIOREACTORS
- (54) Bezeichnung: MIKROBIOREAKTOR SOWIE MIKROTITER-PLATTE MIT MEHREREN MIKROBIOREAKTOREN

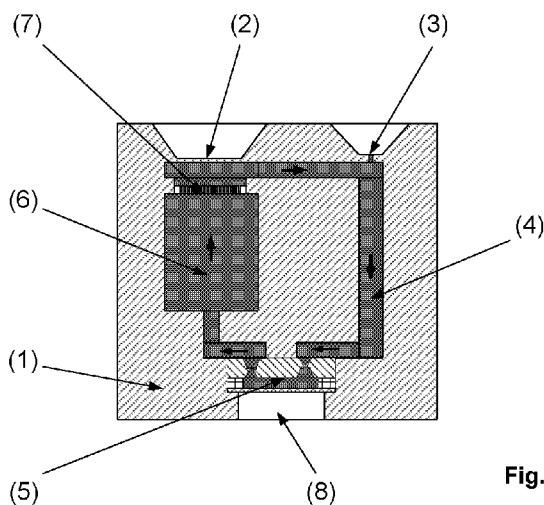


Fig. 1

(57) Abstract: The present invention relates to a microreactor comprising a sample support (7) for holding cells; a bypass (3) with a capillary opening for feeding test reagent and/or for aeration and ventilation of the microreactor; a pump module (5) for perfusion of the microreactor with test reagent and/or gas feeding and purging of the microreactor; a transparent viewing window (2); and fluid channels (4) that form a circuit. The invention further relates to a bioreactor-microtiter plate comprising a plurality of such microreactors.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen Mikrobioreaktor bestehend aus einem Probenhalter (7) zur Aufnahme von Zellen; einem Bypass (3) mit einer Kapillaröffnung zur Zugabe von Testreagenz und/oder zum Be- bzw. Entlüften des Mikrobioreaktors; einem Pumpmodul (5) zur Perfusion des Mikrobioreaktors mit Testreagenz und/oder Be- bzw. Entgasen des Mikrobioreaktors; einem transparenten Sichtfenster (2); und Fluidkanälen (4), die einen Kreislauf bilden. Die Erfindung betrifft weiterhin eine Bioreaktor-Mikrotiter-Platte bestehend aus einer Vielzahl solcher Mikrobioreaktoren.



WO 2009/121868 A2



Veröffentlicht:

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

Mikrobioreaktor
sowie Mikrotiter-Platte mit mehreren Mikrobioreaktoren

Die Erfindung betrifft im Allgemeinen kostengünstig herzustellende, vorzugsweise parallel anzuordnende mikrofluidische Systeme zur Kultivierung von fortgeschrittener Zellkultur (3D Kultur, Stammzellen etc.), die in jedem biotechnologisch und biomedizinisch arbeitenden Labor sinnvoll eingesetzt werden können und zudem HTS-fähig (HTS = High-Throughput-Screening) sind. Solche Systeme sind prinzipiell geeignet, in der Wirkstoffsuche bei ADME/Tox Screenings eingesetzt zu werden und weisen daher ein hohes Vermarktungspotential auf. ADME/Tox Studien dienen der Untersuchung von Substanzen auf ihre Eigenschaften im (menschlichen) Organismus in Bezug auf Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion und Toxizität. Im Speziellen betrifft die Erfindung einen Mikrobioreaktor mit einem Probenträger, der z.B. eine Zellkultur trägt und von einem Fluid durchströmt wird. Von einem Mikrobioreaktor im Sinne der Erfindung spricht man, wenn dieser (im statischen Zustand) eine Medienmenge im unteren Milliliter- vorzugsweise im Mikroliter-Bereich enthält. Außerdem bezieht sich die Erfindung auf eine CellChip Anordnung bzw. Mikrotiter-Platte, in welcher mehrere Mikrobioreaktoren integriert sind.

Für vielfältige Anwendungen in der Medizin und Pharmaforschung oder in der Kosmetikindustrie ist die Kultivierung biologischen Materials eine herausragende Aufgabe. Hierbei ist Zellmaterial, das können Gewebeschnitte z.B. aus Biopsien oder primäre Zellen, die aus Tieren oder Menschen gewonnen wurden, Zelllinien oder gentechnisch veränderte Zellen sein, möglichst so zu kultivieren, dass seine natürliche Funktion und Lebens-

fähigkeit beibehalten werden bzw. die angestrebte Funktion möglichst optimal umgesetzt wird.

Die Bandbreite der Anwendung reicht dabei vom Bereitstellen von Testsystemen für die Pharma- und Kosmetikforschung über die medizinische Forschung (z.B. die Stammzellforschung) bis zur Produktion von Impfstoffen. Ein wichtiger Aspekt ist dabei sowohl der sparsame Umgang mit wertvollem Zellmaterial als auch die Bereitstellung vieler verschiedener paralleler Ansätze zum Durchtesten von unterschiedlichen Parametern.

In einem Gewebe müssen Nährstoffe und Substanzen zur Differenzierung (Botenstoffe) nicht nur über Diffusion, sondern auch mit Hilfe von aktiven Transportmechanismen analog zum Blutkreislauf (und auch dem Lymphsystem) interzellulär zu- und abgeführt werden. Es hat sich gezeigt, dass hierbei die Geometrie z.B. von Unterstützungssystemen, Gerüsten zur Ansiedelung von Zellen, der Abstand und die Führung von fluidischen Versorgungskanälen sowie die Dichte, die Art und der Typus der Zellbesiedelung wichtige Parameter sind, die über die erfolgreiche Kultivierung bzw. Herstellung von Gewebe im Tissue Engineering entscheiden. Zudem ist die Induktion von Differenzierungsprozessen durch gezielte Wirkstoffabgabe in einem Gewebe ein ungelöstes Problem, das bislang nur über „trial and error“ Methoden getestet wird.

Für die ordnungsgemäße Funktion eines Gewebes oder Organs sind viele Parameter von Bedeutung. Um die Aufrechterhaltung von Organ- und Gewebefunktionen *in vitro* zu gewährleisten, muss nicht nur die korrekte molekulare, sondern vor allem auch die korrekte makroskopische Architektur des Zellverbandes reproduziert werden. So ist bekannt, dass primäre Zellen häufig ihre zelltypspezifischen (differenzierten) Funktionen verlieren,

wenn sie als Monolayer kultiviert werden. Es sind deshalb verschiedene Anstrengungen unternommen worden, Zellkultursysteme zu entwickeln, die die dreidimensionale *in vivo* Situation des korrespondierenden Gewebes besser nachbilden.

Eine Möglichkeit besteht in der mikrofluidisch unterstützten Kultivierung von Zellen in Monolayer- vorzugsweise aber in 3D-Kultur auf diversen Trägern. Dabei wird von 3D-Kulturen in mikrostrukturierten Trägern (3D-CellChips) ausgegangen, die sich bereits in der Erprobung auch für eine Langzeit-Kultivierung befinden. Als 3D-CellChips wird dabei eine flächige oder drei dimensional ausgeführte Unterstützungsstruktur zur dreidimensionalen Kultivierung von Zellen, die vorzugsweise perforiert ist und mit Medium durchströmt werden kann, bezeichnet.

Ein solcher 3D-CellChip (Träger) ist z.B. aus der WO 93/07258 bekannt, wobei sich die Größenordnungen für die Stützgerüste in der fortgeschrittenen Zellkultur an den physiologischen Größen orientieren. Die Höhe des Stützgerüsts für Zellen in einer dreidimensionalen Kultur, die von beiden Seiten versorgt wird, sollte 300 μm nicht übersteigen, wenn die Zellschicht nicht aktiv durchströmt wird. Der Prototyp des 3D-CellChips beherbergt auf einer Fläche von 1 cm^2 ca. 900 (30 x 30) Microcontainer mit den Dimensionen 300 x 300 x 300 μm (L x B x H) bei einer Wandstärke von 50 μm . Der Boden besitzt Poren, die einen ungehinderten Stoffaustausch schon bei Superfusion gewährleisten, aber auch das Durchströmen des Zellverbandes mit Medium erlauben (Perfusion).

Der Einsatz von Mikrosystemtechniken zur Herstellung von Bioreaktoren hat sich als großer Vorteil zur definierten Kultivierung von fortschrittlichen Zellkulturen herausgestellt. Die experimentell notwendige Diversität bezüglich

verschiedener Zelllinien, Seren, Medien und Wirkstoffe kann ökonomisch nur durch die Anwendung miniaturisierter Systeme adressiert werden.

Aus der Dissertation von C. Augspurger (Leipzig 2007) ist bekannt, dass derartige 3D-CellChips (d.h. Probenträger mit 3D-Kulturen) standardmäßig in Bioreaktoren mit einigen 25 ml Volumen mit externen Pumpen als in sich geschlossene Systeme betrieben werden. Diese Bioreaktoren sind jedoch nur eingeschränkt für Anwendungen u.a. in der Pharmaforschung einsetzbar, da sie nicht kompatibel zu den Schnittstellen der automatisierten Labortechnik wie z.B. dem Mikrotiterplattenformat (oder auch „MTP footprint“) sind. Außerdem ist es nicht möglich, zu diesen Bioreaktoren Testsubstanzen automatisch zuzuführen. Sie sind zudem durch eine mangelnde Parallelisierbarkeit charakterisiert. Ein weiteres Problem besteht darin, dass das eingesetzte notwendige biologische Material bzw. Volumen für viele Aufgaben einfach zu groß ist, um sinnvoll für parallele Ansätze eingesetzt zu werden.

Für die angestrebte Miniaturisierung und Parallelisierung auf einem MTP footprint ist das Format, Volumen bzw. die Konstruktion der aus dem Stand der Technik bekannten Bioreaktoren insbesondere für Screening Anwendungen zu groß und aufwendig. Aus Wintermantel: Dreidimensionale Zellkulturen; TUM Mitteilungen 4-2006 (Oktober 2006) ist das Einbringen von 3D strukturierten Polymeren oder Polymerschäumen in 24- oder 96-er MTP als Supportstrukturen für die 3D Kultivierung als passive Systeme bekannt. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Bioreaktoren verfügen diese Systeme aber über keine aktive Perfusion, kein aktives Durchströmen des Gewebe- und Zellmaterials, stellen also ein unzureichendes Modell für die Nachbildung der Organe im lebenden Organismus dar.

In der US 2007/0128715 A1 ist ein Perfusionsgerät beschrieben, das einen Probenträger zur Aufnahme von Zellen besitzt. Außerdem sind Eingangskanäle vorhanden, über welche die Zellen mit einem Substrat versorgt werden können. Eine externe Pumpe kann zu Verstärkung der Perfusion angeschlossen werden. Aufgrund der erforderlichen externen Einheiten ist eine parallel Anordnung zahlreicher Perfusionsgeräte in einer integrierten Einheit, insbesondere im Format einer Mikrotiter-Platte nicht möglich.

Die US 2004/0229349 A1 beschreibt u.a. ein Gerät für die mikrofluidische Behandlung und Detektion von Partikeln, wie beispielsweise Zellen. Die Durchflutung von mehreren Zellkammern wird z.B. von einer gemeinsamen peristaltischen Pumpeinheit hervorgerufen, welche jedoch nicht näher erläutert wird. Die Zellkammern stehen in fluidischem Kontakt, sodass die völlig unabhängige Kultivierung unterschiedlicher Zellkulturen in parallelen Zellkammern nicht möglich ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile zu überwinden und einen Mikrobioreaktor sowie ein miniaturisierbares, paralleles Bioreaktorsystem für die 3D-Zellkultivierung für die Laborautomatisierung bzw. das automatisierte High-Content-Screening (HCS), also der automatischen Bestimmung vieler biologischer und physikalischer Parameter, bzw. den sogenannten High-Throughput-Screening (HTS) bereitzustellen.

Erfindungsgemäß gelingt die Lösung dieser Aufgabe mit einem Mikrobioreaktor nach Patentanspruch 1 bzw. einer Bioreaktor-Mikrotiter-Platte nach Anspruch 15.

Ein erfindungsgemäßer Mikrobioreaktor besteht im Wesentlichen aus einem Probeneträger zur Aufnahme von Zellen; einem Bypass mit einer Kapillaröffnung zur Zugabe von Testreagenz und/oder zum Be- bzw. Entlüften des Mikrobioreaktors; einem integrierten Pumpmodul zur Perfusion des Mikrobioreaktors mit Testreagenz und/oder Be- bzw. Entgasen des Mikrobioreaktors; einem transparenten Sichtfenster und Fluidkanälen, die einen Kreislauf bilden.

Eine erfindungsgemäße Bioreaktor-Mikrotiter-Platte besteht aus einer Vielzahl von derartigen Mikrobioreaktoren.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Zeichnungen näher erläutert. In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 - einen prinzipiellen Aufbau eines erfindungsgemäßen Mikrobioreaktors;

Fig. 2 - einen prinzipiellen Aufbau einer Membranpumpe;

Fig. 3 - mehrere Ansichten einer Peristaltikpumpe zur Veranschaulichung der Funktionsweise in mehreren Schritten;

Fig. 4 - eine perspektivische Explosionsdarstellung des prinzipiellen Aufbaus einer bevorzugten erfindungsgemäßen Bioreaktor- bzw. CellChip-Mikrotiter-Platte.

Im Folgenden werden zwei mögliche Lösungsvarianten zur Konstruktion von Mikrobioreaktoren mit integrierten mikroperforierten Unterstützungsstrukturen unterschieden: die aktiven bzw. davon unterschieden die passiven Systeme. Als aktive Systeme werden solche Systeme bezeichnet, bei denen ein Fluid durch eine im System integrierte Pumpe durch das System gepumpt und somit eine CellChip-Struktur bzw. die darin kultivierte Probe durchströmt wird. Passive Systeme hingegen bezeichnen Systeme, bei denen CellChip-Strukturen bzw. Proben in die Mikrobioreaktoren oder Kultivierungsgefäße eingebracht werden und Strömungen - falls überhaupt - durch externe Pumpensysteme etc. realisiert werden.

In Fig. 1 ist ein erfindungsgemäßer Mikrobioreaktor 1 in einer prinzipiellen Ausführungsform dargestellt. Der Mikrobioreaktor 1 besteht aus einem integrierten Pumpmodul 5, das z.B. als Membran- oder Peristaltikpumpe ausgeführt sein kann, einem Mediumreservoir 6 und einem Probenträger 7 (vorzugsweise ein 3D-CellChip) mit einer Probe, die von oben durch ein transparentes Fenster 2 beobachtet werden kann. Aufgrund des geringen Abstands zwischen dem Fenster 2 und der Probe ist ein Mikroskopieren mit geringem Objektivabstand möglich. Über einen Bypass 3 kann von außen in das System über einen Fluidkanal 4 Testreagens eingebracht werden. Der Fluidkanal 4 bildet über das Pumpmodul 5 und das Reservoir 6 einen Kreislauf aus, durch welchen das Fluid/Testreagenz gefördert wird, um die Probe am Probenträger 7 zu durchströmen. Über eine Zuleitung 8 kann ein in den Mikrobioreaktor integriertes Pumpmodul 5 betrieben werden, wobei eine pneumatische Aktivierung bzw. Ent- und Begasung möglich sind. Beim Betrieb des Pumpmoduls 5 fördert die Pumpe das Fluid im Kreislauf, sodass die Zellkultur (Probe) optimal mit dem Nährstoffmedium bzw. dem Testreagenz versorgt werden kann.

In einer abgewandelten Ausführungsform können vorzugsweise für Anwendungen in der Kokultur zwei CellChips übereinander gestapelt in den Bioreaktor eingebracht werden.

Der Probeneträger 7 gestattet die zwei- oder vorzugsweise dreidimensionale Kultivierung von suspendierten oder aggregierten Einheiten, vorzugsweise Zellen oder Geweben. Der Probeneträger kann dazu als Rückhaltemembran für suspendierte Zellen oder als Zellkultursubstrat für adhärente Zellen gestaltet sein. Für adhärente Zellen wird der Probeneträger vorzugsweise auf ganzer Fläche gefüllt und nicht partiell, weil letzteres vorrangig eine Umströmung aber weniger die gewünschte Durchströmung der gefüllten Fläche zur Folge hätte.

In einer in Fig. 2 vereinfacht dargestellten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikrobioreaktors ist eine Membranpumpe als Pumpmodul 5 vorgesehen. Sie besteht aus einem Ventilblock aus zwei gleichartigen Einzelteilen 9 und 10, die je nach verwendetem Material auch untrennbar gefügt sein können, wobei für die Gewährleistung der Funktion der Rückschlagventile, jeweils an einem Ventilsitz 11 eine besondere Beschichtung aufgebracht sein kann, die ein Verbinden an dieser Stelle verhindert. Über einen Zulauf 12 wird das Fluid eingesaugt, wenn sich eine Pumpkammer 13 durch eine Deformation einer Arbeitsmembran eines Kammergehäuses 14 vergrößert. Beim anschließenden Verkleinern des Kammervolumens wird das Fluid an einem Ablauf 15 wieder herausbefördert. Im quasistatischen Betrieb hat diese Pumpe nur eine Förderrichtung, welche durch die Anordnung der Ventile vorgegeben ist. Das Pumpmodul 5 ist derart in den Mikrobioreaktor integriert, dass eine parallele bzw. matrixartige Anordnung zahlreicher Mikrobioreaktoren mit jeweils integriertem Pumpmodul möglich bleibt.

Bei einer geeigneten Wahl von Ventilklappen, Kammergröße, Membran und Fluid kann die zuvor erwähnte Pumpe in Abhängigkeit von der Ansteuerfrequenz vor- bzw. rückwärts pumpen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung einer Membranpumpe liegt in der aktiven Begasung des Mediums, da das Membranmaterial so gewählt werden kann, dass es für Gase permeabel ist. Das Kammervolumen der Membranpumpe ist abhängig von der gewünschten Förderrate und ist bei erfindungsgemäßen Mikrobioreaktoren vorzugsweise kleiner als 2 μ l.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikrobioreaktors ist eine Peristaltikpumpe als Pumpmodul 5 vorgesehen. Den Pumpzyklus der Peristaltikpumpe kann man grob in vier Abschnitte einteilen, die in Fig. 3 dargestellt sind. Zuerst wird über einer Arbeitsmembran 16 ein Unterdruck angelegt. Infolge dessen öffnet sich ein Zulauf 17 der Pumpe und der entstehende Unterdruck in der Pumpkammer wird durch das Einströmen von dem zu förderndem Fluid ausgeglichen. Wenn der anliegende Druck auf der Arbeitsmembran 16 den Umgebungsdruck erreicht hat, ist das Ventil am Zulauf 17 wieder geschlossen. Bei der weiteren Erhöhung des Druckes auf die Arbeitsmembran 16 strömt das zuvor angesaugte Medium in Richtung eines Ablaufs 18, da es auf Grund der Verdrängung für das Medium keine weitere Möglichkeit gibt. Im letzten Schritt liegt wieder der Ausgangszustand vor, d.h. am Ablauf 18 hat sich das Ventil aufgrund elastischer Effekte wieder geschlossen. Damit diese Art von Pumpe optimal arbeitet, wird sie in der Nähe der Resonanzfrequenz betrieben. Aufgrund der Phasenänderung beim Durchlaufen der Resonanzfrequenz kann auch die Pumprichtung umgekehrt werden.

Um die Begrenztheit der aus dem Stand der Technik bekannten Bioreaktoren und anderen Systeme zu überwinden, wird in einem parallelen Format erfindungsgemäß jedes Well, also jeder Mikrobioreaktor, mit einer Mikropumpe versehen, die konstruktionsgemäß als pulsierendes System die Situation in einem wirklichen Organismus (Herzschlag, Blutkreislauf) optimal nachbildet.

Ein solches System wird im Folgenden als „CellChip-Mikrotiter-Platte“ (CellChip-MTP) oder Bioreaktor-Mikrotiter-Platte“ (BR-MTP) bezeichnet. Eine CellChip-Mikrotiter-Platte besteht aus einem Array von vorzugsweise voneinander unabhängigen Mikrobioreaktoren, die als aktive Systeme ausgeführt sind. Kernstück einer solchen CellChip-Mikrotiter-Platte ist mindestens ein Mikrobioreaktor mit integrierter Pumpe vorzugsweise bestückt mit einem CellChip als Träger einer fortgeschrittenen Zellkultur. Dabei ist die Größe eines einzelnen Reaktors auf einer BR-MTP durch das Rastermaß einer Mikrotiter-Platte bestimmt in der je nach Ausführung 6, 12, 24, 48, 96 oder mehr Reaktoren parallel angeordnet sind. Das Medienvolumen, das sich innerhalb eines einzelnen Bioreaktors befindet, variiert somit je nach Menge der Reaktoren zwischen 100 μ l und 25 ml, vorzugsweise aber im unteren Milliliter-Bereich. Alle Kanäle weisen vorzugsweise einen maximalen Querschnitt von unter 4mm² auf.

Ein bei allen geschlossenen Systemen ungelöstes Problem betrifft das automatische Einbringen von Testreagenz in das System. Gerade bei parallelisierten Anordnungen auf dem MTP footprint ist der Einsatz eines Pipettierroboters vorteilhaft, was in geschlossenen Systemen jedoch unzureichend möglich ist. In einem geschlossenen fluidischen System ist es normalerweise nicht möglich, über eine offene Kontaktstelle Flüssigkeit

zuzudosieren. Das Fluidsystem ist über eine Kapillare, eine Art Bypass, mit der Umgebung verbunden. Diese Kapillare ermöglicht das Hinzufügen von kleinen Flüssigkeitsmengen. Erwartungsgemäß würde dies in einem vollständig gefluteten hydraulischen System nicht funktionieren. Da dieses System über elastische Elemente verfügt, kann es bis zu einem gewissen Grad Flüssigkeit aufnehmen. Die Menge der zugeführten Flüssigkeit hängt von der Größe der Kapillare und maximalen Deformation der elastischen Elemente ab, d.h. der Innendruck des Systems ist durch den Grenzflächendruck des Mediums zur Umgebung begrenzt. Elastische Elemente im Sinne der Erfindung können durch Fertigung des gesamten Systems aus einem elastischen Material (z.B. Silikon) erzeugt werden. Auch die Membran der Membranpumpe oder das gezielte Einbringen von Zonen mit sehr geringen Wandstärken kann in diesem Zusammenhang als elastisches Element betrachtet werden. Auch eine gezielte Oberflächenstrukturierung führt zu elastischem Verhalten des Systems.

Die Kapillare liegt in ihrer maximalen Dimension in der Größenordnung der Fluidkanäle. In einer teilsterilen und unsterilen Umgebung der BR-MTP kann ein Septum oder Sterilfilter zum Verschluss der Kapillare zum Einsatz kommen. Das Septum muss dabei in seiner Größe der Verwendung von marktüblichen Injektionskanülen genügen. Bei einer Abtrennung durch einen Sterilfilter sind dessen Dimensionen auch durch die Dimension der Fluidkanäle bestimmt. Das Filtermaterial muss gegenüber dem Testreagenz einen Kontaktwinkel von weniger als 90° und gegenüber dem Medium einen Kontaktwinkel von vorzugsweise größer 90° aufweisen. Bei einem Filter im Sinne der vorliegenden Erfindung muss es sich um eine Siebstruktur handeln, die das Eindringen kontaminierender Partikel verhindert (z.B. Bakterien, Zellen, Pilze, Staub,...). In einer steri-

len Umgebung der BR-MTP kann die Kapillaröffnung auch unverschlossen sein. Hier ist die Dimension der Kapillaröffnung in der Größenordnung der Kanäle, vorzugsweise aber in einem Bereich $<500\mu\text{m}$, zu wählen. Die Kapillare muss so dimensioniert sein, dass der Innendruck des Systems (hervorgerufen durch die Pumpe) immer kleiner ist als der Krümmungsdruck des Meniskus, der an der Kapillare entsteht. Auch die Abdeckung der Kapillare mit einem einfachen Deckel ist Teil einer erfindungsgemäßen BR-MTP.

Erfindungsgemäß können basierend auf der Konstruktion hochintegrativer, paralleler Systeme mit aktiven Elementen zur Perfusion von 3D Zellkultursystemen in verschiedenen Ausführungsformen vorzugsweise mit integrierten Sensoren (pH, O_2 , CO_2 , ...) aktive Systeme auf HTS Anlagen, d.h. analog zu MTPs, realisiert werden.

Erste Versuchsanordnungen fokussieren auf ein 24well-Reaktorsystem. Ein solches aktives System ist potentiell transportfähig und wird gekapselt ausgeführt, also eine CellChip-MTP mit integrierter Fluidik mit zunächst 24 unabhängigen Bioreaktoren mit jeweils einer Öffnung und einem Bypass zur Zuführung z.B. von Testreagenzien und deren Verteilung im einzelnen Reaktor.

Dieses soll in einer Ausführung den Transport eukaryotischer Zellen vom Zellkulturlabor zum Anwender ermöglichen. Die Zellen werden in diesem Fall nicht tiefgefroren, sondern verbleiben in ihrer Kulturmgebung für eine optimale Kultur in einem Modul, das in eine Transportbox eingeschoben wird. Der Transport von einfachen Zellen ist sowohl in einfachen passiven als auch aktiven Systemen möglich. Hierzu werden im einfachsten Fall die 3D-CellChips (Proben) gehaust und mit der geeigneten Carbogen-

Mischung (O_2 mit 5 % CO_2) begast und vorzugsweise auf einer einzustellenden gewünschten Temperatur gehalten.

In einer weiteren Ausführungsform kann das komplette Array in einem vereinfachten Fertigungsverfahren hergestellt und produziert werden. Eine solche Ausführungsform ist in Fig. 4 gezeigt. Diese Ausführungsform der erfindungsgemäßen Bioreaktor-Mikrotiter-Platte ist eine aktive 24 Wellplatte, bestehend aus einer Grundplatte 22 mit Anschluss für die Druckzufuhr. Eine Verteilerplatte 23 beinhaltet Kanäle für die Verteilung der Antriebsdruckluft auf die 24 Kanäle. Ein Pumpenhalter 24 nimmt die 24 Mikropumpen für die einzelnen Wells auf. Eine Rasterplatte 25 nimmt mehrere Träger 26 für die CellChips auf. Jeder Träger 26 stellt ein Kreislaufsystem des Mikrobioreaktors dar, welches der Aufnahme von Proben dient. Jedes Kreislaufsystem umfasst den Probenträger 7, die Fluidkanäle 4 und ggf. das Medienreservoir 6. Die Rasterplatte und die Kreislaufsysteme können auch zu einem Bauteil vereinigt werden. Das System wird mittels eines Deckels 27 abgeschlossen, in welchen die Sichtfenster 2 und die Zugänge zu den Bypässen 3 vorgesehen sind.

Der komplette CellChip-MTP kann demnach aus bis zu fünf einheitlichen Formkörpern produziert werden, wobei natürlich Zwischenstufen, bei denen z.B. die Membranen der einzelnen Pumpen oder die Pumpen als Einzelelemente in einen Rahmen gelegt werden, realisiert werden können.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform wird entweder durch chemische oder physikalische Oberflächenmodifikation der Fluidkanäle die Benetzung mit dem Fluid so optimiert, dass Gasblasen dort keine Anheftungsmöglichkeiten haben oder dass durch geometrische Minimierung relevanter Grenzflächen ebenso

keine Gasblasen anheften können. Umgekehrt können in dem System gerade solche Stellen definiert werden, die als Blasenfänger dienen können.

Die Integration von Strömungssensoren ist in einer weiteren Ausführungsform realisierbar.

Deckgläschen zur Abdeckung des Bioreaktors können vorzugsweise als optisch transparente Sensoren, vorzugsweise aus dem AlGa_N/Ga_N Material, ausgeführt sein. Das Sichtfenster besteht vorzugsweise aus einem transparenten Sensor- und Funktionsmaterial, insbesondere aus Materialien der Gruppe III - V Halbleiter.

Bezugszeichenliste

1	-	Mikrobioreaktor
2	-	transparentes Fenster
3	-	Bypass mit Kapillaröffnung
4	-	Fluidkanal
5	-	Pumpmodul
6	-	Mediumreservoir
7	-	Probenträger
8	-	Zuleitung
9, 10	-	gleichartige Bauteile einer Membranpumpe
11	-	Ventilsitz in der Membranpumpe
12	-	Zulauf der Membranpumpe
13	-	Pumpkammer der Membranpumpe
14	-	Kammergehäuse mit Arbeitsmembran
15	-	Ablauf der Membranpumpe
16	-	Arbeitsmembran einer peristaltischen Pumpe
17	-	Zulauf der peristaltischen Pumpe
18	-	Ablauf der peristaltischen Pumpe
19	-	Rückstellfeder
20	-	Pumpendeckel
21	-	Pumpenkörper
22	-	Grundplatte mit Anschluss für eine Druckzufuhr
23	-	Verteilerplatte
24	-	Pumpenhalter
25	-	Rasterplatte
26	-	CellChip-Träger / Kreislaufsystem
27	-	Deckel

Patentansprüche

1. Mikrobioreaktor (1) umfassend:

- einen Proben­träger (7) zur Aufnahme einer Probe, insbesondere aus Zellen oder Geweben;
- ein integriertes Pumpmodul (5) zur Perfusion des Mikrobioreaktors mit einem Medium;
- Fluidkanäle (4), die zur Schaffung eines Kreislaufs für das Medium mindestens an das Pumpmodul (5) und den Proben­träger (7) angeschlossen sind;
- einen Bypass (3) mit einer Kapillaröffnung, der zur Zugabe von Testreagenz und/oder zum Be- bzw. Entlüften des Mikrobioreaktors an den Kreislauf der Fluidkanäle (4) angeschlossen ist;
- ein transparentes Sichtfenster (2), welches die Beobachtung der Probe gestattet.

2. Mikrobioreaktor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er weiterhin ein Mediumreservoir (6) besitzt, welches in den Kreislauf eingebunden ist.

3. Mikrobioreaktor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das transparente Sichtfenster (2) und der Bypass (3) an einer Oberseite des Mikrobioreaktors angeordnet sind.

4. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Proben­träger ein 3D-CellChip ist oder aus mehreren übereinander gestapelten 3D-CellChips besteht.

5. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Pumpmodul (5) eine peristaltische Pumpe mit einem Zu- bzw. Ablauf (17, 18) und einer Arbeitsmembran (16) ist, mit welcher eine Pumprichtungsumkehr realisiert werden kann.
6. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Pumpmodul (5) eine Membranpumpe mit zwei Rückschlagventilen (11) und einem Zu- bzw. Ablauf (12, 15) ist.
7. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Pumpmodul (5) eine permeable Arbeitsmembran (16) besitzt, durch welche ein Be- bzw. Entgasen des Mikrobioreaktors möglich ist.
8. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Pumpmodul (5) eine Zuleitung (8) besitzt, über welche ein Betriebsmittel zur Betätigung des Pumpmoduls zugeführt werden kann.
9. Mikrobioreaktor nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuleitung (8) an einer Unterseite des Mikrobioreaktors austritt.
10. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberflächen der Fluidkanäle (4) grenzflächenminimierend ausgeführt sind.

11. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sich unter- und/oder oberhalb des Probenträgers (7) eine Luftblasenfalle befindet, welche über einen direkt zugeführten Kanal befüllt oder entleert werden kann.
12. Mikrobioreaktor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der zur Luftblasenfalle geführte Kanal einen Verschluss besitzt, welcher insbesondere als ein Septum ausgebildet ist.
13. Mikrobioreaktor nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das transparente Sichtfenster (2) einen oder mehrere optisch transparente Sensoren umfasst.
14. Mikrobioreaktor nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparenten Sensoren AlGaIn-Sensoren sind.
15. Bioreaktor-Mikrotiter-Platte bestehend aus einer Vielzahl von matrixförmig angeordneten Mikrobioreaktoren (1) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, deren durch ihre jeweiligen Fluidkanäle (4) gebildeten Kreisläufe unabhängig voneinander sind.
16. Bioreaktor-Mikrotiter-Platte nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die mehreren Mikrobioreaktoren (1) im Raster einer Mikrotiter-Platte (vorzugweise 24 Well) angeordnet sind und deren laterale Außenabmaße nicht überschreiten.

17. Bioreaktor-Mikrotiter-Platte nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Pumpmodule (5) aller Mikroreaktoren (1) jeweils eine eigene Zuleitung (8) für die Zufuhr eines Betriebsmediums besitzen.
18. Bioreaktor-Mikrotiter-Platte nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuleitungen (8) an eine gemeinsame Versorgungseinheit geführt sind.
19. Bioreaktor-Mikrotiter-Platte nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einem System von Formteilen, welche zu einer Einheit zusammengesetzt werden, besteht, wobei die einzelnen Formteile eine Grundplatte (22) mit Anschluss für eine Antriebsdruckluftzufuhr, eine Verteilerplatte (23) mit Kanälen für die Verteilung der Antriebsdruckluft, ein Pumpenhalter (24) zur Aufnahme der einzelnen Pumpmodule (5), eine Rasterplatte (25) zur Aufnahme einzelner Träger (26) und ein Deckel (27) sind, wobei die Bestandteile jedes einzelnen Mikroreaktors (1) auf den Pumpenhalte (24), die Träger (26) in der Rasterplatte (25) und den Deckel (27) verteilt sind.

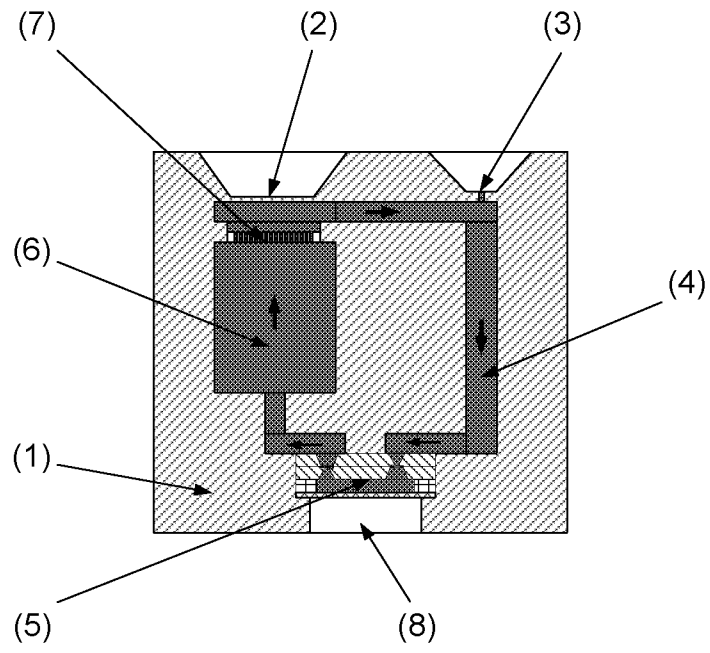


Fig. 1

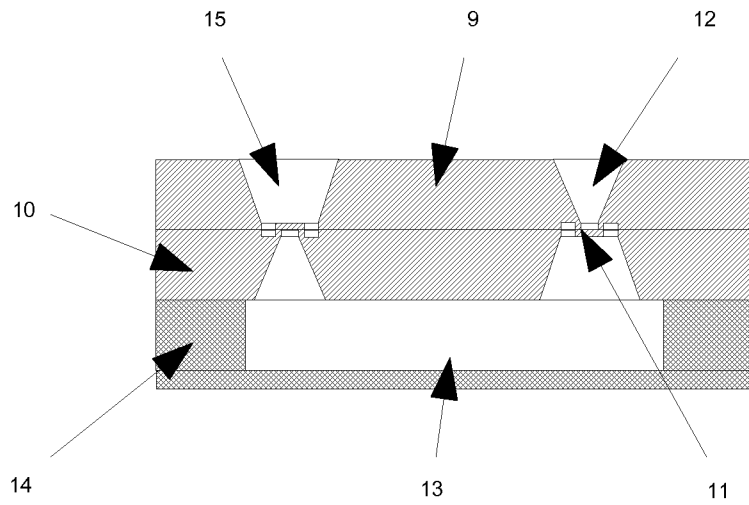


Fig. 2

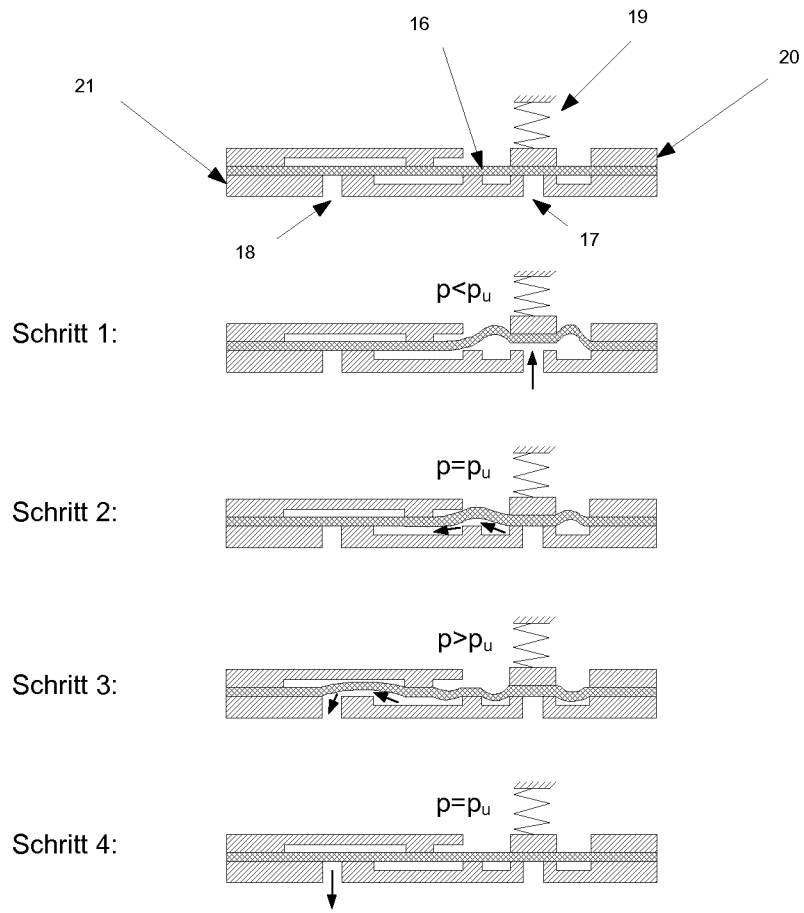


Fig. 3

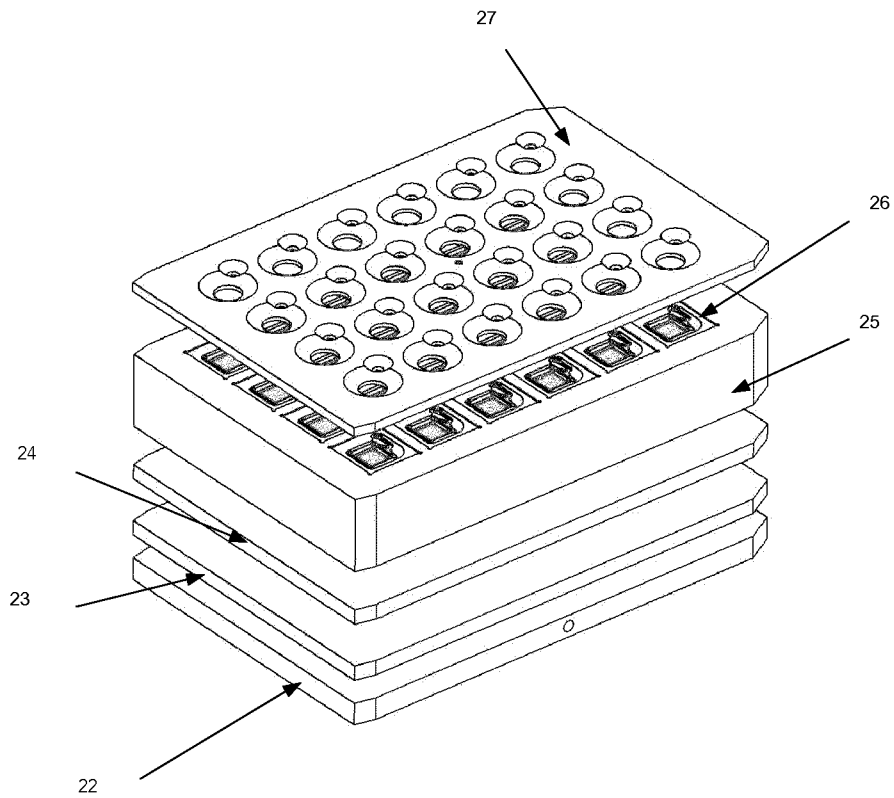


Fig. 4