



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 297 978 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 5/08
C 07 K 17/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 341 417 5 (22) 07.06.90 (44) 30.01.92

(71) siehe (73)

(72) Broly, Herve; Ronfard, Vincent, FR

(73) CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE, 59012 Lille, FR

(74) Grünecker, Kinkelday, Stockmair u. Partner, Patentanwälte, Maximilianstraße 58, W - 8000 München 22, DE

(54) **Biologischer Träger für Zellkulturen, bestehend aus durch Thrombin koagulierten Plasmaproteinen, Verwendung bei der Herstellung von Keratozytkulturen, deren Wiedergewinnung von Transport für therapeutische Zwecke**

(55) biologisches Trägermaterial; Zellkulturen; Plasmaproteine; Thrombin; Fibrinogen; Faktor XIII; Fibronectin; Keratozytkultur; rekonstituiertes Gewebe; Transplantat

(57) Biologisches Trägermaterial für Zellkulturen, gebildet aus einer geronnenen Mischung eines Konzentrats aus Plasmaproteinen und Thrombin. Das Proteinkonzentrat wird durch Ausfällung frischen Plasmas mittels Ethanol gewonnen und enthält Fibrinogen, Faktor XIII und Fibronectin jeweils in einem bestimmten Verhältnis zueinander. Die Thrombinkonzentration wird entsprechend der gewünschten Konsistenz des in Form eines Films geronnenen Trägermaterials eingestellt. Das biologische Trägermaterial wird vorzugsweise für die Herstellung einer Keratozytkultur, deren Rückgewinnung in Form eines rekonstituierten Gewebes und den Transport desselben angewendet. Das rekonstituierte Gewebe ist daher besonders für die Anwendung als Transplantat geeignet.

Patentansprüche:

1. Biologisches Trägermaterial für Zellkulturen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es aus einer Mischung eines Konzentrates aus durch Thrombin gerinnungsfähigen Proteinen besteht, welches durch Behandlung von Plasma mit Ethanol gewonnen werden kann und gerinnungsfähiges Fibrinogen, Faktor XIII und Plasmafibronektin sowie die zur Auslösung des Gerinnungsprozesses notwendige Menge Thrombin jeweils in bestimmten Proportionen enthält.
2. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Konzentrat gerinnungsfähiger Plasmaproteine über 90% Fibrinogen und pro Gramm Protein mindestens 0,1 IE Faktor XIII und 0,03 bis 0,1 Gramm Fibronektin enthält.
3. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Proteinkonzentrat durch Ausfällung frischen Plasmas in zwei aufeinanderfolgenden Behandlungsschritten mit zehnpromzentiger Ethanollösung bei 4°C gewonnen wird.
4. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Proteinkonzentrat gefriergetrocknet wird.
5. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Proteinkonzentrat in einer Aprotininlösung suspendiert wird.
6. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß Calciumthrombin mit dem Proteinkonzentrat etwa im Verhältnis 10 IE/ml gemischt wird.
7. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß ihm eine die Zellvermehrung fördernde Substanz beigefügt wird.
8. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß ihm ein Antibiotikum beigefügt wird.
9. Biologisches Trägermaterial entsprechend Patentanspruch 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß ihm eine die Wundheilung beschleunigende Substanz beigefügt wird.
10. Anwendung des biologischen Trägermaterials entsprechend einem beliebigen, der unter Punkt 1 bis 9 beschriebenen Patentansprüche für die Herstellung einer Kultur menschlicher Keratozyten fetalen oder adulten Ursprungs zur Bildung eines Ersatzgewebes, welches direkt entnommen, transportiert und als Transplantat angewendet werden kann.
11. Anwendung entsprechend Patentanspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zwei Bestandteile des biologischen Trägermaterials dergestalt miteinander vermischt werden, daß sich in einer Kulturschale ein einheitlicher Film bildet und daß die Keratozyten, welche suspendiert im Kulturmedium vorliegen, auf besagten Film geimpft werden.
12. Anwendung entsprechend Patentanspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zwei Bestandteile des biologischen Trägermaterials mit einer Keratozytsuspension so gemischt werden, daß die Zellen durch den anschließend gebildeten Film assimiliert werden.
13. Anwendung entsprechend Patentanspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Keratozytsuspension nach Dispersion einer frischen, vorgezogenen Zellschicht gewonnen wird.
14. Anwendung entsprechend Patentanspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Keratozytsuspension aus einer in flüssigem Stickstoff konservierten Zellbank gewonnen wird.
15. Anwendung des biologischen Trägermaterials entsprechend einem beliebigen, der unter 1 bis 9 aufgeführten Patentansprüche für die Rückgewinnung und den Transport der vorher angelegten Kultur menschlicher Keratozyten fetalen oder adulten Ursprungs.
16. Anwendung entsprechend Patentanspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zwei Bestandteile des biologischen Trägermaterials auf der vorher angelegten Zellschicht in der Kulturschale miteinander vermischt werden.
17. Proteinkonzentrat, welches mittels Thrombin zum Gerinnen gebracht wird und **dadurch gekennzeichnet**, daß es entsprechend einem der unter Punkt 1 bis 9 aufgeführten Patentansprüche für die Herstellung des biologischen Trägermaterials verpackt wird.

Die Erfindung betrifft ein biologisches Trägermaterial für Zellkulturen auf der Basis einer geronnenen Mischung eines Konzentrates aus Plasmaproteinen und Thrombin, seine Anwendung bei der Herstellung von Keratozytkulturen und deren Transport in Form von rekonstituierten Epidermen sowie deren Anwendung zu therapeutischen Zwecken.

Die im Labor betriebene Rekonstitution lebender, der menschlichen Haut vergleichbarer Haut auf der Grundlage einiger, durch Biopsie gewonnener Zellen, oder vereinfachter Haut, welche die physiologischen Funktionen normaler Haut gewährleistet, ist Gegenstand umfangreicher Studien, denen die Aufgabe zugrunde liegt, infolge einer schweren Krankheit (genetisch bedingt, etc.) geschädigte oder durch großflächige Verbrennungen zerstörte Haut zu ersetzen.

Die Haut ist ein komplexes Organ, welches aus drei übereinander lagernden Schichten gebildet wird: der Epidermis, die zu 85% aus Keratocyten besteht, welche die impermeable, den Körper gegenüber der äußeren Umwelt abschirmende Hornschicht bilden; der Lederhaut, die von durch hauptsächlich aus Kollagen bestehendem Bindegewebe getrennten Zellen, einschließlich Fibrozyten, gebildet wird; die Lederhaut befindet sich über der Unterhaut, zu der auch Fett speichernde Zellen gehören. Die künstliche Rekonstitution eines derart komplexen Organs ist daher sehr problematisch.

Das erste, partiell in vitro rekonstituierte Gewebe war die Lederhaut, wobei dieses Ergebnis durch Bell und seine Mitarbeiter erzielt wurde (Bell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76 - 1979 - 1274).

Durch Hautbiopsien gewonnene Fibroblasten wurden erfolgreich in Kulturen dargestellt, zuerst in monozellulären Schichten und nach einer Anzahl von Passagen durch Dispersion dieser Zellen in einem kollagenhaltigen (aus Rattenschwanzsehnen gewonnenes Kollagen) Kulturmedium, wobei das Kollagen ein Gel bildet und die Darstellung dreidimensionaler Kulturen erlaubt. In einer solchen Kultur treten die Fibroblasten mit der Kollagenmatrix in Wechselwirkung, steuern diese und lassen sie wie eine normale Lederhaut kontrahieren. Bei diesem in vitro rekonstituierten Gewebe handelt es sich um ein „Lederhautäquivalent“. Nach einigen Wochen des Wachstums erlauben die mechanischen Eigenschaften des Lederhautäquivalents, dieses auf einen Patienten bzw. einen Verletzten zu transplantieren. Das Transplantat wird anscheinend nicht abgestoßen. Jedoch ist dieses Lederhautäquivalent nur ein zeitweiser Schutz, die Schutzfunktion der Haut kann es nicht wieder herstellen.

Des Weiteren haben Green und seine Mitarbeiter (H. Green et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1979, 5665) ein Verfahren sowie ein entsprechendes Kulturmedium entwickelt, welches die Zucht von Keratocyten über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Bei diesem Verfahren erfolgt eine Überimpfung der in Trypsin dispergierten Keratocyten auf eine vorgezogene, hauptsächlich aus 3T3-Zellen gebildete monozelluläre Fibroblastschicht, die einer letalen Strahlendosis ausgesetzt wurde und als Nährschicht und Matrix dient. Die Epidermisschicht entwickelt sich unter Bildung eines drei bis fünf Zellen dicken Gewebes sehr schnell; dieses Gewebe kann bei einem Patienten transplantiert werden und differenziert sich in situ weiter. Patienten mit schweren Verbrennungen konnten mit diesem Verfahren bereits nachweislich gerettet werden (G. Gallico et al., New England J. Med., 311, 1984, 448).

Mit Greens Verfahren kann aus einer Biopsie von 2 cm² innerhalb von drei Wochen ein Quadratmeter Epidermis gewonnen werden.

Die Rückgewinnung des rekonstituierten Gewebes für die Herstellung des Transplantats ist noch mit einer Reihe technischer Probleme verbunden. Es ist hierbei erforderlich, die Zellen von der Kulturschale mittels einer Enzymbehandlung zu trennen, ohne ihre Verbindung untereinander zu zerstören; bei dieser Operation kann stets eine Schrumpfung der Zellschicht beobachtet werden, was zum Verlust eines gewissen Prozentsatzes an Transplantatoberfläche führt. Sobald das rekonstituierte Gewebe abgetrennt worden ist, muß dieses mit einem Trägermaterial verbunden werden, das den Transport des Gewebes und dessen Transplantation auf den Patienten erlaubt. Gewöhnlich wird hierzu mit Vaseline behandelte Verbandmull genutzt. Die hier beschriebenen Operationen erfordern große Präzision und sind sehr zeitaufwendig.

Es wäre daher von großem Nutzen, stünden neuartige biologische Trägermaterialien zur Verfügung, die nach Verpflanzung des Transplantats vom Patienten schnell genug resorbiert werden können und die Handhabung der Zellen vereinfachen würden. Außerdem müßten diese Trägermaterialien bzw. deren Bestandteile in ausreichendem Maße verfügbar sein, damit deren industriemäßige Herstellung und Verpackung gewährleistet ist.

Der Anmelder hat daher ein biologisches Trägermaterial für Zellkulturen auf der Basis einer Mischung, die aus einem Plasmaproteinkonzentrat, welches mit Thrombin zum Gerinnen gebracht werden kann, und aus der für die Auslösung des Gerinnungsprozesses notwendigen Menge Calciumthrombin besteht, entwickelt.

Die Gerinnung von Plasmaproteinen in Anwesenheit von Thrombin ist hauptsächlich zurückzuführen auf die Bildung eines polymerisierten Filznetzes, ähnlich wie bei der Bildung eines Blutgerinnsels. Zur Bildung eines Trägermaterials, welches sich für die Herstellung von Zellkulturen eignet, findet die Gerinnung unter Bedingungen, die zur Bildung eines Films führen, statt, d. h. in Petrischalen oder anderen, für Zellkulturen geeigneten Schalen.

Das Plasmaproteinkonzentrat wurde vom Anmelder bereits in der Europäischen Patentanmeldung 884019613 beschrieben. Dieses Konzentrat wird durch Ausfällung frischen Plasmas in zwei aufeinanderfolgenden Behandlungsschritten mittels einer zehnpromzentigen Ethanolösung bei einer Temperatur von 4°C gewonnen. Das Konzentrat enthält über 90% Fibrinogen und pro Gramm Protein mindestens 0,1 IE Faktor XIII sowie 0,03 bis 0,1 Gramm Fibronectin. Das Konzentrat wird abgepackt und gefriergetrocknet, um es bis zu seiner Anwendung zu konservieren.

Die Erfindung betrifft also auch das Proteinkonzentrat, welches mit Thrombin zum Gerinnen gebracht, speziell für die Herstellung des biologischen Trägermaterials für Zellkulturen abgepackt wird.

Soll das Konzentrat zur Anwendung kommen, dann wird es in einer wäßrigen Kochsalzlösung oder in einer einen polyvalenten Proteasenhemmstoff enthaltenden Lösung, vorzugsweise Aprotinin, bei einer Konzentration von 3000 KIE/ml wiederaufgelöst.

Zur Auslösung des Gerinnungsprozesses, d. h. zur Bildung des als Trägermaterial für die Zellen fungierenden Films, wird Thrombin mit oder ohne Zusatz von Calcium zugefügt. Während des Gerinnungsprozesses wird Fibrinogen unter Einwirkung von Thrombin in Fibrin umgewandelt und erfolgt die Polymerisation von monomerischem Fibrin mit Fibronectin unter Einwirkung von durch Ca⁺⁺-Ionen aktiviertem Faktor XIII.

Um entsprechend der Erfindung die Trägerschicht zu bilden, ist - insbesondere bei Zellkulturen - eine Thrombinkonzentration von vorzugsweise etwa 10 IE/ml (eine weitaus geringere Konzentration als die zur Erzielung einer anderen Konsistenz, wie dies bei biologischen Leimen der Fall ist - Patent Nr. 884019613, siehe oben - einzustellen).

Entsprechend unterschiedlichen Varianten der Erfindung ist es möglich, dem Trägermaterial verschiedene speziell für die Förderung der Zellvermehrung in vitro oder in situ gestaltete und damit die Wundheilung nach erfolgter Transplantation fördernde Substanzen zuzusetzen.

Das Trägermaterial kann somit ein die Zellvermehrung förderndes Additiv wie zum Beispiel einen Wachstumsfaktor, insbesondere EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), enthalten.

Die Heilung fördernde oder antibiotische Präparate können auch hinzugefügt werden.

Das entsprechend der Erfindung hergestellte Trägermaterial ist besonders für die Herstellung von menschlichen Keratozytkulturen geeignet. Bei diesen Zellen kann es sich entweder um Primärkulturen, die aus von einem Patienten entnommenen Hautbiopsien, die ein bis vier Passagen in Verdünnung $1/10$ bis $1/20$ durchlaufen haben, gewonnen wurden, oder um in flüssigem Sticks' off konservierte Zellbanken handeln.

Diese in einer konfluenten Schicht hergestellten Keratozyten werden erfindungsgemäß mit Trypsin behandelt und in einem geeigneten Kulturmedium zum Zeitpunkt der Impfung auf das Trägermaterial in Suspension substituiert.

Die Anwendung des biologischen Trägermaterials kann entsprechend der Erfindung auf drei verschiedene Arten modifiziert werden. Entsprechend einer ersten Anwendungsart wird das biologische Trägermaterial in Form eines Films durch Mischung seiner zwei Bestandteile in einer Kulturschale hergestellt; in einem geeigneten Kulturmedium wird eine Keratozytsuspension auf diesen Film geimpft. Wenn die Keratozytkultur zusammengeflossen ist bzw. am Zusammenfließen ist, bildet diese ein Substitutionsgewebe, das als Transplantat direkt rückgewonnen und mit einer Pinzette aus der Schale entnommen und in diesem Zustand auf den Patienten transplantiert werden kann, ohne daß ein zeitweiliges Trägermaterial wie z. B. Mull notwendig wäre. Dies ermöglicht eine beträchtliche Einsparung an Arbeitszeit sowie eine 100prozentige Ausnutzung des Transplantationsgewebes.

Entsprechend eines weiteren erfindungsgemäßen Verfahrens zur Anwendung des Trägermaterials werden die zwei Bestandteile des Trägermaterials mit der Keratozytsuspension dergestalt gemischt, daß die Zellen fest in sich bildenden Film verankert sind. Hierbei können die zwei Bestandteile mit der Zellsuspension in einer Kulturschale gemischt und dann als Transplantat analog zum oben beschriebenen Verfahren angewendet werden; die Mischung kann auch direkt auf der zur Transplantation vorbereiteten Wunde des Patienten erfolgen, d. h. durch Aufsprühen des biologischen Trägermaterials und der Zellen mit Hilfe eines Träggases (Stickstoff) bei einem Druck von 2 bis 2,5 bar.

Bei einem weiteren Verfahren der erfindungsgemäßen Anwendung des Trägermaterials werden die zwei Bestandteile auf einer Zellschicht aus Keratozyten, die vorher in einer Kulturschale angelegt wurde, dergestalt gemischt, daß die Zellen mit dem gebildeten Film bedeckt sind und somit abgetrennt und zur Anwendung als Transplantat transportiert werden können. Die Erfindung soll nachstehend anhand folgender Beispiele, die jedoch deren Anwendungsbereich nicht begrenzen, erläutert werden.

Beispiel 1

Herstellung des biologischen Trägermaterials für Zellkulturen

Ein biologisches Trägermaterial für Zellkulturen wird durch Mischung eines Konzentrats aus gerinnungsfähigen Plasmaproteinen und der zur Auslösung des Gerinnungsprozesses notwendigen Menge Thrombin hergestellt.

A. Herstellung des Plasmaproteinkonzentrats

Die Herstellung des Proteinkonzentrats wurde vom Anmelder bereits in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 88 401 961 3 beschrieben. Das Verfahren läßt sich wie folgt zusammenfassen: Nicht durch Kältebehandlung ausgefälltes menschliches Plasma kommt zur Anwendung; dieses Plasma wird jeweils zweimal hintereinander in zehnpromentiger Ethanollösung bei einem pH-Wert von 7,2 und einer Temperatur von 4°C ausgefällt. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Fällungen wird das Produkt einer Virusinaktivierungsbehandlung unterzogen. Das vom Überstand durch Zentrifugieren getrennte Fällprodukt wird bei 4°C in Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Fällprodukt wird in Suspension in einem Tris(Citrat)Puffermedium bei einer Proteinkonzentration von etwa 35 g/l substituiert, Lysin wird zugefügt bei einer Endkonzentration von 0,1 bis 0,2 g pro Gramm Protein. Nach Diafiltration zur Abtrennung des Ethanol und des Citrats und zur Einstellung der Ionenkraft wird das Konzentrat in Flaschen verpackt und gefriergetrocknet.

Dieses Proteinkonzentrat enthält pro Gramm Protein mindestens 0,9 g Fibrinogen, 0,03 bis 0,06 g Fibronectin und 0,15 bis 0,30 IE Faktor XIII.

B. Herstellung des Trägermaterials für Zellkulturen

Das oben beschriebene Proteinkonzentrat wird in Suspension in wäßriger Lösung mit oder ohne Aprotinin bei einer Konzentration von 3000 KIE/ml (Kallikreininhibitoreinheiten/ml) substituiert.

Diese Lösung wird mit einer gleichen Menge Calciumthrombin einer Konzentration von 10 IE/ml gemischt.

Eine Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm wird mit 2 ml Proteinsuspension und 2 ml Thrombin gefüllt, wobei beide Lösungen gleichzeitig mittels zweier durch Mischkopplungen miteinander verbundener Spritzen injiziert werden. Die Petrischale wird geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen, danach wird die Mixtur für 15 bis 20 Minuten ruhig gestellt. Sie bildet dann einen Film, der die Schale bedeckt.

Bei den Kulturschalen handelt es sich um „unbehandelte, für Zellkulturen geeignete Schalen“, womit gesichert wird, daß das Trägermaterial nicht permanent an der Schale haften bleibt, sondern sich leicht wieder ablösen läßt.

Der Film wird dann mit Zellkulturmedium bedeckt. Dieses Medium wird mehrmalig erneuert, bis sich der osmotische Druck des Filmes auf ein für die Zellen physiologisch verträgliches Maß, d. h. zwischen 260 und 340 mOSM (Milliosmol), stabilisiert hat. Es ist auch möglich, das rekonstituierte Proteinkonzentrat vor seiner Mischung mit Thrombin zu dialysieren.

Beispiel 2

Darstellung einer Keratozytkultur auf dem biologischen Trägermaterial

Hierbei kommen nach Greens klassischem Verfahren hergestellte Keratozytprimärkulturen aus Hautbiopsien, die der Haut eines Patienten (oder eines Embryo zur Bildung fetaler Zellbanken) entnommen wurden, zur Anwendung. Diese Primärkulturen können vier bis fünf Passagen in $1/10$ -Lösung durchlaufen.

Eine Schicht konfluenter Keratozyten wird mit Trypsin behandelt, in Kulturmedium in Suspension substituiert und in $1/10$ -Lösung auf einer mit einem Film des biologischen Trägermaterials bedeckte Petrischale geimpft, wie dies in Beispiel 1 beschrieben wurde.

Nach wenigen Stunden haften die Zellen auf dem Trägermaterial, wo sie sich normal vermehren, bis sie ein Stück konfluenter, eine Schichtdicke von drei bis vier Zellen aufweisender Epidermis bilden.

Dieses auf dem Trägermaterial haftende Fragment rekonstituierter Epidermis kann der Kulturschale mittels Pinzette entnommen und in diesem Zustand auf die zum Empfang des Transplantats vorbereitete Wunde appliziert werden. Da die Zellen auf dem Trägermaterial haften, muß die rekonstituierte Epidermis nicht auf einem anderen Trägermaterial, z. B. mit Vaseline behandeltem Mull, befestigt werden, wie das bei Zellkulturen anderer Art der Fall ist. Dies erlaubt es, Arbeitszeit in beträchtlichem Maße einzusparen, da hierbei 40 Packungen anstelle der mit konventionellen Verfahren möglichen vier Packungen pro Stunde bearbeitet werden können. Außerdem ist dieses Trägermaterial gut zu handhaben und zieht sich bei der Abtrennung nicht zusammen, so daß 100% der Oberfläche der Zellkulturschicht tatsächlich genutzt werden können.

Beispiel 3

Rückgewinnung einer vorher angelegten Zellschicht mittels des biologischen Trägermaterials

Keratozyten werden entsprechend des herkömmlichen Verfahrens nach Green in einer Petrischale mit einer Schicht Fibroblasten, die einer letalen Strahlendosis ausgesetzt wurden, geimpft.

Wenn die Keratozytenlage am Zusammenfließen ist und eine Schichtdicke von mehreren Zellen erreicht hat, wird das Kulturmedium entfernt, man läßt eine EDTA-Lösung für 1 Stunde 30 Minuten einwirken, danach wird zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Das biologische Trägermaterial wird daraufhin direkt in die Zellschicht entsprechend dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren gegeben.

Wenn sich der Film auf den Zellen gebildet hat, kann er mittels Pinzette abgenommen und wie im vorhergehenden Beispiel als Transplantat angewendet werden.

Beispiel 4

Einbau der Zellen in das biologische Trägermaterial

Jeweils eine Spritze mit Proteinlösung und eine Spritze mit die Keratozyten in Suspension enthaltendem Thrombin werden vorbereitet. Die Keratozyten können einer frischen, mit Trypsin behandelten Kultur oder einer in flüssigem Stickstoff konservierten Zellbank entnommen werden.

Die zwei Spritzen sind durch eine Mischkopplung miteinander verbunden, das die Zellen enthaltende Trägermaterial wird auf die Petrischale gesprüht (oder auf die das Transplantat zu empfangende Wunde), dadurch verbleiben die Zellen während der Gerinnung im Film. Das Aufsprühen kann unter Verwendung eines Trägergases (Stickstoff bei einem Druck von 2 bis 2,5 bar) erfolgen.

Der Sprühvorgang führt zu keiner Denaturierung der Zellen; es zeigt sich, daß sich die Zellschicht in Kultur in vitro neu bildet. Die Zellen würden sich also normal bzw. nahezu normal vermehren, wenn die Mixtur in einer sehr dünnen Schicht direkt auf die Wunde aufgesprüht wird.