



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 006 843 A1** 2008.08.14

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 006 843.5**

(22) Anmeldetag: **12.02.2007**

(43) Offenlegungstag: **14.08.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12M 1/40 (2006.01)**
C12M 3/04 (2006.01)

(71) Anmelder:
bioregeneration GmbH, 85748 Garching, DE

(74) Vertreter:
**Huebner, S., Dipl.-Phys. Dr. rer. nat., Pat.-Anw.,
80803 München**

(72) Erfinder:
Bertholdt, Günter, Dr., 73092 Heiningen, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 103 61 898 A1

EP 12 30 939 A1

EP 03 96 344 A2

WO 03/0 70 084 A2

WO 01/61 026 A1

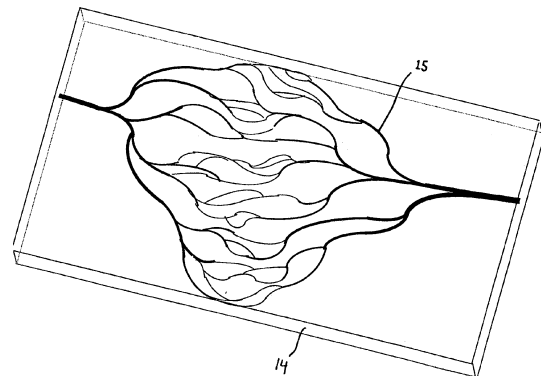
JP 2006-3 25 534 AA

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Stützstruktur zum Kultivieren lebender Zellen**

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zum Kultivieren lebender Zellen, bei dem die Zellen auf einer Stützstruktur (14) kultiviert werden, umfasst die Stützstruktur (14) Cellulose. Ein Verfahren zur Herstellung einer Stützstruktur (14) aus Cellulose zum Kultivieren lebender Zellen umfasst die Schritte: Bereitstellen einer Hohlform; Kultivieren Cellulose bildender Organismen in einem von der Hohlform geschaffenen Innenraum, um die Stützstruktur (14) in dem Innenraum wachsen zu lassen; Entformen der Hohlform. Beim Schritt eines Entformens der Hohlform wird wenigstens ein Teil (2, 3, 4) der Hohlform irreversibel verformt.



Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Kultivieren lebender Zellen gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1 und eine Verwendung einer Struktur, die kristalline Cellulose umfasst. Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Stützstruktur aus Cellulose zum Kultivieren lebender Zellen gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 8, Stützstrukturen zum Kultivieren lebender Zellen gemäß der Oberbegriffe der Ansprüche 16 bis 18 und eine Hohlform zur Herstellung einer Stützstruktur gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 19.

Stand der Technik

[0002] Es ist häufig wünschenswert, lebende Zellen in vitro zu züchten, z. B. aus Zellen, die einem Organismus entnommen worden sind, um die gezüchteten Zellen demselben Organismus zu implantieren und so eine Gewebefunktion zu erhalten oder wieder herzustellen. Die Züchtung von Zellen oder Zellgeweben in vitro wird häufig auch als "Tissue Engineering" bezeichnet. Bei den Geweben handelt es sich vorzugsweise um Weichgewebe, z. B. Haut-, Muskel- oder Fettgewebe, im Gegensatz zur Hart- oder Knorpelgewebe.

[0003] Es ist bekannt, lebende Zellen in Kulturgefäßen, z. B. Kulturflaschen oder -schalen, zu kultivieren, wo sie vom Nährmedium bedeckt auf dem Boden des Kulturgefäßes eine einlagige ("zweidimensionale") Zellschicht ausbilden. Die so kultivierten Zellen können sich jedoch in ihren Eigenschaften von Zellen gleichen Typs unterscheiden, die sich in vivo in einem Gewebeverband innerhalb eines Organismus befinden, was ihren diagnostischen und therapeutischen Wert wesentlich beeinträchtigen kann.

[0004] Ein lebendes Gewebe besteht in der Regel aus einer Vielzahl spezialisierter Zellen, die sich gegenseitig mit Hilfe von Signalmolekülen beeinflussen, und es wird vermutet, dass Zellen sich innerhalb von Konzentrationsgefällen kleinmolekularer Stoffe orientieren und in einer bestimmten Weise verhalten können. Man spricht hier auch von „positioneller Information“. Zwischen den Zellen eines Gewebes gibt es Stützstrukturen, extrazelluläre Matrix genannt, die aus von den Zellen abgegebenen Makromolekülen bestehen und die die Zellen in ihrer jeweiligen Position stabilisieren. Wird die extrazelluläre Matrix zerstört und werden die Zellen durchmischt, sind normale, differenzierte Körperzellen nicht mehr in der Lage, sich neu zu organisieren und die verlorenen Strukturen wiederaufzubauen. Man hat jedoch festgestellt, dass diese Zellen ihre normale Funktion wieder aufnehmen können, wenn sie in ihren ursprünglichen, räumlichen Zusammenhang mit den entsprechenden

Nachbarzellen gebracht werden.

[0005] Ein bekannter Lösungsansatz versucht, die extrazelluläre Matrix nachzubilden, indem Zellen innerhalb spezieller Stütz- oder Gerüststrukturen, auch Scaffolds genannt, "dreidimensional" kultiviert werden. Scaffolds sind zumindest schaumartige, poröse Gebilde mit einer großen inneren Oberfläche.

[0006] Es sind Scaffolds aus biologisch abbaubaren ("resorbierbaren") Materialien bekannt. Diese sollen es unter anderem ermöglichen, dass die in dem Scaffold wachsenden Zellen dieses allmählich durch eine eigene extrazelluläre Matrix ersetzen.

[0007] Die US-Offenlegungsschrift US 2005/0063939 A1 beschreibt ein für Tissue Engineering geeignetes Scaffold aus einem biologisch abbaubaren, elastomeren Polymer, welches Citronensäure enthält. In der Europäischen Patentschrift EP 1 053 757 B1 wird ein Trägermaterial aus Collagen (Gelatine) beschrieben. Die Internationale Offenlegungsschrift WO 2006/099137 A1 beschreibt ein Scaffold für die Wundheilung aus vernetztem Fibrin und/oder Albumin. Die Internationale Offenlegungsschrift WO 2002/062961 offenbart die Herstellung von Scaffolds aus sich selbst zu größeren Verbänden anordnenden ("self-assembling") Peptiden, um Zellen einzukapseln.

[0008] Bei der Verwendung resorbierbarer Materialien kann es nachteilig sein, dass sich diese zu schnell abbauen, um die notwendige mechanische Stabilität zu gewährleisten. Insbesondere kann das Risiko bestehen, dass mit Hilfe resorbierbarer Scaffolds geschaffene Gefäße Blut nicht sicher leiten. Weiterhin kann es nachteilig sein, dass Restmaterial verbleibt, das Fremdkörper- oder Abstoßungsreaktionen auslöst. Aus diesen und anderen Gründen wurden auch Scaffolds aus nicht-resorbierbaren Materialien vorgeschlagen.

[0009] Die Schrift WO 03/070084 beschreibt ein röhrenförmiges Scaffold zur Regeneration von Blutgefäßen aus nicht-resorbierbaren Fasern wie Nylon, SILASTIC™, Silikon, Polyurethan und Polyester. Die Internationale Offenlegungsschrift WO 2006/096791 offenbart die Verwendung zahlreicher gegenwärtig verfügbarer resorbierbarer und nicht-resorbierbarer synthetischer Polymere, um daraus sogenannte Nanofilamente zu erzeugen, aus denen ein geschichtetes Scaffold aufgebaut werden soll. Nachteilig an den nicht-resorbierbaren Materialien kann sein, dass sie zumindest leichte Gewebereaktionen auslösen. Außerdem ist es möglich, dass die Materialien bei längerer Implantationszeit im Körper angegriffen und zersetzt werden.

[0010] Beim Kultivieren von Zellen oder Geweben in vitro kann erforderlich sein, Vorkehrungen zu treffen,

um die Zellen mit Nährstoffen und/oder Sauerstoff, zu versorgen. In der Europäischen Offenlegungsschrift EP 1 230 939 A1 wird eine primär vaskularisierte Gewebematrix beschrieben, die aus Teilen des Magen-Darm-Trakts des Schweins hergestellt wurde. Bei der Herstellung soll darauf geachtet werden, dass ein vollständiger Gefäßast mit zuführender Arterie und abführender Vene vorhanden ist. Nachdem die tierischen Zellen durch sogenannte Azellularisierungsverfahren entfernt worden sind, soll die resultierende Matrix mit Blut durchströmt und mit humanen Zellen besiedelt werden. Es soll auf diese Weise möglich sein, auch eine größere Zahl von Zellen und stärkere Schichtdicken ausreichend mit Nährstoffen, Mineralien und Sauerstoff zu versorgen. Nachteilig kann jedoch sein, dass die verwendete Matrix erhebliche Mengen an tierischem Eiweiß und anderen potentiell immunogenen Molekülen enthält. Weiterhin kann nachteilig sein, dass der tierische Ursprung der Matrix eine Standardisierung des Verfahrens erschwert.

[0011] Die Internationale Offenlegungsschrift WO 2006/042287 A2 offenbart ein mehrlagiges Scaffold mit Mikrokanälen zur Anwendung für Tissue Engineering, das mit bakterieller Cellulose beschichtet ist. Das darin beschriebene Scaffold ist jedoch im Wesentlichen auf die Züchtung von Knorpelgewebe optimiert und nur bedingt zur Implantation geeignet. Insbesondere ist unklar, wie die Beschichtung mit der bakteriellen Cellulose erfolgen soll, denn die angegebene Vorschrift führt weder zu einer gleichmäßigen Schicht, noch gibt sie an, wie diese auf der Unterlage haften soll.

[0012] Die Internationale Offenlegungsschrift WO 2001/61026 A1 offenbart ein Verfahren zur Herstellung eines Hohlkörpers aus mikrokristalliner Cellulose bakteriellen Ursprungs, der ohne nachteilige Wirkung wie Fremdkörperreaktion oder Thrombenbildung in die Halsschlagader einer Ratte implantierbar sein soll. Das hier beschriebene Verfahren eignet sich jedoch nur zur Herstellung eines etwa 20 Millimeter langen Hohlkörpers.

Der Erfindung Zugrundeliegendes Problem

[0013] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren zum Kultivieren lebender Zellen bereitzustellen. Der Erfindung liegt außerdem die Aufgabe zugrunde, eine neue Verwendung einer Struktur, die kristalline Cellulose umfasst, bereitzustellen. Weiterhin liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung einer kristalline Cellulose umfassenden Stützstruktur, eine verbesserte Stützstruktur zum Kultivieren lebender Zellen und eine verbesserte Hohlform zur Herstellung einer kristalline Cellulose umfassenden Stützstruktur bereitzustellen.

Erfindungsgemäße Lösung

[0014] Zur Lösung der Aufgabe lehrt die Erfindung ein Verfahren zum Kultivieren lebender Zellen mit den Merkmalen des Anspruchs 1, die Verwendung einer Struktur, die kristalline Cellulose umfasst, mit den Merkmalen des Anspruchs 7, ein Verfahren zur Herstellung einer Stützstruktur mit den Merkmalen des Anspruchs 8, Stützstrukturen mit den Merkmalen der Ansprüche 16, 17 oder 18 und eine Hohlform mit den Merkmalen des Anspruchs 19.

[0015] Die erfindungsgemäße Stützstruktur kann beim Kultivieren der Zellen vorteilhaft als Ersatz für eine extrazelluläre Matrix dienen.

[0016] Es ist ein Aspekt der vorliegenden Erfindung, dass sie die vorteilhaften Eigenschaften der kristallinen Cellulose, vorzugsweise mikrokristalliner Cellulose in der nativen Form, wie von dem Bakterium *Acetobacter xylinum* hergestellt, zur Herstellung von Stützstrukturen zum Kultivieren lebender Zellen nutzt.

[0017] Es ist ein erreichbarer Vorteil der Erfindung, dass die Stützstrukturen nicht-toxisch und nicht-immunogen sind. Insbesondere ist erreichbar, dass die Stützstrukturen auch nach der Implantation in einem Organismus, z. B. dem menschlichen Organismus, keine oder nur eine verminderte Fremdkörper- oder Immunreaktion auslösen.

[0018] Es ist ein weiterer erreichbarer Vorteil der Erfindung, dass die Stützstrukturen nicht resorbiert werden. Hierdurch kann insbesondere eine größere mechanische Stabilität während der Kultivierung der Zellen oder auch über den längeren Zeitraum darüber hinaus sichergestellt werden.

[0019] Es ist ein erreichbarer, dass die Stützstruktur, obwohl sie nicht resorbiert wird, die Kultivierung der Zellen nicht oder weniger stört, sowohl in vitro als auch in vivo, insbesondere, weil schon ein Struktur mit einem geringen Celluloseanteil eine hohe Stabilität gewährleisten kann und der Rest der Stützstruktur im Wesentlichen aus Wasser bestehen kann. Insbesondere kann dies den Austausch von Signalmolekülen und/oder den Aufbau von Signalmolekülgradienten, die für die Zellkultivierung von Bedeutung ist, gewährleisten. Es kann auch dazu beitragen, dass die Stützstruktur kein oder nur ein geringes Hindernis für die Bildung oder Anlagerung einer extrazellulären Matrix darstellt. Es ist ein außerdem erreichbarer, dass die Stützstruktur ähnliche mechanische Eigenschaften aufweist wie das Zielgewebe. Mit der Erfindung kann erreicht werden, dass das ein mit der erfindungsgemäßen Stützstruktur kultiviertes Gewebe sich in seinen wesentlichen Eigenschaften nicht oder weniger von einem Gewebe unterscheidet, in dem keine Cellulose enthalten wäre.

[0020] Es ist ein erreichbarer Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass die Stützstruktur mittels einer Form hergestellt werden kann. Insbesondere kann eine an einen bestimmten Zweck angepasste Struktur geplant oder natürlichen Vorbildern nachgebildet werden.

[0021] Es ist ein Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer Stützstruktur und der erfindungsgemäßen Hohlform, dass sie sich das Prinzip der "verlorenen Form" zu Nutze machen.

[0022] Es ist ein erreichbarer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer Stützstruktur und der erfindungsgemäßen Hohlform, dass Hinterschneidungen beim Entformen kein Hindernis mehr darstellen. So ist insbesondere erreichbar, dass auch kompliziert gestaltete Hohlformen einfach zum Einsatz kommen können. Es ist insbesondere ein erreichbarer Vorteil, dass auch kompliziert gestaltete Stützstrukturen, insbesondere solche mit Hinterschneidungen, einfach hergestellt werden können.

[0023] Die Erfindung kann z. B. dazu eingesetzt werden, verschiedene Zellarten in vitro einzeln oder gemeinsam so zu kultivieren, dass daraus ein größerer Gewebeverband entsteht, der über längere Zeiträume hinweg untersucht werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäßen Stützstrukturen eignen sich insbesondere zur dreidimensionalen Kultivierung von Zellen, z. B. Säugtierzellen. Das Kultivierungsverfahren und die Stützstrukturen können auch zur Herstellung und/oder Regeneration lebender Gewebe, insbesondere menschlicher Organe oder Gewebe, eingesetzt werden. Die Erfindung kann dazu eingesetzt werden, extrazelluläre Strukturen natürlicher Gewebe nachzubilden, um sie anschließend mit den in diesen Geweben natürlich vorkommenden Zelltypen zu besiedeln.

[0024] Die Zellen bzw. das Gewebe können, nachdem sie in vitro kultiviert worden sind, z. B. in einen lebenden Organismus, insbesondere ein Säugetier, insbesondere den Menschen, implantiert werden. Es ist aber auch denkbar, die Stützstruktur ohne vorheriges Besiedeln zu implantieren, um eine Besiedelung in vivo zu ermöglichen. Hierbei kann die Stützstruktur die Selbstorganisation der Zellen in vivo durch Vorgabe einer Struktur anregen. Auf diese Weise bietet die Erfindung zum ersten Mal die Möglichkeit, ein (Weich-)Gewebe in vivo gezielt und stabil neu zu strukturieren.

Aufbau und Weiterbildung der erfindungsgemäßen Lösung

[0025] Die Stützstruktur umfasst vorzugsweise kristalline Cellulose. Vorzugsweise besteht die Stützstruktur im Wesentlichen aus Wasser und kristalliner

Cellulose, besonders vorzugsweise mikrokristalliner Cellulose, wie sie von dem Bakterium *Acetobacter xylinum* gebildet wird. Das bevorzugte Material enthält weniger als 10 Prozent kristalline Cellulose. Das Wasser ist bei dem bevorzugten Material teilweise und unterschiedlich stark an die mikrokristalline Cellulose gebunden. Kristalline Cellulose hat sich in Experimenten als besonders gewebefreundlich erwiesen. Die Cellulose bildenden Organismen sind vorzugsweise Bakterien, besonders vorzugsweise Bakterien des Stamms *Acetobacter xylinum*. Es ist denkbar, dass auch andere Cellulose bildende Mikroorganismen eingesetzt werden, wie z. B. geeignete Stämme von *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aerobacter* und *Zooglea*. Da die Gene der Cellulose synthetisierenden Enzymkomplexe von *Acetobacter xylinum* bekannt sind, könnten diese auch in andere Mikroorganismen, wie z. B. *Escherichia coli* durch die Anwendung bekannter molekularbiologischer Verfahren eingebracht werden, wodurch auch diese Organismen Cellulose synthetisieren könnten. Es sind aber auch Stützstrukturen aus Kombinationen kristalliner Cellulose und anderen Materialien denkbar, z. B. mit synthetischen resorbierbaren oder nicht-resorbierbaren Polymeren, z. B. den in der Internationalen Offenlegungsschrift WO 2006/096791 offenbarten. Der gesamte diesbezügliche Inhalt der vorgenannten Schrift ist durch Verweis Teil der vorliegenden Offenbarung. Es ist auch denkbar, dass die Stützstruktur Collagen, wie beispielsweise offenbart in der Europäischen Patentschrift EP 1 053 757, Fibrin und/oder Albumin, wie offenbart in der Internationalen Offenlegungsschrift WO 2006/099137 A1, oder azellularisiertes natürliches Gewebe, wie z. B. offenbart in der Europäischen Offenlegungsschrift EP 1 230 930 A1, umfasst. Der gesamte diesbezügliche Inhalt der vorgenannten Schriften ist durch Verweis Teil der vorliegenden Offenbarung. Vorzugsweise ist das andere Material im Wesentlichen vollständig von kristalliner Cellulose eingeschlossen.

[0026] Eine besonders bevorzugte Stützstruktur weist in ihrem Inneren mehrere voneinander getrennte Hohlräume auf. Die Hohlräume können z. B. globulär sein oder röhrenförmige Kanäle, besonders vorzugsweise spiralförmige Kanäle bilden. Besonders vorzugsweise sind die Hohlräume durch Öffnungen, z. B. durch röhrenförmige Kanäle mit der Außenseite der Stützstruktur verbunden. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass zu kultivierende Zellen oder Vorläufer der zu kultivierenden Zellen von außen durch die Öffnungen in die Hohlräume eindringen können. Es ist auch denkbar, dass ein Hohlraum, in denen sich Zellen angesiedelt haben, mit einem Medium durchströmt werden, z. B. einem Nährmedium oder Blut, um die Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, oder mittels des Durchströmens Einfluss auf die Entwicklung der Zellen zu nehmen. Auch können die Öffnungen dazu ge-

nutzt werden, dass ein Produkt der Zellen, z. B. Keratin, nach außen dringen können.

[0027] Eine bevorzugte Stützstruktur umfasst mindestens einen röhrenförmigen Hohlraum, der sich an wenigstens einer Stelle verzweigt. Besonders vorzugsweise laufen wenigstens einige der Zweige an anderer Stelle wieder zusammen. Besonders vorzugsweise umfasst die Stützstruktur ein System sich verzweigender und wieder zusammenlaufender Röhren, ähnlich einem Blutgefäßsystem. Vorzugsweise ist der Hohlraum an wenigstens zwei Stellen durch eine Öffnung mit der Außenseite der Stützstruktur verbunden. Besonders vorzugsweise sind die Stellen, an denen der Hohlraum sich verzweigt, und die Stellen, an denen die Zweige wieder zusammenlaufen, zwischen den beiden Stellen angeordnet, an denen der Hohlraum durch Öffnungen mit der Außenseite der Stützstruktur verbunden ist. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass Flüssigkeiten, z. B. Nährstofflösungen oder Blut, durch die Verzweigungen geleitet werden können, wobei die Flüssigkeit an der ersten der beiden Stellen hineingeleitet und an der zweiten wieder abgeleitet wird.

[0028] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer Stützstruktur aus Cellulose ist die Cellulose vorzugsweise kristalline Cellulose. Die Cellulose bildenden Organismen sind vorzugsweise Bakterien, besonders vorzugsweise Bakterien vom Stamm *Acetobacter xylinum*. Für die Kultivierung von *Acetobacter xylinum* sind unterschiedliche Nährmedien beschrieben. Ein geeignetes, häufig verwendetes Medium ist das in *Biochemical Journal* 58 von 1954, S. 345–352 beschriebene Medium von Schramm und Hestrin. Der gesamte diesbezügliche Inhalt des vorgenannten Artikels ist durch Verweis Teil der vorliegenden Offenbarung. Ein Nachteil dieses Mediums kann darin bestehen, dass es nicht genau definiert ist, da es Hefeextrakt und Pepton enthält.

[0029] Für die Ausführung der vorliegenden Erfindung wird ein vollsynthetisches Medium bevorzugt, wie z. B. von Fornig et al. in *Applied and Environmental Microbiology* von 1989, Bd. 55, Nr. 5, S. 1317–1319 beschrieben. Der gesamte diesbezügliche Inhalt des vorgenannten Artikels ist durch Verweis Teil der vorliegenden Offenbarung. Ein Nachteil dieses Mediums kann in dem etwas langsameren Wachstum der Bakterien bestehen.

[0030] Es ist auch denkbar, den sogenannten Kombucha-Teepilz zur Ausführung der Erfindung zu verwenden. Diese Kultur enthält neben *Acetobacter xylinum* zahlreiche andere in Symbiose lebende Organismen, wie Hefen und Bakterien, und lässt sich durch ein Medium, bestehend lediglich aus Schwarzte und Saccharose (100 g/l) unterhalten.

[0031] Bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren kann die irreversible Verformung beispielsweise durch ein plastisches Verformen, einen Verlust der Form durch Bruch oder durch wenigstens teilweisen Übergang in einen flüssigen oder gasförmigen Aggregatzustand, vorzugsweise durch Schmelzen oder Verdampfen, geschehen. Es sind aber auch Ausführungen der Erfindung denkbar, bei denen die Verformung durch chemische Behandlung, z. B. mittels eines Lösungsmittels, oder durch mechanische Behandlung, z. B. durch Ultraschall, herbeigeführt wird. Der Teil der Hohlform, der im Schritt des Entformens irreversibel verformt wird, grenzt vorzugsweise vor dem Verformen an die in der Hohlform gebildete Cellulose an. Der Schritt des Entformens der Hohlform wird vorzugsweise ausgeführt, nachdem die Stützstruktur die Hohlform vollständig ausgefüllt hat.

[0032] In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens umfasst die Hohlform eine äußere Form und mindestens einen Formkern. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass mit dem Hohlraum eine Stützstruktur mit Hohlräumen gebildet werden kann. Vorzugsweise ist ein Formkern ein Teil der Hohlform, der beim Entformen irreversibel verformt wird. Es ist ein Aspekt dieser Ausführung der Erfindung, dass das aus dem Stand der Technik bekannte Konzept eines beim Entformen entnehmbaren Formkerns aufgegeben wurde. Die Hohlform kann auch mehr als einen Formkern umfassen. Bei mehreren Formkernen werden vorzugsweise mindestens ein, besonders vorzugsweise alle Formkerne beim Schritt des Entformens irreversibel verformt. Vorzugsweise wird beim Entformen der Formkern wenigstens teilweise mit Wärme behandelt. Vorzugsweise umfasst der Schritt des Entformens ein wenigstens teilweises Schmelzen des Formkerns. Es kann der gesamte Formkern schmelzen oder nur bestimmte Teile von ihm. So ist es beispielsweise denkbar, dass der Formkern einen oder mehrere mit einem oder mehreren schmelzbaren Bestandteilen verbundene, vorzugsweise von ihnen zusammengehaltene, unschmelzbare Bestandteile umfasst.

[0033] In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung liegt der Schmelzpunkt des im Schritt des Entformens schmelzenden Teils der Hohlform über 28°C, besonders vorzugsweise bei oder über 30°C, besonders vorzugsweise bei oder über 60°C. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass der Formkern während des Kultivierens der Cellulose stabil bleibt. In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung liegt der Schmelzpunkt des im Schritt des Entformens schmelzenden Teils der Hohlform unter 100°C, besonders vorzugsweise unter 80°C, besonders vorzugsweise bei 62°C. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass die Cellulose-Stützstruktur beim Schmelzen des Formkerns nicht beschädigt wird.

[0034] Der Formkern wird beim Entformen der Hohlform vorzugsweise im Wesentlichen entfernt, besonders vorzugsweise quantitativ, d. h. rückstandslos.

[0035] Der Teil des Formkerns, der beim Entformen schmilzt, ist vorzugsweise im Wesentlichen hydrophob. Es ist ein Aspekt dieser Ausführung der Erfindung, dass ausgenutzt wird, dass ein hydrophobes Material von der hydrophilen Oberfläche des Cellulosekörpers abgestoßen wird. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass die Hohlform im Wesentlichen quantitativ entfernt werden kann.

[0036] In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung umfasst der Teil des Formkerns, der beim Entformen schmilzt, ein thermoplastisches Material, besonders vorzugsweise ein thermoplastisches Wachs und/oder Polymermaterial. Es ist ein erreichbarer Vorteil von Formkernen aus thermoplastischen Materialien, dass sie durch Gießen hergestellt werden können. Es ist ein weiterer Vorteil von Wachs und/oder Polymermaterialien, dass ihre Oberflächen einfach durch Polieren geglättet werden können, um die enge Anlagerung der synthetischen Cellulose zu erleichtern.

[0037] Ein bevorzugtes Wachs und/oder Polymermaterial umfasst Polyvinylalkohol (PVA), besonders vorzugsweise zu einem Anteil von mehr als 1%, besonders vorzugsweise mehr als 50%. In einer besonders bevorzugten Ausführung der Erfindung besteht das Wachs- und/oder Polymermaterial im Wesentlichen vollständig aus Polyvinylalkohol. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass ein Zurückbleiben toxischer Rückstände nach dem Entfernen der Hohlform vermieden werden kann, weil Polyvinylalkohol nicht-toxisch ist.

[0038] Ein anderes bevorzugtes Wachs- und/oder Polymermaterial ist das aus der Dental-Technik bekannte sogenannte "Sommerwachs". Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung dieser Erfindung, dass das Material mechanisch so stabil ist, dass auch filigrane Strukturen erhalten bleiben. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass ein Zurückbleiben toxischer Rückstände nach dem Entfernen der Hohlform vermieden werden kann, weil Sommerwachs nicht-toxisch ist.

[0039] Bei einem bevorzugten Herstellungsverfahren weist der Formkern mindestens einen sich an mindestens einer Stelle verzweigenden Strang auf. Vorzugsweise laufen wenigstens einige der Zweige an anderer Stelle wieder zusammen. Es ist ein erreichbarer Vorteil dieser Ausführung der Erfindung, dass in der Stützstruktur ein System sich verzweigender und wieder zusammenlaufender Röhren, ähnlich einem Blutgefäßsystem, geschaffen werden kann. Der Formkern ist vorzugsweise aus Wachsdrähten

aufgebaut, vorzugsweise solchen aus Sommerwachs, wie sie aus der Dentaltechnik bekannt sind. Die Drähte sind vorzugsweise aneinander geschmolzen.

[0040] Eine bevorzugte nach dem Herstellungsverfahren hergestellte Stützstruktur weist mindestens eine Öffnung auf, durch die der verformte, vorzugsweise geschmolzene, Formkern oder seine Rückstände das Innere der Stützstruktur verlassen können. Die bevorzugte Stützstruktur weist in ihrem Inneren mindestens eine Hinterschneidung auf, vorzugsweise derart, dass ein starrer Formkern, der das Innere des Hohlkörpers ausfüllt, nicht aus dem Hohlkörper entnommen werden kann, ohne den Formkern zu verformen. Vorzugsweise weist die Stützstruktur in ihrem Inneren mindestens einen Hohlraum auf, der von außen nur durch Passieren einer Engstelle zugänglich ist, deren Querschnitt kleiner ist als der Querschnitt des Hohlraums.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0041] Die Erfindung wird im Folgenden anhand schematischer Zeichnungen und Ausführungsbeispielen mit weiteren Einzelheiten näher erläutert. Es zeigen:

[0042] [Fig. 1](#): Eine erste schematische perspektivische Darstellung eines ersten Ausführungsbeispiels eines Formkerns für das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren einer Stützstruktur;

[0043] [Fig. 2](#): Eine zweite schematische perspektivische Darstellung des ersten Ausführungsbeispiels eines Formkerns für das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren;

[0044] [Fig. 3](#): Eine schematische perspektivische Darstellung eines zweiten Ausführungsbeispiels eines Formkerns für das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren;

[0045] [Fig. 4](#): Eine schematische Querschnittsdarstellung eines Aufbaus durch Durchführung des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens;

[0046] [Fig. 5](#): Eine schematische perspektivische Darstellung eines Ausführungsbeispiels einer erfindungsgemäßen Stützstruktur.

Beschreibung anhand eines Ausführungsbeispiels

[0047] [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) zeigt eine Anordnung **1** zur Herstellung einer Cellulose-Stützstruktur geeigneter Formkerne **2, 3** aus schraubenförmig gewundenen Wachsdrähten, z. B. aus Sommerwachs. Die Drähte sind in zwei Ebenen angeordnet, wobei die Drähte in jeder Ebene jeweils im Wesentlichen parallel zueinander ausgerichtet sind. Die Wachsdrähte **2** in der

ersten Ebene sind zu denen 3 der zweiten Ebene in einem Winkel von z. B. 90° ausgerichtet. Die beiden Ebenen liegen direkt übereinander und sind in [Fig. 1](#) lediglich zur Klarheit voneinander abgesetzt dargestellt. An einigen Stellen berühren Drähte 2 der ersten Ebene Drähte 3 der zweiten Ebene. Die spiralförmigen Wachsfäden können z. B. in einem Extrusionsverfahren hergestellt werden. Die Anordnung 1 ist zur Schaffung einer Stützstruktur aus Cellulose geeignet, die schraubenförmige Hohlräume aufweist, wobei einige der schraubenförmigen Hohlräume mit anderen durch Öffnungen verbunden sind.

[0048] Ein zweites Ausführungsbeispiel eines Formkerns für das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer Stützstruktur ist in [Fig. 3](#) dargestellt. Globuläre Wachstropfen 4, z. B. mit einem Durchmesser von ca. 50 bis 100 µm, sind an dünnen Fäden, z. B. Wachsfäden oder Stahldrähten 5, aufgehängt, die an einem Körper 6, z. B. einer Platte 6 verankert sind. Die Anordnung eignet sich zur Herstellung einer Stützstruktur mit mehreren globulären Hohlräumen, die durch die Wachstropfen 4 geschaffen werden, wobei die Hohlräume durch dünne Kanäle, die durch die Drähte 5 geschaffen werden, mit der Außenseite der Stützstruktur verbunden sind.

[0049] In [Fig. 4](#) ist schematisch ein Ausführungsbeispiel einer Anordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens für eine Stützstruktur dargestellt. Ein steriles Gefäß 7 wird mit einer sterilen Nährlösung 8, bestehend aus 20 g Glucose, 5 g Hefeextrakt, 5 g Bactopepton, 2,7 g Natriumphosphat und 1,15 g Citronensäure-Monohydrat, pH 6,0, gefüllt, und mit einer 3 Tage alten Vorkultur aus *Acetobacter xylinum* (z. B. *Gluconacetobacter xylinus*, DSM-No. 2325, DSZM Braunschweig) angeimpft. Wenn sich nach ca. 7 Tagen eine etwa 3 mm dicke Schicht 9 aus Cellulose auf der Flüssigkeitsoberfläche gebildet hat, wird diese durch ein Netz 10 aus Teflon (ePTFE expandiertes Polytetrafluorethylen, z. B. Zahnseide GLIDE, W. L. Gore and Associates Inc.) unterstützt, das in einem von Stützen aus Glas getragenen Glasrahmen aufgespannt ist. Eine Hohlform mit mehreren Ebenen mit Formkernen 11, 12, 13 aus Sommerwachs wird auf die mit dem Netz 10 unterstützte Celluloseoberfläche 9 gelegt und bei 28°C in einem Brutschrank kultiviert.

[0050] Die Besiedelung der Hohlform durch die Bakterien und ihr Ausfüllen mit Cellulose dauert in der Regel 2 bis 3 Wochen. In dieser Zeit ist darauf zu achten, dass verbrauchtes bzw. verdunstetes Medium 8 gegebenenfalls ersetzt wird. Wenn die Hohlform vollständig mit Cellulose ausgefüllt ist, wird die Stützstruktur entnommen und anschließend auf ca. 65°C erhitzt, so dass die Formkerne schmelzen und Hohlräume in der Stützstruktur hinterlassen. Das Erhitzen dient gleichzeitig dem Sterilisieren der Stützstruktur.

[0051] [Fig. 5](#) zeigt ein Beispiel einer Stützstruktur 14, die mittels eines Formkerns geschaffen wurde, der aus zu einem Netzwerk 15 mit sich verzweigenden und wieder zusammenlaufenden Strängen verschmolzener Wachsdrahte gebildet wurde. Als Wachsdrahte werden im Dentalfachhandel erhältliche Drähte aus Sommerwachs verwendet. Nachdem die Cellulose die Hohlform mit dem Wachsdrahtgeflecht 15 als Formkern vollständig ausgefüllt hat, wird die Stützstruktur 14 entnommen und auf 65°C erhitzt, um das Wachsdrahtgeflecht zu schmelzen. Das Wachs kann so im wesentlichen vollständig aus der Stützstruktur 14 entfernt werden. Zurück blieb ein Hohlraum aus sich verzweigenden und wieder zusammenlaufenden Röhren, ähnlich einem Blutgefäßsystem. Der Hohlraum an zwei Stellen durch eine Öffnung mit der Außenseite der Stützstruktur verbunden. Die Stellen, an denen der Hohlraum sich verzweigt, und die Stellen, an denen die Zweige wieder zusammenlaufen, sind zwischen den beiden Stellen angeordnet, an denen der Hohlraum durch Öffnungen mit der Außenseite der Stützstruktur 14 verbunden ist.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 2005/0063939 A1 [0007]
- EP 1053757 B1 [0007]
- WO 2006/099137 A1 [0007, 0025]
- WO 2002/062961 [0007]
- WO 03/070084 [0009]
- WO 2006/096791 [0009, 0025]
- EP 1230939 A1 [0010]
- WO 2006/042287 A2 [0011]
- WO 2001/61026 A1 [0012]
- EP 1053757 [0025]
- EP 1230930 A1 [0025]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Biochemical Journal 58 von 1954, S. 345–352 [0028]
- Forng et al. in Applied and Environmental Microbiology von 1989, Bd. 55, Nr. 5, S. 1317–1319 [0029]

Patentansprüche

1. Verfahren zum Kultivieren lebender Zellen, bei dem die Zellen auf einer Stützstruktur (14) kultiviert werden, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Stützstruktur (14) kristalline Cellulose umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur (14) mikrokristalline Cellulose umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die mikrokristalline Cellulose von Bakterien der Art *Acetobacter xylinum*, oder von Enzymkomplexen für Cellulosesynthese, die aus dieser Art gewonnen wurden, gebildet wurde.

4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur (14) in ihrem Inneren mehrere voneinander getrennte Hohlräume aufweist.

5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur mindestens einem röhrenförmigen Hohlraum (15) umfasst, der sich an wenigstens einer Stelle verzweigt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens einige der Zweige an anderer Stelle wieder zusammenlaufen.

7. Verwendung einer Struktur, die kristalline Cellulose umfasst, als Stützstruktur (14) zum Kultivieren lebender Zellen.

8. Verfahren zur Herstellung einer kristalline Cellulose umfassenden Stützstruktur (14) zum kultivieren lebender Zellen, mit den Schritten:

- Bereitstellen einer Hohlform;
 - Kultivieren Cellulose bildender Organismen in einem von der Hohlform geschaffenen Innenraum, um die Stützstruktur in dem Innenraum wachsen zu lassen;
 - Entformen der Hohlform;
- dadurch gekennzeichnet, dass beim Schritt eines Entformens der Hohlform, wenigstens ein Teil (2, 3, 4) der Hohlform irreversibel verformt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Hohlform eine äußere Form und mindestens einen Formkern (2, 3, 4, 5) umfasst und beim Schritt des Entformens wenigstens ein Teil des Formkerns (2, 3, 4, 5) irreversibel verformt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass beim Schritt des Entformens der Hohlform der Formkern (2, 3, 4, 5) im Wesentlichen entfernt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Entformens ein wenigstens teilweises Schmelzen des Formkerns (2, 3, 4, 5) umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Schmelzpunkt des im Schritt des Entformens schmelzenden Teils (2, 3, 4) des Formkerns (2, 3, 4, 5) über 28°C liegt.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Teil (2, 3, 4) des Formkerns (2, 3, 4, 5), der beim Entformen schmilzt, im Wesentlichen hydrophob ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Teil (2, 3, 4) des Formkerns (2, 3, 4, 5), der beim Entformen schmilzt, ein thermoplastisches Wachs- und/oder Polymermaterial umfasst.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Formkern (2, 3, 4, 5) mindestens einen sich an mindestens einer Stelle verzweigenden Strang aufweist.

16. Stützstruktur (14) zum Kultivieren lebender Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem der in den Ansprüchen 8 bis 15 beschriebenen Verfahren hergestellt worden ist.

17. Stützstruktur (14) zum Kultivieren lebender Zellen mit mindestens einem röhrenförmigen Hohlraum (15), der sich an wenigstens einer Stelle verzweigt, wobei wenigstens einige der Zweige an anderer Stelle wieder zusammenlaufen, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur (14) kristalline Cellulose umfasst.

18. Stützstruktur (14) zum Kultivieren lebender Zellen, die in ihrem Inneren mehrere voneinander getrennte Hohlräume aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur (14) kristalline Cellulose umfasst.

19. Hohlform zur Herstellung einer kristalline Cellulose umfassenden zum kultivieren lebender Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Formkern (2, 3, 4, 5) umfasst, der wenigstens teilweise aus Polyvinylalkohol und/oder Sommerwachs gebildet ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

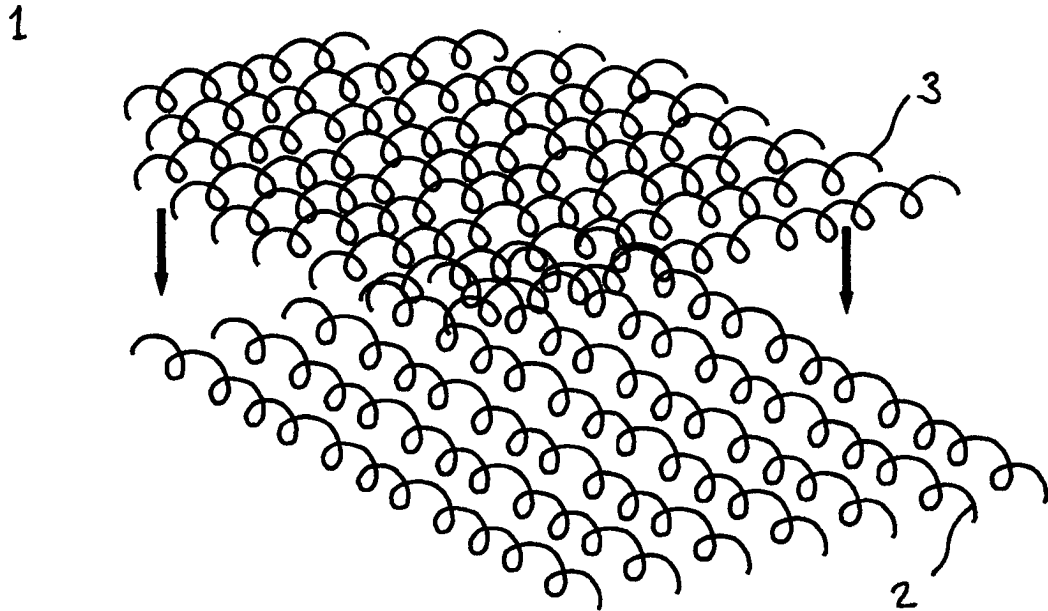


Fig. 2

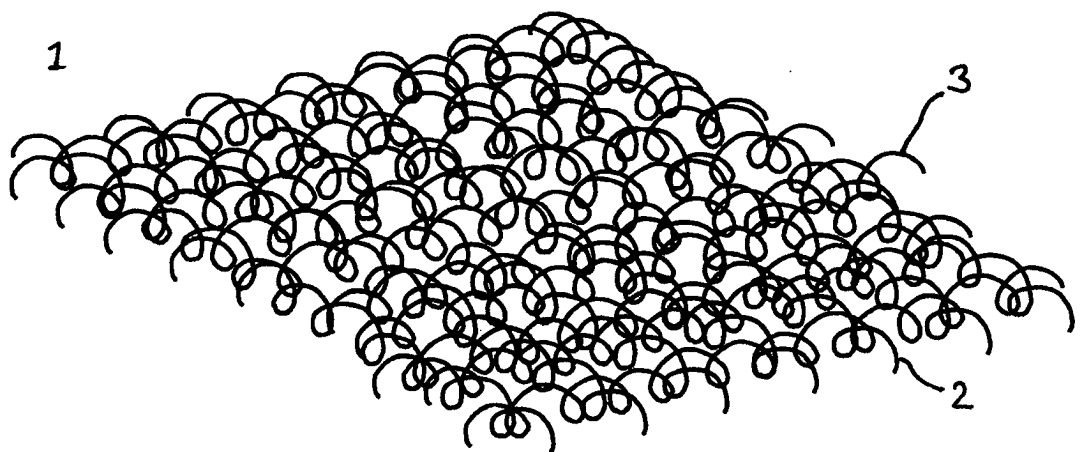


Fig. 3

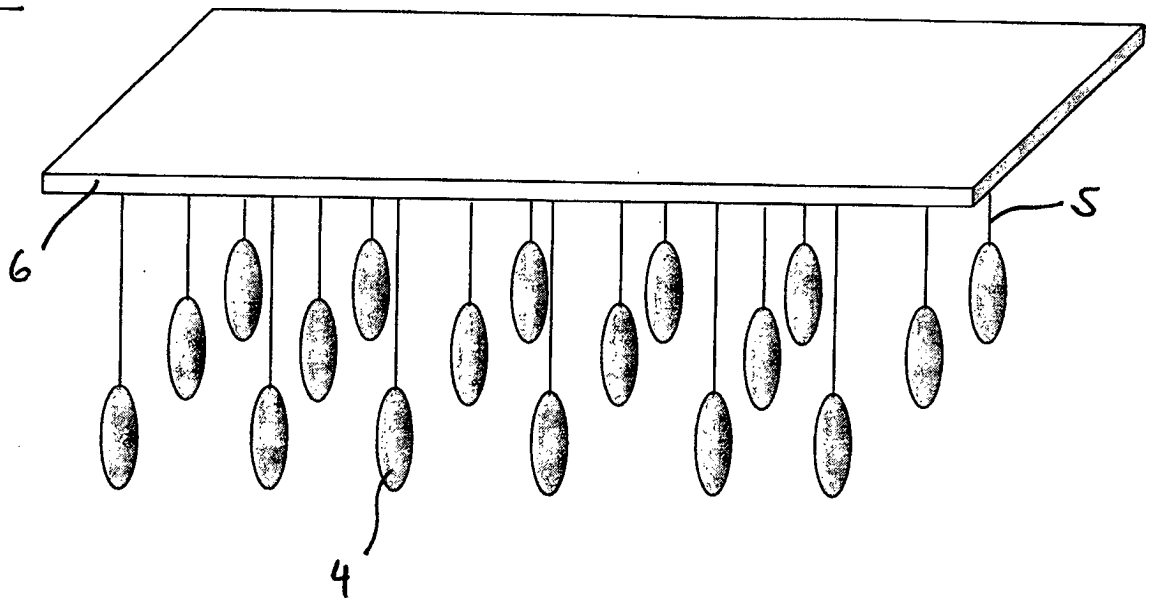


Fig. 4

