



(10) **DE 20 2010 015 310 U1** 2011.03.17

(12)

## Gebrauchsmusterschrift

(21) Aktenzeichen: **20 2010 015 310.7**

(22) Anmeldetag: **08.11.2010**

(47) Eintragungstag: **10.02.2011**

(43) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **17.03.2011**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12M 3/04 (2006.01)**

**C12M 1/22 (2006.01)**

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:  
**Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden  
e.V., 01069 Dresden, DE**

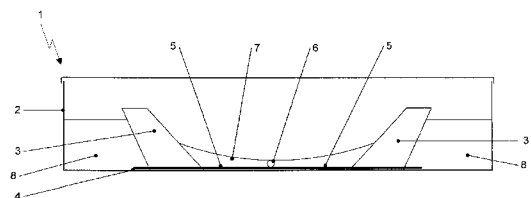
(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:  
**Sperling, Fischer & Heyner Patentanwälte, 01277  
Dresden**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

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

(57) Hauptanspruch: Vorrichtung (1) zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen, umfassend:

- eine Zellkulturschale (2) mit auf dem Boden aufgelegten Glasdeckplättchen (4);
- einen sterilen Ring (3), der auf dem Glasdeckplättchen (4) unter Ausbildung einer inneren kreisförmigen Fläche (5) und eines äußeren Abschnitts zwischen dem Ring (3) und der Wand der Zellkulturschale (2) aufgesetzt ist, wobei der Platz an oder nahe der Mitte der kreisförmigen Fläche (5) auf dem Glasdeckplättchen (4) für die zu kultivierenden Gewebe oder embryonalen Organanlagen und die durch den sterilen Ring (3) eingeschlossene kreisförmige Fläche (5) des Glasdeckplättchens (4) für die Zugabe des kompletten Nährmediums (7) in einer Menge, die für die vollständige Benetzung dieser Fläche (5) notwendig ist, vorgesehen sind.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen. Diese Vorrichtung ermöglicht unter anderem 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 untersuchen. Das System erlaubt zudem in großem Umfang eine funktionelle Analyse und wird genutzt, um die Entwicklungsfunktionen spezifischer Moleküle durch eine 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 Clifflort 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 Blutgerinnens 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 Blutgerinnens 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  $\sigma$  die Oberflächenspannung des Mediums sind.

**[0004]** Für einen Radius von 500  $\mu\text{m}$ , 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-Organ Kultivierungen 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 beziehungsweise Vorrichtungen zu entwickeln. Am häufigsten 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]** Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung einer Vorrichtung für die Kultivierung von Organen und Geweben, die einerseits ein kosten sparendes Verfahren ermöglicht und die andererseits die Sichtbarkeit, insbesondere für die Phasenkontrast-Mikroskopie, und zudem eine gegenüber herkömmlichen Methoden optimierte Entwicklung der Organe und Gewebe gewährleistet.

**[0008]** Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch eine Vorrichtung zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen, umfassend:

- eine Zellkulturschale mit auf dem Boden aufgelegten Glasdeckplättchen;
- einen sterilen Ring, der auf dem Glasdeckplättchen unter Ausbildung einer inneren kreisförmigen Fläche und eines äußeren Abschnitts zwischen dem Ring und der Wand der Zellkulturschale aufgesetzt ist, wobei der Platz an oder nahe der Mitte der kreisförmigen Fläche auf dem Glasdeckplättchen für die zu kultivierenden Gewebe oder embryonalen Organanlagen und die durch den sterilen Ring eingeschlossene kreisförmige Fläche des Glasdeckplättchens für die Zugabe des kompletten Nährmediums in einer Menge, die für die vollständige Benetzung dieser Fläche notwendig ist, vorgesehen sind.

**[0009]** Gemäß der Konzeption der Erfindung können in einer solchen erfindungsgemäßen Vorrichtung Gewebe oder embryonale Organanlagen, zum Beispiel Nierenanlagen, auf Glasdeckplättchen, die leicht mit definierten Substraten, insbesondere Matrixkomponenten, beschichtet werden können, wachsen. In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung weist der sterile Ring die Form eines enthaupteten Kegels auf, dessen kleineres Ende eine kreisförmige Fläche definiert, wenn dieses kleinere Ende auf dem Glasdeckplättchen platziert wird. Vorzugsweise besteht der sterile Ring aus Silikon. Der äußere Raumabschnitt zwischen der Außenseite des Rings und der Wand der Zellkulturschale, in der das Glasdeckplättchen platziert ist, kann vorteilhafterweise mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gefüllt werden, um einen geeigneten Wasserdampfdruck in der Luftumgebung oberhalb des Nährmediums zu halten, wenn die Inkubation der Organanlage und des Nährmediums in feuchter kohlendioxidangereicherter Atmosphäre, vorzugsweise mit 5% Kohlendioxid, erfolgt. Der geeignete Temperaturbereich liegt zwischen 35 und 39°C, wobei eine Temperatur von 37°C bevorzugt wird.

**[0010]** In einer Ausführung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist das kleinste Ende des sterilen Rings durch einen Kreis von 1 cm<sup>2</sup> definiert. Das Endvo-

lumen des gemessenen kompletten Nährmediums liegt für diese Ausführungsform in einem Bereich von 70 bis 200 µl. Das neuartige System der Kultivierung gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht es somit, dass Gewebe oder embryonale Organanlagen (hier Nierenanlagen) direkt auf Glasdeckplättchen in nur wenig Nährmedium, bevorzugt in 85 µl Nährmedium, kultiviert werden können. In einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung sind die Glasdeckplättchen mit spezifischen Substraten, insbesondere Matrixkomponenten, vorbeschichtet. Zu diesen Beschichtungen zählen unter anderem Proteine, die vorzugsweise nach einer Vorbeschichtung mit einem Maleinsäureanhydrid-Copolymer als Haftvermittler zwischen dem Protein und dem Glasdeckplättchen auf dem Glasdeckplättchen aufgetragen sind. Vor der Vorbeschichtung mit Maleinsäureanhydrid-Copolymer wird auf das gereinigte Glas zunächst ein Aminosilan gegeben, das die Verbindung zwischen dem Glas und dem eigentlichen Copolymer herstellt. Als Nährmedium kann vorzugsweise Eagle's Minimal Essentielles Medium (EMEM) mit Earle-Salzen (GIBCO) und nicht-essentielle Aminosäuren mit 10% fötalem Kälberserum (Biochrom) und 1% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin; Sigma) verwendet werden. Die neue Vorrichtung ermöglicht einen Kultivierungszeitraum von mindestens zehn Tagen.

**[0011]** Erfindungsgemäß wird somit eine alternative Vorrichtung für eine Kultivierungstechnik bereitgestellt, die als Konzeption die Nutzung des durch die Oberflächenspannung erzeugten Drucks enthält und es darüber hinaus ermöglicht, dass Organe sich auf einem transparenten Substrat in äußerst geringen Mengen des Mediums entwickeln.

**[0012]** Es zeigt sich, dass die Methode für die Entwicklung von Geweben oder embryonalen Organanlagen, insbesondere Nieren, in einer erfindungsgemäßen Vorrichtung den herkömmlichen Methoden überlegen ist. Mit Hilfe des durch die erfindungsgemäße Vorrichtung durchführbaren Verfahrens können Gewebe oder embryonale Organanlagen, insbesondere Maus-Nieren, für mehrere Tage auf Glas mit einer geringen Menge eines Nährmediums ex vivo kultiviert werden. Bei der Kultivierung in geringen Mengen des Nährmediums entwickeln sich die Organanlagen überraschenderweise gut auf Glas. Bei den Nieren wird das besonders deutlich, wenn die üblichen Kennzahlen, wie Gesamtfläche, Nephronenanzahl 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.

**[0013]** Weitere Vorteile eines in der erfindungsgemäßen Vorrichtung durchgeführten Verfahrens bestehen, wie bereits erwähnt, unter anderem in der

verbesserten Sichtbarkeit. So ist durch die Vorrichtung die Beobachtung durch Hellfeldmikroskopie und Zeitraffer-Fotografie (allgemein Mikroskopie) in hoher Auflösung ohne jegliche Interferenz mit dem Kultur-Oberflächenmaterial möglich. Des Weiteren ermöglicht die Vorrichtung eine Reduzierung der Menge an Nährmedium. Das ist besonders wichtig in Fällen, bei denen zum Beispiel teure Zusatzmittel verwendet werden müssen.

**[0014]** Außerdem sind mit der Vorrichtung nun auch längere Kultivierungszeiträume möglich, das heißt mindestens zehn Tage. Schließlich bestehen die Vorteile der erfindungsgemäßen Vorrichtung in einer einfachen Handhabung und geringen Kosten.

**[0015]** Die neue erfindungsgemäße Vorrichtung bietet somit erhebliche Vorteile wirtschaftlicher Natur und bezüglich der Realisierbarkeit der Entwicklung gegenüber herkömmlichen Vorrichtungen.

**[0016]** Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen mit Bezugnahme auf die zugehörigen Zeichnungen. Es zeigen:

**[0017]** Fig. 1: experimentelle Vorrichtungen für eine Großvolumen-Kultivierung, Stand der Technik; darin enthalten:

**[0018]** Fig. 1a: eine Großvolumen-Kultivierung auf einer Membran eines Trowell-Gitters; Stand der Technik;

**[0019]** Fig. 1b: eine Großvolumen-Kultivierung auf einer Membran an der Unterseite eines Well-Einsatzes; Stand der Technik;

**[0020]** Fig. 2: eine Vorrichtung für ein Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahren in der Seitenansicht;

**[0021]** Fig. 3: eine vereinfachte Darstellung eines Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahrens in einer erfindungsgemäßen Vorrichtung;

**[0022]** Fig. 4: eine detaillierte schematische Darstellung der Richtungen der Versorgung mit dem Nährmedium und von wirkenden Kräften bei der Niedrigvolumen-Kultivierung;

**[0023]** Fig. 5: eine fotografische Abbildung der Vorrichtung für das Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahren in der Draufsicht;

**[0024]** Fig. 6a: Ergebnisse der Hellfeldmikroskopie zur Entwicklung von Maus-Nierenanlagen;

**[0025]** Fig. 6b: mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen zur Entwicklung von Maus-Nierenanlagen;

**[0026]** Fig. 7: eine grafische Darstellung der Abhängigkeit der Gesamtoberfläche des Organs, der Zahl der Nephronen darin und der Zahl der Ureterverzweigungen vom Volumen des Nährmediums und

**[0027]** Fig. 8: mikroskopische Hellfeldaufnahmen von Lungenkultivierungen bei verschiedenen Kultivierungsdauern und verschiedenen Kultivierungsvorrichtungen.

**[0028]** 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.

**[0029]** 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 Vaginalpfropfs 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.

**[0030]** Die Fig. 2 zeigt eine erfindungsgemäße Vorrichtung 1 zur Durchführung eines Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahrens in der Seitenansicht. Die Vorrichtung 1 umfasst eine Zellkulturschale 2 in Form einer Petrischale 2. Für die Niedrigvolumen-Kultivierung wurde jeweils ein steriler Ring 3 aus Silikon verwendet (flexiPERM®, ConA, Greiner Bio-One; „ConA“ ist die Beschreibung für eine Kegelform durch den Anbieter und hat nichts mit dem ähnlich benannten Lektin zu tun). Der Ring 3 wird auf ein steriles, chemisch gereinigtes (RCA-Reinigung) 22·22 mm<sup>2</sup>

Glasdeckplättchen **4** am Boden der Zellkulturschale **2** (35·10 mm, Sarstedt) aufgesetzt. Das untere Ende des Rings **3** schließt auf dem Glasdeckplättchen **4** somit eine kreisförmige Fläche **5** ein.

**[0031]** An oder in der Nähe der Mitte der kreisförmigen Fläche **5** wurden die Nierenanlagen **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 Glasdeckplättchens **4** benetzt war. Der Raum zwischen der Außenseite des Rings **3** und der Wand der Petrischale **2** wurde mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung **8** (PBS), die vorzugsweise 1% eines Zusatzes Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) enthielt, gefüllt, um einen geeigneten Wasserdampfdruck in der Luftumgebung oberhalb des Nieren-Nährmediums **7** zu halten. Alle Kultivierungen wurden in feuchter Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid bei 37°C inkubiert. Das Nährmedium **7** wurde aller zwei Tage ausgewechselt.

**[0032]** Die Vorrichtung für das Kultivierungsverfahren wurde unter Verwendung eines Silikonrings **3** von flexiPERM® mit der Form eines enthaupteten Kegels gemäß den Darstellungen in **Fig. 2** und **Fig. 3** entwickelt, dessen kleinstes (unteres) Ende eine 1 cm<sup>2</sup> große kreisförmige Fläche **5** (das heißt eine 5,6 mm große Radiusfläche) definiert, wenn der Silikonring **3** auf einem gesäuberten Glasdeckplättchen **4** platziert wird. E11.5-Nierenanlagen **6** wurden, wie bereits beschrieben, ungefähr an der Mitte der kreisförmigen Fläche **5** in definierten Volumina des Nährmediums **7** kultiviert, nämlich in 70, 80, 85, 90 und 120 µl. Volumen von weniger als 70 µl erwiesen sich als unzureichend, um die ganze kreisförmige Fläche **5** zu benetzen. Die Volumen wurden demnach so ausgewählt, dass sie das Glasdeckplättchen **4** ausreichend benetzten und die Niere **6** einem Druck durch die Oberflächenspannung aussetzten, wie es in **Fig. 3** durch die nach unten gerichteten Druckpfeile **9** dargestellt ist. Die Pfeile **10** zeigen die Hauptrichtung der Versorgung mit dem Nährmedium **7** an.

**[0033]** Die **Fig. 4** zeigt eine detaillierte schematische Darstellung der Richtungen der Versorgung mit dem Nährmedium und von wirkenden Kräften bei der Niedrigvolumen-Kultivierung. Dabei zeigen, wie bereits erwähnt, die Pfeile **10** die Hauptrichtung der Versorgung mit dem Nährmedium **7** an, während der Druckpfeil **9** die auf die Niere wirkende Haupt-Oberflächenspannungskraft skizziert, die senkrecht nach unten wirkt. Der Pfeil **11** stellt jeweils die Hauptausbreitungsrichtung/-kraft der wachsenden Niere **6** dar, die sich beidseitig waagrecht ausbreitet.

**[0034]** Die **Fig. 5** zeigt eine fotografische Abbildung der erfindungsgemäßen Vorrichtung für das

Niedrigvolumen-Kultivierungsverfahren in der Draufsicht. Die Entwicklung der Nierenanlagen wurde durch Phasenkontrast-Mikroskopie, durch Immunfärbung und durch Messung der Gesamtoberfläche, der Anzahl der gebildeten Ureterknospenzweigenden und der Anzahl der gebildeten Nephrone ausgewertet. Dabei hatten die Nieren zunächst zwei Ureterknospenzweigenden und keine Nephrone, wie für E11.5 erwartet. Die Ergebnisse sind in **Fig. 6a** dargestellt, welche mikroskopische Helfeldaufnahmen von für 96 Stunden lang kultivierten, embryonalen Mäusenieren mit Hilfe des neu entwickelten 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.

**[0035]** Die **Fig. 6b** zeigt mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von den selbigen, für 96 Stunden kultivierten, embryonalen Mäusenieren mit Hilfe des neu entwickelten 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. 6b** sind helle Strukturen, die verzweigte Ureterknospen darstellen, über eine Antikörperfärbung von dem Markerprotein Calbindin sichtbar gemacht. Dunklere kugelförmige Strukturen, die wiederum sich entwickelnde Nephrone illustrieren, werden durch eine Antikörperfärbung des Markerproteins Laminin (Laminin 1) visualisiert. Die **Fig. 6b**, Abb. A' bis D', zeigt den Ureterknospenmarker **12**, Calbindin-D28K, und den Marker **13**, Laminin, als Marker sowohl für die Nephrone als auch für die Ureterknospen.

**[0036]** Vergleichsnieren, die durch eine konventionelle Methode nach Trowell kultiviert wurden, siehe **Fig. 6a**, Abb. D, und **Fig. 6b**, Abb. D', entwickelten sich normal, indem sie calbindin-positive, verzweigte Ureterknospen (Mittelwert = 23,4, Standardabweichung vom Mittelwert = 16, bei Minimum an Nieren = 43) entwickeln und viele frühe, sich entwickelnde Nephrone (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 innerhalb von Silikonringen in großen Mengen Nährmedium, zum Beispiel in 200 µl auf Glas gebildet wurden, siehe **Fig. 6a**, Abb. C, und **Fig. 6b**, 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. 6a**, Abb. A, **Fig. 6b**, Abb. A', **Fig. 6a**, Abb. B, und **Fig. 6b**, Abb. B', verbesserte sich jedoch die Entwicklung. Das zeigt ein Vergleich in Form eines Diagramms in **Fig. 7**, welches 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.

**[0037]** Beim optimalen Volumen von 85  $\mu$ l 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.

**[0038]** Die Zugabe von 500  $\mu$ l Nährmedium zu den Nierenanlagen, die bereits für einen Tag in 85  $\mu$ l 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 am Glas zu befestigen.

**[0039]** Die Niedrigvolumen-Glaskultivierungstechnik ist auch für andere Organe anwendbar. In **Fig. 8** sind mikroskopische Hellfeldaufnahmen von Lungenkultivierungen bei verschiedenen Kultivierungsdauern und verschiedenen Kultivierungsvorrichtungen dargestellt. Dabei zeigt die **Fig. 8**, Abb. A, eine mikroskopische Hellfeldaufnahme einer kultivierten Lunge auf einem Filter nach 48 Stunden, wohingegen **Fig. 8**, Abb. B, eine mikroskopische Hellfeldaufnahme einer auf Glas kultivierten Lunge, ebenfalls nach 48 Stunden, darstellt. Schließlich sind die nach den verschiedenen Verfahren beziehungsweise in den verschiedenen Vorrichtungen kultivierten Lungen auf Filterpapier (Stand der Technik) in **Fig. 8C** und erfindungsgemäß auf Glas in **Fig. 8D** nach jeweils 96 Stunden gegenübergestellt. Der Vorteil des Verfahrens in der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist dabei die Verbesserung der Sichtbarkeit der zu kultivierenden Organanlagen.

## Bezugszeichenliste

1	Vorrichtung
2	Zellkulturschale, Petrischale
3	Ring, Silikonring
4	Glasdeckplättchen
5	kreisförmige Fläche
6	Organanlagen, Nierenanlagen, Nieren
7	Nährmedium
8	phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
9	Druckpfeile
10	Pfeil (für die Hauptrichtung der Versorgung mit dem Nährmedium 7)
11	Pfeil (für die Hauptausbreitungsrichtung/-kraft)
12	Ureterknospenmarker
13	(Laminin-)Marker

## ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

### Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Clifford Grobstein: (1953) Nature 172: 869–870; (1953) Science 118: 52–55; (1953) J Exp Zool 124: 383–414 [0003]
- 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 [0003]
- 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 [0003]
- 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 [0004]
- 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 [0005]
- 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 [0005])

**Schutzansprüche**

1. Vorrichtung (1) zur Ex-vivo-Kultivierung von Geweben oder embryonalen Organanlagen, umfassend:

– eine Zellkulturschale (2) mit auf dem Boden aufgelegten Glasdeckplättchen (4);  
 – einen sterilen Ring (3), der auf dem Glasdeckplättchen (4) unter Ausbildung einer inneren kreisförmigen Fläche (5) und eines äußeren Abschnitts zwischen dem Ring (3) und der Wand der Zellkulturschale (2) aufgesetzt ist, wobei der Platz an oder nahe der Mitte der kreisförmigen Fläche (5) auf dem Glasdeckplättchen (4) für die zu kultivierenden Gewebe oder embryonalen Organanlagen und die durch den sterilen Ring (3) eingeschlossene kreisförmige Fläche (5) des Glasdeckplättchens (4) für die Zugabe des kompletten Nährmediums (7) in einer Menge, die für die vollständige Benetzung dieser Fläche (5) notwendig ist, vorgesehen sind.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der sterile Ring (3) die Form eines enthauppteten Kegels aufweist, dessen kleineres Ende auf dem Glasdeckplättchen (4) platziert wird und dabei die kreisförmige Fläche (5) definiert.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der sterile Ring (3) ein Silikonring (3) ist.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Glasdeckplättchen (4) mit Substraten vorbeschichtet ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat ein Protein ist, wobei eine Maleinsäureanhydrid-Copolymer-Vorbeschichtung als Haftvermittler zwischen dem Protein und dem Glasdeckplättchen (4) auf dem Glasdeckplättchen (4) vorgesehen ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der äußere Raumabschnitt zwischen der Außenseite des Rings (3) und der Wand der Zellkulturschale (2), in der das Glasdeckplättchen (4) platziert ist, für eine Befüllung mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (8) (PBS) vorgesehen ist, um einen geeigneten Wasserdampfdruck in der Luftumgebung oberhalb des Nährmediums (7) zu halten.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das kleinste Ende des sterilen Rings (3) durch einen Kreis von 1 cm<sup>2</sup> definiert ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Endvolumen des gemessenen

kompletten Nährmediums (7) 70 bis 200 µl vorgesehen ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Endvolumen des gemessenen kompletten Nährmediums (7) 85 µl vorgesehen ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Stand der Technik

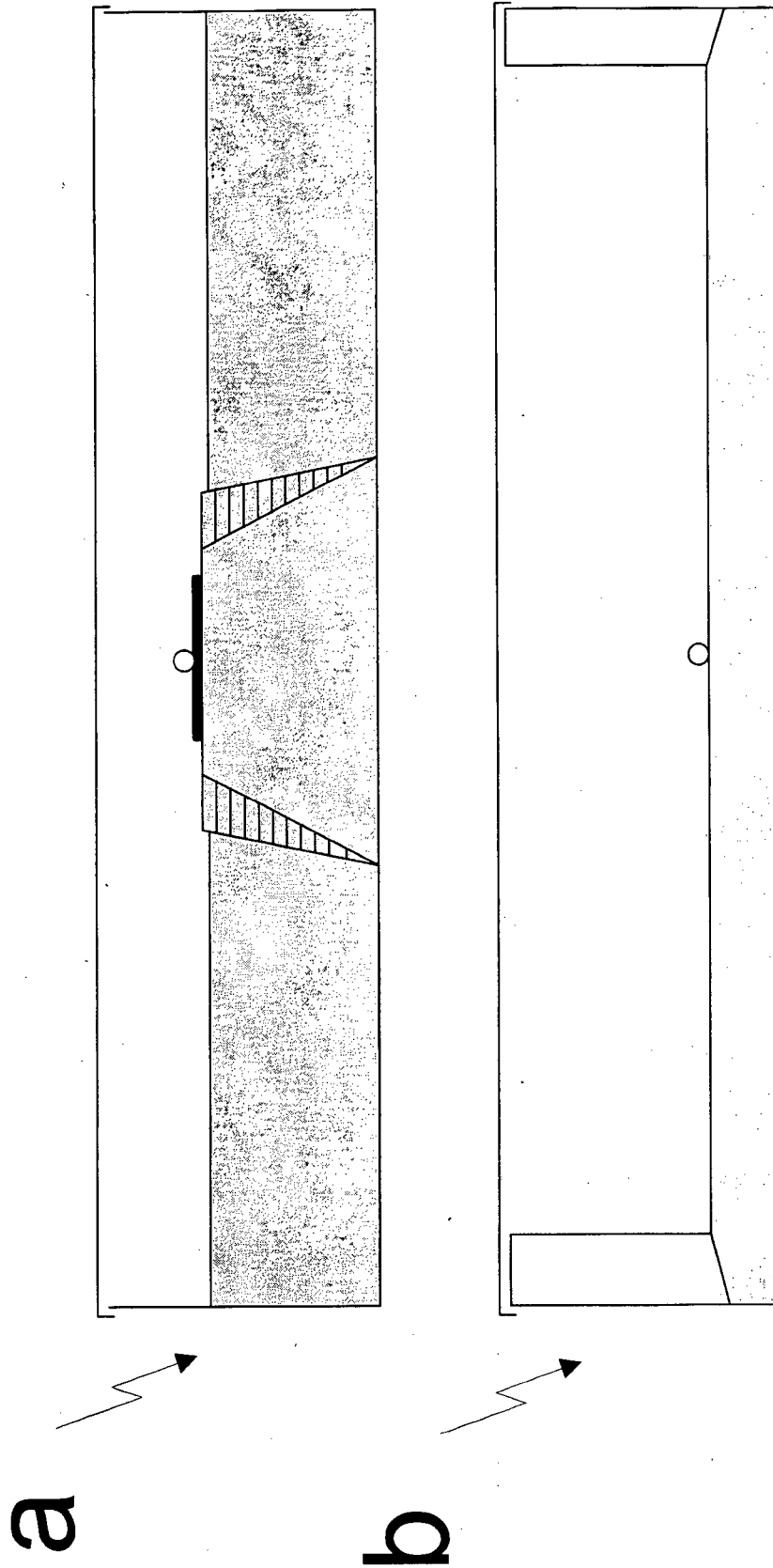


Fig. 1

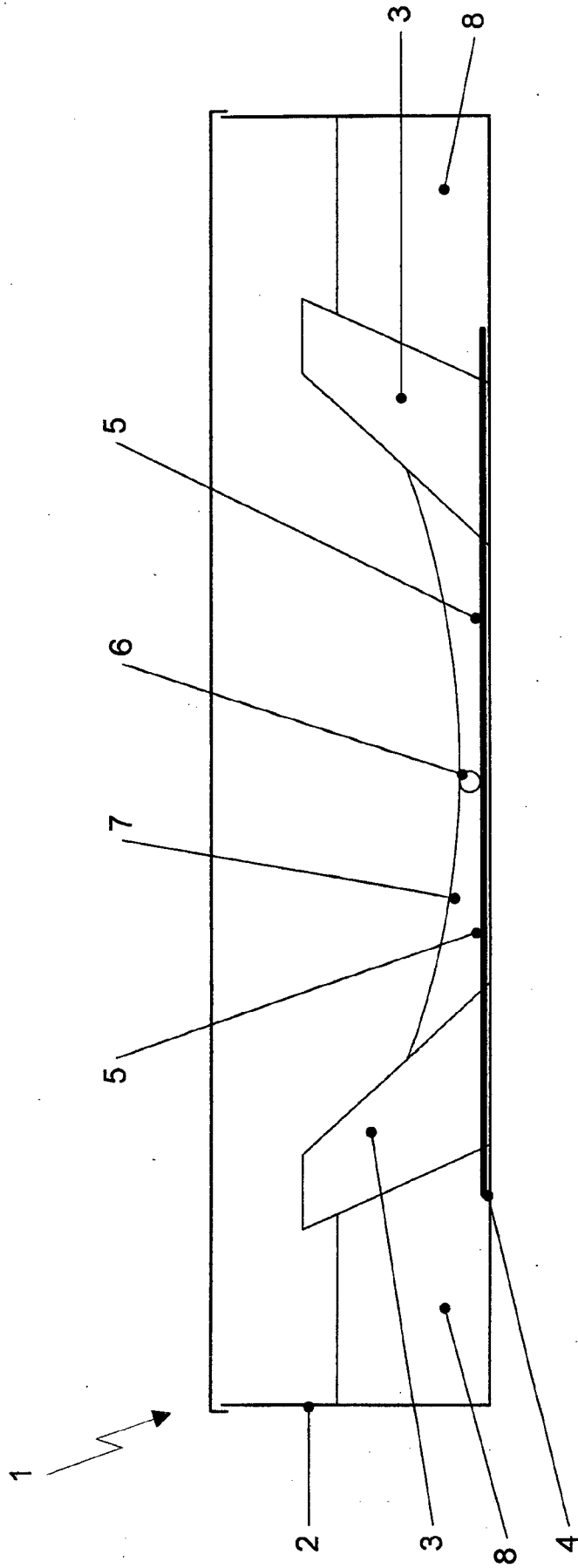


Fig. 2

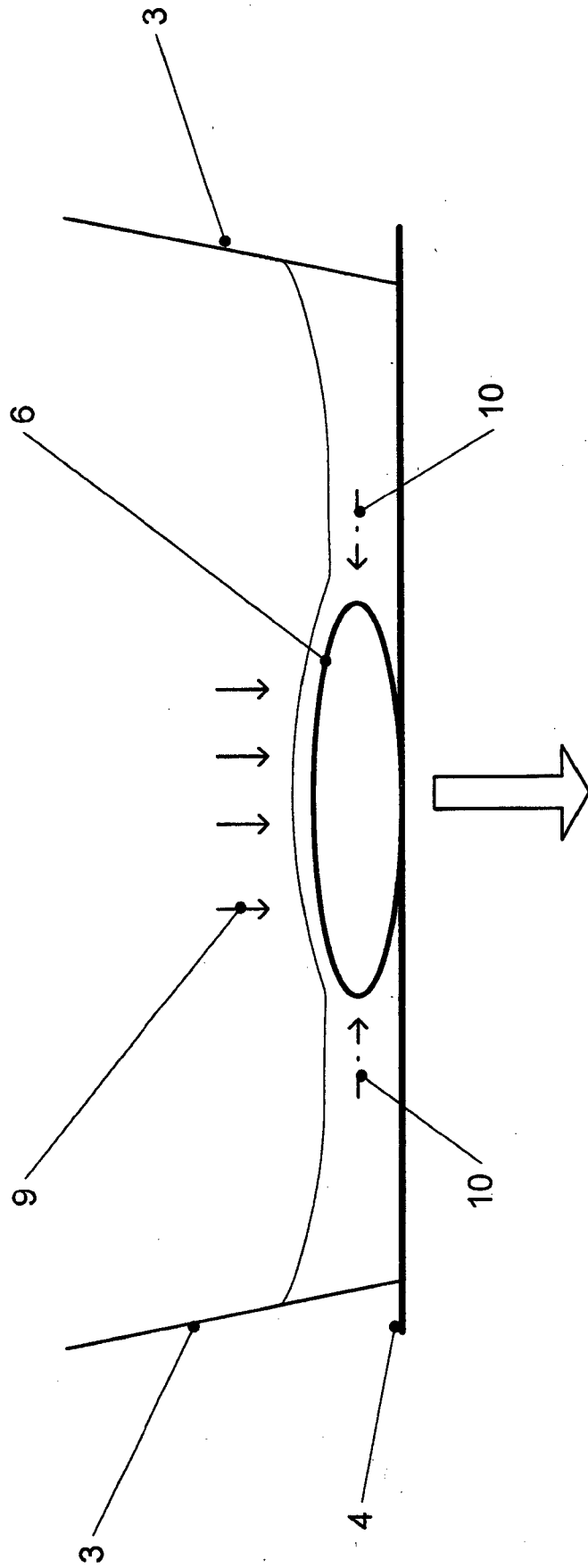


Fig. 3

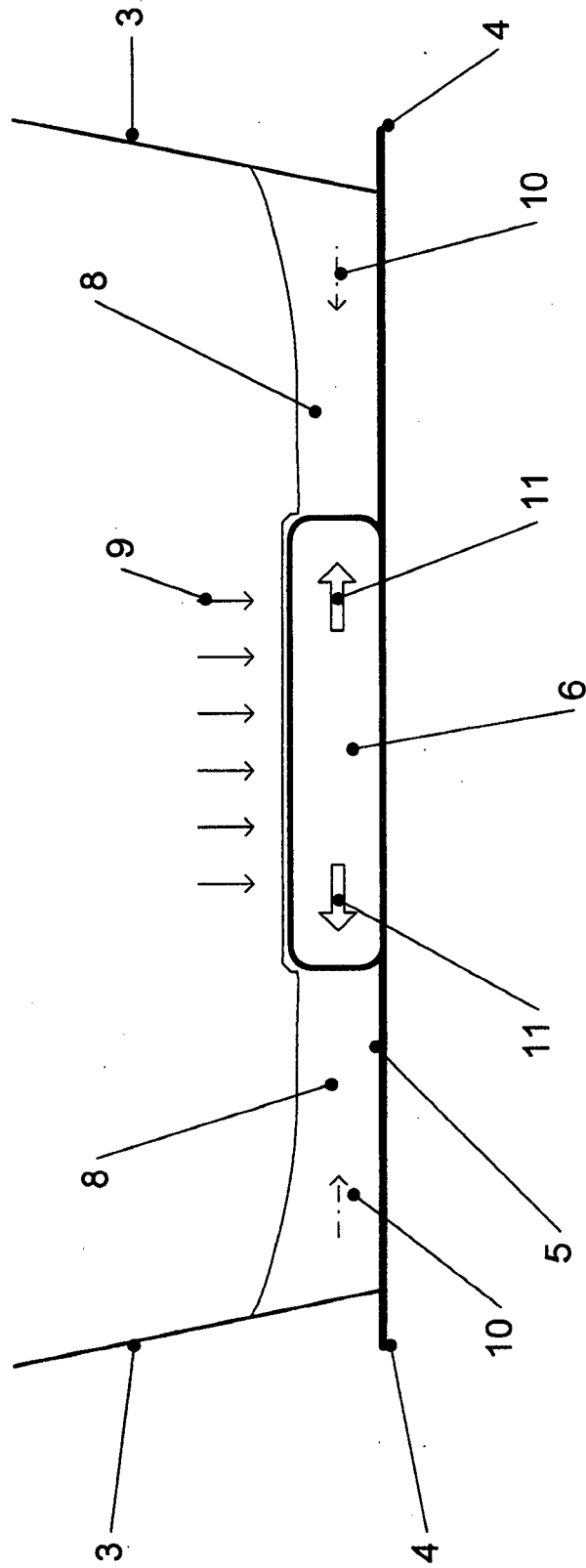
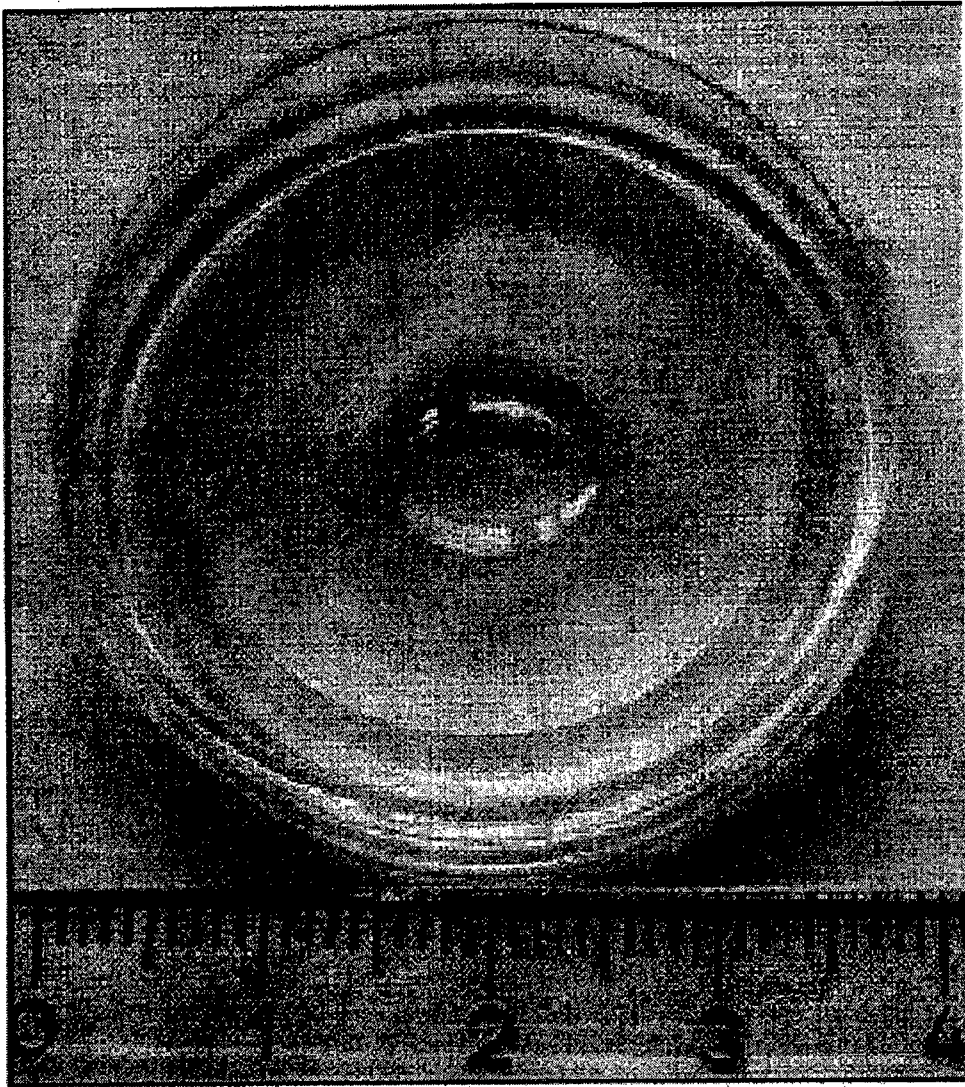


Fig. 4



**Fig. 5**

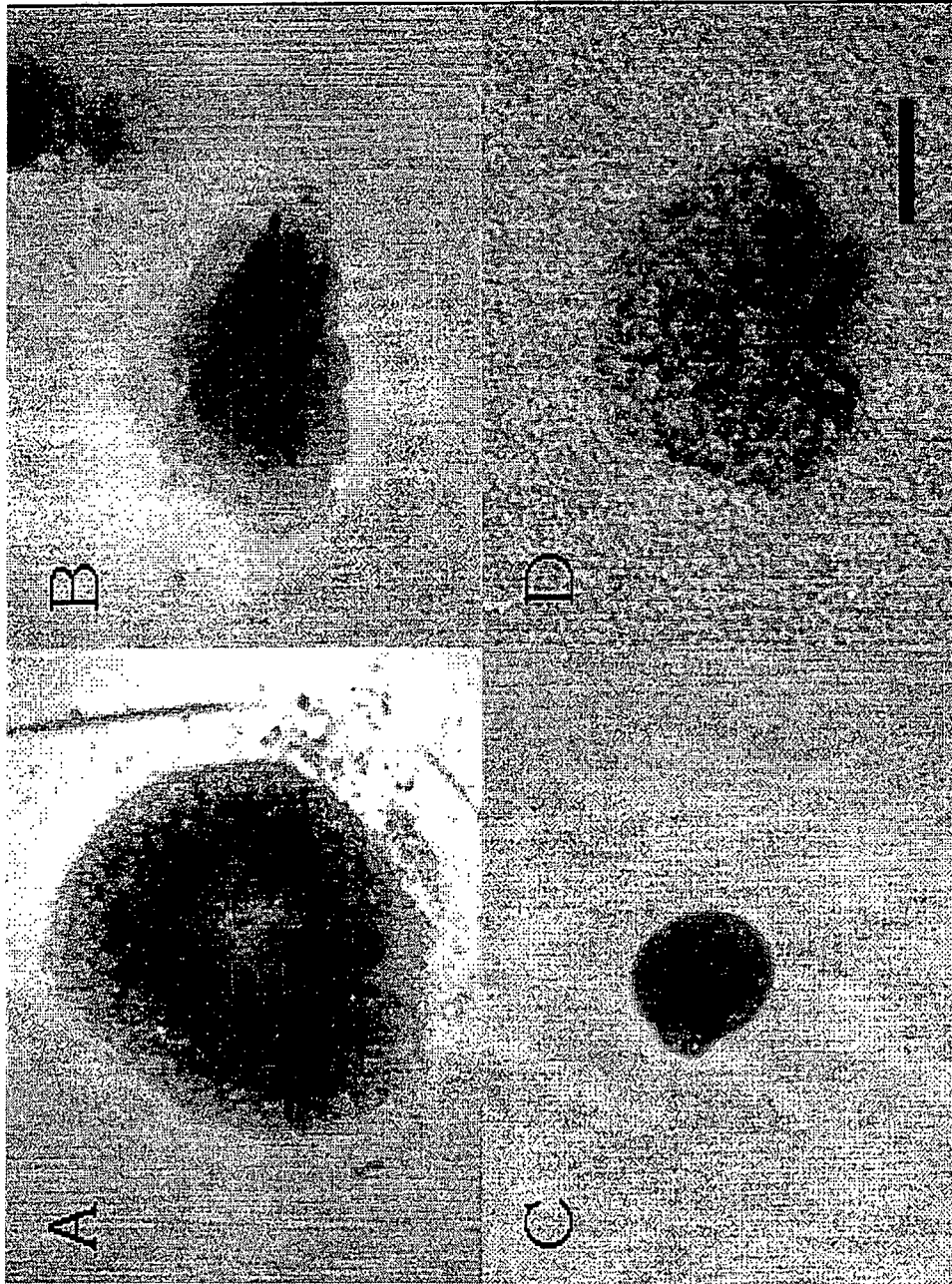


Fig. 6a

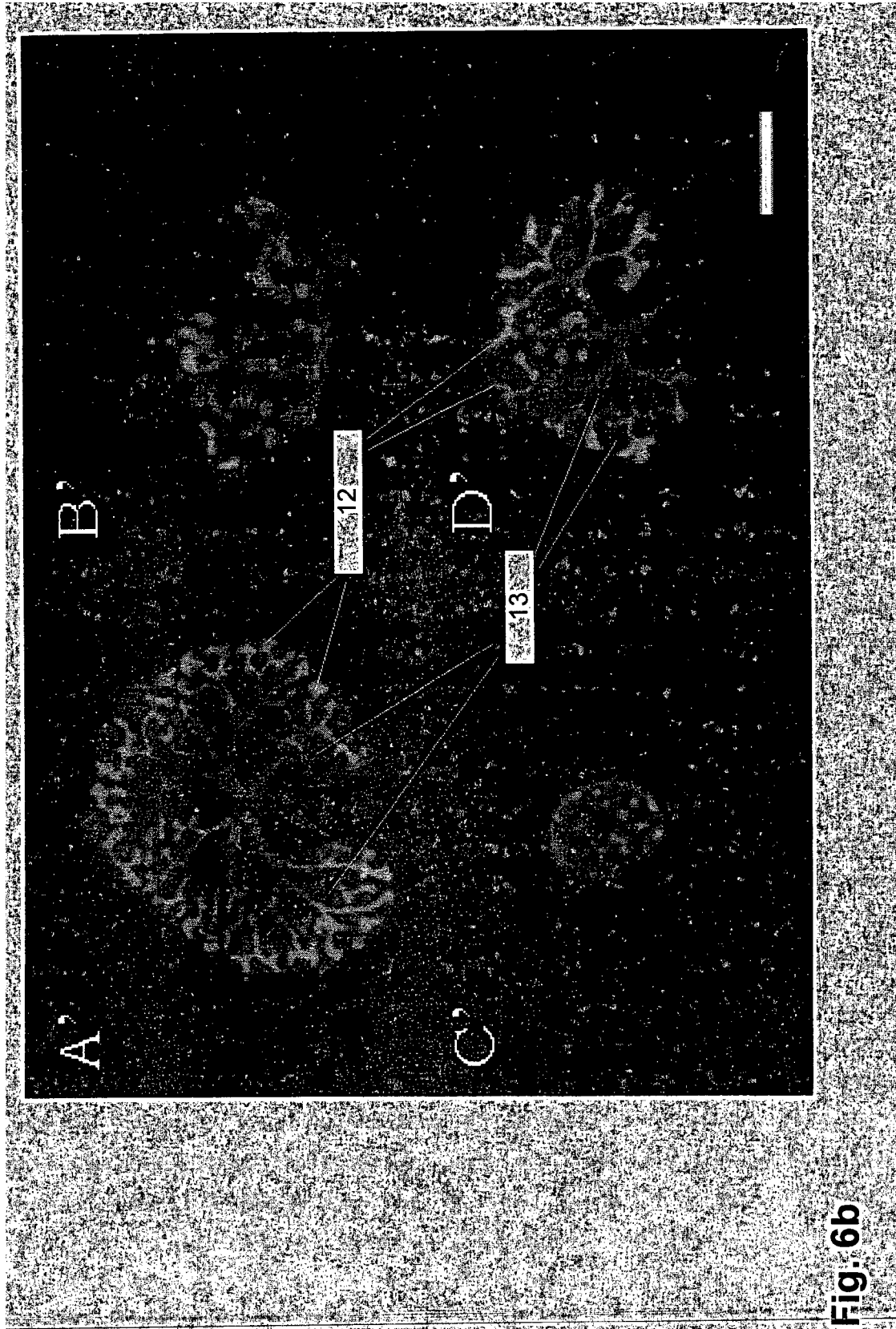


Fig. 6b

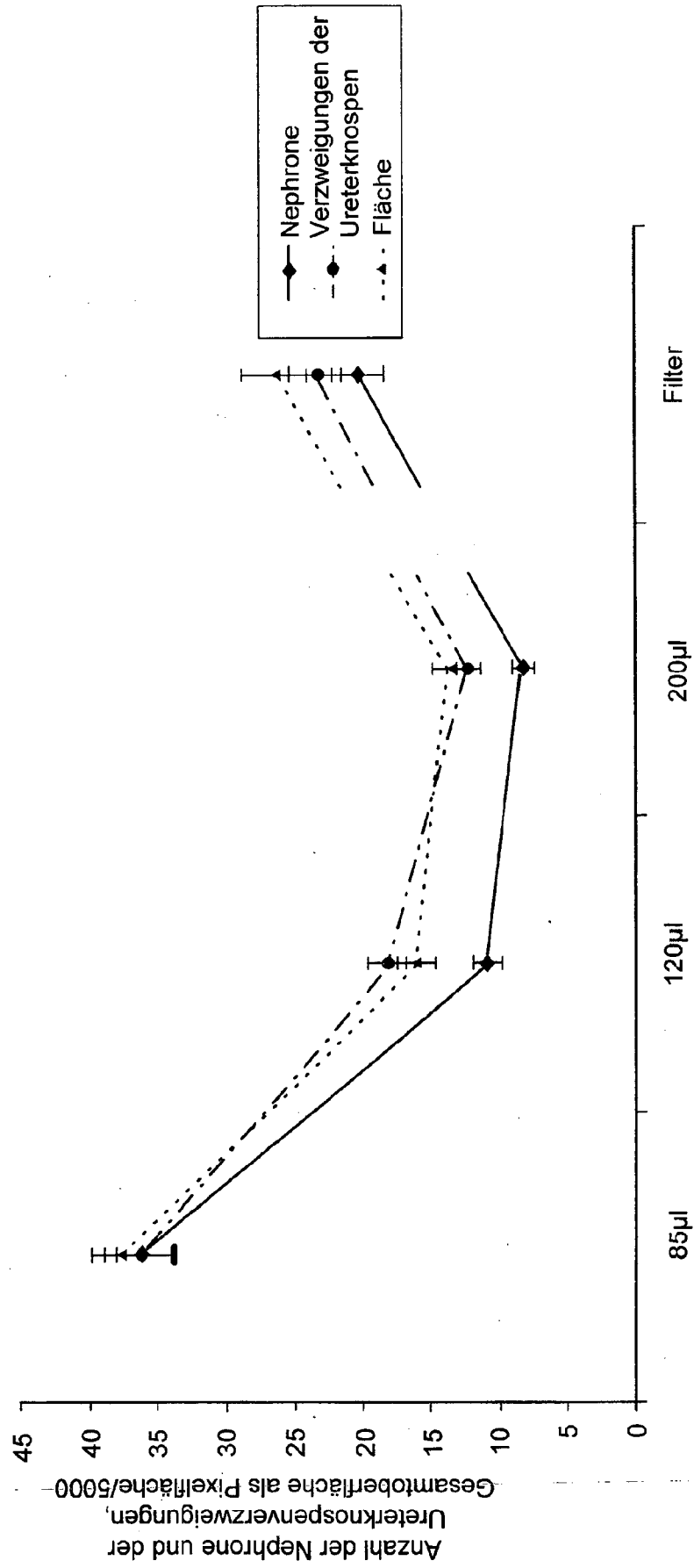


Fig. 7

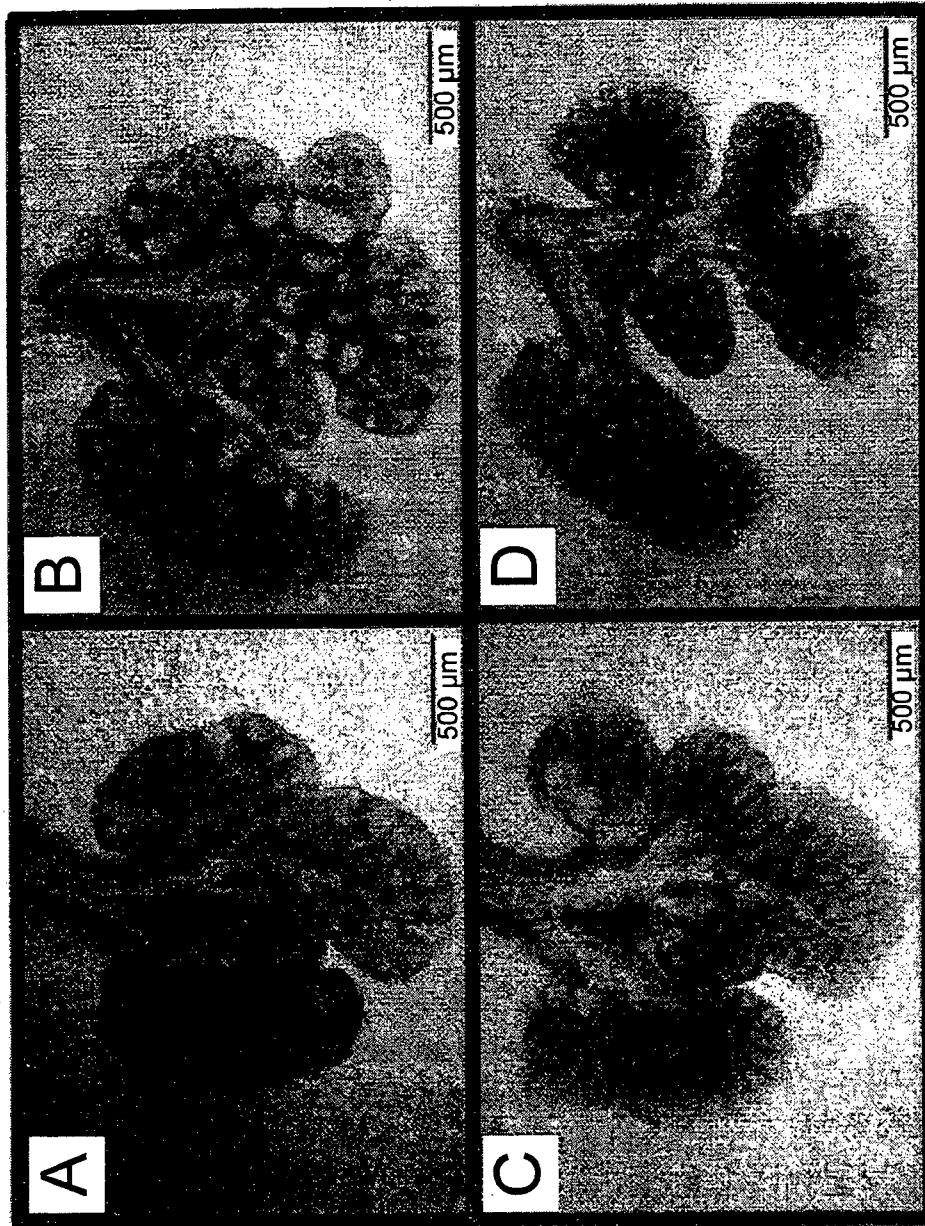


Fig. 8