

(19)



Deutsches
Patent- und Markenamt



(10) **DE 10 2010 043 555 B4** 2015.07.23

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2010 043 555.4**

(22) Anmeldetag: **08.11.2010**

(43) Offenlegungstag: **10.05.2012**

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **23.07.2015**

(51) Int Cl.: **C12N 5/071 (2010.01)**

C12N 5/073 (2010.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

**Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden
e.V., 01069 Dresden, DE**

(74) Vertreter:

**Sperling, Fischer & Heyner Patentanwälte, 01277
Dresden, DE**

(72) Erfinder:

**Sebinger, David D. R., 01069 Dresden, DE;
Werner, Carsten, Prof. Dr., 01069 Dresden, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

WO 2006/ 109 044 A2

**Firmenprospekt der Fa. Greiner "348 Well
Format"**

**Sebinger, D. et al. "A Novel, Low-Volume
Method for Organ Culture of Embryonic Kidneys
That Allows Development of Cortico-Medullary
Anatomical Organization" Plosone, May 2010
Vol.5, Issue 5, S. 1-10**

**firmenprospekt der fa. greiner "Zellkultur
multiwell Platten 6, 12, 24, 48 Well Format"**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen, ausgenommen Organanlagen aus menschlichen Embryonen, auf einer Multiwellplatte (1), umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

a) Platzieren jeweils eines oder mehrerer Gewebe oder einer oder mehrerer embryonaler Organanlagen (6) an oder nahe der Mitte der kreisförmigen Oberfläche des Wellbodens (4) in einem einzelnen Well (2);

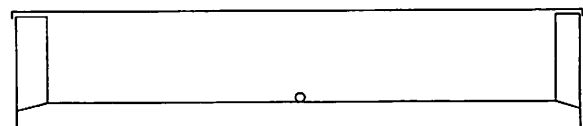
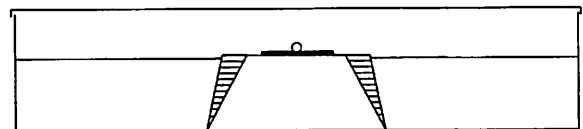
b) Zugabe des kompletten Nährmediums (7) in einer Menge, die für die vollständige Benetzung der kreisförmigen Oberfläche des Wellbodens (4) notwendig ist; und

c) Inkubation der/des Gewebe(s) oder der embryonalen Organanlage(n) (6) und des Nährmediums (7) in kohlendioxidangereicherter feuchter Atmosphäre und einem Temperaturbereich von 35 bis 39 °C,

dadurch gekennzeichnet, dass Multiwellplatten (1) der Konfigurationsgrößen 6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well oder 384-Well eingesetzt werden und für die Wells (2) der unterschiedlichen Wellplattenformate mit den entsprechenden Wellbodenflächen (5) folgende Volumina/Volumenbereiche an Nährmedium (7) vorgesehen sind:

12 Well	3,9	331,5 (±70)
24 Well	1,9	161,5 (±40)
48 Well	1,0	85 (±30)
96 Well	0,32	27,2 (±10)
384 Well	0,1	8,5 (±3).

Multiwellplattenformat	Größe der Wellbodenfläche (5) in cm ²	Nährmediumsvolumen in µl
6 Well	9,6	816 (±200)



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen. Mit diesem Verfahren kann die/das zu kultivierende Organanlage/Gewebe fixiert und stetig Einfluss auf die Entwicklung der/des kultivierten Organanlage/Gewebes ausgeübt werden. Das Verfahren ermöglicht die genaue Untersuchung der Frühentwicklung von Organen in vitro.

[0002] Die Erfindung ist dem wissenschaftlichen Gebiet der Entwicklung und der experimentellen physiologischen Biologie der embryonalen Organe und Gewebe zugeordnet. Insbesondere die Organkultivierung aus embryonalen Nierenanlagen erwies sich in der Vergangenheit bei der Untersuchung der Entwicklung der Nierenfunktion als sehr wertvoll. Das System wurde verwendet, um die Dynamik der normalen Entwicklung durch Zeitraffer-Fotografie zu beobachten. Das System erlaubt zudem in großem Umfang eine funktionelle Analyse und wird genutzt, um die Entwicklungsfunktionen spezifischer Moleküle durch experimentelle Zugabe von exogenen Wachstumsfaktoren, funktionsblockierenden Antikörpern, Oligosacchariden, Drogen, Antisense-Oligonukleotiden und Short-Interfering-RNAs zu untersuchen. Das System wird auch angewendet, um die Zellautonomie von Mutationen bei der Produktion von rekombinanten chimären Nieren zu prüfen.

[0003] Die erste erfolgreiche Technik zur Kultivierung von Säugetiernierenanlagen in vitro ist durch Clifford Grobstein: (1953) Nature 172: 869–870; (1953) Science 118: 52–55; (1953) J Exp Zool 124: 383–414 bekannt, der murine, embryonale Tag 11 (E11)-Metanephren in geronnenem Eulenplasma in ein Medium mit einer Tyrode-Lösung, extrahiertem Pferdeserum und Hühnerembryo gab. Ein wichtiger Fortschritt wurde durch Lauri Saxén et al.: (1962) J Natl Cancer Inst 29: 597–631; (1966) Int J Cancer 1: 271–290; (1968) Adv Morphog 7: 251–293 in den 1960er Jahren beschrieben, wobei bei der dort angewandten Methode die Notwendigkeit eines Blutgerinnsels beseitigt wurde und die Kultivierung in einer einfachen, mit Serum angereicherten Earle-Modifikation von EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) stattfinden konnte. In dem System nach Lauri Saxén et al.: (1962) J Natl Cancer Inst 29: 597–631; (1966) Int J Cancer 1: 271–290; (1968) Adv Morphog 7: 251–293 werden die mechanischen Funktionen des Blutgerinnsels durch einen Milliporenfilter ersetzt, auf dem die Kultivierung der Nierenanlagen erfolgt, wobei der Milliporenfilter durch ein Raster an der Oberfläche des Mediums gehalten wird. Die Anwesenheit der Niere bewirkt infolgedessen, dass die Oberfläche des Mediums um sie herum eine Krümmung beschreibt. Diese Krümmung der Oberfläche erzeugt nach der Young-Laplace-Gleichung einen Abwärtsdruck

$$p = \sigma(1/r_x + 1/r_y),$$

wobei r_x und r_y die Krümmungsradien um die x- und y-Achsen und σ die Oberflächenspannung des Mediums sind.

[0004] Für einen Radius von 500 μm , was etwa der Tiefe einer frisch präparierten Nierenanlage entspricht, und unter der Annahme, dass das Medium die Oberflächenspannung von Wasser hat, beträgt dieser Druck etwa 300 Pa und wird sich verringern, je mehr sich die Niere ausbreitet und sich die Radien der Oberflächenkrümmung des Mediums infolgedessen vergrößern. Dieser Abwärtsdruck p hat Einfluss auf die Entwicklung der Niere. Wenn sich der Filter unterhalb anstatt an der Oberfläche des Nährmediums befindet, so dass das Medium flach ist und keinen Druck ausübt, entwickelt sich die Nierenanlage nur sehr schlecht. Die Entwicklung verläuft auch in hängenden Tropfen schlecht, obwohl die Niere, die an die Unterseite des Tropfens sinkt, sich so nahe an gasförmigem Sauerstoff befindet wie es in dem System nach Lauri Saxén et al.: (1962) J Natl Cancer Inst 29: 597–631; (1966) Int J Cancer 1: 271–290; (1968) Adv Morphog 7: 251–293 der Fall wäre.

[0005] Das Verfahren nach Lauri Saxén et al.: (1962) J Natl Cancer Inst 29: 597–631; (1966) Int J Cancer 1: 271–290; (1968) Adv Morphog 7: 251–293 blieb die Standard-Technik für Nieren-Organokultivierungen und ist die allgemein übliche Methode, die in Labor-Handbüchern (zum Beispiel Davies JA (2010) The embryonic kidney: isolation, organ culture, immunostaining and RNA interference. Chapter in Mouse Cell Culture Editor – Ward. A. (Humana Press, ISBN 978-1588297723) gelehrt wird, obwohl die ursprünglichen Milliporenfilter in der Regel mittlerweile durch Track-Etched-Polycarbonatfilter ersetzt werden. Es gilt jedoch, dass einige Medien die Experimente mit Wachstumsfaktoren und Antikörpern teuer gestalten können. Typischerweise werden etwa 3 Milliliter in einer 35 Millimeter Petrischale benötigt.

[0006] Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Arten von Filtern, die das Nierenwachstum am besten fördern, undurchsichtig sind, was die Phasenkontrast-Beobachtungen von lebenden Kulturen erschwert und präzise Mikroinjektionen und andere Manipulationen unmöglich gestaltet. Aus diesem Grund wurden in jüngster Zeit einige Versuche unternommen, um alternative Verfahren zu entwickeln. Die häufigste Verwendung

finden dabei Well-Einsätze, die aus Zylindern bestehen, deren untere Enden mit einem Filter verschlossen sind, und die 6- oder 24-Well-Kulturplatten aufnehmen können. Allerdings erfordern selbst diese Well-Einsätze viele Hunderte von Mikrolitern für die Kultivierung. Unvorteilhafterweise werden bei dieser Methode die Nieren außerhalb der Reichweite am Boden eines engen Rohres platziert. Nachteilig ist des Weiteren, dass, obwohl alle Kultivierungssysteme Ureterknospenverzweigung und die Produktion von Nephronen zeigen, in keinem von ihnen die organotrophe Organisation der Niere in verschiedene kortikale und medulläre Zonen stattfindet.

[0007] Aus der PloS ONE, May 2010, Vol. 5, Issue 5, e10550, Seiten 1 bis 10, ist ein Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahren ausschließlich für embryonale Nieren bekannt, das auf einem Glasplättchen stattfindet, welches in einer Petrischale platziert ist und auf dem ein speziell geformter, nach unten verjüngter Silikonring aufliegt. Auf die durch den aufliegenden Silikonring gebildete kreisförmige Fläche des Glasplättchens wird das Gewebe aufgebracht und das Kulturmedium in einer Menge hinzugegeben, die zur Benetzung der Oberfläche erforderlich ist.

[0008] Die WO 2006/109044 A2 beschreibt Nierenorgankulturen in Multiwellplatten, wobei Fragmente in ein Medium eingetaucht werden. In einem Firmenprospekt der Firma Greiner „Zellkultur-Multiwellplatten 6, 12, 24, 48 Well Format“, sind Multiwellplatten beschrieben, die zur Zellkultur eingesetzt werden können. Aus einem Firmenprospekt der gleichen Firma „384 Well Format“, sind 384-Well-Formate bekannt, die eine konische Geometrie aufweisen. Ziel der konischen Geometrie im unteren Bereich der 384-Well ist die Platzierung von kleinen Volumina in der Weise, dass sie leicht durch Pipettenspitzen oder Pin-Tools erreicht und aufgenommen werden können, ohne dass viel Probenmaterial verloren geht. Dafür sollen sich diese kleinen Volumina innerhalb der konischen Form konzentrieren.

[0009] Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens für die Kultivierung von Organen oder Geweben, das einerseits Kosten sparend realisierbar ist und das andererseits Sichtbarkeit, insbesondere für die Phasenkontrast-Mikroskopie, und zudem eine gegenüber herkömmlichen Methoden optimierte Entwicklung der Organe oder Gewebe gewährleistet.

[0010] Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch ein Verfahren zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen auf einer Multiwellplatte, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- a) Platzieren jeweils eines oder mehrerer Gewebe oder einer oder mehrerer embryonaler Organanlagen an oder nahe der Mitte der kreisförmigen Oberfläche des Wellbodens in einem einzelnen Well;
- b) Zugabe des kompletten Nährmediums in einer Menge, die für die vollständige Benetzung der kreisförmigen Oberfläche des Wellbodens notwendig ist; und
- c) Inkubation der/des Gewebe(s) oder der embryonalen Organanlage(n) und des Nährmediums in kohlendioxidangereicherter feuchter Atmosphäre und einem Temperaturbereich von 35 bis 39 °C.

[0011] Erfindungsgemäß wird somit eine alternative Kultivierungstechnik bereitgestellt, die als Konzeption die Nutzung des durch die Oberflächenspannung erzeugten Drucks enthält und es darüber hinaus ermöglicht, dass Gewebe oder Organe sich auf einem transparenten Substrat in äußerst geringen Mengen des Mediums entwickeln. Überraschenderweise bedarf es für diese Kultivierungstechnik auf Multiwellplatten keiner zusätzlichen Einbauten. Der Reaktionsraum, den ein Well in einer Multiwellplatte bietet, erwies sich als ideal für die Organkultivierung. Die Vorteile der Kultivierung auf Wellplatten bestehen somit in der Vereinfachung der Handhabung, da speziell bei den Vorbereitungen kein zuvor zu reinigender und zusammenzustellender Aufbau mehr nötig ist. Dies führt zu einer Zeit- und Kostenersparnis.

[0012] Des Weiteren befinden sich auf einer Multiwellplatte mehr Vertiefungen, bezogen auf die eingenommene Fläche, als bei der gleichen Anzahl an anderen üblichen Zellkulturträgern, wie zum Beispiel Petrischalen. Die Erfindung stellt ein sehr einfaches Kultivierungsprinzip zur Verfügung, das überraschenderweise für alle gängigen embryonalen Organe/Gewebe anwendbar ist. Daher erlaubt es die vergleichende und parallele Kultivierung von unterschiedlichen Geweben/Organen in einer Multiwellplatte. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet verbesserte Untersuchungsmöglichkeiten im Rahmen eines sogenannten „Organ Arrays“. Generell bietet die Kultivierung in Multiwellplatten die Möglichkeit der Automatisierung, speziell bei großen Ansätzen („Screening“). Die Automatisierbarkeit bezieht sich hier sowohl auf die Kultivierung als auch auf die darauffolgende Auswertung.

[0013] Vorzugsweise erfolgt die Inkubation der/des Gewebe(s) oder der Organanlage(n) und des Nährmediums in feuchter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid bei 37 °C.

[0014] Es können sowohl Multiwellplatten aus Kunststoff als auch aus Glas beziehungsweise Kombinationen aus beiden Materialien verwendet werden. Untergründe, insbesondere Glas und spezielle Kunststoffe, wie sie bei Multiwellplatten Verwendung finden, und die die Anhaftung von Geweben oder Zellen ermöglichen und unterstützen, sind unumgänglich. Bei der Verwendung von Multiwellplatten aus Kunststoff werden bevorzugt Wellplatten aus Polystyren, Polypropylen, Polycarbonat oder Polyethylen eingesetzt.

[0015] In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden die Oberflächen der Multiwellplatten durch Beschichtung oder Oberflächenbehandlung modifiziert. Sie können mit spezifischen Substraten vorbeschichtet werden, insbesondere mit Matrixkomponenten. Das Verfahren ist jedoch sowohl bei Multiwellplatten aus Glas als auch bei Multiwellplatten aus Kunststoff ohne jede weitere Vorbeschichtung erfolgreich durchführbar.

[0016] Für das erfindungsgemäße Verfahren sind Multiwellplatten der Konfigurationsgrößen 6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well oder 384-Well vorgesehen.

[0017] Das Endvolumen des gemessenen kompletten Nährmediums innerhalb eines Wells ist für die einzelnen Multiwellplattenformate unterschiedlich. Das neuartige System der Kultivierung gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht es, dass embryonale Organe/Gewebe direkt auf dem Wellboden in nur wenig Nährmedium kultiviert werden können. Dabei sind im Folgenden die Multiwellplattenformate den Größen der jeweiligen Wellbodenflächen der einzelnen Wells sowie den daraus resultierenden Nährmediumsvolumina mit möglichen tolerierbaren Abweichungen in tabellarischer Form gegenübergestellt:

Multiwellplattenformat	Größe der Wellbodenfläche in cm ²	Nährmediumsvolumen in µl
6 Well	9,6	816 (±200)
12 Well	3,9	331,5 (±70)
24 Well	1,9	161,5 (±40)
48 Well	1,0	85 (±30)
96 Well	0,32	27,2 (±10)
384 Well	0,1	8,5 (±3)

[0018] Dabei konnten auch mehrere Organanlagen in einem Well kultiviert werden, wobei die für die Entwicklung optimale Anzahl an Organanlagen von der Wellgröße abhängt. Bevorzugt ist bei 48-Wellplatten mit einer Wellbodenfläche von je einem Quadratzentimeter die Kultivierung genau einer Organanlage in einem Well. Bei Wellplatten mit größeren Wells, zum Beispiel 6- oder 12-Well-Platten, steigt die Anzahl der Organanlagen, die unter optimalen Entwicklungsbedingungen gleichzeitig in einem Well kultiviert werden können.

[0019] In einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung sind die Welloberflächen mit spezifischen Substraten, wie zum Beispiel Proteinen, vorbeschichtet.

[0020] Als Nährmedium wird vorzugsweise Eagle's Minimal Essentielles Medium (EMEM) mit Earle-Salzen (GIBCO) und nicht-essentiellen Aminosäuren, mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom) und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin; Sigma) verwendet. Das neue Verfahren ermöglicht einen Kultivierungszeitraum von mindestens zehn Tagen. Es ist jedoch auch möglich, jeweils andere geeignete Nährmedien für die unterschiedlichen Gewebe beziehungsweise Organe zu verwenden.

[0021] Es zeigt sich, dass die erfindungsgemäße Entwicklungsmethode von Organen, insbesondere Nieren, den herkömmlichen Methoden überlegen ist. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können embryonale Organe, insbesondere Maus-Nieren, für mehrere Tage mit einer geringen Menge eines Nährmediums ex vivo auf Multiwellplatten kultiviert werden. Bei der Kultivierung in geringen Mengen von Nährmedium entwickeln sich die Organanlagen überraschenderweise gut in den Wells. Bei den Nieren wird das besonders deutlich, wenn die üblichen Kennzahlen, wie Gesamtfläche, Nephronenzahl und Verzweigungsgrad der Ureterknospe, mit den Ergebnissen von Standard-Methoden aus dem Stand der Technik verglichen werden. Zusätzlich zeigen die Nieren, ebenfalls überraschenderweise, eine korrekte kortikal-medulläre Zonierung.

[0022] Weitere Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens bestehen, wie bereits erwähnt, unter anderem in der Sichtbarkeit. So ist bei Verwendung von Multiwell-Platten aus Glas die Beobachtung bei hellem Licht und Zeitraffer-Fotografie (allgemein Mikroskopie) in hoher Auflösung ohne jegliche Interferenz mit dem Kultur-

Oberflächenmaterial möglich. Daher sind Multiwellplatten mit Glasboden bezüglich der Auswertung der Kultivierungen vorteilhaft.

[0023] Des Weiteren ermöglicht das Verfahren, wie bereits erwähnt, eine Reduzierung der Menge an Nährmedium. Das ist besonders wichtig in Fällen, bei denen zum Beispiel teure Zusatzmittel verwendet werden müssen. Außerdem sind nun auch längere Kultivierungszeiträume möglich, mindestens zehn Tage. Schließlich bestehen die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens in einer einfachen Handhabung und geringen Kosten. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, das auf Multiwellplatten stattfindet, kann eine Vielzahl von Geweben und Organen gleichzeitig und platzsparend kultiviert werden.

[0024] Die neue erfindungsgemäße Technik bietet somit erhebliche Vorteile wirtschaftlicher Natur und bezüglich der Realisierbarkeit der Entwicklung gegenüber herkömmlichen Methoden.

[0025] Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen mit Bezugnahme auf die zugehörigen Zeichnungen. Es zeigen:

[0026] Fig. 1: experimentelle Vorrichtungen für eine Großvolumen-Kultivierung, Stand der Technik; darin enthalten:

[0027] Fig. 1a: eine Großvolumen-Kultivierung auf einer Membran eines Trowell-Gitters, Stand der Technik;

[0028] Fig. 1b: eine Großvolumen-Kultivierung auf einer Membran an der Unterseite eines Well-Einsatzes, Stand der Technik;

[0029] Fig. 2: eine vereinfachte Darstellung eines Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahrens in einem Well einer Multiwellplatte in der Seitenansicht;

[0030] Fig. 3: eine weitere vereinfachte Darstellung eines Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahrens in einem Well einer Multiwellplatte in der Seitenansicht mit Druckpfeilen und Pfeilen für die Hauptrichtung der Versorgung mit dem Nährmedium;

[0031] Fig. 4: eine detaillierte schematische Darstellung der Richtungen der Versorgung mit dem Nährmedium und von wirkenden Kräften bei der Niedrigvolumen-Kultivierung;

[0032] Fig. 5a: Ergebnisse der Hellfeldmikroskopie zur Entwicklung von Maus-Nierenanlagen;

[0033] Fig. 5b: mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen zur Entwicklung von Maus-Nierenanlagen;

[0034] Fig. 5c: eine grafische Darstellung der Abhängigkeit der Gesamtoberfläche des Organs, der Zahl der Nephronen darin und der Zahl der Ureterverzweigungen vom Volumen des Nährmediums;

[0035] Fig. 6A: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme einer auf einer Multiwellplatte kultivierten Nierenanlage;

[0036] Fig. 6B: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von auf einer Multiwellplatte kultivierten Lungenanlagen;

[0037] Fig. 6C: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme einer auf einer Multiwellplatte kultivierten Leber;

[0038] Fig. 6D: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme eines auf einer Multiwellplatte kultivierten Darms;

[0039] Fig. 6E: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme eines auf einer Multiwellplatte kultivierten Herzens;

[0040] Fig. 6F: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von auf einer Multiwellplatte kultivierten Schilddrüsen;

[0041] Fig. 6G: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von einer auf einer Multiwellplatte kultivierten Vorderhirnhälftenanlage;

[0042] Fig. 6H: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von auf einer Multiwellplatte kultivierten Hodenanlagen;

[0043] Fig. 6I: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von einer auf einer Multiwellplatte kultivierten Magenanlage;

[0044] Fig. 6J: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von auf einer Multiwellplatte kultivierten Nasenanlagen;

[0045] Fig. 6K: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von auf einer Multiwellplatte kultivierten Augenanlagen und

[0046] Fig. 6L: eine mikroskopische Hellfeldaufnahme von auf einer Multiwellplatte kultivierten Fußanlagen.

[0047] Die Fig. 1 zeigt zwei verschiedene experimentelle Vorrichtungen a und b für Großvolumen-Kultivierungsverfahren nach dem Stand der Technik, die in Zellkulturschalen stattfinden, welche mit einem Nährmedium gefüllt sind, in Fig. 1 dargestellt als gepunktete Flächen innerhalb der Zellkulturschalen. Dabei weist die Vorrichtung a ein mittig innerhalb der Zellkulturschale positioniertes Trowell-Gitter auf, an dessen Oberseite sich eine Membran befindet, auf der wiederum embryonale Organanlagen platziert sind. Die Vorrichtung b weist dagegen eine entsprechende Membran für die embryonalen Organanlagen an der Unterseite eines Well-Einsatzes innerhalb der Zellkulturschale auf. Die Organanlagen sind in Fig. 1 in den Vorrichtungen a und b jeweils als kleine Kreise dargestellt.

[0048] Das Kultivierungsverfahren nach dem Stand der Technik wurde folgendermaßen durchgeführt: Metanephrische Anlagen und Lungenanlagen wurden aus Embryonen von NMRI- oder CD-Mäusen am Tag E 11.5 isoliert. Der Morgen des Erscheinens des Vaginalpropfs wurde genommen, um E 0.5 (halber Tag) zu erfüllen. Nieren wurden gesammelt, um sie nach dem Zufallsprinzip zu kontrollieren oder experimentellen Gruppen zuzuordnen. Für eine konventionelle Kultivierung wurden die Organanlagen auf einem Polycarbonat-Filter mit Drei-Mikrometer-Porenweite an der Unterseite eines Well-Einsatzes in einer Sechs-Well-Platte von Corning® und Costar® platziert. Die Ebene des Nährmediums wurde so eingestellt, dass die Oberseite des Filters und damit der Niere gerade benetzt, aber nicht tief in das Nährmedium getaucht war. Als Nährmedium wurden EMEM (Eagle's Minimal Essentielles Medium) mit Earle-Salzen (GIBCO) und nicht-essentielle Aminosäuren mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom) und mit 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin; Sigma) verwendet.

[0049] Die Fig. 2 zeigt einen Querschnitt einer Multiwellplatte 1, genauer gesagt eines Wells 2 zur Durchführung eines Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahrens in der Seitenansicht. Für die Niedrigvolumen-Kultivierung wurde jeweils ein Well einer 48-Well-Platte der Firma Greiner Bio-One GmbH aus Kunststoff mit einer ringförmigen Wellwandung 3 verwendet (Greiner-Well). Die ringförmige Wellwandung 3 ist senkrecht auf den Wellboden 4 der 48-Well-Platte aufgesetzt. Das untere Ende der Wellwandung 3 schließt auf dem Wellboden 4 somit eine kreisförmige Fläche 5 ein.

[0050] An oder in der Nähe der Mitte der kreisförmigen Fläche 5 wurden die jeweils zu kultivierenden Organanlagen 6 platziert. Das bei diesem Pipettierschritt übertragene Medium wurde entfernt und durch das Endvolumen (70 bis 200 µl) des gemessenen kompletten Nährmediums 7 ersetzt, wobei sichergestellt werden musste, dass die vollständige eingeschlossene kreisförmige Fläche 5 des Wellbodens 4 benetzt war. Alle Kultivierungen wurden in feuchter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid bei 37 °C inkubiert. Das Nährmedium 7 wurde aller zwei Tage ausgewechselt.

[0051] E11.5-Nierenanlagen 6 wurden, wie bereits beschrieben, ungefähr an der Mitte der kreisförmigen Fläche 5 des Wellbodens 4 einer 48-Well-Platte in definierten Volumina des Nährmediums 7 kultiviert, nämlich in 85 µl. Volumina von weniger als 70 µl erwiesen sich als unzureichend, um die ganze kreisförmige Fläche 5 zu benetzen. Die Volumina an Nährmedium 7 wurden demnach so ausgewählt, dass das Nährmedium 7 den Wellboden 4 ausreichend benetzten und das jeweilige Organ 6 einem Druck durch die Oberflächenspannung aussetzten, wie es in Fig. 3 durch die nach unten gerichteten Druckpfeile 8 dargestellt ist. Die Pfeile 9 zeigen die Hauptrichtung der Versorgung mit dem Nährmedium 7 an.

[0052] Die Fig. 4 zeigt eine detaillierte schematische Darstellung der Richtungen der Versorgung mit dem Nährmedium 7 und von wirkenden Kräften bei der Niedrigvolumen-Kultivierung. Dabei zeigen, wie bereits erwähnt, die Pfeile 9 die Hauptrichtung der Versorgung mit dem Nährmedium 7 an, während der Druckpfeil 8 die auf die Organanlage 6 wirkende Haupt-Oberflächenspannungskraft skizziert, die senkrecht nach unten wirkt. Der Pfeil 10 stellt jeweils die Hauptausbreitungsrichtung/-kraft des wachsenden Organs dar, die sich beidseitig waagrecht ausbreitet.

[0053] Die Fig. 5a und die Fig. 5b zeigen die Entwicklung von Nierenanlagen, die einerseits durch konventionelle Verfahren und andererseits durch Niedrigvolumenverfahren durchgeführt wurden, wobei die Auswertung durch Phasenkontrast-Mikroskopie, durch Immunfärbung und durch Messung der Gesamtoberfläche, der Anzahl der gebildeten Ureterknospenzweigenden und der Anzahl der gebildeten Nephronen erfolgte. Die Fotos des Niedrigvolumenverfahrens entstammen Aufnahmen aus einem Niedrigvolumenverfahren in einer speziellen Niedrigvolumenvorrichtung, in der ein Silikonring innerhalb einer Zellkulturschale auf einem Glasdeckplättchen unter Ausbildung einer kreisförmigen Bodenfläche für die Kultivierung aufgesetzt ist. Die Fig. 5a, Fig. 5b und Fig. 5c dienen lediglich dazu, allgemein die Vorteile eines Niedrigvolumenverfahrens gegenüber konventionellen Verfahren herauszustellen. Für das erfindungsgemäße Niedrigvolumenverfahren sind im Gegensatz zu dem gemäß den Fig. 5a und Fig. 5b durchgeführten Niedrigvolumenverfahren jedoch keine speziellen Einsätze erforderlich. Überraschenderweise verläuft das erfindungsgemäße Niedrigvolumenverfahren auch für andere embryonale Organanlagen außer den Nierenanlagen erfolgreich.

[0054] Die Nieren hatten zunächst zwei Ureterknospenzweigenden und keine Nephronen, wie für E11.5 erwartet. Die Ergebnisse sind in Fig. 5a dargestellt, welche mikroskopische Hellfeldaufnahmen von für 96 Stunden lang kultivierten embryonalen Mausnieren mit Hilfe des Niedrigvolumen-Kultivierungssystems A bei 85 μl , des Kultivierungssystems B bei 120 μl und des Kultivierungssystems C bei 200 μl Nährmediumsvolumen zeigt. In einem weiteren Kultivierungssystem D wird eine unter bisher nach dem Stand der Technik üblichen Bedingungen auf Filtermaterial kultivierte embryonale Niere als Vergleichsniere zur Kontrolle gezeigt.

[0055] Die Fig. 5b beschreibt mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von den selbigen, für 96 Stunden kultivierten embryonalen Mausnieren mit Hilfe des Niedrigvolumen-Kultivierungssystems A' bei 85 μl , des Kultivierungssystems B' bei 120 μl und des Kultivierungssystems C' bei 200 μl Nährmediumsvolumen. Beim Kultivierungssystem D' wird eine unter bisher üblichen Bedingungen in einer konventionellen Nieren-Organkultur auf Filtermaterial über 96 Stunden lang kultivierte embryonale Niere als Vergleichsniere zur Kontrolle gezeigt. In der Fig. 5b sind helle Strukturen, die verzweigte Ureterknospen darstellen, über eine Antikörperfärbung von dem Markerprotein Calbindin sichtbar gemacht. Dunklere kugelförmige Strukturen, die wiederum sich entwickelnde Nephronen illustrieren, werden durch eine Antikörperfärbung des Markerproteins Laminin (Laminin 1) visualisiert. Die Fig. 5b, Abb. A' bis D', zeigt den Ureterknospen-Marker 11, Calbindin-D28K, und den Marker 12, Laminin, als Marker sowohl für die Nephronen als auch die Ureterknospen.

[0056] Vergleichsnieren, die durch eine konventionelle Methode nach Trowell kultiviert wurden, siehe Fig. 5a, Abb. D, und Fig. 5b, Abb. D', entwickelten sich normal, indem sie calbindinpositive verzweigte Ureterknospen (Mittelwert = 23.4, Standardabweichung vom Mittelwert = 16, bei Minimum an Nieren = 43) entwickeln und viele frühe, sich entwickelnde Nephronen (Mittelwert = 20.2, Standardabweichung vom Mittelwert = 16, bei Minimum an Nieren = 43), die nach ihrer Form und durch ihre lamininreichen Basalmembranen und das Fehlen einer Calbindin-Färbung identifizierbar waren, zeigen. Nieren, die in einer Niedrigvolumenvorrichtung innerhalb von Silikonringen in großen Mengen Nährmedium, zum Beispiel in 200 μl , auf Glas gebildet wurden, siehe Fig. 5a, Abb. C, und Fig. 5b, Abb. C', blieben abgerundet und schlecht entwickelt und zeigen weniger als die Hälfte der Ureterknospen-Verzweigung und Nephrogenese der Vergleichsnieren, die über konventionellen Trowell-Filtern gewachsen sind. Mit geringeren Mengen des Mediums, siehe Fig. 5a, Abb. A, Fig. 5b, Abb. A', Fig. 5a, Abb. B, und Fig. 5b, Abb. B', verbesserte sich jedoch die Entwicklung. Das zeigt ein Vergleich in Form eines Diagramms in Fig. 5c, das die Abhängigkeit der Gesamtoberfläche des Organs, die Zahl der Nephronen darin und die Zahl der Ureterverzweigungen vom Volumen des Nährmediums darstellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert und repräsentieren ein Minimum von 49 Nieren; jeder Zeitpunkt unterscheidet sich signifikant ($p < 0,01$) von allen anderen.

[0057] Beim optimalen Volumen von 85 μl bedecken Nierenanlagen deutlich mehr Gesamtoberfläche, nämlich 42 % mehr als die der Vergleichsnieren, wobei sie 46 % mehr Ureterknospenenden und 81 % mehr Nephronen produzieren. Die Variabilität zwischen den Nieren wurde ebenfalls reduziert. Die normalisierten Standardabweichungen bei den Messungen der Gesamtoberfläche, der Zweiganzahl und der Anzahl der Nephronen betragen etwa vier Fünftel von den jeweiligen Werten für die Vergleichsnieren.

[0058] Die Zugabe von 500 μl Nährmedium zu den Nierenanlagen, die bereits für einen Tag in 85 μl kultiviert wurden, hat zur Folge, dass die Nieren abrunden und sich nicht mehr gut entwickeln. Die Auswirkungen des niedrigen Nährmediums, ob zurückzuführen auf den Druck der Oberflächenspannung oder andere Einflüsse, sind demzufolge kontinuierlich erforderlich und nicht nur dazu geeignet, zu Beginn der Kultivierung die Niere an der Bodenoberfläche (Glas) zu befestigen.

[0059] Das erfindungsgemäße Verfahren wird auf Multiwellplatten durchgeführt und ermöglicht eine Niedrigvolumenkultivierung verschiedener Organanlagen.

[0060] Die Fig. 6A zeigt eine mikroskopische Hellfeldaufnahme einer Mausnierenanlage, die in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 120 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurde. Die Niere gemäß Fig. 6A wurde auf einer 48-Wellplatte der Firma NUNC GmbH & Co.KG mit einer Bodenfläche von 1 cm² pro Well bei 85µl Nährmedium für fünf Tage kultiviert. Das Material der 48-Wellplatte war Polystyren.

[0061] Die Niere und alle im Folgenden beschriebenen Organe, die in den Fig. 6B bis Fig. 6L gezeigt sind, wurden am Tag 11,5 der Schwangerschaft aus dem Embryo isoliert. Die in den Fig. 6B bis Fig. 6L abgebildeten Organe wurden auf Kunststoff-Multiwellplatten der Firma Greiner Bio-One GmbH kultiviert.

[0062] Die Fig. 6B zeigt eine Lunge, die aus Mauslungenanlagen in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurde.

[0063] Die Fig. 6C zeigt eine Leber, die aus embryonalen Mausleberanlagen in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurde.

[0064] Die Fig. 6D zeigt einen Darm, der aus embryonalen Maudarmanlagen in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurde.

[0065] Die Fig. 6E zeigt ein Herz, das aus embryonalen Mausherzanlagen in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurde.

[0066] Die Fig. 6F zeigt Schilddrüsen, die aus den embryonalen Schilddrüsenanlagen von Mäusen in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurden.

[0067] Die Fig. 6G zeigt eine Vorderhirnhälfte, die aus entsprechenden embryonalen Anlagen von Mäusen in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurde.

[0068] Die Fig. 6H zeigt Hodenanlagen einer männlichen Maus, die in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurden.

[0069] Die Fig. 6I zeigt einen Magen, der aus embryonalen Mausmagenanlagen in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurde.

[0070] Die Fig. 6J zeigt Nasenanlagen einer Maus, die in einem Well einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurden.

[0071] Die Fig. 6K zeigt Augenanlagen einer Maus, die in einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium für 48 Stunden lang bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurden.

[0072] Die Fig. 6L zeigt Fußanlagen einer Maus, nach dem sie für 48 Stunden lang in einer 48-Wellplatte bei 85 µl Nährmedium bei 37 °C in einer mit 5 % Kohlendioxid angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert wurden.

Bezugszeichenliste

- 1 Multiwellplatte
- 2 einzelnes Well
- 3 Wellwandung
- 4 Wellboden
- 5 kreisförmige Fläche, Wellbodenfläche
- 6 Organanlage, Nierenanlage, Niere, Organ
- 7 Nährmedium
- 8 Druckpfeile
- 9 Pfeil (für die Hauptrichtung der Nährmediumversorgung)
- 10 Pfeil (für die Hauptausbreitungsrichtung/-kraft)
- 11 Ureterknospen-Marker
- 12 (Laminin-)Marker

Patentansprüche

1. Verfahren zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen, ausgenommen Organanlagen aus menschlichen Embryonen, auf einer Multiwellplatte (1), umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- a) Platzieren jeweils eines oder mehrerer Gewebe oder einer oder mehrerer embryonaler Organanlagen (6) an oder nahe der Mitte der kreisförmigen Oberfläche des Wellbodens (4) in einem einzelnen Well (2);
- b) Zugabe des kompletten Nährmediums (7) in einer Menge, die für die vollständige Benetzung der kreisförmigen Oberfläche des Wellbodens (4) notwendig ist; und
- c) Inkubation der/des Gewebe(s) oder der embryonalen Organanlage(n) (6) und des Nährmediums (7) in kohlendioxidangereicherter feuchter Atmosphäre und einem Temperaturbereich von 35 bis 39 °C, **dadurch gekennzeichnet**, dass Multiwellplatten (1) der Konfigurationsgrößen 6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well oder 384-Well eingesetzt werden und für die Wells (2) der unterschiedlichen Wellplattenformate mit den entsprechenden Wellbodenflächen (5) folgende Volumina/Volumenbereiche an Nährmedium (7) vorgesehen sind:

Multiwellplattenformat	Größe der Wellbodenfläche (5) in cm ²	Nährmediumsvolumen in µl
6 Well	9,6	816 (±200)
12 Well	3,9	331,5 (±70)
24 Well	1,9	161,5 (±40)
48 Well	1,0	85 (±30)
96 Well	0,32	27,2 (±10)
384 Well	0,1	8,5 (±3).

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Inkubation der/des Gewebe(s) oder der Organanlage(n) (6) und des Nährmediums (7) in feuchter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid bei 37 °C erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Multiwellplatte (1) aus Kunststoff und/oder Glas besteht.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Kunststoff für die Multiwellplatte (1) Polystyren, Polypropylen, Polycarbonat oder Polyethylen ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Oberflächen der Multiwellplatten (1) modifiziert sind.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Nährmedium (7) Eagle's Minimal Essentielles Medium (EMEM) mit Earle-Salzen und nicht-essentiellen Aminosäuren, mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Kultivierungszeitraum mindestens zehn Tage beträgt.

Es folgen 19 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Stand der Technik

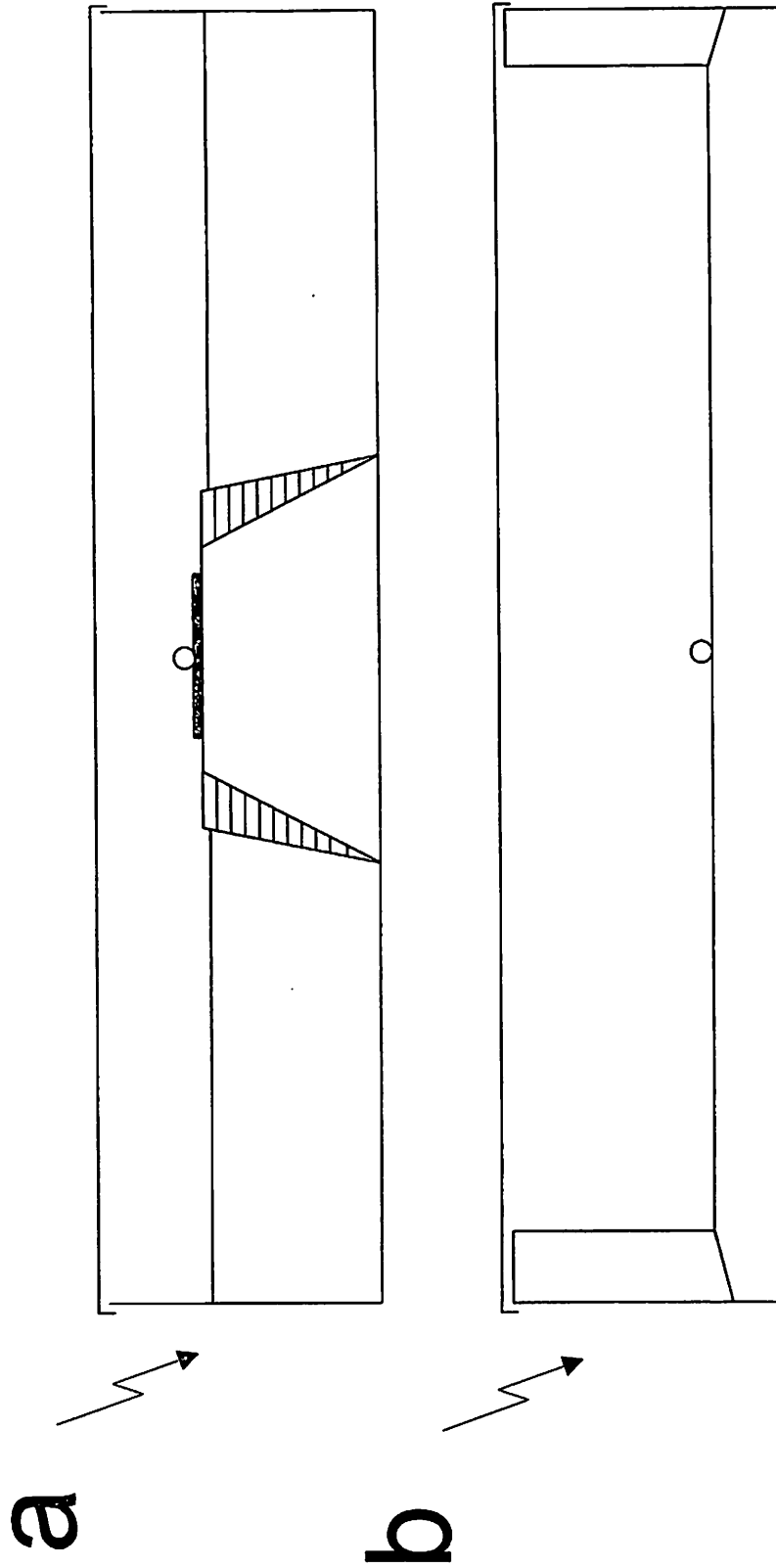


Fig. 1

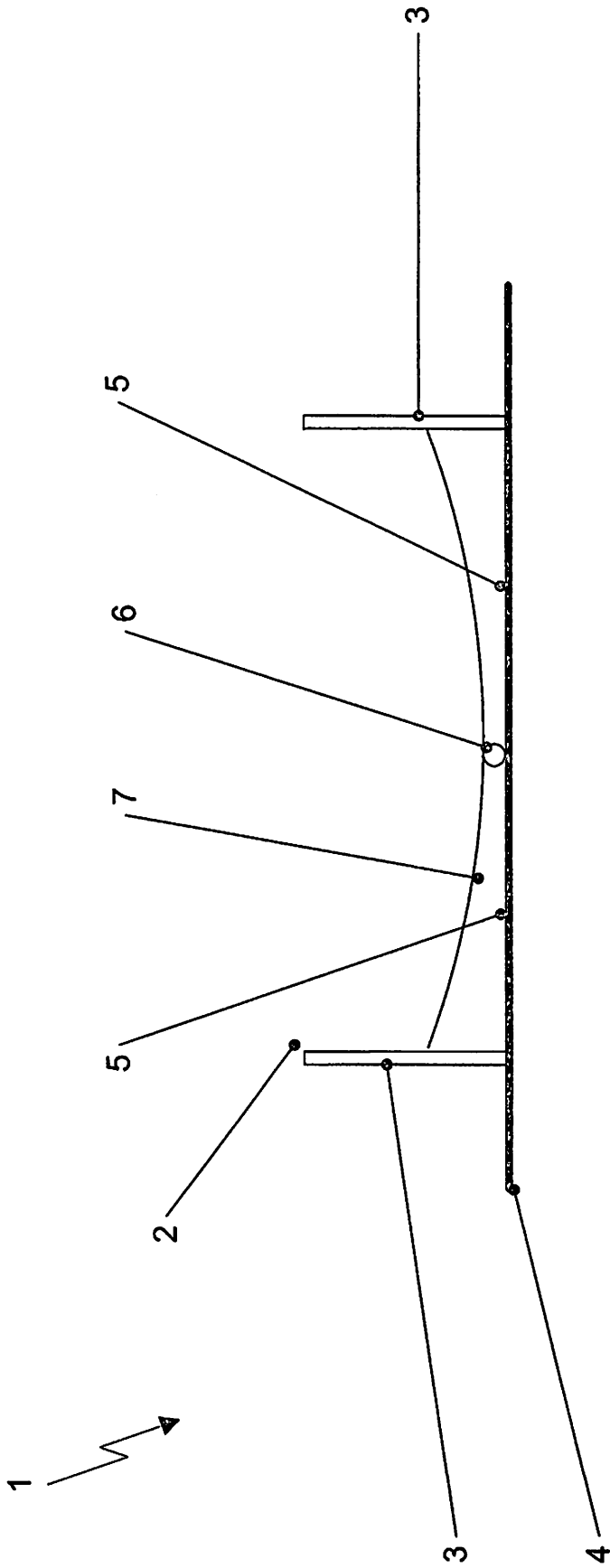


Fig. 2

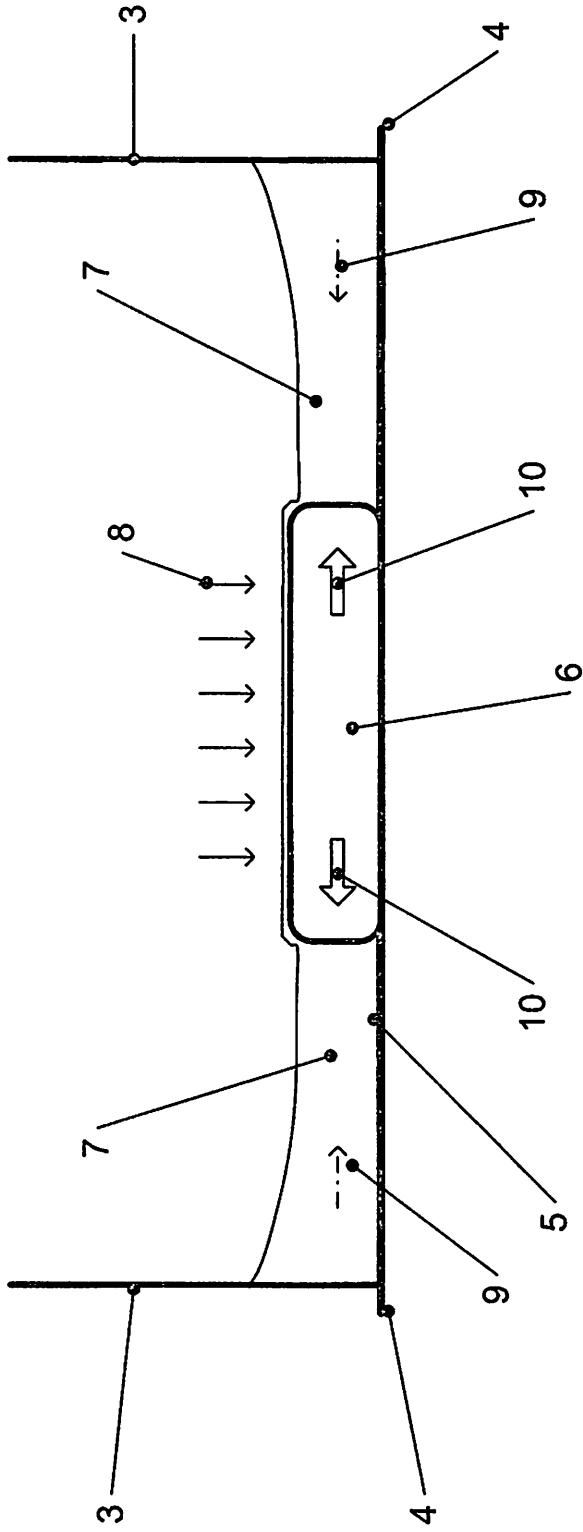


Fig. 4

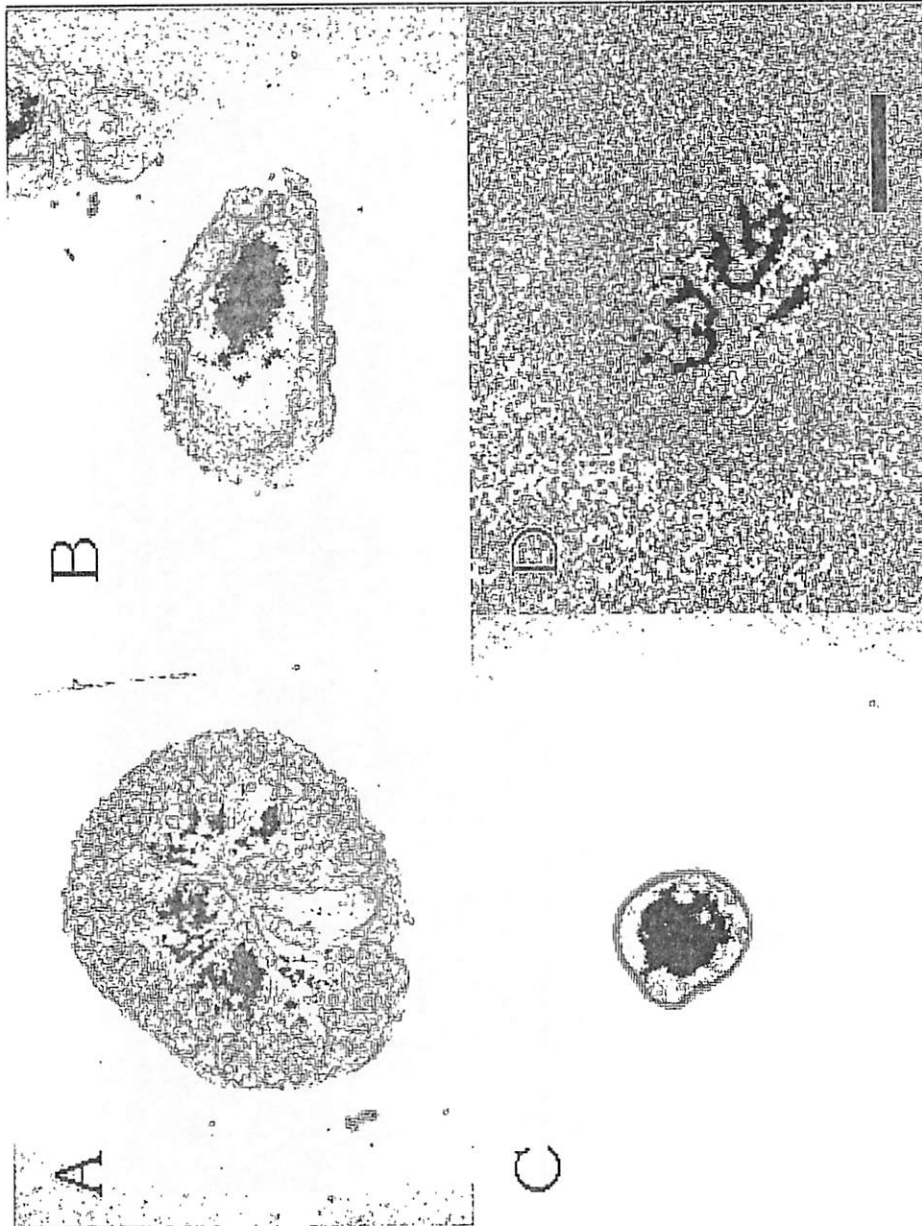


Fig. 5a

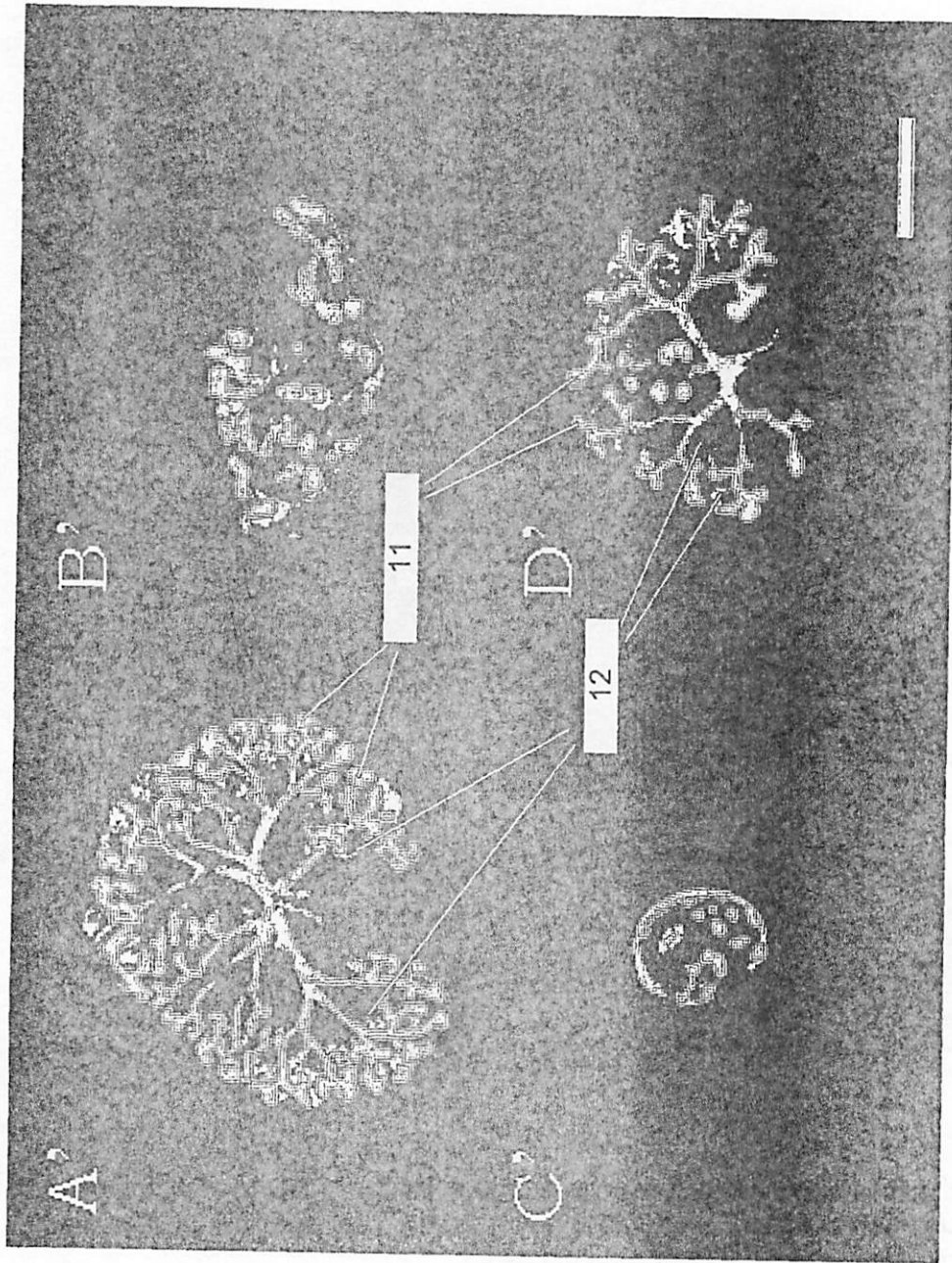


Fig. 5b

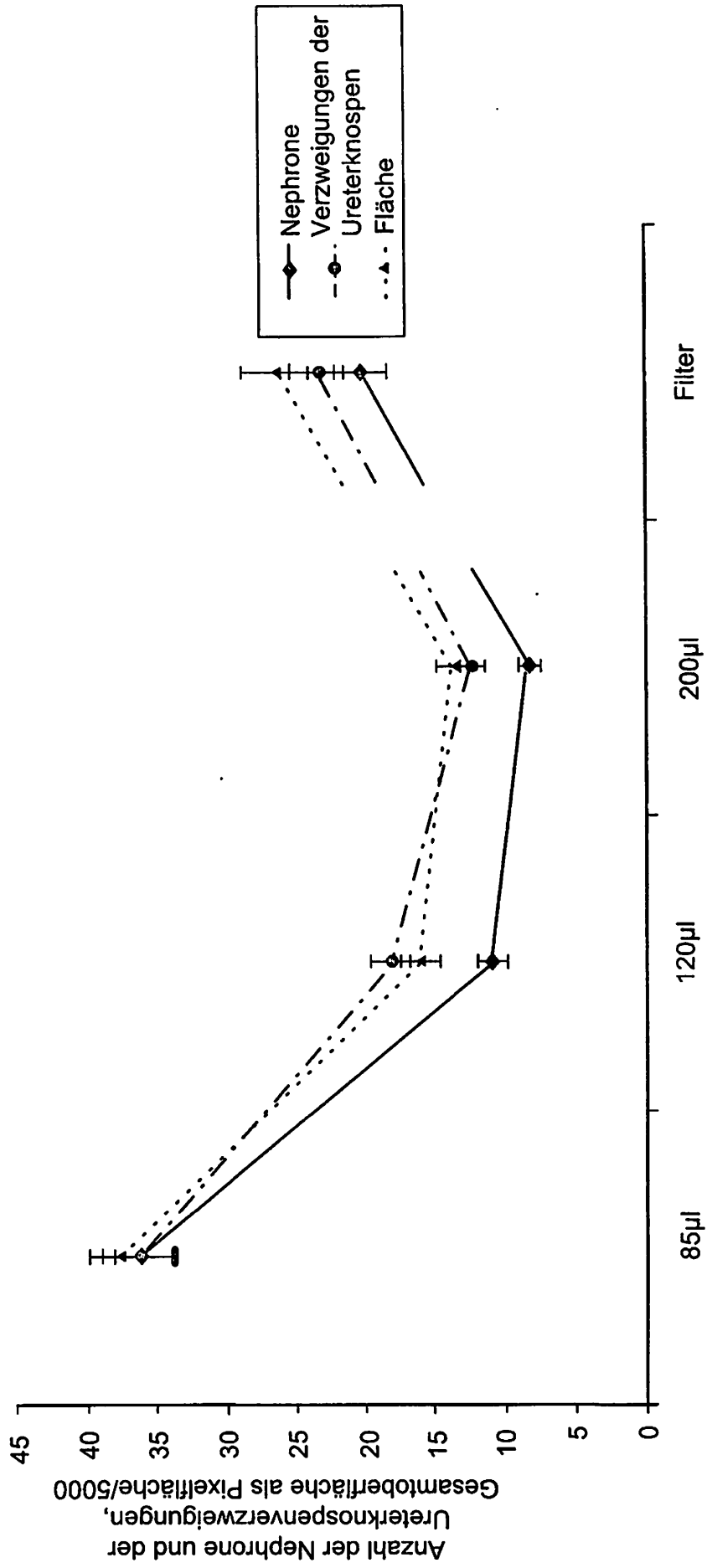


Fig. 5c

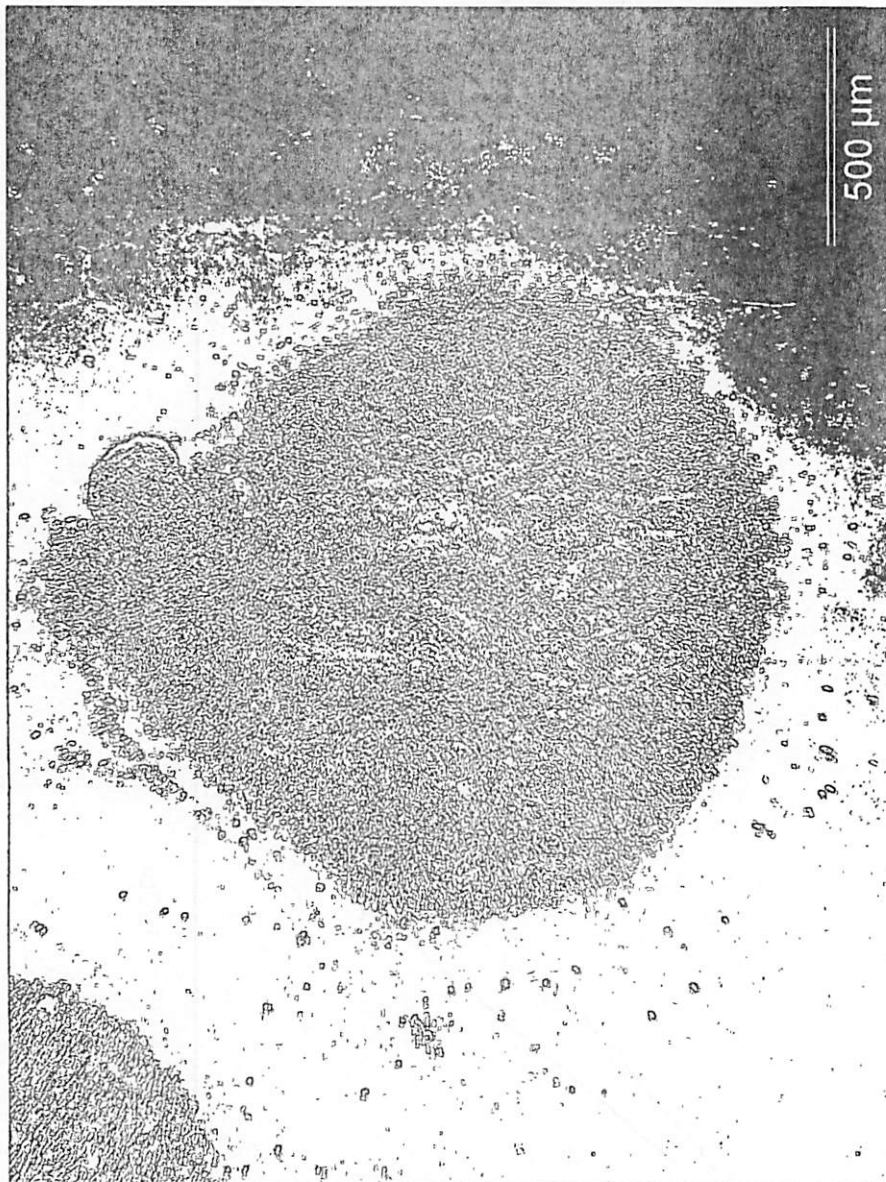


Fig. 6A

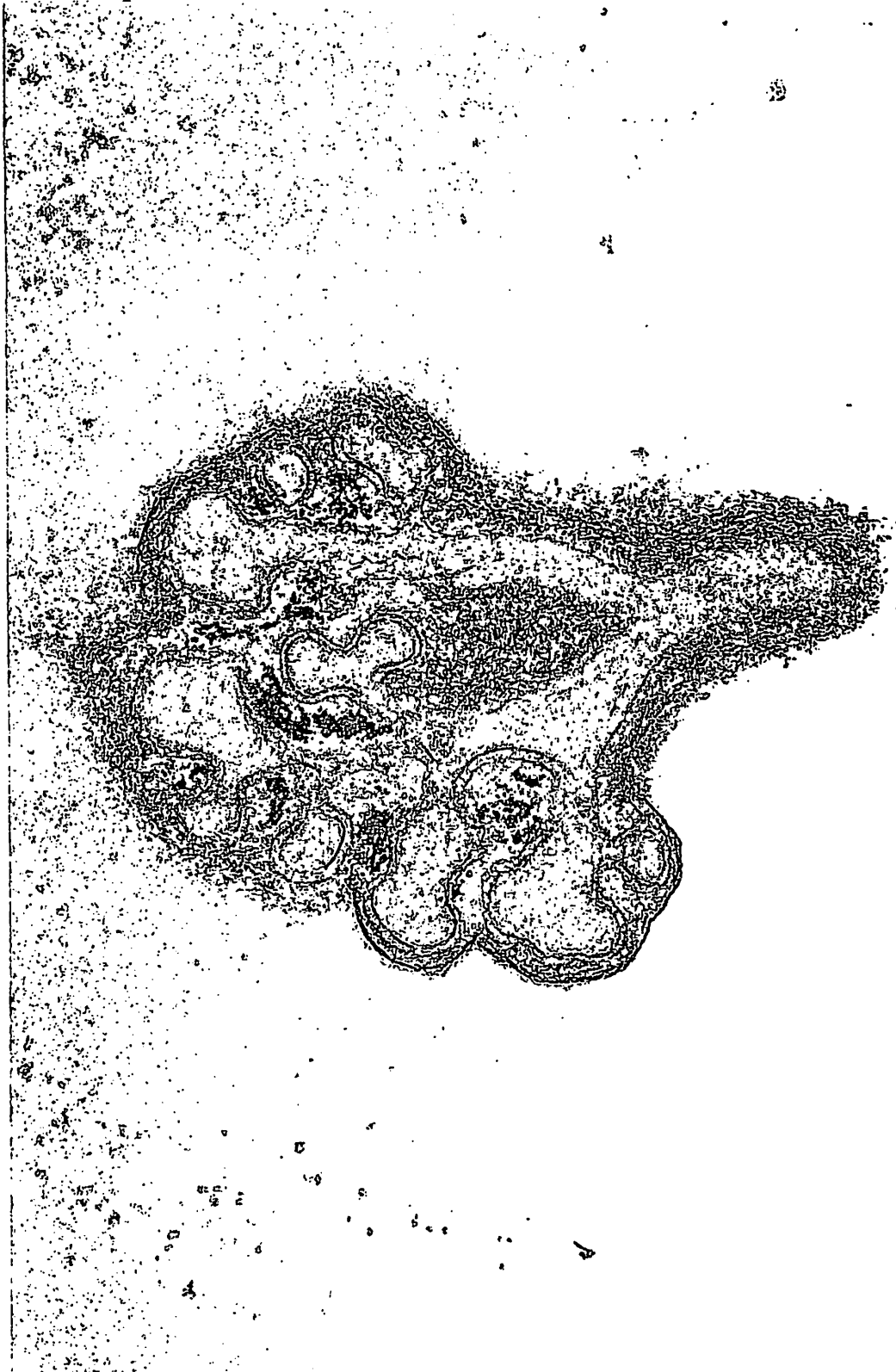


Fig. 6B

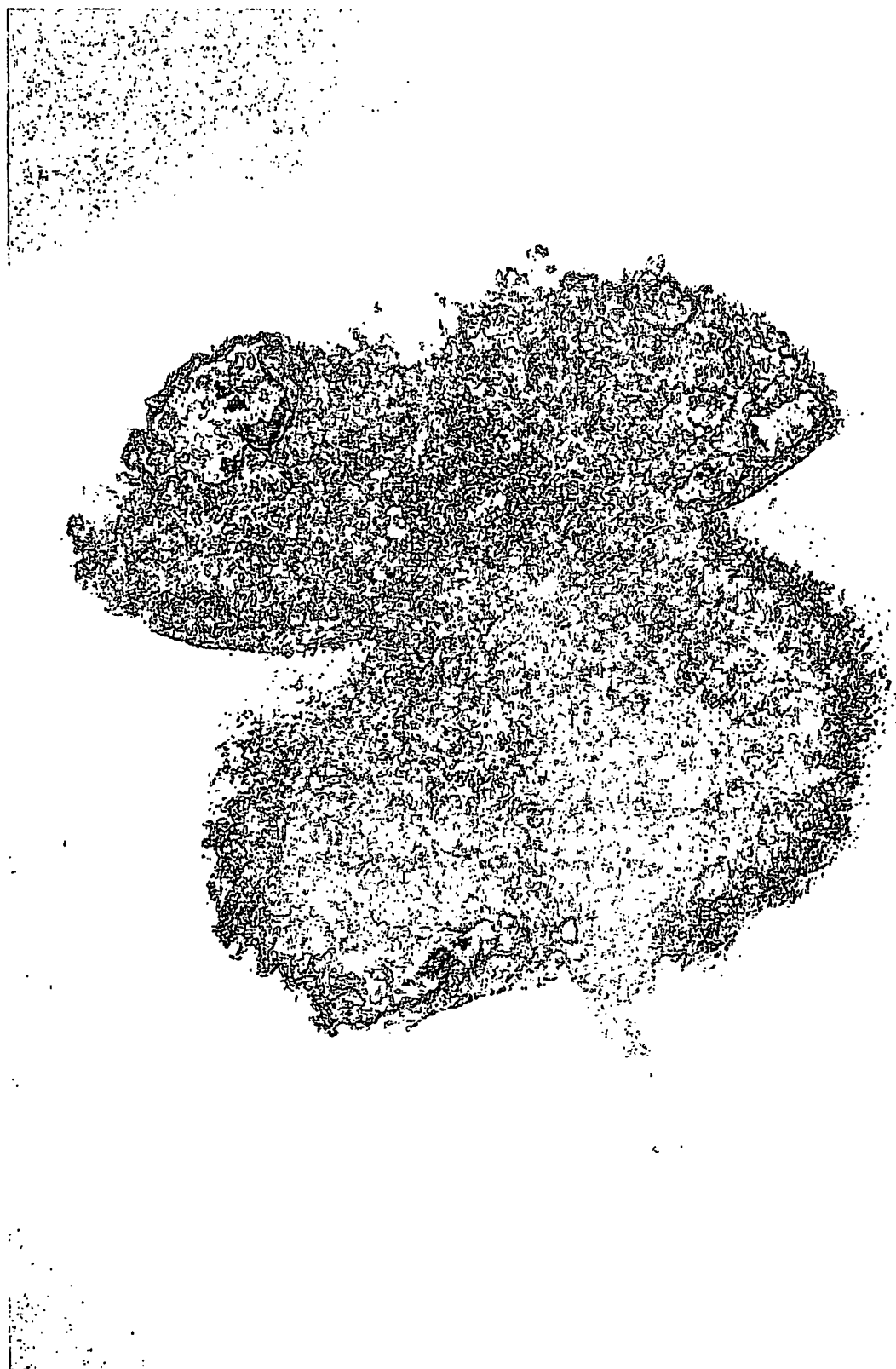


Fig. 6C

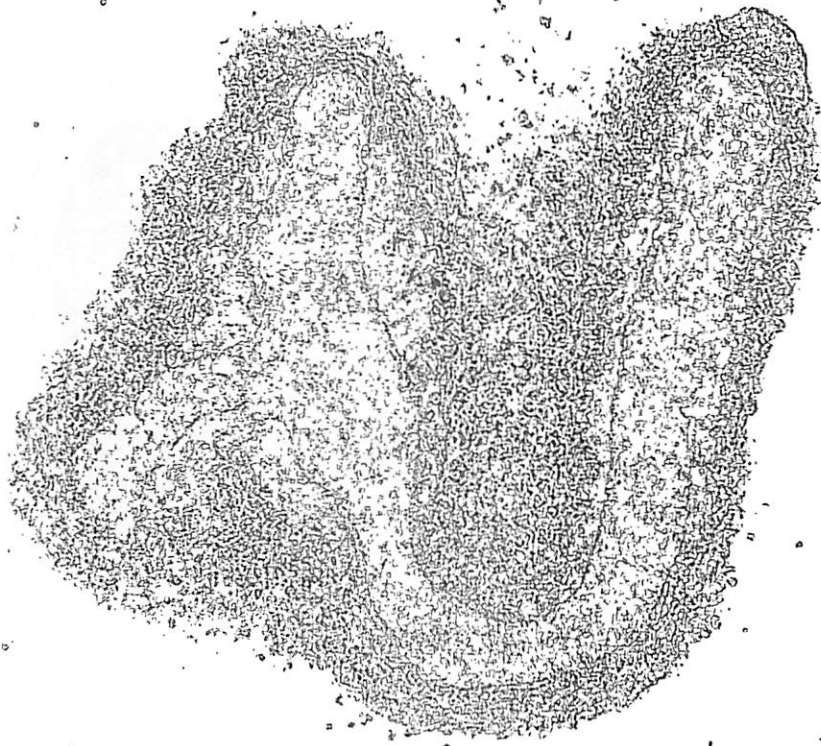


Fig. 6D

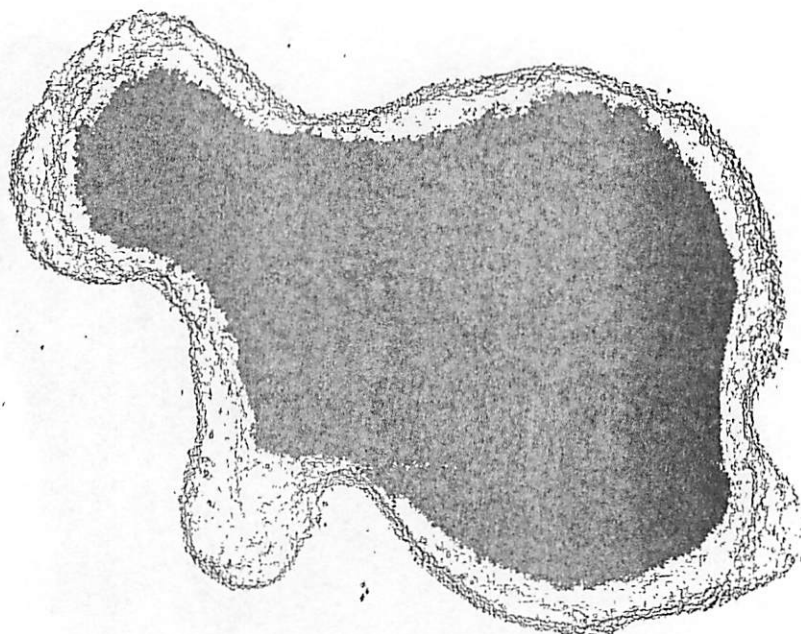


Fig. 6E



Fig. 6F



Fig. 6G

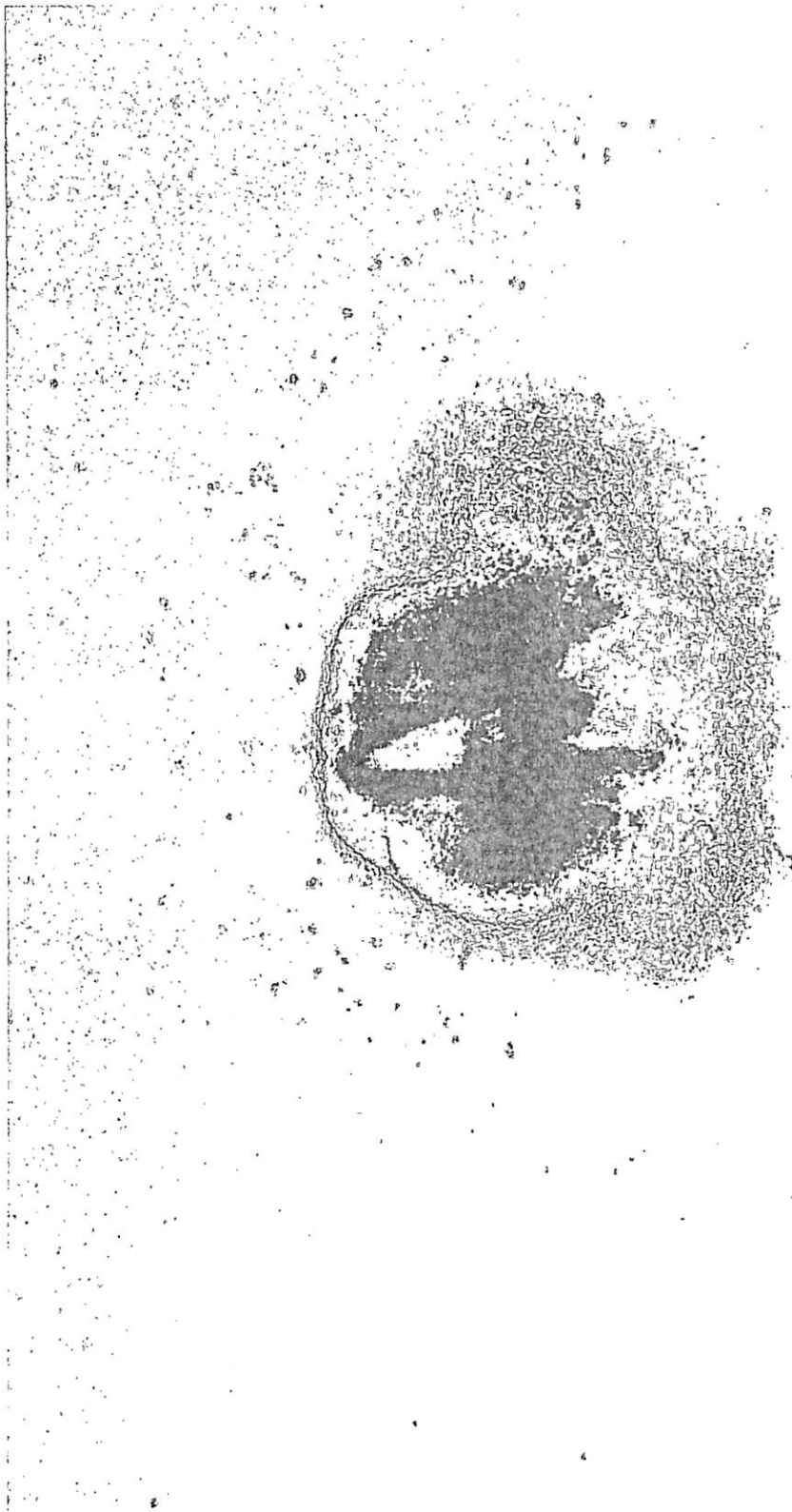


Fig. 6H



Fig. 6 I

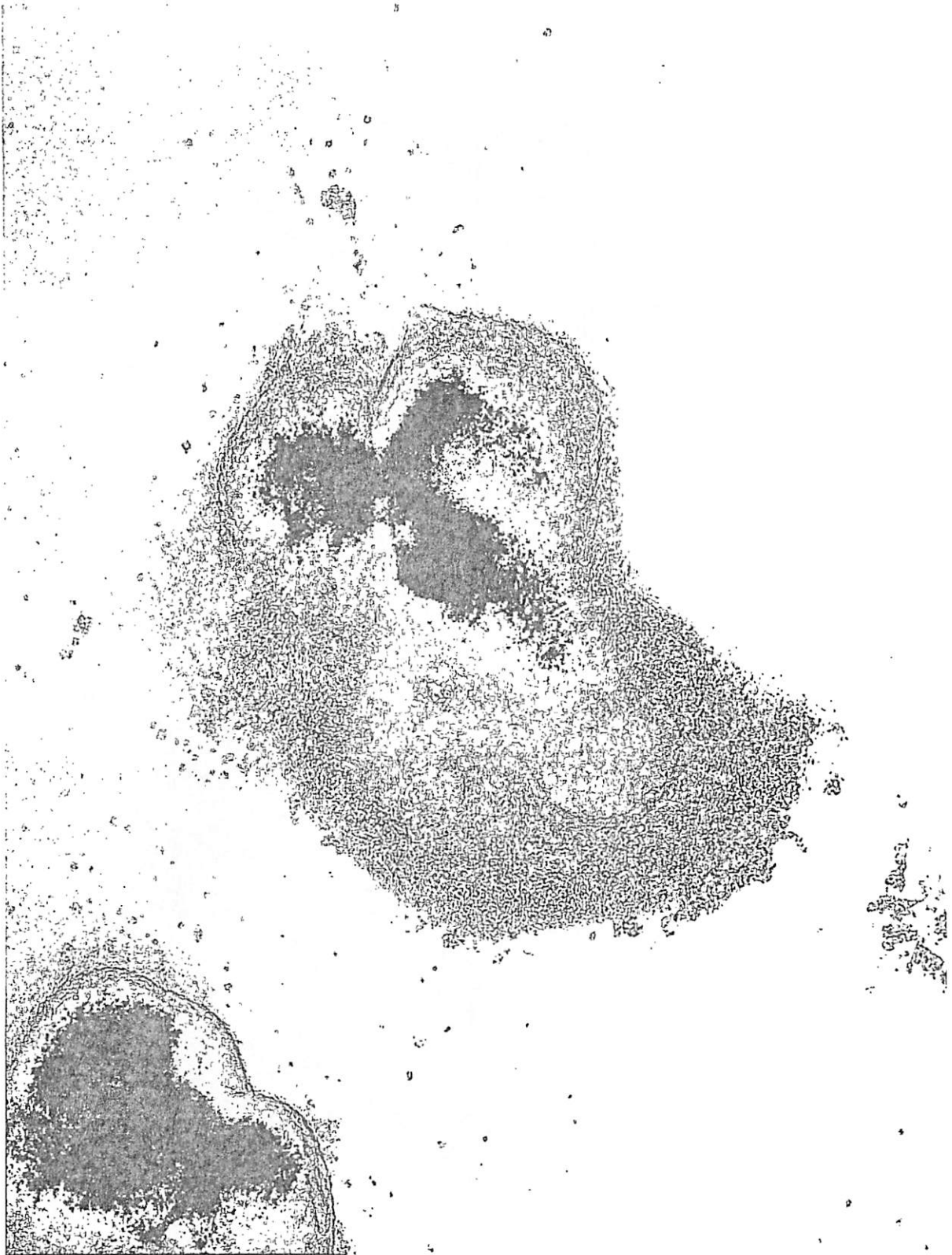


Fig. 6 J

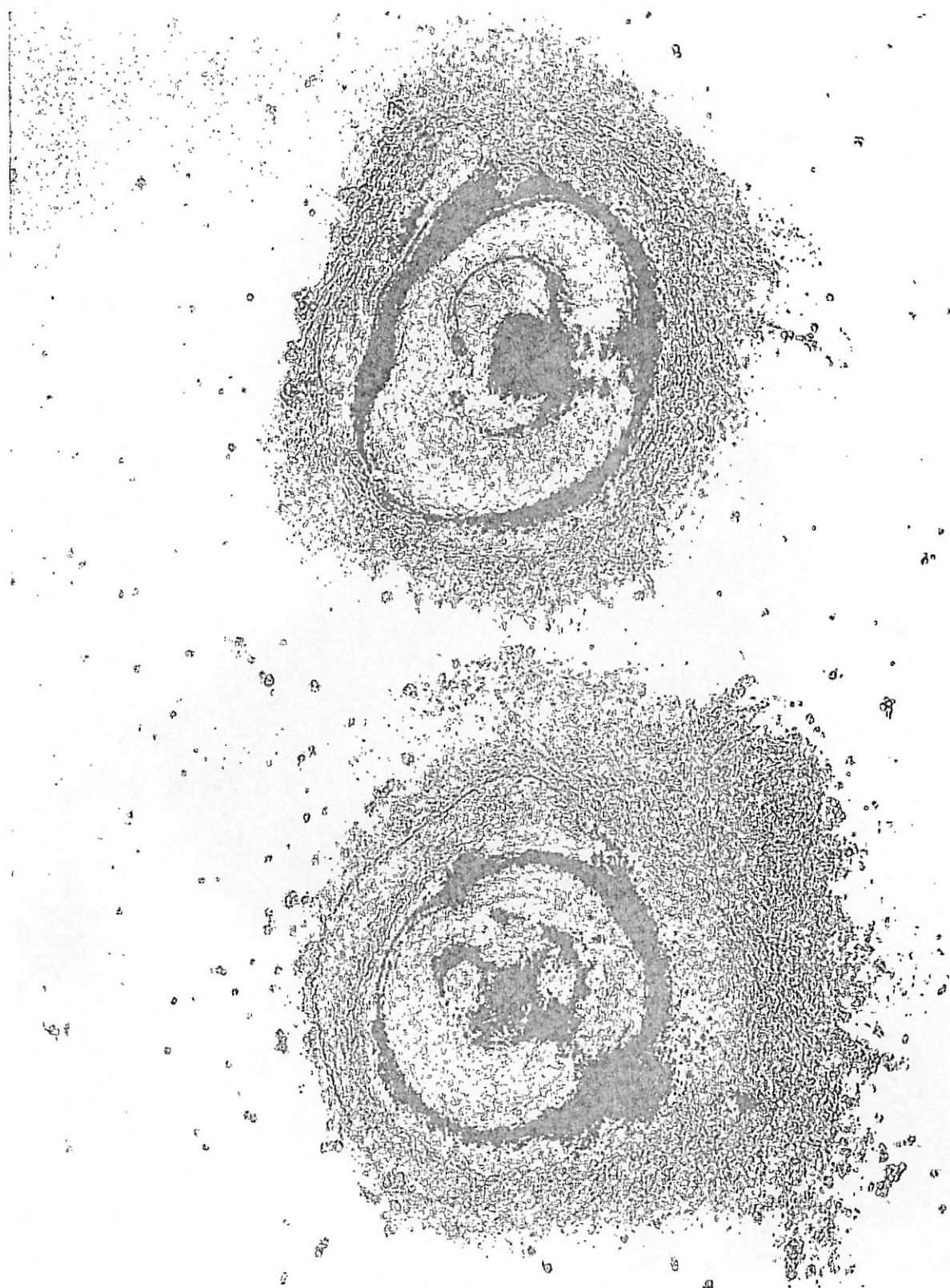


Fig. 6 K



Fig. 6 L