

EUROPÄISCHE EIGNUNGSPRÜFUNG 2019

# Aufgabe A

Diese Prüfungsaufgabe enthält:

- |                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| * Schreiben des Anmelders   | 2019/A/DE/1-7   |
| * Zeichnungen der Anmeldung | 2019/A/DE/8     |
| * Dokument D1               | 2019/A/DE/9-10  |
| * Dokument D2               | 2019/A/DE/11-12 |

Merkmale:

- Prod. + Verf.
- Ej. Fähigkeit v. D1 & D2 ?



Schreiben des Anmelders

CELLabrate Ltd., Kidlington, Oxfordshire, United Kingdom

5 Sehr geehrte Frau Organa,

*1. Verfahren?* [001] Unser Unternehmen konzipiert und produziert Vorrichtungen, die für die Anzucht  
10 von Zellen im Labor verwendet werden. Wir reisen gerade nach Japan zu einem Treffen  
mit einem potenziellen Kunden, der an unserer Technologie interessiert ist. Bevor wir  
ihn treffen, würden wir gerne unsere Ideen mit einer Patentanmeldung schützen. Leider  
werden wir uns alle während der nächsten 12 Stunden auf dem Flug nach Japan  
befinden und können daher keine Fragen beantworten. Ich habe Ihnen deshalb alle  
Informationen beigefügt, die Sie benötigen, um die Anmeldung abzufassen und heute  
15 einzureichen. Außerdem habe ich zwei Dokumente beigelegt (D1 und D2), die Ihnen für  
das Verständnis des Hintergrunds unserer Erfindung hilfreich sein können. Bitte  
beachten Sie, dass wir gemäß unserer Unternehmenspolitik keine zusätzlichen  
Anspruchsgebühren entrichten werden.

[002] Um Zellen erfolgreich in Kultur, d. h. im Labor, zu züchten, müssen die Zellen mit  
20 allem Wesentlichen versorgt werden, was für Wachstum und Atmung erforderlich ist.  
Aus Tieren oder Menschen gewonnene Zellen werden normalerweise in einem  
Flüssigmedium gezüchtet, das alle erforderlichen Nährstoffe enthält. Die Zellen werden  
normalerweise unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet, zu denen der pH-Wert, die  
Temperatur und der Austausch von Gasen wie Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>)  
25 mit der Umgebung gehören. Zellkulturvorrichtungen werden üblicherweise in einem  
Inkubator aufbewahrt, in dem Sauerstoff mit einer Konzentration von rund 20 %  
bereitgestellt wird, um sicherzustellen, dass die Zellen genügend Sauerstoff für ein  
adäquates Wachstum erhalten.



~~A~~



5 [003] In herkömmlichen Zellkulturvorrichtungen wie Multi-Well-Platten (siehe D1) erfolgt die Bereitstellung von Sauerstoff aus dem Raum im Behälter über der Oberfläche des Zellkulturmediums, der als Kopfraum bezeichnet wird. Damit ist die Oberfläche für den Gasaustausch begrenzt, was zu niedrigen Zellwachstumsraten führen kann. Auch kann es innerhalb der ersten ein bis zwei Stunden zu einem starken anfänglichen Absinken des pH-Werts kommen, der dadurch verursacht wird, dass sich Kohlendioxid aus dem Kopfraum im Medium löst. Dieses Absinken des pH-Werts kann die Zellwachstumsrate negativ beeinflussen.

Kopfraum  
optimum

DA  
Nachw.

10 [004] Die Erfindung überwindet diese Nachteile, indem eine Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen bereitgestellt wird, die eine erste und eine zweite gasdurchlässige Membran umfasst. Die gasdurchlässigen Membranen sind von einem Rahmen gehalten, so dass eine Zellkulturkammer zwischen den beiden gegenüberliegenden Membranen und dem Rahmen gebildet wird. Der Begriff "gasdurchlässig" bedeutet, dass die Membran Poren enthält, durch die Gase dringen können. Die Verwendung einer gasdurchlässigen Membran ermöglicht einen erhöhten Austausch von Gasen, insbesondere CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>. Ziel der Erfindung ist es, den Austausch von Gasen zu erhöhen und somit die Zellwachstumsrate zu steigern.

Oben-  
begriff

J. Anz  
mit 2

20 [005] Um zu verhindern, dass das Zellkulturmedium aus der Vorrichtung ausläuft, ist es wesentlich, dass die gasdurchlässigen Membranen flüssigkeitsundurchlässig sind. Aus demselben Grund müssen die Membranen mittels einer auslaufsicheren Abdichtung an dem Rahmen der Vorrichtung befestigt sein. Wir haben es für vorteilhaft befunden, eine gasdurchlässige und flüssigkeitsundurchlässige Membran zu verwenden, die optisch transparent ist, was die Beobachtung der Zellen ermöglicht. Es werden im Handel viele verschiedene Arten von Membranen angeboten, die verwendet werden können, z. B. Membranen, die Polymere wie Polyethylen, Polycarbonat, Polypropylen oder ein Silikon-Copolymer umfassen. Die Wahl des Polymers hängt ab von der Art der zu züchtenden Zelle, der Rate des Gastransfers und der optischen Transparenz.

A

A



[006] Wir haben festgestellt, dass gasdurchlässige Membranen, die Polyethylen enthalten, eine **sehr gute Kombination von Merkmalen für die Zellkultur** aufweisen. Wir haben weiter festgestellt, dass bei normalem Atmosphärendruck ( $=10^5$  Pa) und bei 37 °C Membranen mit einer Gasdurchlässigkeitsrate von  $1 \times 10^{-16}$  bis  $3 \times 10^{-16}$   $\text{m}^3/(\text{s}\cdot\text{Pa})$  für  $\text{O}_2$  und von  $6 \times 10^{-16}$  bis  $7 \times 10^{-16}$   $\text{m}^3/(\text{s}\cdot\text{Pa})$  für  $\text{CO}_2$  zu **ausgezeichneten Zellwachstumsraten** führen. Membranen, die in diese Bereiche der Gasdurchlässigkeit fallen, sind wohlbekannt und am Markt erhältlich.  $\Rightarrow$  nicht erfunden? *kein*

~~X~~  
D2

~~X~~  
D2

[007] Zellen einer bestimmten Art, die als adhärenente Zellen bezeichnet werden, müssen an einer Oberfläche anhaften, damit sie wachsen können. Deshalb wünschen manche Kunden, dass wir die Innenfläche einer **oder beider** gasdurchlässigen Membranen mit einem Stoff beschichten, der die Zelladhäsion erleichtert. Am Markt sind zu diesem Zweck verschiedene Arten von Beschichtungsmitteln erhältlich, die Moleküle wie Gelatine, Kollagen und Fibronectin umfassen.

A

A

[008] Wir haben verschiedene Möglichkeiten zur Verwendung gasdurchlässiger Membranen in Vorrichtungen für Zellkulturen ausprobiert. Unser **wirtschaftlich vielversprechendster Ansatz** besteht in einer Vorrichtung gemäß Fig. 1a -1c.

Fig. 1a zeigt eine Aufsicht auf die Zellkulturvorrichtung.  
Fig. 1b zeigt eine Seitenansicht der Zellkulturvorrichtung.  
Fig. 1c zeigt einen Schnitt durch die Zellkulturvorrichtung entlang dem in Fig.1a gezeichneten Querschnitt A-A.

Die Vorrichtung hat eine erste gasdurchlässige Membran 2a und eine zweite gasdurchlässige Membran 2b, die so von einem Rahmen 1 gehalten werden, dass eine Zellkulturkammer 4 zwischen den beiden gegenüberliegenden Membranen 2a, 2b und dem Rahmen 1 gebildet wird. Die Verwendung von zwei gasdurchlässigen Membranen 2a, 2b an gegenüberliegenden Seiten des Rahmens **vergrößert die Oberfläche, die für den Gasaustausch zwischen der Kultur und dem Inkubator zur Verfügung steht.** Die Vorrichtung hat mindestens eine dicht wiederverschließbare Aussparung 3a, 3b im Rahmen 1, durch die Stoffe in die Kulturkammer eingebracht oder aus ihr entnommen werden können.

*zugrunde*  
25

*< ?*



[009] Es ist uns gelungen, diese Vorrichtung in einer Vielzahl von Formen und Größen herzustellen, um den Bedürfnissen unserer Kunden zu entsprechen. Wir haben jedoch festgestellt, dass mit einem durchschnittlichen Abstand zwischen den Membranen von rund 1 mm bis 5 mm die optimale Menge Raum für das Zellwachstum und zugleich für  
5 ausreichenden Gaskontakt bereitgestellt wird.

[010] Der Rahmen kann aus jedem Material bestehen, das den erforderlichen strukturellen Zusammenhalt besitzt, um die Vorrichtung relativ starr zu machen, und das für den Kontakt mit den Zellen geeignet ist. Zum Beispiel kann der Rahmen aus einer  
10 biokompatiblen Zusammensetzung bestehen, die einen geeigneten Kunststoff oder thermoplastischen Stoff umfasst. Die Abmessungen des Rahmens hängen zumindest teilweise von der Art des verwendeten Materials ab. Wir fertigen die Vorrichtung üblicherweise in rechteckiger Form an, sodass sie leicht von einem standardisierten  
15 Probenhalter für ein Mikroskop festgehalten werden kann. Aus demselben Grund sind die meisten unserer Vorrichtungen rund 10 cm bis 15 cm lang, rund 7 cm bis 9 cm breit und rund 0,2 cm bis 2 cm hoch, wobei die Membranen jeweils eine Dicke von 0,05 mm bis 0,15 mm haben.

[011] Die Verwendung von zwei Membranen 2a, 2b und einem Rahmen 1 zur Bildung  
20 der Zellkulturkammer 4 hat den Nachteil, dass das Flüssigmedium und die Zellen nicht eingebracht oder entnommen werden können, indem einfach wie in D1 beschrieben der Deckel geöffnet wird. Deshalb ist es wesentlich, dass die Zellkulturvorrichtung eine dicht  
wiederverschließbare Öffnung aufweist. Zwei alternative Lösungen zur Bereitstellung  
einer dicht wiederverschließbaren Öffnung sind möglich: entweder umfasst der Rahmen  
25 mindestens eine dicht wiederverschließbare Aussparung 3a, 3b wie oben beschrieben, oder mindestens eine Membran 2a, 2b ist eine dicht wiederverschließbare Membran wie in D2 beschrieben. Folglich umfasst zur Ausführung der Erfindung der Rahmen der  
Zellkulturvorrichtung mindestens eine dicht wiederverschließbare Aussparung 3a, 3b  
30 oder/und mindestens eine der Membranen 2a, 2b ist dicht wiederverschließbar am Rahmen 1 befestigt.



A

[012] Erste Ausführungsform: Die dicht wiederverschließbare Aussparungen 3a, 3b ermöglichen es dem Benutzer, Flüssigmedium und Zellen in die Vorrichtung einzubringen und sie nach Abschluss des Zellkulturprozesses zu entnehmen. Damit die Vorrichtung auslaufsicher ist, muss die Aussparung 3a, 3b dicht wiederverschließbar sein, sodass sie nach dem Öffnen wieder komplett verschlossen werden kann. Wir bevorzugen die Verwendung einer Dichtung; diese ist eine Art mechanischer Verschluss. Wenn die Spitze einer Nadel in die Dichtung gesteckt wird, liegt die Dichtung um die Spitze herum an, sodass sie einen auslaufsicheren Verschluss bildet, und verschließt sich nach dem Herausziehen der Spitze wieder. Idealerweise besteht die Dichtung aus einem elastomeren Material, das leicht verformbar ist und dann wieder zurückspringt. Das elastomere Material kann natürlich sein, z. B. Naturkautschuk, oder künstlich, z. B. Silikonkautschuk oder Fluorcarbonkautschuk.

A

A

[013] Die Aussparung 3a, 3b ist auch ein potenzielles Einfallstor für die Infizierung der Zellkultur durch Mikroben aus der Umgebung. Wir haben es deshalb für vorteilhaft erachtet, eine Dichtung zu verwenden, die ein elastomeres Material zusammen mit einem darin eingebundenen antimikrobiellen Wirkstoff enthält. Am Markt sind viele verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe erhältlich, die verwendet werden können, wie beispielsweise Triclosan oder Chlorxylenol.

A

[014] Es ist nützlich, wenn der Rahmen zwei oder mehr Aussparungen 3a, 3b aufweist, denn so kann der Benutzer durch die eine Aussparung 3a Stoffe in die Kulturkammer einbringen (wie etwa frisches Medium), während andere Stoffe (wie Luft oder verbrauchtes Medium) durch die andere Aussparung 3b entnommen werden. Die meisten unserer Kunden verwenden für den Zugang zur Zellkulturkammer eine Nadel und Spritze in Standardgröße. Deshalb ist es vorteilhaft, wenn jede Aussparung einen Durchmesser hat, im Allgemeinen von 1 mm bis 2 mm, der groß genug ist, dass eine Standardnadel hindurchpasst. Vorteilhaft ist es auch, wenn der Rahmen so dick und der Durchmesser der einen oder mehreren Aussparungen so begrenzt ist, dass die Nadelspitze nicht mit einer der beiden Membranen in Kontakt kommen und sie durchstechen kann.

A

A

A



5 [015] Wenn eine Aussparung 3a, 3b im Rahmen 1 als dicht wiederverschließbare  
Öffnung verwendet wird, ist es wesentlich, dass beide Membranen 2a, 2b so an den  
Rahmen 1 gefügt werden, dass das Flüssigmedium nicht entweichen kann. Die  
Membranen können mittels eines Klebstoffs, etwa eines Schmelzklebstoffs, am Rahmen  
angebracht werden. Wir bevorzugen es jedoch, dass jede Membran durch  
10 Ultraschallschweißen am Rahmen befestigt wird, d. h. Membran und Rahmen werden  
so miteinander verschmolzen, dass eine auslaufsichere Abdichtung zwischen Membran  
und Rahmen entsteht. Wir denken, dass diese Verfahren zur Herstellung der  
Zellkulturvorrichtung kommerziell interessant sein könnten.

15 [016] Zweite Ausführungsform: Statt einer Aussparung im Rahmen kann alternativ eine  
Membran 2b dicht wiederverschließbar sein, sodass die Vorrichtung mehrmals geöffnet  
und wieder verschlossen werden kann. Dies ermöglicht eine einfachere Entnahme von  
Proben aus der Zellkultur oder die Zugabe von Zellkultur-Flüssigmedium.

20 [017] Wird die dicht wiederverschließbare Öffnung mittels einer dicht  
wiederverschließbaren Membran 2b verwirklicht, müssen andere Klebstoffe zur  
Befestigung der dicht wiederverschließbaren Membran an den Rahmen verwendet  
werden als bei der ersten Ausführungsform. Für die zweite Ausführungsform ist es  
wesentlich, dass der Klebstoff druckempfindlich ist, sodass die dicht  
wiederverschließbare Membran, wenn sie auf den Rahmen zurückgedrückt wird, eine  
auslaufsichere Abdichtung bildet. Der druckempfindliche Klebstoff hinterlässt keine  
klebrigen Rückstände, wenn die dicht wiederverschließbare Membran vom Rahmen  
abgezogen wird, und erlaubt somit ein mehrmaliges Öffnen und Verschließen der  
25 Membran. Es werden im Handel viele verschiedene Arten von druckempfindlichen  
Klebstoffen angeboten, und alle von uns getesteten haben ordnungsgemäß funktioniert.

A  
A

A



[018] Dritte Ausführungsform: Die erste und die zweite Ausführungsform können auch derart kombiniert werden, dass der Rahmen mindestens eine dicht wieder-

5

[019] Die Verwendung von zwei gegenüberliegenden Membranen 2a, 2b und einem Rahmen 1 zur Bildung der Zellkulturkammer 4 erlaubt nur die drei oben beschriebenen Ausführungsformen. Für die zweite und dritte Ausführungsform ist es wesentlich, dass

10

der Klebstoff druckempfindlich ist. Bei allen drei Ausführungsformen ist es vorteilhaft, dass die erste und die zweite Membran direkten Luftkontakt haben, um Gasaustausch zu ermöglichen. Dies kann durch ein Gestell verwirklicht werden, das die Vorrichtung so im Inkubator halten kann, dass es zwischen jeder Membran und dem Inkubator genügend Raum für Luftzirkulation gibt.

15

[020] Wie oben erläutert, kann die Vorrichtung in einem Verfahren zur Zellkultivierung verwendet werden. Ein typisches Verfahren zur Zellkultivierung in unserer Vorrichtung beinhaltet die folgenden Schritte:

20

- a) Suspendieren der zu kultivierenden Zellen in einer angemessenen Menge eines Zellkulturmediums zur Bildung einer Zellsuspension,
- b) Einbringen der Zellsuspension in die Zellkulturvorrichtung,
- c) Inkubieren der Zellkulturvorrichtung, die die Zellsuspension enthält, unter Bedingungen, die Zellwachstum ermöglichen.

25

[021] Wenn eine besonders hohe Zellwachstumsrate erforderlich ist, kann die Zellkulturkammer komplett mit Zellsuspension gefüllt sein, sodass es keinen Kopfraum gibt, der Luft enthält. So kann ein Absinken des pH-Werts verhindert werden, das durch aufgelöstes CO<sub>2</sub> aus dem Kopfraum verursacht wird. Wenn die Kulturkammer komplett mit Suspension gefüllt ist, kann die Vorrichtung außerdem gekippt oder leicht geschüttelt werden, ohne dass sich Schaum bildet, der das Zellwachstum beeinträchtigen könnte.

30

Mit freundlichen Grüßen

Herr B. Kenobi

A



Nicht  
benötigt?

Oder doch?

A



UA

nicht  
benötigt.



Zeichnungen der Anmeldung

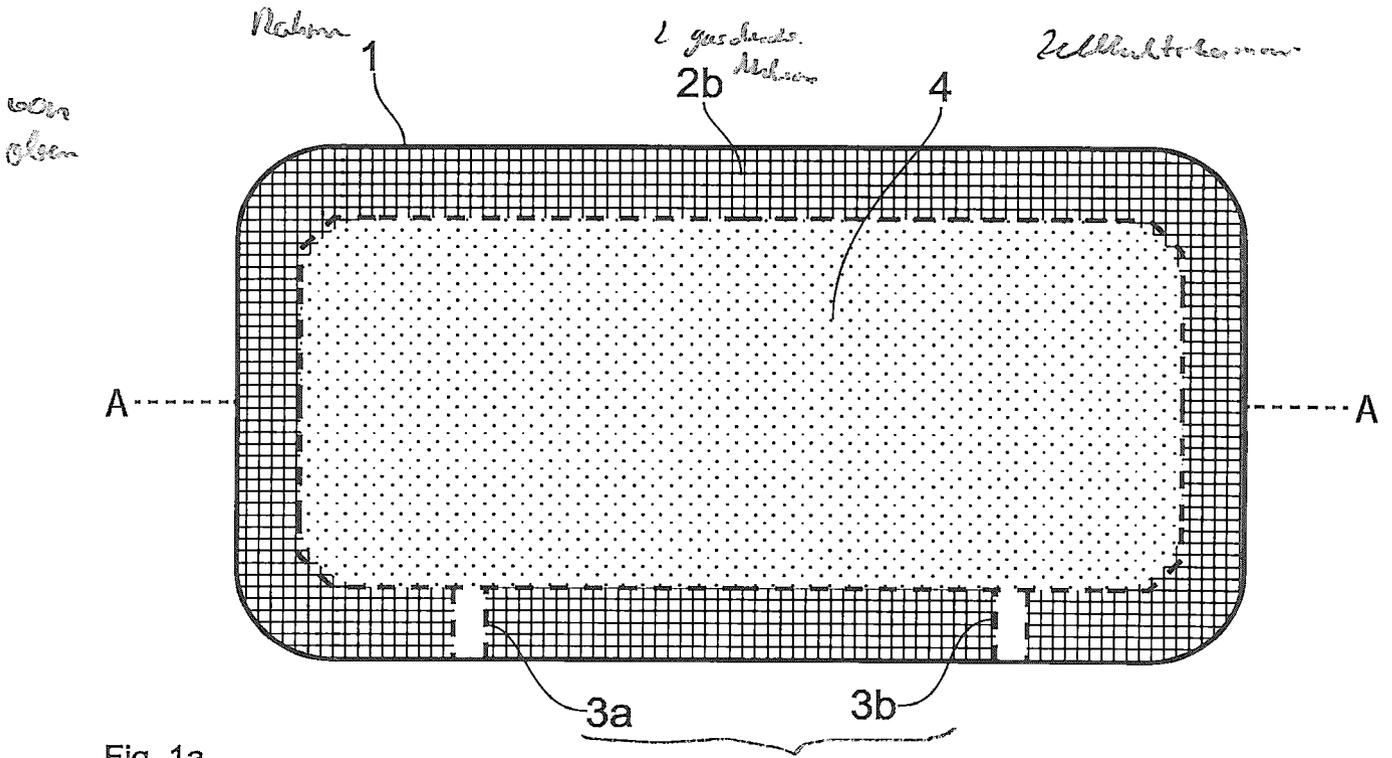


Fig. 1a

dient zur Verankerung des Anlagens

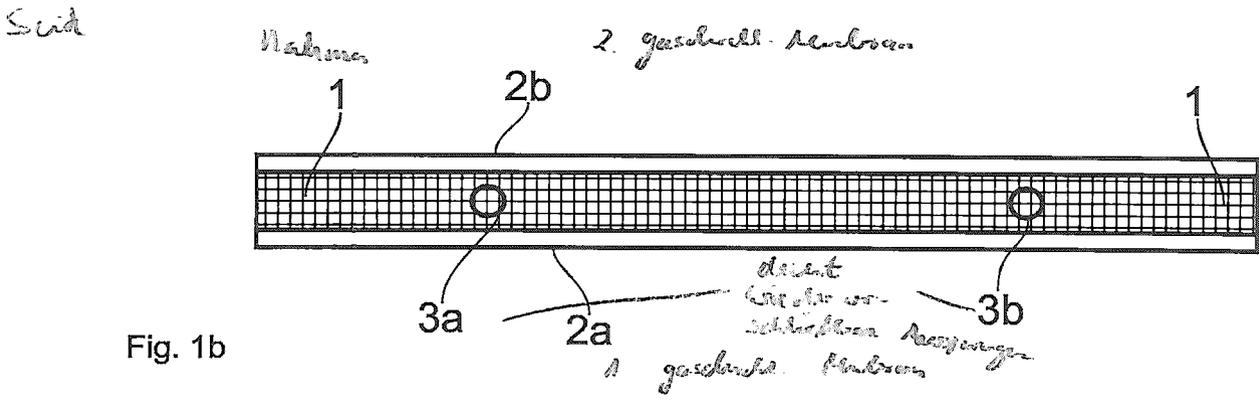


Fig. 1b

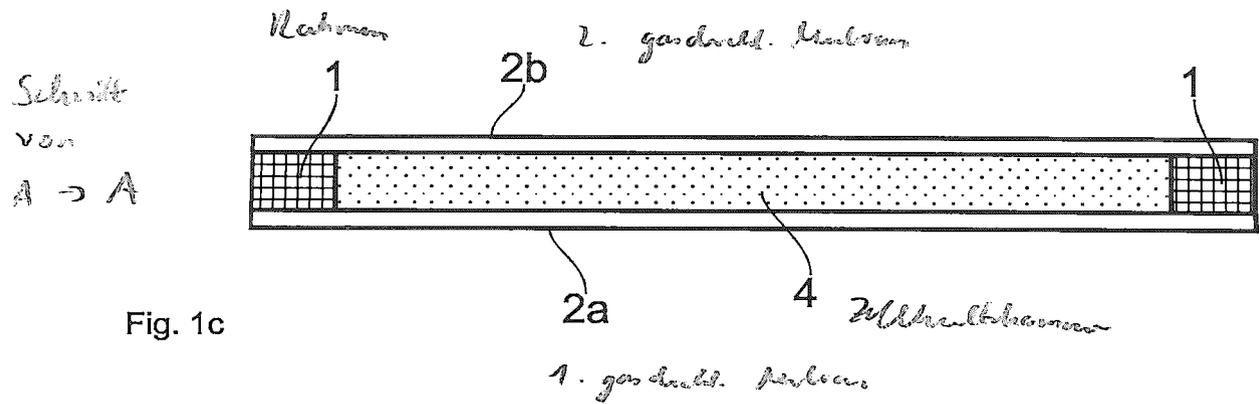


Fig. 1c



Dokument D1

Auszug aus einem Lehrbuch

5 [001] Als Zellkultur wird die Entnahme von Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung und ihre anschließende Anzucht in einer künstlichen Umgebung bezeichnet. Geeignete künstliche Umgebungen bestehen typischerweise aus einem Behälter, der ein Zellkulturmedium enthält, welches die für das Wachstum wesentlichen Nährstoffe liefert. Die Zellen benötigen auch verschiedene Gase, insbesondere Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>). Zellen werden bei einer angemessenen Temperatur und in einer  
10 angemessenen Gasmischung in einem Zellinkubator gezüchtet und aufbewahrt.

[002] Ein herkömmlicher Behälter in Form einer Multi-Well-Platte ist in Fig. 1 gezeigt. Die Platte 11 besteht aus einer flachen Oberfläche, die eine Reihe von Kavitäten („Wells“) 12 umfasst, die für das Zellkulturmedium und die Zellen vorgesehen sind.  
15 Während der Verwendung sind die Kavitäten von einem luftdichten Deckel 13 bedeckt, der sicher befestigt ist und die Kavitäten dicht verschließt. Platten sowie Deckel bestehen typischerweise aus einem starren, luftdichten Kunststoff wie Polystyrol. Die Platten und Deckel sind auch optisch transparent, sodass die Beobachtung der Zellen während der Kultur ermöglicht wird. Eine oder mehrere Oberflächen der Kavitäten  
20 können behandelt sein, um das Anhaften von adhären Zellen zu ermöglichen, z. B. durch Beschichtung der Oberfläche mit einem Stoff wie Kollagen.

*Netz e  
Deckel  
luftdicht*

[003] Einzelne Kavitäten 12 müssen möglicherweise mit Flüssigmedium wiederaufgefüllt werden, ohne das Zellwachstum in anderen Kavitäten zu stören. Zu diesem Zweck kann  
25 eine dicht wiederverschließbare Aussparung im Deckel oder in der Platte vorgesehen werden, die den individuellen Zugang zu einzelnen Kavitäten gewährt. Statt eines starren Deckels kann eine gasdurchlässige Membran verwendet werden. Eine solche Membran ist am Markt unter dem Handelsnamen GasEasy™ erhältlich.

*Deckel  
+ DZ nicht  
luftdicht*



[004] Die optimalen Bedingungen für die Zellkultur unterscheiden sich für jede Art von Zelle. Alle Verfahren zur Zellkultivierung beinhalten jedoch dieselben grundlegenden Schritte, nämlich:

- 5 a) Suspendieren der zu kultivierenden Zellen in einer angemessenen Menge eines Zellkulturmediums zur Bildung einer Zellsuspension,
- b) Einbringen der Zellsuspension in das Zellkulturgefäß,
- c) Inkubieren der Zellkulturvorrichtung, die die Zellsuspension enthält, unter Bedingungen, die Zellwachstum ermöglichen.

*Anspruch  
Verfahren*

10 Bedingungen für das Zellwachstum, wie die angemessene Temperatur und der angemessene Druck, sind im Stand der Technik wohlbekannt.

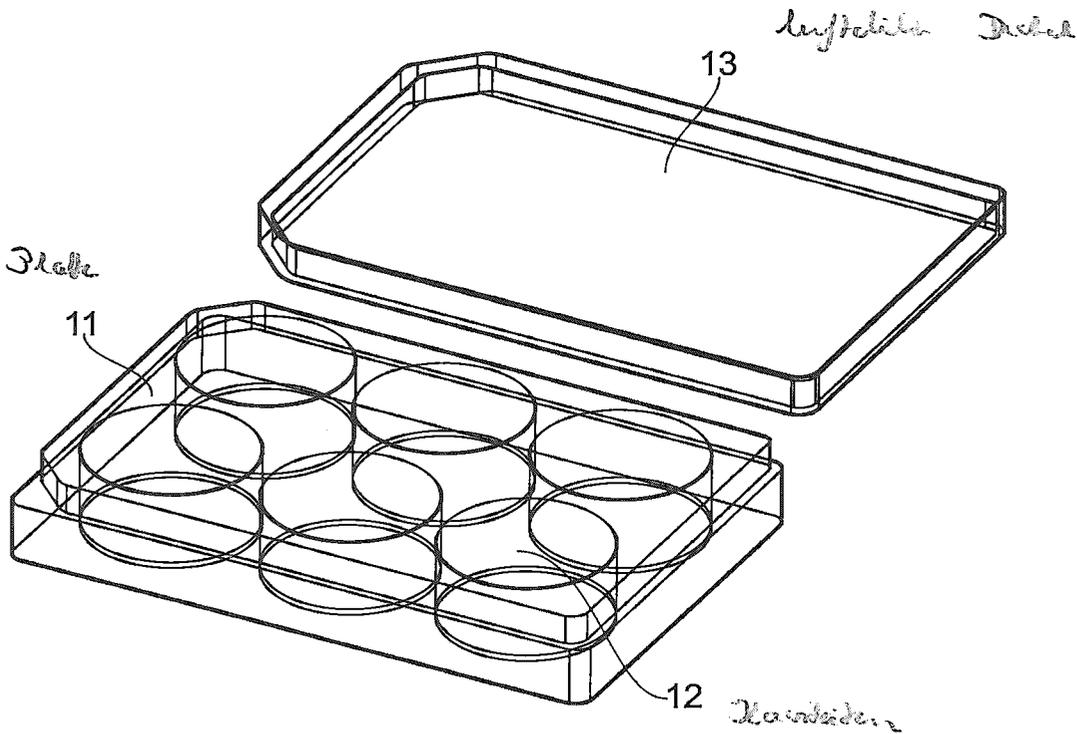


Fig. 1

*Multi-well-Platte*



## Dokument D2

### Produktinformation

5 [001] Die Abdichtfolie GasEasy™ sorgt auf einfache und effektive Weise dafür, dass Gase in Zellkulturen gelangen können, und bildet zugleich eine Barriere gegen Kontamination. GasEasy™ ist eine adhäsive, gasdurchlässige und flüssigkeitsundurchlässige Membran, die zur Abdichtung der Öffnungen eines Zellkulturbehälters verwendet werden kann. Die Folie hinterlässt keine klebrigen Rückstände, wenn sie abgezogen wird, und ermöglicht somit, dass die Öffnung  
10 mehrmals geöffnet und dicht wieder verschlossen werden kann.

→ DM  
in  
Platte  
Deckel  
✓

[002] GasEasy™-Folien ermöglichen einen raschen, gleichförmigen Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid für optimales Zellwachstum. Sie sind hochgradig gasdurchlässig und weisen bei Atmosphärendruck ( $10^5$  Pa) und 37 °C eine  
15 Gaspermeationsrate von rund  $1,5 \times 10^{-16} \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{Pa})$  für  $\text{O}_2$  und von rund  $6 \times 10^{-16} \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{Pa})$  für  $\text{CO}_2$  auf.

[003] GasEasy™ besteht aus einer Membran, die Polyethylen enthält, das so beschaffen ist, dass es in einem Bereich von Temperaturbedingungen stabil bleibt. Die  
20 Folie kann auch leicht abgezogen und wieder platziert werden, was die einfache Entnahme von Proben aus der Zellkultur oder die Zugabe von Zellkulturmedium ermöglicht. Die Folie ist flexibel und vollkommen transparent. Weil die GasEasy™-Membran flüssigkeitsundurchlässig ist, verhindert sie auch das Verschütten von Zellkulturmedium.

25 [004] GasEasy™ eignet sich hervorragend für die auslaufsichere Abdichtung von Multi-Well-Platten, wie in Fig. 1 gezeigt. Es reicht, die adhäsive Folie oder Folien einfach über die Oberfläche der Platte zu legen und anzudrücken, sodass sie um den Rand jeder Kavität herum dicht abschließt. Um eine auslaufsichere Abdichtung sicherzustellen, ist  
30 fester und gleichmäßiger Druck auszuüben. Zu diesem Zweck kann ein Hartgummiroller verwendet werden. Bei großen Multi-Well-Platten können mehrere Folien nebeneinander angeordnet werden.



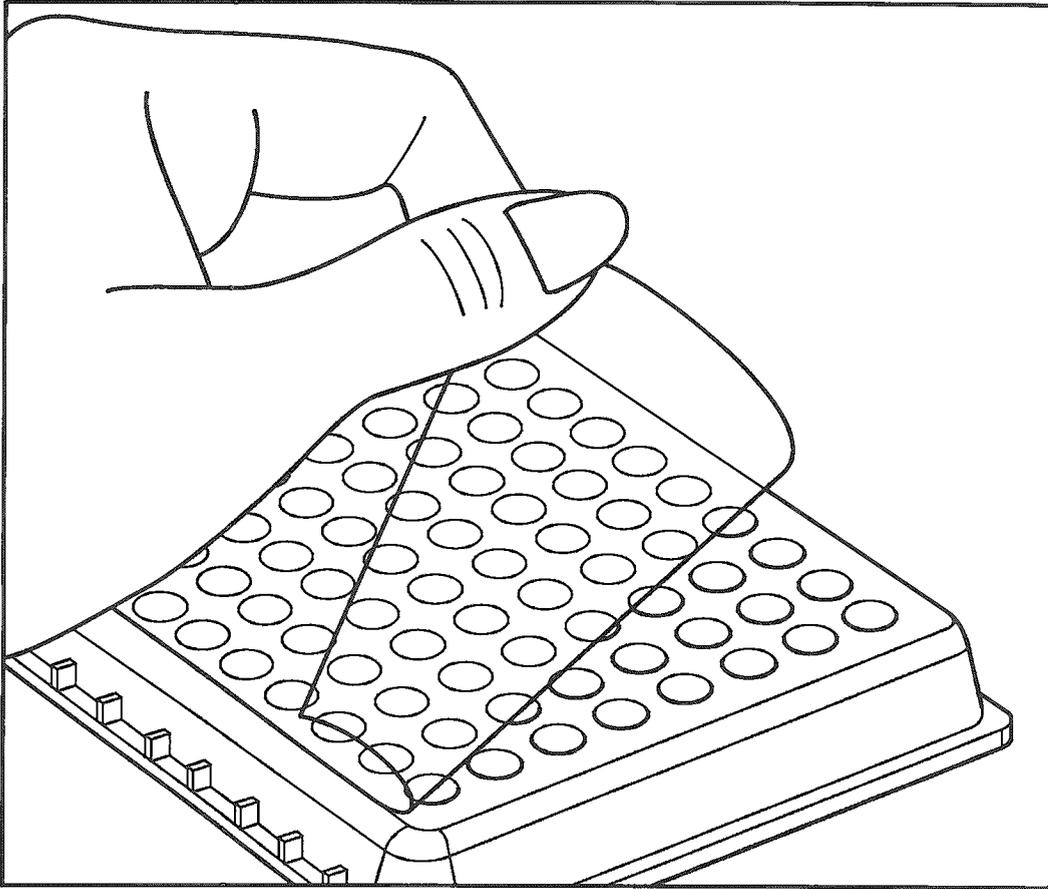


Fig. 1

