

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 506 826 A1 2009-12-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 823/2008**

(22) Anmeldetag: **23.05.2008**

(43) Veröffentlicht am: **15.12.2009**

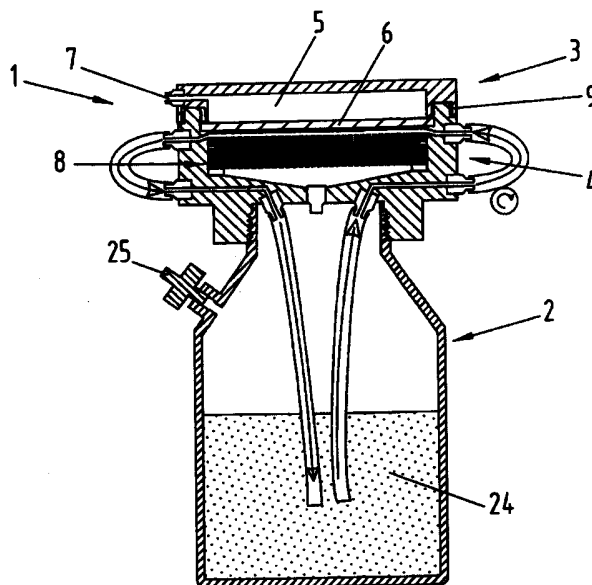
(51) Int. Cl.⁸: **C12M 3/00** (2006.01),
C12N 5/06 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

GREINER BIO - ONE GMBH
D-72636 FRICKENHAUSEN (DE)

(54) BIOREAKTOR UND VERFAHREN ZUM KULTIVIEREN VON ZELLEN UND GEWEBEN

(57) Die Erfindung betrifft einen Bioreaktor (1) für Zell- und Gewebekultur zur mechanischen Stimulation und/oder Perfusion von Gewebe- bzw. Zellkulturen umfassend ein Oberteil (3) und ein damit verbundenes Unterteil (4) mit einer Gewebekulturkammer (8), wobei in der Gewebekulturkammer (8) zumindest eine Verteilerplatte (12) angeordnet ist, sowie ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen und Geweben im Bioreaktor (1).



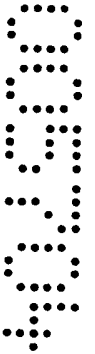
AT 506 826 A1 2009-12-15

005704

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Erfindung betrifft einen Bioreaktor (1) für Zell- und Gewebekultur zur mechanischen Stimulation und/oder Perfusion von Gewebe- bzw. Zellkulturen umfassend ein Oberteil (3) und ein damit verbundenes Unterteil (4) mit einer Gewebekulturkammer (8), wobei in der Gewebekulturkammer (8) zumindest eine Verteilerplatte (12) angeordnet ist, sowie ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen und Geweben im Bioreaktor (1).

Fig. 1



Die Erfindung betrifft einen Bioreaktor für Zell- und Gewebekultur zur mechanischen Stimulation und/oder Perfusion von Gewebe- bzw. Zellkulturen umfassend ein Oberteil und ein damit verbundenes Unterteil mit einer Gewebekulturkammer, sowie eine Verteilerplatte für Zell- und Gewebekulturen und ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen und/oder Geweben in einem Bioreaktor.

Für eine Vielzahl experimenteller Studien, wie z.B. Korrosionsstudien an rekonstruierter Haut, Metabolismusstudien an rekonstruierter Leber, und Therapieverfahren, wie z.B. Knorpeltransplantation nach Trauma des Knieknorpels, werden rekonstruierte Gewebe verwendet. Ziel der Geweberekonstruktion ist der Aufbau eines funktionstüchtigen Gewebes aus Einzelzellen, wobei die Gewebeeigenschaften denen im lebenden Organismus möglichst nahe kommen sollen. Von Bedeutung sind hierbei der Erhalt des Differenzierungsgrades der Zellen, die Präsenz mehrerer Zellschichten und einer extrazellulären Matrix. Zur Geweberekonstruktion werden Petrischalen, Multiwellplatten, Zellkultureinsätze und Bioreaktoren verwendet.

Die autologe Knorpeltransplantation (ACT) ist eine Methode zur Behandlung von Knorpelverletzungen. Hauptanwendungsgebiet der ACT ist die Behandlung von Knorpeldefekten im Kniegelenk, wie sie durch Sportunfälle entstehen können. Hierbei werden durch eine Biopsie spendereigene (autologe) Knorpelzellen gewonnen, teils unter Verwendung eines Trägermaterials (Bsp.: Kollagen I-Gel) ex vivo kultiviert und dem Spender zur Reparatur des Knorpeldefektes reimplantiert. Während der ex vivo-Kultur können die Knorpelzellen vermehrt werden, wodurch die zur Reparatur großflächiger Knorpeldefekte nötige erhöhte Anzahl von Zellen verfügbar wird. Ein allgemein bekanntes Problem ist die Dedifferenzierung der Knorpelzellen, welche mit dem Eintritt in die Zellvermehrung verbunden ist. Nach Reimplantation können dedifferenzierte Knorpelzellen atypischen Knorpel bil-

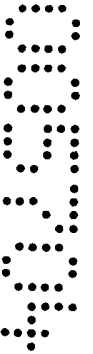
den. Ein Beispiel hierfür ist die Ausbildung von Faserknorpel nach Implantation dedifferenzierter Knorpelzellen in Defekte des Kniegelenkes. Im Gegensatz zum knietypischen hyalinen Knorpel hält Faserknorpel dem hohen Druck im Kniegelenk nur kurze Zeit stand. Es kommt zum frühzeitigen Versagen des Implantates.

Gegenstand der Forschung sind Methoden, mit denen dedifferenzierte Knorpelzellen noch vor der Implantation redifferenziert werden können. Neben der Verwendung von dreidimensionalen Trägermaterialien stellt die Kultur in Bioreaktoren, insbesondere unter Zuhilfenahme organ- und gewebetypischer mechanischer Stimuli (Bsp.: Scherkräfte oder rhythmische Kompressionen der zellbeladenen Trägermaterialien) einen Lösungsansatz für das genannte Problem dar. Die Redifferenzierung dedifferenzierter Knorpelzellen durch Applikation mechanischer Stimuli wurde mehrfach beschrieben.

Aus der DE4306661A1, DE10249903A1, US20060110822A1, DE10208311B4, US006060306A sind Bioreaktorsysteme, bei denen das Zellkulturmedium relativ zur Kultur bewegt und somit der Nährstoffaustausch zwischen Kultur und Medium erhöht wird (Perfusionsbioreaktoren), bekannt. Teilweise wird in diesen Systemen die Ausbildung von hyaliner Knorpelsubstanz (Bsp.: Kollagen II-Synthese) durch den gezielten Einsatz von Scherkräften angeregt (US5928945A, DE10249903A1, US20050095711A1).

Andere Bioreaktoren ermöglichen die Applikation von Druck auf die zellbeladenen Trägermaterialien mittels eines Druckstempels (WO2005040332A2, DE19808055B4, DE102004012010A1/WO002005087912A3).

In der DE102004012010A1/WO002005087912A3 wird ein Bioreaktor beschrieben, der aus einer Grundplatte, einer Deckplatte und einer handelsüblichen Multiwell-Gewebekulturplatte besteht. In Bohrungen der Grundplatte sind Kolben eingesetzt, welche nach Art eines Stempels in das Well der darunter befindlichen Gewebekulturplatte ragen, dort jedoch einen Raum, in dem ein Gewebe kultiviert werden kann, freilassen. Diese Gewebekulturkammer ist mit mehreren zu- und abführenden Anschlüssen für Medium und Begasung versehen. Eine elastische Membran ist oberhalb der Kolben angeordnet, sodass sich unterhalb der Membran ein steriler Bereich ausbildet. Durch Einleitung von Druckluft kann eine Auslenkung der Kolben und somit eine Kompression des kultivierten Gewebes erzielt werden.



Die WO2005040332A2 beschreibt einen Bioreaktor, der aus einem druckdicht verschließbaren Reaktorraum besteht, in dem eine Ablagefläche für ein Gewebekonstrukt und ein Miniaktuator Platz finden. Der Reaktorraum ist mit Anschlüssen für eine Mediumzu- und -abfuhr und Begasung versehen. Kultiviertes Gewebe kann durch Auslenkung des metallischen Miniactuators, vorzugsweise durch Applikation eines Magnetfeldes, komprimiert werden. Ferner wird ein Verfahren zur Herstellung dreidimensionaler Zelltransplantate im vorgenannten Bioreaktor beschrieben.

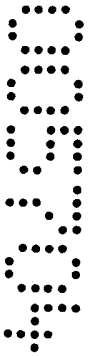


Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen Bioreaktor für die Kultivierung mit optimaler Nährstoffversorgung von Zell- und/oder Gewebekulturen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird jeweils eigenständig durch einen Bioreaktor, wobei zumindest eine Verteilerplatte in der Gewebekulturkammer angeordnet ist, sowie einer Verteilerplatte unter Anwendung mechanischer Stimulation und/oder Perfusion, die Ausnehmungen, insbesondere Löcher, Bohrungen, Durchbrüche und zumindest eine Erhebung bzw. Vertiefung aufweist, und einem Verfahren zur Kultivierung von Zellen und/oder Geweben in einem Bioreaktor umfassend die Schritte i) Einbringen der Zellen auf eine Verteilerplatte in der Gewebekulturkammer, insbesondere Gewebelumen, ii) Versorgung der Zellen mit Kulturmedium, iii) mechanische Stimulation und/oder Perfusion, gelöst. Vorteilhaft dabei erweist sich, dass Zellen bzw. Gewebe differenziert bzw. dedifferenzierte Zellen redifferenziert werden können, weil durch die Applikation mechanischer Stimuli, wie bspw. rhythmische Kompressionen, Druck-, Zug-, Scherkräfte, etc. auf die Zellen der Verteilerplatte ausgeübt werden und somit das native System, wie z.B. Knorpel, Knochen, Sehnen, Bänder, Haut, Endothelien, Blutgefäße, im Körper eines Individuums nachgeahmt wird. Durch Perfusion kann eine optimale Nährstoffversorgung nachgeahmt werden, wie sie unter nativen Bedingungen durch ein Gefäßsystem bewirkt wird und für zahlreiche Gewebe, wie z.B. Lebergewebe und Haut, typisch ist. Dadurch kann bspw. autologes Gewebe für eine Transplantation gezüchtet bzw. vorbereitet werden.

Von Vorteil ist auch, dass das Verfahren und der Bioreaktor zur Herstellung großflächiger dreidimensionaler Gewebekonstrukte verwendet werden können. Der erfindungsgemäße Bioreaktor bietet sowohl die Möglichkeit der Mediumüberströmung (beispielsweise geeignet für die Herstellung von Knorpelkonstrukten, Knorpel-Knochenkonstrukten, Sehnen,

Bänder, etc.) als auch der Mediumdurchströmung (beispielsweise geeignet für die Herstellung von Leberzellen bzw. Leberäquivalenten) und/oder der mechanischen Stimulation sowie die Kombinationen dieser Möglichkeiten bei kontinuierlicher Prozessführung im geschlossenen System. Ferner ist der Bioreaktor auch für die Rekonstruktion von Endothelien und Hauttransplantaten, zur Herstellung von Gefäßprothesen und Rekonstruktion von Blutgefäßen geeignet. Sofern mit dem erfindungsgemäßen Bioreaktor Blutgefäße bzw. Gefäßprothesen hergestellt werden, wird zur Generierung des Lumens der Gefäße vorzugsweise eine Hilfsstruktur im Bioreaktor verwendet.



Ein Vorteil gegenüber dem in DE102004012010A1 beschriebenen Bioreaktor besteht ferner im Loslösen vom Konzept des in die Wells einer Gewebekulturplatte ragenden Stempels und der Einführung einer großflächigen, Druck applizierenden Verteilerplatte, um groß dimensionierte Gewebetransplantate, insbesondere im Durchmesser von >35 mm, zu kultivieren.

Durch die Anordnung von Ausnehmungen, insbesondere Löcher, Bohrungen, Durchbrüche in der Verteilerplatte wird ermöglicht, dass die Zellen bzw. das Gewebe mit Kulturmedium nicht nur über-, sondern auch durch- bzw. über- und durchströmt werden können und somit eine optimale Nährstoffversorgung der Zellen unter anderem durch Diffusion stattfinden kann.

Weiters ist vorgesehen, dass die Verteilerplatte zumindest eine Erhebung bzw. Vertiefung aufweist, wodurch gewährleistet wird, dass eine permanente Versorgung der Zellen bzw. des Gewebes mit Kulturmedium stattfindet, da selbst bei Ausübung von Druck bzw. bei einer Kompression das Medium nicht zur Gänze aus der Gewebekulturkammer, insbesondere Medium- und Restmediumlumen, verdrängt wird.

Ferner weist der Bioreaktor im Übergangsbereich von Ober- zu Unterteil eine vorzugsweise elastische Membran zur Aufteilung in eine Druck- und Gewebekulturkammer auf, wodurch eine Kombination aus elastischen und starren Elementen und einem Reaktorraum (Gewebekulturkammer), der durch Vorliegen verschiedener Zu- und Abflüsse verschiedene Varianten des Mediumstroms ermöglicht, vorliegt. Von Vorteil erweist sich zudem, dass durch die Elastizität der Membran dem durch die Druckkammer ausgeübten Druck

nachgeben werden kann und somit das darunter liegende Gewebelumen komprimiert wird und wieder in die Ausgangsstellung zurückgeht.

In einer Weiterbildung ist vorgesehen, dass zumindest eine Deckplatte in der Gewebekulturkammer, vorzugsweise zwischen Membran und Verteilerplatte angeordnet ist, wodurch eine gleichmäßige Übertragung der mechanischen Stimulation, wie z.B. des durch die Druckkammer auf die Membran ausgeübten Drucks, auf die Zellen bzw. das zu züchtende Gewebe ermöglicht wird. Zudem verhindert die Deckplatte das Kollabieren des Mediumlumens sofern die Membran direkt auf die Verteilerplatte zum Liegen käme.

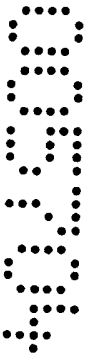
Weiters ist vorgesehen, dass die Gewebekulturkammer zumindest eine Zu- und Abflusseinrichtung für das Kulturmedium aufweist, wodurch die Nährstoffversorgung der Zellen bzw. des Gewebes ermöglicht wird und kontinuierlich Medium anher und wieder wegtransportiert werden kann.

Weiters ist vorgesehen, dass die Gewebekulturkammer mehrere Lumen umfasst, insbesondere ein Gewebelumen, ein Mediumlumen und gegebenenfalls ein Restmediumlumen, wobei im Gewebelumen die zu züchtenden Zellen bzw. das züchtende Gewebe enthalten ist, im Mediumlumen das für die Versorgung der Zellen bzw. des Gewebes zur Verfügung stehende Kulturmedium enthalten ist und im Restmediumlumen das abzutransportierende Kulturmedium abtransportiert wird.

In einer Ausführungsvariante ist das Gewebelumen zwischen einer oberen und einer unteren Verteilerplatte angeordnet, wodurch die Nährstoffversorgung über das Kulturmedium optimiert werden kann.

Die Zuflusseinrichtung für das Kulturmedium kann in das Mediumlumen münden, wobei das Kulturmedium durch die Verteilerplatte gleichmäßig über die Zellen bzw. das zu züchtende Gewebe verteilt wird und das biologische Material entweder über- oder durchströmt werden kann.

Die Abflusseinrichtung für das Kulturmedium mündet aus dem Restmediumlumen und/oder aus dem Mediumlumen, wobei sowohl bei einer Überströmung als auch bei einer Durchströmung des Gewebes bzw. der zu züchtenden Zellen ein kontinuierlicher Abtransport des Kulturmediums gewährleistet wird.



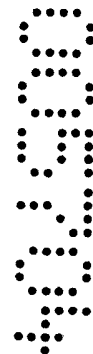
Vorteilhafterweise weist die Druckkammer zumindest eine Zufuhreinrichtung für Druckluft auf, wodurch Druck über die Druckkammer auf die darunter liegende Gewebekulturkammer ausgeübt werden kann.

In einer Weiterbildung ist vorgesehen, dass zumindest ein elastisches Element in der Gewebekulturkammer, insbesondere im Gewebelumen angeordnet ist, das eine Kompression der Zell- und Gewebekultur zulässt und auch sichergestellt ist, dass sich das Gewebe bzw. die Zellen nach Entfernen des Drucks wieder ausdehnen können und der Druck bzw. die Scherkräfte auf das Gewebe bzw. die zu züchtenden Zellen nur intermittierend bzw. temporär ausgeübt wird, wie dies auch bei nativem Gewebe wie bspw. im Knorpel des Kniegelenks oder in Blutgefäßen, insbesondere Endothelien, aufgrund des Pulsierens des Blutes verursacht durch Herz-Muskel-Kontraktionen vorkommt. Die Möglichkeit der Gelpolymerisation im Bioreaktor – die Verteilerplatte und das elastische Element, insbesondere der elastische Ring, dienen hierbei als Gießform für das Sol – und der Verzicht auf ein externes Aussaatelement erhöhen die Anwenderfreundlichkeit und den Integrationsgrad des Bioreaktorsystems.

Weiters ist vorgesehen, dass zumindest ein Widerlager in der Gewebekulturkammer angeordnet ist, das die maximale Kompression festlegt, wodurch eine übermäßige Kompression und womöglich Beschädigungen des zu züchtenden Gewebes bzw. der zu züchtenden Zellen verhindert wird.

Zwischen der oberen und der unteren Verteilerplatte können das elastische Element und zumindest ein Widerlager angeordnet sein, wobei einerseits durch das elastische Element das bereits oben erwähnte Rückstellverhalten sichergestellt wird und andererseits durch das Widerlager die maximale Kompression festgelegt ist.

In einer Weiterbildung ist vorgesehen, dass zumindest ein Abstandhalter im Restmediumlumen angeordnet ist, wodurch einerseits sichergestellt ist, dass die untere Verteilerplatte beabstandet zum Anschluss angeordnet ist und die Zirkulation des Kulturmediums gewährleistet werden kann und andererseits auch ein Reservevolumen geschaffen wird, um die Variabilität des Bioreaktors zu erhöhen, indem der Abstandhalter im Restmediumlumen entfernt werden kann und somit das Gewebelumen vergrößert werden kann.



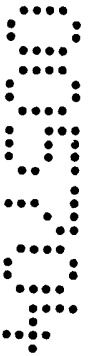
In einer Ausführungsvariante ist das Ober- und Unterteil über eine lösbare Verbindung miteinander verbunden, wodurch auf einfache Weise das zu kultivierende Gewebe bzw. die zu kultivierenden Zellen direkt in das Gewebelumen des Unterteils eingebracht werden können und nach Verbindung mit dem Oberteil unter sterilen Bedingungen weiter gezüchtet werden können.

Das Unterteil kann über eine lösbare Verbindung, insbesondere Gewinde, mit einem Stativ- und/oder Mediumreservoir verbunden sein, wodurch eine kontinuierliche Versorgung mit Kulturmedium gewährleistet wird oder der Bioreaktor beabstandet von einer Oberfläche gehalten wird um beispielsweise höhere Temperaturstabilität zu gewährleisten, die sonst womöglich durch Abstellen bzw. Inkubation des Bioreaktors auf einer Oberfläche nicht konstant gehalten werden kann, weil durch direkten Kontakt über die Oberfläche Temperaturschwankungen viel rascher auf den Bioreaktor übertragen werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der sicheren und anwenderfreundlichen Integration des Mediumreservoir in das geschlossene Bioreaktorsystem, wobei der Bioreaktor mittels eines im Unterteil befindlichen Gewindes auf einer Mediumflasche befestigt wird, und somit gleichzeitig als Mediumreservoir als auch als Stativ des Systems fungiert, welches somit als vollständig geschlossen anzusehen, leicht zu transportieren und zu manipulieren ist.

Als Stativ- und/oder Mediumreservoir kann eine Kulturmediumflasche dienen, womit ein geschlossenes Bioreaktorsystem bestehend aus dem Bioreaktor selbst und der Kulturmediumflasche gebildet werden kann und somit die Kontaminationsgefahr bei Zuführung des Kulturmediums aus einem externen Reservoir vermindert wird. Ferner kann die Kulturmediumflasche vor Wiederverwendung autoklaviert werden und lediglich der Bioreaktor ausgetauscht werden.

Weiters ist vorgesehen, dass die Zu- und Abflusseinrichtung über Schläuche mit dem Mediumreservoir verbunden ist, wodurch eine geschlossene Verbindung hergestellt wird und dadurch ebenfalls das Kontaminationsrisiko ausgeschlossen werden kann.

Weiters ist in einer Weiterbildung vorgesehen Sensoren, insbesondere Durchflusssensoren, dO_2 Sensoren, pH-Wert Sensoren, etc. in den Schläuchen zu integrieren, wodurch unterschiedliche Parameter bestimmt werden können wie bspw. das Durchflussvolumen, der Anteil gelösten Sauerstoffs oder der pH-Wert des Kulturmediums, das kontinuierlich zir-



kuliert. Sobald ein Grenzwert erreicht wird, können Vorkehrungen getroffen werden um einen definierten Zielwert wieder zu erreichen.

Es ist vorgesehen, dass die zumindest eine Erhebung bzw. Vertiefung der Verteilerplatte radial, zentral und/oder konzentrisch angeordnet ist, wodurch das Kulturmedium selbst bei mechanischer Stimulation, wie z.B. Druck- oder Zugapplikation, ungehindert über bzw. durch die Verteilerplatte fließen kann.

In einer Ausführungsvariante ist vorgesehen, dass mehrere Erhebungen in Form von Stegen radial voneinander beabstandet angeordnet sind, wodurch eine gleichmäßige Verteilung des Kulturmediums über das zu züchtende Gewebe bzw. die zu züchtenden Zellen ermöglicht wird und zudem ein Kollabieren des Mediumflusses verursacht durch die Membran verhindert wird.

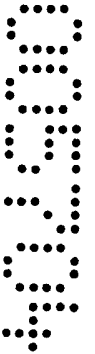
In einer Weiterbildung ist eine Erhebung zentral angeordnet und davon sind beabstandet Radialstege bis zur konzentrischen Erhebung angeordnet, wodurch sowohl eine Überströmung als auch eine Durchströmung mit Kulturmedium des zu züchtenden Gewebes ermöglicht wird.

In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass eine Erhebung zentral angeordnet ist und zumindest eine weitere Erhebung randständig radial angeordnet ist, wodurch wiederum eine kontinuierliche Versorgung des zu züchtenden Gewebes bzw. der Zellen mit Kulturmedium stattfinden kann.

Weiters kann zumindest ein Kanal für die Zufuhr des Kulturmediums angeordnet sein, wodurch die Zufuhr des Kulturmediums zur Verteilerplatte und somit zu den zu züchtenden Zellen und zu dem zu züchtenden Gewebe stattfinden kann.

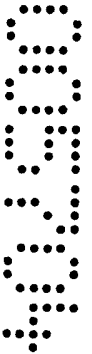
Weiters ist vorgesehen, dass das Kulturmedium über eine Zuflusseinrichtung zur Gewebekulturkammer transportiert wird und über eine Abflusseinrichtung das Gewebe verlässt, womit eine Versorgung mit Kulturmedium des zu züchtenden Gewebes bzw. der zu züchtenden Zellen gewährleistet wird.

Die Versorgung der Zellen und/oder Gewebe mit Kulturmedium kann permanent erfolgen, womit kontinuierlich frisches Kulturmedium zugeführt werden kann.



Das Kulturmedium kann die Verteilerplatte entweder durch- oder überströmen oder durch- und überströmen, womit eine gleichmäßige Versorgung mit Nährstoffen sowohl durch Diffusion als auch durch Perfusion gewährleistet wird und somit ein gleichmäßiges Wachstum der zu züchtenden Zellen bzw. des zu züchtenden Gewebes stattfinden kann.

Zum besseren Verständnis der Erfindung wird diese anhand der nachfolgenden Figuren näher erläutert.



Es zeigen jeweils in stark vereinfachter schematischer Darstellung:

- Fig. 1 einen Bioreaktor 1 mit Kulturmediumflasche 2;
- Fig. 2 einen Bioreaktor 1;
- Fig. 2a weitere Ausführungsvariante des Bioreaktors 1;
- Fig. 3 eine Explosionsdarstellung eines Bioreaktors 1;
- Fig. 4 a, b, c, d und e verschiedene Ausführungsvarianten einer Verteilerplatte 12.

Einführend sei festgehalten, dass in den unterschiedlich beschriebenen Ausführungsformen gleiche Teile mit gleichen Bezugszeichen bzw. gleichen Bauteilbezeichnungen versehen werden, wobei die in der gesamten Beschreibung enthaltenen Offenbarungen sinngemäß auf gleiche Teile mit gleichen Bezugszeichen bzw. gleichen Bauteilbezeichnungen übertragen werden können. Auch sind die in der Beschreibung gewählten Lageangaben, wie z.B. oben, unten, seitlich usw. auf die unmittelbar beschriebene sowie dargestellte Figur bezogen und sind bei einer Lageänderung sinngemäß auf die neue Lage zu übertragen. Weiters können auch Einzelmerkmale oder Merkmalskombinationen aus den gezeigten und beschriebenen unterschiedlichen Ausführungsbeispielen für sich eigenständige, erfinderische oder erfindungsgemäße Lösungen darstellen.

Sämtliche Angaben zu Wertebereichen in gegenständlicher Beschreibung sind so zu verstehen, dass diese beliebige und alle Teilbereiche daraus mit umfassen, z.B. ist die Angabe 1 bis 10 so zu verstehen, dass sämtliche Teilbereiche, ausgehend von der unteren Grenze 1 und der oberen Grenze 10 mitumfasst sind, d.h. sämtliche Teilbereich beginnen mit einer

unteren Grenze von 1 oder größer und enden bei einer oberen Grenze von 10 oder weniger, z.B. 1 bis 1,7 oder 3,2 bis 8,1 oder 5,5 bis 10.

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Bioreaktor 1 für die Kultivierung und Züchtung von Zellen bzw. Geweben bei gleichzeitiger mechanischer Stimulation und/oder Perfusion. Die mechanische Stimulation kann durch Druck, Zug oder Scherkräfte bewirkt werden. Vorzugsweise werden im Bioreaktor 1 dreidimensionale Zell- und Gewebekulturen zur Geweberekonstruktion gezüchtet. Der beschriebene Bioreaktor 1 kann zur Herstellung verschiedener künstlicher Gewebe, so zum Beispiel zur Herstellung künstlichen Knorpels im Rahmen der autologen Knorpeltransplantation verwendet werden. Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind Knochen bzw. Knorpel-Knochen transplantate, Sehnen, Bänder, Haut, Gefäße, etc.

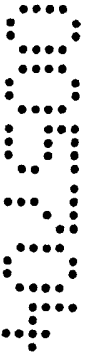
Verschiedene Ausführungsvarianten des erfindungsgemäßen Bioreaktors

Fig. 1 zeigt eine Ausführungsvariante des Bioreaktors 1 mit einer Kulturmediumflasche 2 für die Geweberekonstruktion im geschlossenen Zustand.

Diese Ausführungsvariante des Bioreaktors 1 besteht aus einem Oberteil 3 und einem Unterteil 4. Das Oberteil 3 umschließt eine Druckkammer 5, welche auf einer Seite von einer elastischen Membran 6 begrenzt ist und durch eine Öffnung 7 mit Druckluft beaufschlagt werden kann. Das Unterteil 4 umschließt eine Gewebekulturkammer 8. Es ist mit dem Oberteil 3 verbunden, vorzugsweise durch ein Gewinde 9, wodurch die elastische Membran 6 eingeklemmt und die Druckkammer 5 dicht gegen die vom Unterteil 4 eingeschlossene Gewebekulturkammer 8 verschlossen wird.

In Fig. 2 sind weitere Details der ersten Ausführungsvariante des Bioreaktors 1 dargestellt. Diese Ausführungsvariante des Bioreaktors 1 umfasst ferner ein Widerlager 10, beispielsweise einen oberen Abstandhalter um die maximale Kompression in der Gewebekulturkammer 8 festzulegen. Ein elastisches Element 11, insbesondere ein elastischer Ring oder eine Feder sichern die Rückstellung in die Ausgangsposition.

Weiters ist zumindest eine Verteilerplatte 12, vorzugsweise mit Ausnehmungen 13, angeordnet. Die Verteilerplatte 12 kann z.B. einen gelochten Boden aufweisen. Zwischen der Verteilerplatte 12 und der Deckplatte 14 ist das Gewebelumen 15 angeordnet.



Ferner umfasst die Gewebekulturkanne 8 neben dem Gewebelumen 15, wo das zu kultivierende Gewebe bzw. die zu kultivierenden Zellen angesiedelt sind, ein Mediumlumen 16, wo Kulturmedium antransportiert wird und gegebenenfalls ein Restmediumlumen 17, wo Kulturmedium abtransportiert wird.

In jener Ausführungsform, wie sie in Fig. 2 dargestellt ist, wird das Gewebelumen 15 zwischen einer oberen und einer unteren Verteilerplatte 12 gebildet. Angrenzend an das Gewebelumen 15 ist das Restmediumlumen 17 angeordnet.

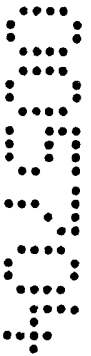
Zur Beabstandung der unteren Verteilerplatte 12 vom Boden des Restmediumlumens 17 ist ein Abstandhalter 18 angeordnet.

Zwischen der oberen Verteilerplatte 12 und der Deckplatte 14 ist das Mediumlumen 16 angeordnet, in welches das Kulturmedium gelangt.

Ein System zuführender Kanäle 19, welches über einen Schlauch 20 geschlossen ist und eine Schlauchpumpe 21, ermöglichen den Eintrag von Kulturmedium in die Gewebekulturkanne 8 des Unterteils 4, insbesondere in das Mediumlumen 16 benachbart zur oberen Verteilerplatte 12.

Ein System abführender Kanäle 22, welches über einen Schlauch 20 geschlossen ist, ermöglicht das Abfließen von Kulturmedium aus dem Restmediumlumen 17 des Unterteils 4. Ein Austausch (Diffusion) von Nährstoffen und Metaboliten zwischen dem durch das Mediumlumen 16 der oberen Verteilerplatte 12 strömenden Kulturmedium und einem im Gewebelumen 15 befindlichen Gewebe wird durch die Öffnungen 7 im Boden der oberen Verteilerplatte 12 ermöglicht.

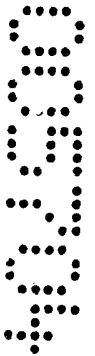
Alternativ zur Variante des Mediumüberströmens, kann das im Gewebelumen 15 befindliche Gewebe von Kulturmedium durchströmt werden. Für diese Betriebsart des Bioreaktors 1 werden die mediumabführenden Kanäle 22 mit Blindverschlüssen geschlossen und der Anschluss 23 zur Mediumabfuhr geöffnet. Auch ein Umschalten zwischen beiden Betriebsarten (Über- und Durchströmen) bei kontinuierlicher Prozessführung ist möglich und kann für Gewebe, deren mechanische Eigenschaften (Bsp.: Durchströmbarkeit) sich während der Reifung in der Zellkultur ändern, eingesetzt werden.



Die dargestellte Ausführungsvariante erlaubt es den Bioreaktor 1 mittels eines Gewindes 9 (Bsp.: GL45-Gewinde) auf eine Kulturmediumflasche 2 aufzuschrauben. Die Kulturmediumflasche 2 dient somit als Mediumreservoir und als Standfuß des geschlossenen Systems. Die mediumzuführenden und -abführenden Kanäle 19, 22 des Bioreaktors 1 können mit Schläuchen 20 verbunden sein, die in das Mediumreservoir 24 der Kulturmediumflasche 2 eintauchen. Ein gasdurchlässiger Filter, insbesondere Sterilfilter 25, kann zum Gasaustausch zwischen dem abgeschlossenen Bioreaktorsystem und der Umgebungsatmosphäre (Bsp.: Innenraum eines Zellkulturinkubators) eingesetzt werden. Durch den kontinuierlichen Betrieb als geschlossenes System und die damit verbundene Sicherstellung steriler Gewebekulturbedingungen wird der Bioreaktor 1 den Anforderungen der Good Manufacturing Practise-Richtlinie der WHO gerecht. Die Schlauchverbindungen im System der mediumzuführenden und -abführenden Kanäle 19, 22 können zur Integration von Sensoren (Bsp.: Durchflusssensoren, dO₂-Sensoren, pH-Sensoren) unter Erhalt des geschlossenen Charakters des Mediumkreislaufs im Bioreaktor genutzt werden.

Die dargestellte Ausführungsvariante des Bioreaktors erlaubt die Applikation von Druckimpulsen und Scherkräften auf das in der Gewebekulturkanne 8, insbesondere im Gewebelumen 15, kultivierte Gewebe. Hierfür kann durch Einleitung von Druckluft in die Druckkammer 5 ein Überdruck erzeugt werden, welcher durch die elastische Membran 6 über die Deckplatte 14 auf die obere Verteilerplatte 12 und von dieser weiter auf das in der Gewebekulturkanne 8 befindliche Gewebe übertragen werden. Die Auflage der oberen Verteilerplatte 12 auf einem elastischen Element 11, insbesondere Ring, ermöglicht deren Bewegung nach unten, hin zum kultivierten Gewebe, jedoch nur soweit, bis sie auf dem als Anschlag fungierenden, soliden oberen Widerlager 10, insbesondere oberen Abstandhalter, aufliegt. Weniger die Stärke des aufgebauten Überdrucks (Bsp.: 0,2 - 0,5 Bar), sondern vielmehr die Höhendifferenz zwischen elastischem Ring und oberem Abstandhalter bestimmt präzise, in welchem Maße das kultivierte Gewebe komprimiert wird. Die dargestellte Ausführungsvariante des Bioreaktors 1 erlaubt die Applikation von Druckimpulsen und Scherkräften ohne Unterbrechung des Mediumflusses.

In einer alternativen in Fig. 2a dargestellten Ausführungsvariante kann das zu züchtende Gewebe bzw. die zu züchtenden Zellen auch auf einer Verteilerplatte 12 angeordnet sein und nicht wie in Fig. 1 und 2 dargestellt zwischen zwei Verteilerplatten 12. So kann bei-





spielsweise das Gewebelumen 15 direkt an das Mediumlumen 16 anschließen und von einer Deckplatte 14 begrenzt sein. Die Anordnung der Druckkammer 5 entfällt, weil beispielsweise über einen Stempel intermittierend Druck auf die Deckplatte 14 ausgeübt werden kann und dieser auf das Gewebe bzw. die Zellen im Gewebelumen 15 übertragen wird. Die Beweglichkeit der Deckplatte 14 kann beispielsweise durch eine Dichtung aus elastischem Material im Verbindungsbereich mit dem Bioreaktor 1 erzielt werden. Durch die Ausübung von Druck wirken automatisch auch Scherkräfte auf die Zellen.

Ferner ist in Fig. 2a die Ausführungsvariante ohne unteren Abstandhalter 18 unter der Verteilerplatte 12 im Restmediumlumen 17 dargestellt. Durch Entfernen dieses Abstandhalters 18 kann das Gewebelumen 15 vergrößert und das Restmediumlumen 17 verkleinert werden.

Figur 3 zeigt eine Ausführungsvariante des Bioreaktors für die Geweberekonstruktion im geöffneten Zustand während der Einbringung eines zellbeladenen Collagen I-Sols in den Bioreaktor 1. Selbstverständlich können die Zellen auch ohne Träger, also in Suspension, oder auf anderen Trägern eingebracht werden.

In das sterile, mit einem sterilen unteren Abstandhalter 18, einer sterilen unteren Verteilerplatte 12, einem sterilen Widerlager 10, insbesondere oberen Abstandhalter, und einem sterilen elastischen Element 11, wie z.B. Ring versehene Unterteil 4 des Bioreaktors 1 kann mit einer Pipette 26 unter Einhaltung steriler Bedingungen ein zellbeladenes Collagen I-Sol eingefüllt werden. Nach Übergang des Collagen I-Sols in den Gelzustand füllt es das gesamte Gewebelumen 15, aus. Die Gewebekulturkammer 8, insbesondere das Gewebelumen 15, kann durch Auflegen einer sterilen oberen Verteilerplatte 12 und einer sterilen elastischen Membran 6 und durch Aufschrauben des Bioreaktor-Oberteils 3 dicht verschlossen werden.

Andere Anwendungsbeispiele sind die Einbringung zellbeladener Vlies- und Fasermaterialien, zellbeladener poröser Strukturen und zellbeladener Komposite aus gel-, vlies-, faserartigen und/oder porösen Trägermaterialien in die Gewebekulturkammer 8.

Durch Variation der Abmessungen des Widerlagers 10, insbesondere des oberen Abstandhalters, des elastischen Elements 11, wie des Rings, und des unteren Abstandhalters 18

können unter Ausnutzung des vorliegenden Volumens im Restmediumlumen 17 sowohl Dicke und Durchmesser des kultivierten Gewebes, als auch die Stärke einer eventuell applizierten mechanischen Stimulation, z.B. Kompression, Scherkraft, etc., eingestellt werden.

Fig. 4a-e zeigen Ausführungsvarianten der oberen Verteilerplatte 12 des erfindungsgemäßen Bioreaktors 1.

Bei der ersten Variante in Fig. 4a kann einströmendes Kulturmedium durch einen Kanal 27 aufgenommen werden und durch die Ausnehmungen 13 im Boden nach unten abgegeben werden. Stege 28 sind radial angeordnet, um eine gleichmäßige Verteilung des Kulturmediums zu erzielen. Ein Durchströmen des auf der Verteilerplatte 12 bzw. zwischen den Verteilerplatte 12 befindlichen kultivierten Gewebes wird ermöglicht. Bei Variante a verhindern die dicht angeordneten Stege 28 das Kollabieren des mediumdurchströmten Mediumlumens 16 der Verteilerplatte 12 während der mechanischen Stimulation, z.B. während des Druckimpulses. Die Stege 28 verhindern auch, dass sich die elastische Membran 6 bei Ausübung mechanischer Stimulation dicht an die Verteilerplatte 12 bzw. das darauf befindliche Gewebe anlegt und somit die Ausnehmungen 13 verschließt, womit die Versorgung mit Kulturmedium unterbrochen wäre.

In Variante b der Verteilerplatte 12, wie in Fig. 4b dargestellt, kann Kulturmedium durch einen Kanal 27 aufgenommen und durch einen zweiten Kanal 27 wieder abgegeben werden. Nährstoff- und Metabolitdiffusion zwischen dem überströmenden Kulturmedium und dem unter der Platte befindlichen Gewebe werden durch Ausnehmungen 13 im Boden der Platte ermöglicht. Sowohl Variante a, als auch Variante b können Druckimpulse aufnehmen und auf das darunter liegende Gewebe übertragen. Bei Variante b in Fig. 4b wird diese Funktion von einer soliden Scheibe 29 mit Auflagepunkten am Rand und im Zentrum, also den Erhebungen 30, der Verteilerplatte 12 übernommen.

Eine dritte Ausführungsvariante c der Verteilerplatte 12 ist in Fig. 4c dargestellt. Die Erhebungen 30 sind spiralartig angeordnet. Zudem ist eine zentrale Erhebung 30 dargestellt, wobei die Verteilerplatte 12 auch ohne diese Erhebung 30 funktioniert, weil die spiralartig angeordneten Stege 28 deren Funktion übernehmen können.

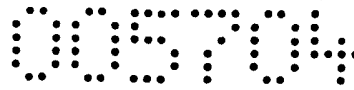


Fig. 4d zeigt eine weitere Ausführungsvariante der Verteilerplatte 12, wobei optional eine Erhebung 30 zentral angeordnet ist und davon beabstandet einzelne Stege 28.

In Fig. 4e ist eine laminare Anordnung der Erhebung 30 auf einer Verteilerplatte 12 dargestellt. Die Erhebungen können gleichmäßig über die Verteilerplatte 12 oder im Randbereich dichter und in Zentrumsnähe weniger dicht angeordnet sein.

Weitere Ausführungsvarianten der Verteilerplatte 12 sind denkbar, wobei diese den Mediumstrom über und/oder durch das kultivierte Gewebe lenken und gleichzeitig eine mechanische Stimulation, wie Druckimpulse, Zug- und oder Scherkräfte auf das kultivierte Gewebe übertragen können.

Die Ausführungsbeispiele zeigen mögliche Ausführungsvarianten des Bioreaktors 1 und der Verteilerplatte 12, wobei an dieser Stelle bemerkt sei, dass die Erfindung nicht auf die speziell dargestellten Ausführungsvarianten derselben eingeschränkt ist, sondern vielmehr auch diverse Kombinationen der einzelnen Ausführungsvarianten untereinander möglich sind und diese Variationsmöglichkeit aufgrund der Lehre zum technischen Handeln durch gegenständliche Erfindung im Können des auf diesem technischen Gebiet tätigen Fachmannes liegt. Es sind also auch sämtliche denkbaren Ausführungsvarianten, die durch Kombinationen einzelner Details der dargestellten und beschriebenen Ausführungsvariante möglich sind, vom Schutzzumfang mit umfasst.

Anwendungsgebiete

Anwendungsgebiete des erfindungsgemäßen Bioreaktors 1 sind:

- (1) die Knorpelrekonstruktion im Rahmen einer autologen Knorpeltransplantation (ACT),
- (2) die Rekonstruktion von Knorpel für Forschungszwecke,
- (3) die Herstellung von Knorpel-Knochen-Konstrukten zur Transplantation in Knorpel-Knochen-Defekten,
- (4) die Herstellung von Knorpel-Knochen-Konstrukten für Forschungszwecke,

- (5) die Herstellung dreidimensionaler Leberäquivalente für toxikologische, pharmazeutische und biologische Untersuchungen,
- (6) die Herstellung und Rekonstruktion von Bändern, Sehnen, etc.,
- (7) die Herstellung und Rekonstruktion von Zwischenwirbelscheiben, insbesondere der Zellen des Anulus fibrosus,
- (8) die Herstellung und Rekonstruktion von Hauttransplantaten,
- (9) die Herstellung und Rekonstruktion von Blutgefäßen, insbesondere Endothelien, für Gefäßprothesen und Gefäßtransplantate, und
- (10) andere Anwendungen aus dem Bereich des Tissue Engineerings mit dem Ziel, ein dreidimensionales Gewebe zu rekonstruieren.

Anwendungsbeispiel 1

Im ersten Anwendungsbeispiel werden primäre Chondrocyten aus dem Knieknorpel eines jungen Schweins gewonnen und für 14 Tage in einem 3%igen Kollagen 1-Gel in DMEM/Ham's F12-Medium mit 50 µg/ml Ascorbat-2-phosphat und 10% FCS im Bioreaktor kultiviert. Während der gesamten Kulturdauer wird mit Kulturmedium überströmt. Nach der Kultivierung werden Kollagen II und Aggrecan immunzytochemisch nachgewiesen. Beide Proteine sind Markerproteine für hyalinen Knorpel. Ein Teil der Gewebekonstrukte wird nach einwöchiger unbelasteter Kultur einem einwöchigen mechanischen Belastungsprogramm unterworfen. Die unbelastete Kultur zeigt geringe Immunreaktivität gegen Kollagen II (Kollagen II rot, Zellkerne blau) und Aggrecan (Aggrecan rot, Zellkerne blau). Demgegenüber fördert die Kompression die Bildung von Kollagen II (Kollagen II rot, Zellkerne blau) und Aggrecan (Aggrecan rot, Zellkerne blau). Im Bioreaktor 1 mit mechanischer Belastung kann demnach ein Knorpelkonstrukt generiert werden, dessen extrazelluläre Matrix der eines hyalinen Knorpels entspricht. Der Dedifferenzierung der primären Chondrocyten wird entgegen gewirkt.

Anwendungsbeispiel 2

Im zweiten Anwendungsbeispiel werden primäre Chondrozyten aus dem Knieknorpel eines jungen Schweins gewonnen, in dreitägiger Monolayer-Kultur dedifferenziert und anschließend für drei Wochen in einem 3%igen Kollagen I-Gel in DMEM/Ham's F12-Medium mit 50 µg/ml Ascorbat-2-phosphat und 10% FCS im Bioreaktor kultiviert. Während der gesamten Kulturdauer wird das Kollagengel mit Kulturmedium überströmt und im Intervall von 12 Stunden für zwei Stunden mit einer Frequenz von 0,5 Hz rhythmisch komprimiert. Im Kontrollexperiment wird ein Kollagengel für drei Wochen kultiviert, mit Medium überströmt, aber keiner mechanischen Kompression ausgesetzt. Nach der Kultivierung werden Kollagen II und Aggrecan immunzytochemisch nachgewiesen. Beide Proteine sind Markerproteine für hyalinen Knorpel. Die unbelastete Kultur des Kontrollexperiments zeigt geringe Immunreaktivität gegen Kollagen II und Aggrecan. Demgegenüber fördert die Kompression die Bildung von Kollagen II und Aggrecan. Durch mechanische Stimulation im Bioreaktor können demnach dedifferenzierte primäre Chondrozyten redifferenziert werden und Merkmale eines hyalinen Knorpels ausbilden.

In der Fig. 4b, 4c, 4d und 4e sind weitere und gegebenenfalls für sich eigenständige Ausführungsform der Verteilerplatte 12 gezeigt, wobei wiederum für gleiche Teile gleiche Bezugszeichen bzw. Bauteilbezeichnungen wie in der vorangegangenen Fig. 4a verwendet werden. Um unnötige Wiederholungen zu vermeiden, wird auf die detaillierte Beschreibung in den vorangegangenen Fig. hingewiesen bzw. Bezug genommen.

Der Ordnung halber sei abschließend darauf hingewiesen, dass zum besseren Verständnis des Aufbaus des Bioreaktors 1 und der Verteilerplatte 12 diese bzw. deren Bestandteile teilweise unmaßstäblich und/oder vergrößert und/oder verkleinert dargestellt wurden.

Die den eigenständigen erfinderischen Lösungen zugrundeliegende Aufgabe kann der Beschreibung entnommen werden.

Vor allem können die einzelnen in den Fig. 1, 2, 2a, 3, 4a-e gezeigten Ausführungen den Gegenstand von eigenständigen, erfindungsgemäßen Lösungen bilden. Die diesbezüglichen, erfindungsgemäßen Aufgaben und Lösungen sind den Detailbeschreibungen dieser Figuren zu entnehmen.

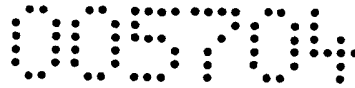
005704

Bezugszeichenaufstellung

- 1 Bioreaktor
- 2 Kulturmediumflasche
- 3 Oberteil
- 4 Unterteil
- 5 Druckkammer
- 6 Membran
- 7 Öffnung
- 8 Gewebekulturkanne
- 9 Gewinde
- 10 Widerlager
- 11 Elastisches Element
- 12 Verteilerplatte
- 13 Ausnehmung
- 14 Deckplatte
- 15 Gewebelumen
- 16 Mediumlumen
- 17 Restmediumlumen
- 18 Abstandhalter
- 19 Kanal
- 20 Schlauch
- 21 Pumpe
- 22 Kanal
- 23 Anschluss
- 24 Mediumreservoir
- 25 Filter
- 26 Pipette
- 27 Kanal
- 28 Steg
- 29 Scheibe
- 30 Erhebung

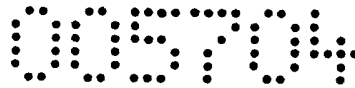
Patentansprüche

1. Bioreaktor (1) für Zell- und Gewebekultur zur mechanischen Stimulation und/oder Perfusion von Gewebe- bzw. Zellkulturen umfassend ein Oberteil (3) und ein damit verbundenes Unterteil (4) mit einer Gewebekulturkanmer (8), dadurch gekennzeichnet, dass in der Gewebekulturkanmer (8) zumindest eine Verteilerplatte (12) angeordnet ist.
2. Bioreaktor (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilerplatte (12) Ausnehmungen (13), insbesondere Löcher, Bohrungen, Durchbrüche, aufweist.
3. Bioreaktor (1) nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilerplatte (12) zumindest eine Erhebung (30) bzw. Vertiefung aufweist.
4. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Übergangsbereich von Ober- (3) zu Unterteil (4) eine Membran (6) zur Aufteilung in eine Druckkammer (5) und die Gewebekulturkanmer (8) angeordnet ist.
5. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran (6) elastisch ist.
6. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Oberteil (3) zumindest eine Deckplatte (14) umfasst.
7. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die zumindest eine Deckplatte (14) in der Gewebekulturkanmer (8) zwischen Membran (6) und Verteilerplatte (12) angeordnet ist.



8. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Gewebekulturkammer (8) zumindest eine Zu- und Abflusseinrichtung, insbesondere einen zu- (19) und abführenden Kanal (22), für ein Kulturmedium aufweist.
9. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Gewebekulturkammer (8) mehrere Lumen, insbesondere ein Gewebelumen (15), ein Mediumlumen (16) und gegebenenfalls ein Restmediumlumen (17), aufweist.
10. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewebelumen (15) zwischen einer oberen und einer unteren Verteilerplatte (12) angeordnet ist.
11. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuflusseinrichtung für das Kulturmedium in das Mediumlumen (16) mündet.
12. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abflusseinrichtung für das Kulturmedium aus dem Restmediumlumen (17) und/oder Mediumlumen (16) mündet.
13. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Druckkammer (5) zumindest eine Zufuhreinrichtung für Druckluft aufweist.
14. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein elastisches Element (11) in der Gewebekulturkammer (8), insbesondere im Gewebelumen (15), angeordnet ist, das eine Kompression der Zell- und Gewebekultur zulässt.
15. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein Widerlager (10) in der Gewebekulturkammer (8) angeordnet ist, das die maximale Kompression festlegt.

16. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der oberen und unteren Verteilerplatte (12) das elastische Element (11) und das Widerlager (10) angeordnet sind.
17. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein Abstandhalter (18) im Restmediumlumen (17) angeordnet ist.
18. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Ober- und Unterteil (3, 4) über eine lösbare Verbindung miteinander verbunden sind.
19. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Unterteil (4) über eine lösbare Verbindung, insbesondere Gewinde (9), mit einem Stativ und/oder Mediumreservoir (24) verbunden ist.
20. Bioreaktor (1) nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kulturmediumflasche (2) das Stativ und/oder Mediumreservoir (24) bildet.
21. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Zu- und Abflusseinrichtungen über Schläuche (20) mit dem Mediumreservoir (24) verbunden sind.
22. Bioreaktor (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass Sensoren, insbesondere Durchflusssensoren, dO₂-Sensoren, pH-Wert Sensoren, in den Schläuchen (20) integriert sind.
23. Verwendung des Bioreaktors (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Züchtung von Zell- und Gewebekultur für Geweberekonstruktionen.
24. Verteilerplatte (12) für Zell- und Gewebekultur, insbesondere unter Anwendung von mechanischer Stimulation und/oder Perfusion, dadurch gekennzeichnet, dass



Ausnehmungen (13), insbesondere Löcher, Bohrungen, Durchbrüche, und zumindest eine Erhebung (30) bzw. Vertiefung angeordnet sind.

25. Verteilerplatte (12) nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die zumindest eine Erhebung (30) radial, zentral und/oder konzentrisch angeordnet ist.

26. Verteilerplatte (12) nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Erhebungen (30) in Form von Stegen (28) radial voneinander beabstandet angeordnet sind.

27. Verteilerplatte (12) nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass eine Erhebung (30) zentral angeordnet ist und davon beabstandet radial Stege (28) bis zur konzentrischen Erhebung (30) angeordnet sind.

28. Verteilerplatte (12) nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass eine Erhebung (30) zentral angeordnet ist und zumindest eine weitere Erhebung (30) randständig radial angeordnet ist.

29. Verteilerplatte (12) nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein Kanal (27) für ein Kulturmedium angeordnet ist.

30. Verfahren zur Kultivierung von Zellen und/oder Geweben in einem Bioreaktor (1), insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 22, umfassend die Schritte i) Einbringen der Zellen auf eine Verteilerplatte (12) in eine Gewebekulturkammer (8), insbesondere Gewebelumen (15), ii) Versorgung der Zellen mit Kulturmedium, iii) mechanische Stimulation und/oder Perfusion der Zellen bzw. Gewebekulturzellen

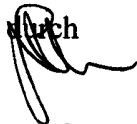
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass das Kulturmedium über eine Zuflusseinrichtung, insbesondere zuführenden Kanal (19), zur Gewebekulturkammer (8), insbesondere Gewebelumen (15), transportiert wird und über eine Abfluss-

einrichtung, insbesondere abführenden Kanal (22), die Gewebekulturkammer (8), insbesondere das Gewebelumen (15), verlässt.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Versorgung der Zellen und/oder Gewebe mit Kulturmedium permanent erfolgt.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Kulturmedium die Verteilerplatte (12) durchströmt und/oder überströmt.

Greiner Bio - One GmbH

 durch

Dr. Günter Secklehner

005704

Fig.1

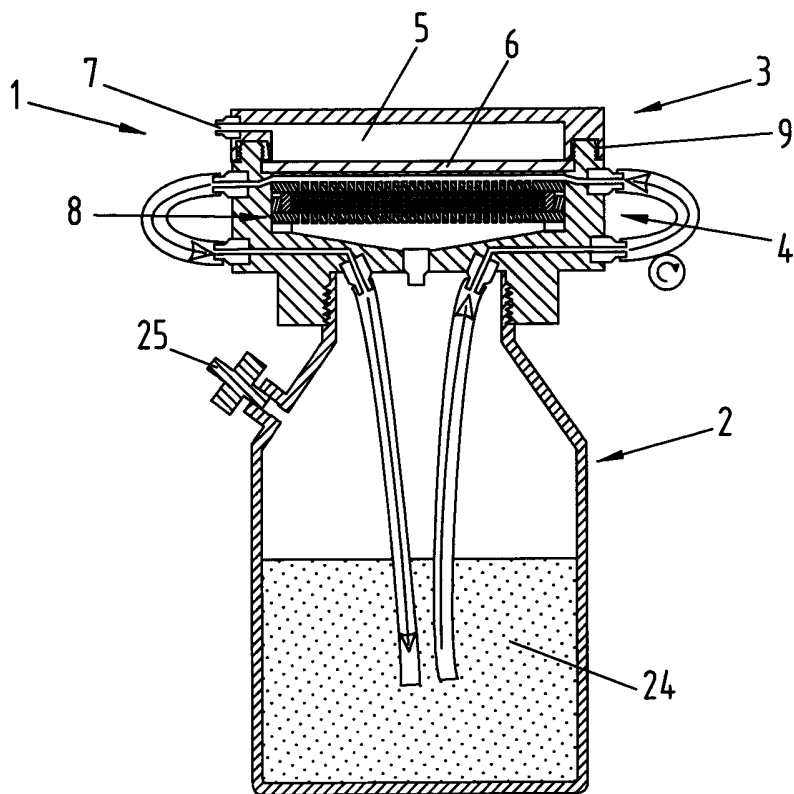
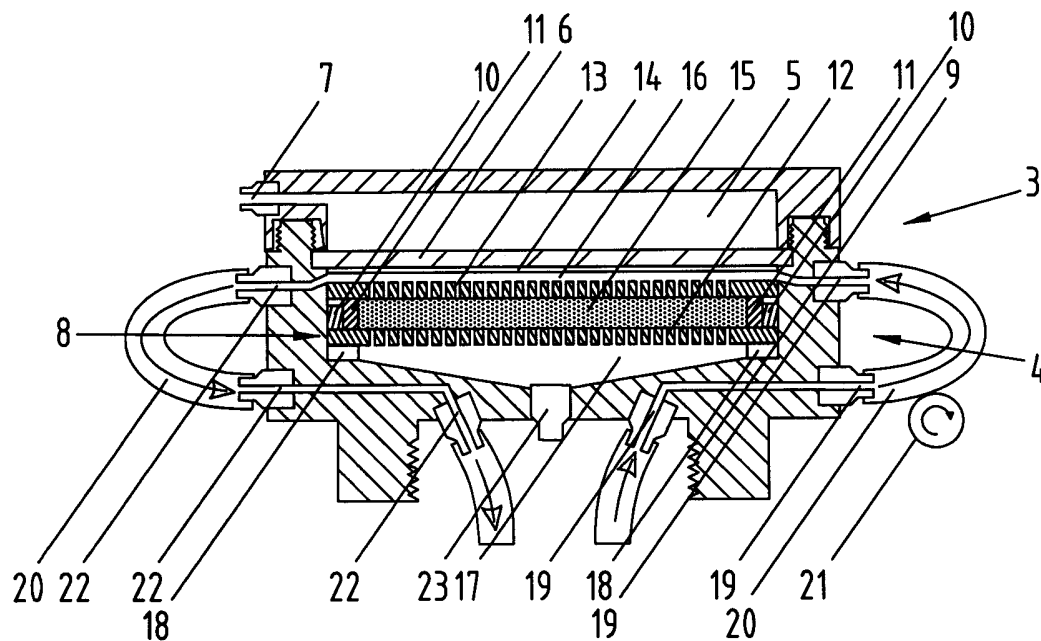


Fig.2



005704

Fig.2a

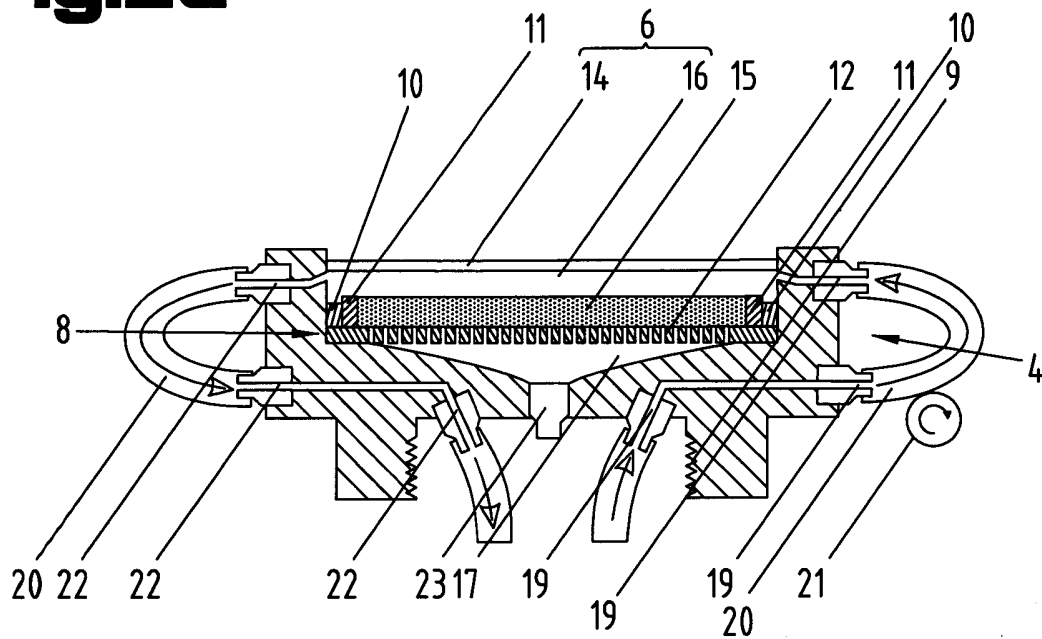
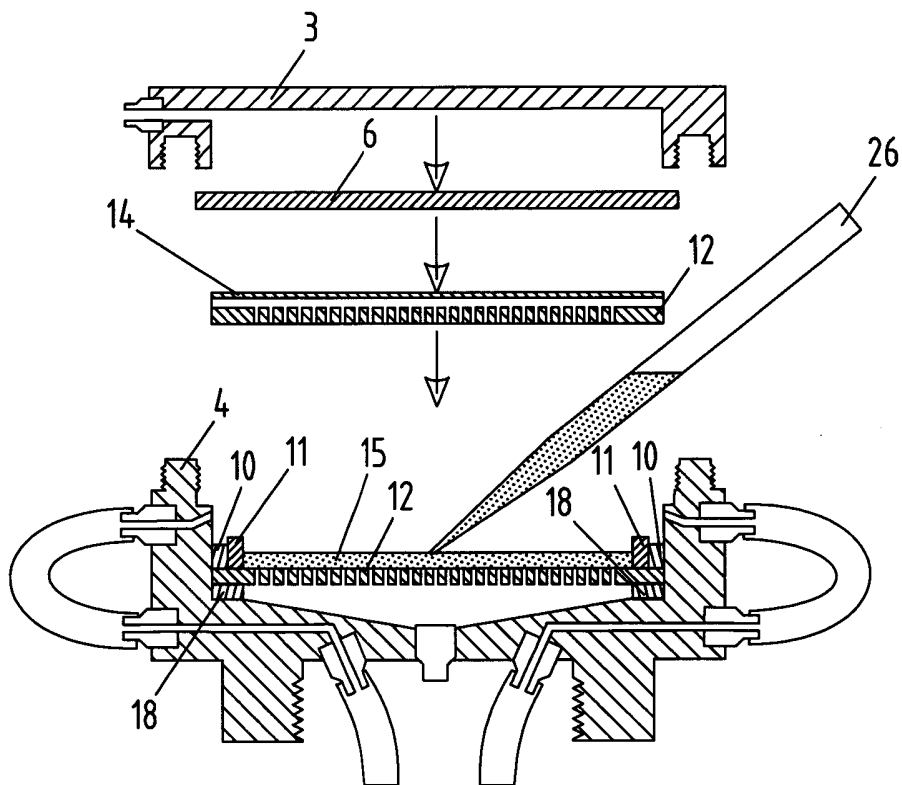


Fig.3



005704

Fig.4a

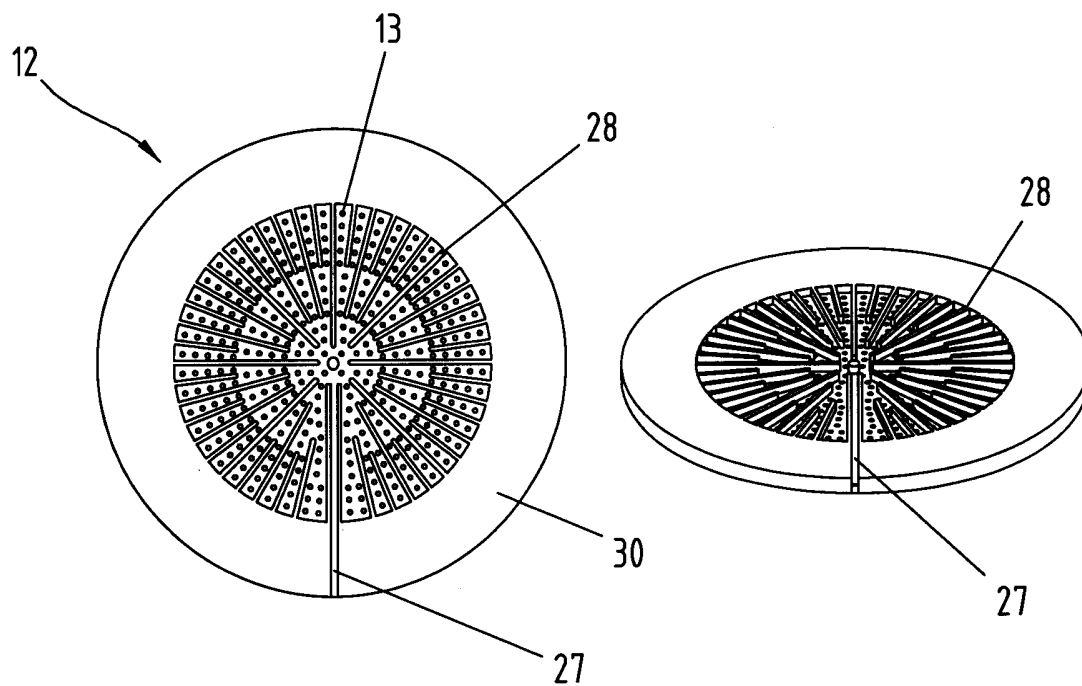
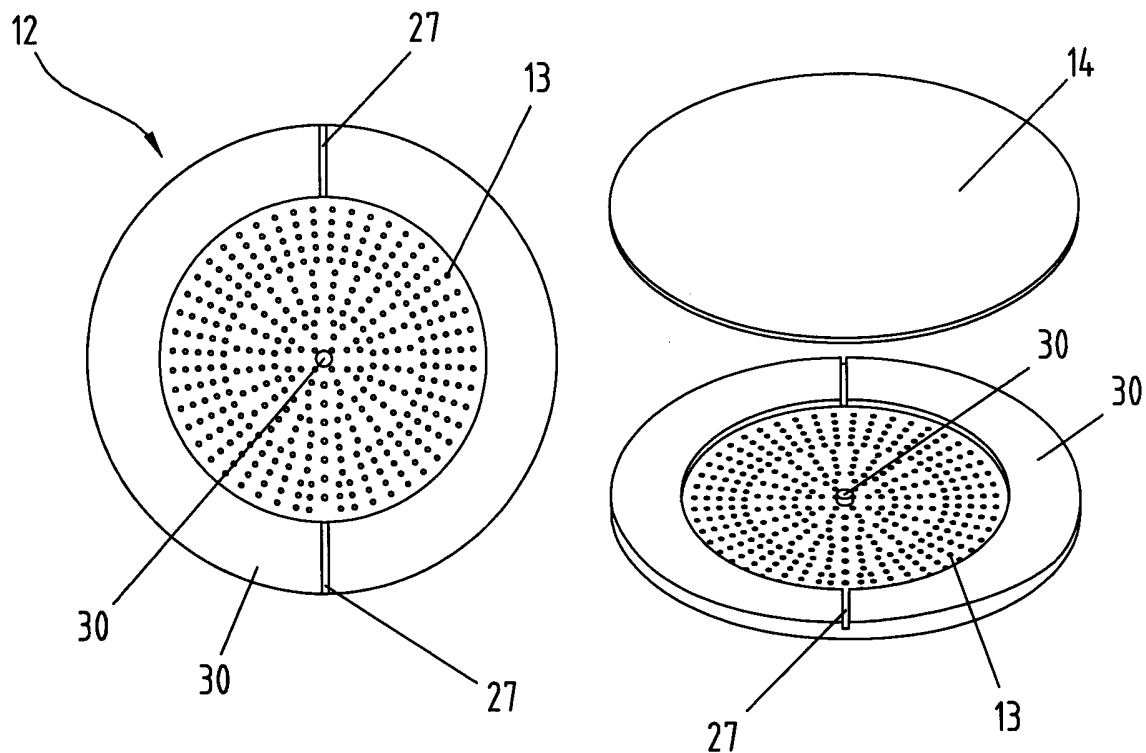


Fig.4b



005704

Fig.4c

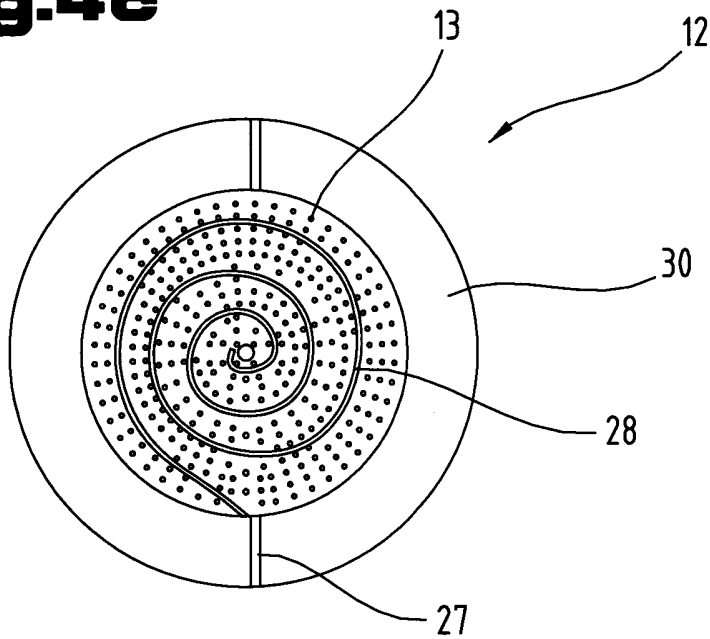


Fig.4 d

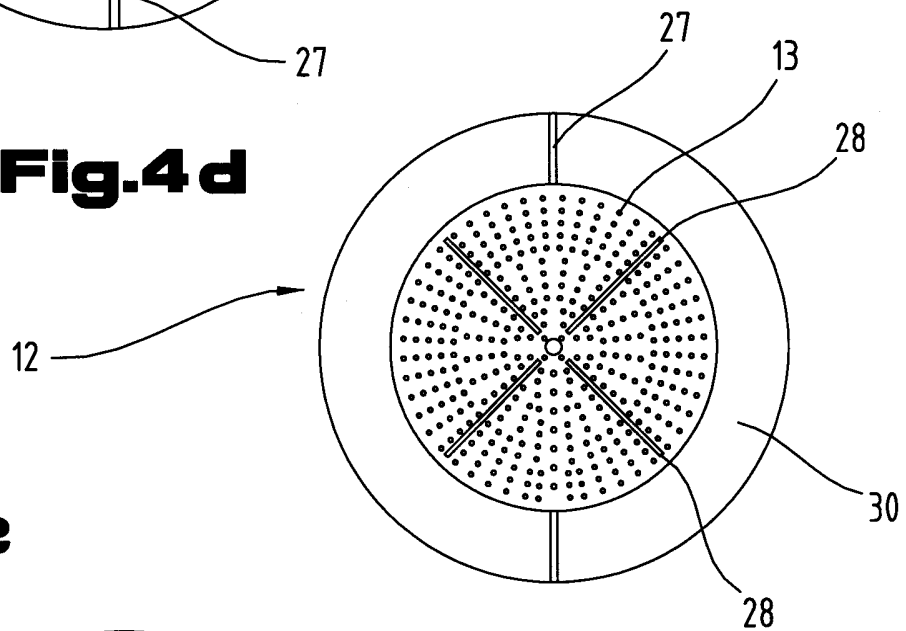
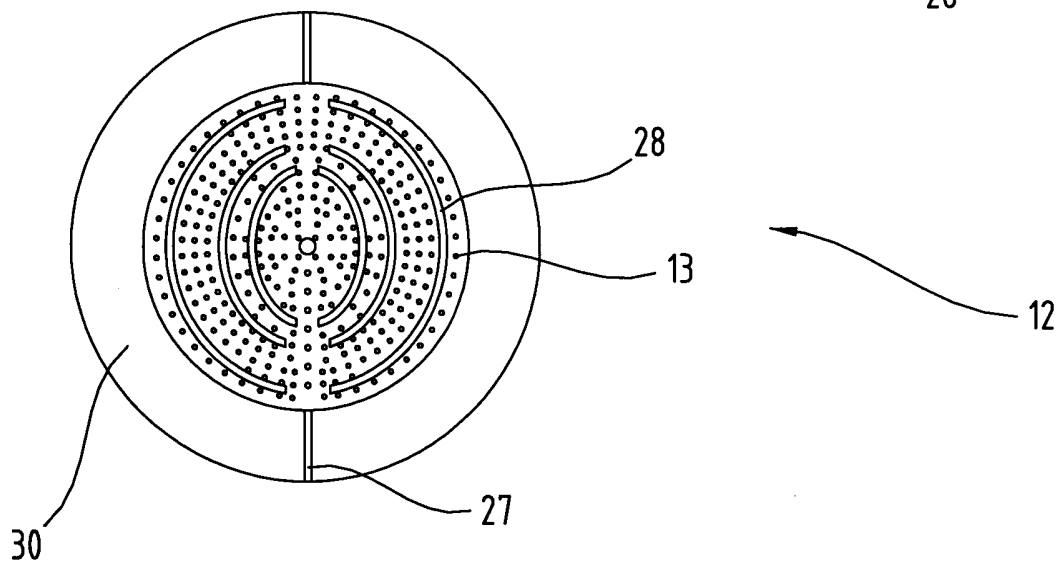


Fig.4e





Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : C12M 3/00 (2006.01); C12N 5/06 (2006.01)		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: C12M 3/00, C12N 5/06		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): C12M, C12N		
Konsultierte Online-Datenbank:		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 23. Mai 2008 eingereichten Ansprüchen 1-33 erstellt.		
Kategorie ⁷⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO 2003/060061 A1 (ORGANOGENESIS INC.) 24. Juli 2003 (24.07.2003) <i>Zusammenfassung; Figuren 1, 9a</i> --	1-3, 5-12, 14-25, 30-33
X	EP 1857543 A1 (SCHOOL JURIDICAL PERSON KITASATO GAKUEN) 21. November 2007 (21.11.2007) <i>Ansprüche 1, 10, 11; Figur 2</i> --	1-4, 6-12, 14-17, 20-24, 30-33
X	EP 1078982 A2 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) 28. Februar 2001 (28.02.2001) <i>Zusammenfassung mit Figur 1</i> --	1, 2, 6, 8-12, 15-17, 19-24, 30-33
X	WO 2006/033935 A2 (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 30. März 2006 (30.03.2006) <i>Ansprüche; Figuren</i> --	1-4, 6, 8-13, 15-24, 30-33
X	US 5827729 A (NAUGHTON et al.) 27. Oktober 1998 (27.10.1998) <i>Figuren 1-4; Spalte 7, Zeile 43 - Spalte 10, Zeile 45</i> --	1-4, 6-24, 30-33
Datum der Beendigung der Recherche: 25. März 2009		☒ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Mag. MOSSER
⁷⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	EP 1626278 A2 (ONCHIP CELLOMICS CONSORTIUM SUMIDA-KU) 15. Februar 2006 (15.02.2006) <i>Seite 47, Absätze [0273]-[0275]; Figuren 40, 41, 45, 46</i>	1-3, 6, 8-12, 15-24, 30-33
X	-- US 2006/0183222 A1 (KUWABARA et al.) 17. August 2006 (17.08.2006) <i>Anspruch 1; Figuren 1, 2</i>	24
X	-- DE 1051249 B (PUROLATOR PRODUCTS. INC) 26. Februar 1959 (26.02.1959) <i>Figur 3</i> ----	24-29