(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) 143568 B

(21) Ansøgning nr. 2264/77

(51) Int.Cl.³ C 12 N 5/02

(22) Indleveringsdag 24. maj 1977

(24) Løbedag 24. maj 1977

(41) Alm. tilgængelig 29. nov. 1977

(44) Fremlagt 7. sep. 1981

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 28. maj 1976, 2624047, DE

(71) Ansøger DR. RENTSCHLER ARZNEIMITTEL GMBH & CO., 7958 Laupheim, DE.

(72) Opfinder Rastislav Skoda, DE: Waldemar Pakos, DE.

(74) Fuldmægtig Kontor for Industriel Eneret v. Svend Schønning.

(54) Fremgangsmåde og apparat til massedyrkning af diploide celler.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde af den i indledningen til krav 1 angivne art til massedyrkning af diploide celler.

Der behøves normale diploide celler til mange formål, fx til produktion af vacciner og celleprodukter til menneskelig anvendelse og til forskningsformål. Heteroploide celler kan ikke bruges til sådanne formål da de er cancerøse, selv om dyrkningen deraf ville være væsentligt simplere.

Normale diploide celler vokser kun på cellevenlige overflader til hvilke de hæfter sig fast og danner en lukket, tæt cellegruppe (monolag). Dette muliggør på den ene side en hurtig udskiftning af mediet uden fracentrifugering af cellerne, og på den anden side dannes der dog kun en bestemt, af overfladens størrelse afhængig mængde celler. Til formering udløses cellerne ved hjælp af proteolytiske enzymer som fx trypsin, eventuelt i kombi-

DK 143568 B

nation med EDTA, fra overfladen. Efter ansætning i en dyrkningsbeholder hæfter cellerne sig fast i løbet af tre timer og opnår den for den givne slags celle typiske form på ca. 8 timer. Alt efter ansætningens tæthed og vækstens hurtighed (celledeling) danner der sig i løbet af 1 eller nogle dage den tætte cellebestand. Så snart cellerne har en bestemt tæthed pr. cm^2, afhængig af den givne cellestamme, hører de op med at formere sig. Princippet med dyrkning af celler på overfladen af en substans sætter derfor en naturlig grænse for produktionen i den enkelte enhed.

Selv om der teoretisk kunne være en plan overflade på indtil 100 x 100 cm (1 m^2) synes en praktisk løsning af problemet på denne måde umulig, da sterilitet og hyppigt også en lukket atmosfære må sikres, hvorfor kun flade flasker, såkaldte Roux-skåle i praksis kan komme i betragtning; forstørrelse af disse til såkaldte penicillinskåle har dog kun tilvejebragt en 2 til 3 gange så stor flade (Roux-skåle af glas eller af plast: 100-200 cm^2; penicillinskåle: 600 cm^2).

Roux-skålene er blevet overtaget til dyrkning af celler fra bakteriologien, hvor de blev indført for ca. 100 år siden og hvor de indtil nu ikke har kunnet erstattes af noget bedre.

I flere år har man bestræbt sig på at finde en praktisk løsning på problemet med forstørrelse af den indvendige overflade i en beholder, og flere muligheder har været foreslået:

Krumning af overfladen til et rør som stadig drejes så at cellerne ganske vist vokser på hele den indvendige overflade, men dog kun i den nederste 1/5 - 1/3 er dækket med næringsmedium. Der kendes flere systemer for disse såkaldte Roller-rør, hos hvilke fladen i en beholder er blevet forstørret til 500-1300 cm^2. Ved anordning af indtil nogle 100 rør i etager over hinanden er der opnået produktionsenheder på indtil 7200 Roller-flasker. Ulempen ved sådanne systemer består i at hvert rør er en enhed som må bearbejdes særskilt, hvilket teknisk er meget kostbart. Automatisering er hidtil mislykkedes i praksis.

Det har været foreslået at forstørre overfladen af et rør ved at indlægge en snekke (spiral) af cellevenligt plastmateriale (W. House, Bulk Culture of Cell Monolayers, side 338-344), hvilket har ført til udvikling af en 2-20 liter stor kolbe med 8000-80000 cm^2. Efter dette system skal der kunne opnås 5-10 celleformeringer, hvilket dog ikke har bekræftet sig i praksis, da cellerne i spira-

lens indvendige vindinger vokser meget sparsomt. Også her må man se en ulempe i at hvert rør udgør en enhed som må bearbejdes særskilt, hvilket teknisk er meget kostbart. Foruden en forholdsvis høj pris pr. beholder er der også ved dette system den ulempe at automatiseringen i praksis frembyder store vanskeligheder.

Princippet med roterende overflader er også udnyttet i et fra tysk fremlæggelsesskrift nr. 22 36 240 kendt apparat til dyrkning af vævsceller og mikroorganismer, forsynet med en i en beholder anbragt roterbar flade, idet denne er således opviklet i spiral på en i det væsentlige vandret, drejelig aksel, at der holdes afstand mellem vindingerne og spiralfladen i begge ender afsluttes mod beholderen af runde skiver der ud for den inderste vinding er åben mod beholderen ved hjælp af åbninger. Dette apparat har den ulempe at der ikke er ens betingelser i alle spiralens områder for cellevæksten, hvilket fører til uregelmæssig udvikling af cellegrupperne. Dertil kommer at det således kendte apparat er teknisk kompliceret at fremstille, at det næppe kan fremstilles på økonomisk måde af glas foreslået i skriftet og af tekniske grunde næppe af polystyren. Noget lignende gælder for de også i skriftet foreslåede udveje, nemlig at fremstille apparatet af stål med overtræk af glasemalje eller af polykarbonat.

Et andet forslag er gået ud på at forstørre overfladen i en beholder ved indlægning af mangelagede stabler af plader af glas, metal eller formstof. Et af Weiβ og Schleicher (1968) foreslået system består af mange plader af vinduesglas, fjernet 6 mm fra hinanden og indlagt i 1-200 liter store tanke. Lignende modeller af titan er i to størrelser (18000 og 72000 cm^2) bragt på markedet af firmaet New Brunswick Scientifics (NBS).

I hovedpladen i den netop nævnte model befinder der sig studser til gastilførsel, mediumudskiftning osv. Cellevæksten finder sted i pladernes vandrette eller lodrette stilling, med eller uden rulning af hele beholderen.

En ulempe ved dette system består i at der behøves en stor mængde medium i forhold til overfladen.

Endvidere er det blevet foreslået at forstørre overfladen i en beholder ved indlægning af glasperler (Gey, 1933, Robineaux, 1970, Rüdiger 1975) eller "Sephadex"-småkugler (van Wezel, Growth of Cell-Strains and Primary Cells in Microcarriers in homogenous

culture, 1967 side 216; Horug et al., 1974; "Sephadex" er et i Danmark indregistreret varemærke for et tværbundet dextran-produkt) i mediet i beholderen. Der findes beholdere på 1-3 liter, der i første tilfælde drives som hvilende monolag-kultur og i andet tilfælde som suspensionskultur. I begge tilfælde er der indbygget muligheder til måling og tilpasning af omgivelsesbetingelserne, fx med hensyn til CO_2, O_2, temperatur, pH, glukose osv.

Ulempen ved dette system består i nødvendigheden af store mængder medium i forhold til cellerne og vanskeligheder ved celleudvindingen.

En fuldstændig ny mulighed for massedyrkning af celler betyder det såkaldte "Hollow Fiber Cartridge System", der udgøres af et bundt kapillærer af cellevenligt formstofmateriale som befinder sig i et rørkammer. Cellerne vokser på kapillærernes udvendige overflade, der fortløbende perfunderes med vækstmedium. De for tiden eksisterende modeller har en overflade på ca. 100 cm^2, hvilket ikke er tilstrækkeligt til masseproduktion af celler.

Det kan siges at ingen af de hidtidige systemer til massedyrkning af celler har nået et stadium med operationel, driftsikker og rutinemæssig produktion af celler eller af celleprodukter til parenteral anvendelse hos mennesker. I praktisk henseende er der ikke med noget system opnået en virkelig massedyrkning af celler, og i teoretisk henseende er alle systemer behæftet med tungtvejende ulemper, fx med mulighed for mikrobiel og cellulær forurening og vanskeligheder med rationalisering og automatisering.

Et system til massedyrkning af celler som imødekommer de praktiske behov bør tilfredsstille følgende kriterier:

Systemet skal muliggøre en langvarig dyrkning af diploide celler indtil tidspunktet for deres mulige, dvs. teoretisk på grundlag af en mutationsrate på $1:10^6$ til $1:10^{12}$ beregnelige transformation eller indtil deres død, hvorved cellernes specielle funktion såsom produktion af interferon må bevares. I systemet skal cellerne i minimal grad udsættes for biologiske risici ("biohazards"), dvs. indvirkning af fremmede stoffer og omverdenen, navnlig i perioden for indhøstning og ansætning (udsåning). Desuden skal fremstillings- og produktionsomkostningerne være realistiske fra et økonomisk synspunkt.

Det har nu vist sig at det er muligt at forøge den nyttige flade til celledyrkning væsentligt og samtidigt udføre de for dyrkningen nødvendige arbejdsgange for et antal nytteflader samtidig og fælles, hvilket tillader en vidtgående rationalisering og automatisering af dyrkningen. Dette opnås ved den foreliggende fremgangsmåde, der er af den fra tysk fremlæggelsesskrift nr. 1.924.191 til mikroorganismedyrkning i og for sig kendte art, ved hvilken man

a) indfører næringsmediet, cellesuspensionen og andre opløsninger gennem en central forsyningskanal 1 (se den senere nærmere beskrevne tegning) i den nedre del af et ved stabling af ensrettede flade kar dannet system af indbyrdes kommunikerende kamre 2 med i det væsentlige lodret anbragte karbunde 3 (position A) og lader væsken eller væskerne fordele sig efter princippet for kommunikerende rør, idet der samtidig gennem en i den øvre del af kammersystemet værende central luftnings- og udluftningskanal 4 sker lufttrykudligning, og

b) efter lukning af ventiler 5 og 6, der regulerer nævnte tilførsel og luftningen eller udluftningen ved svingning af kammersystemet til vandret stilling (position B) fordeler cellesuspensionen, næringsmediet og andre opløsninger på nyttefladen af de nu i det væsentlige vandrette kars nytteflade (3) og gennemfører dyrkningen af cellerne, såfremt man ifølge opfindelsen efter afslutning af cellernes vækst og tilbageføring af kammersystemet til den lodrette stilling udvinder cellesuspensionen eller celleprodukterne. Cellesuspensionen eller produkterne flyder bort gennem den centrale forsyningskanal.

Ifølge opfindelsen kan man under dyrkningen af cellerne holde det i hovedsagen vandret anbragte kammersystem i bevægelse ved hjælp af en vippeindretning. Det er en meget simpel måde til at opretholde bevægelsen på, og bevægelsen sikrer en ensartet sammen-

sætning af næringsmediet under dyrkningen.

Opfindelsen angår også et apparat til udøvelse af den beskrevne fremgangsmåde. Det er ejendommeligt ved det i krav 3 angivne.

Et sådant apparat skal beskrives nærmere i det følgende under henvisning til tegningen. På denne viser

fig. 1 apparatet i tværsnit i lodret stilling af de enkelte kamre eller kar, som den anvendes når apparatet fyldes og tømmes (stilling A),

fig. 2 samme apparat i tværsnit med karrene eller kamrene i vandret stilling som den foreligger under selve dyrkningen og

fig. 3 perspektiviske gengivelser af et par udførelsesformer for de enkelte kar eller kamre som indgår i det i fig. 1 og 2 viste apparat.

Kammersystemet består af et antal flade kar eller trug hvis nytteflade eller bund 3 kan have forskellige ønskede størrelser (dog ens i det enkelte apparat), idet størrelsen i betydelig grad beror på de tekniske muligheder for fremstillingen deraf. De enkelte kar eller kamre 2 kan have som nævnt en som vækst- eller nytteflade tjenende indre bundflade 3 og er forsynet med sidevægge 9 (fig. 3) hvis højde fortrinsvis er mellem 5 og 20 mm. Naturligvis kan karbunden og karvæggen også være udført hver for sig og være stablet sammen til kammersystemet ifølge opfindelsen. I to hjørner af den korte sidevæg er der overløb 10 som kan have form af fx et rør eller en firkant, og overløbenes højde kan være den samme som den lave sidevæg (karret 7) og således at der i den øvre del deraf er en eller flere åbninger 11 der tjener til tilførsel af væske henholdsvis til luftning eller udluftning af vedkommende kammer. Overløbene kan også være lavere end sidevæggene (som vist i karret 7a), hvorved nødvendigheden af de særlige åbninger 11 bortfalder. Højden af sådanne lavere overløb bestemmes af at der ved den i hovedsagen vandrette stilling (position B, fig. 2) ikke må løbe nogen væske ud i den centrale forsynings- eller luftningskanal.

Et antal sådanne kar, fx 10-20, danner en karstabel med 10-20 kamre, idet de enkelte kar holdes tæt sammen ved hjælp af tætningsringe eller ved at være klæbet til hinanden, idet de yderligere kan sammenholdes ved hjælp af skruer. Overløbene i de enkelte kar danner i stablen to kanaler hvoraf den ene tjener som

forsyningskanal 1 og den anden som luftningskanal og udluftningskanal 4 (fig. 1 og 2). Disse kanaler kan lukkes ved hjælp af ventiler 5 og 6, klemskruer eller lignende organer. I stablens lodrette stilling (A, fig. 1) befinder forsyningskanalen sig forneden og luftnings- og udluftningskanalen sig foroven. Forsyningskanalen har ved den forreste indgang hensigtsmæssigt en flervejsventil, mens luftningskanalen hensigtsmæssigt i den forreste ende har en tovejsventil med milliporefilter. Begge ledninger ender blindt.

Karrene kan bestå af et hvilket som helst til celledyrkning egnet materiale, fx glas eller formstof. Fortrinsvis består karrene af polystyren hvis overflade er behandlet indvendigt.

Forsyningen af kammersystemet sker i lodret stilling i henhold til princippet med kommunikerende rør. Forsyningskanalen er ved hjælp af slanger sluttet til et centralt forsynings- og udtømningssystem. Gastryksudligningen ved fyldningen eller tømningen sker gennem luftnings- og udluftningskanalen.

Efter fyldningen stilles det fyldte kammersystem i position B (fig. 2), hvorved begge kanaler står lodret og deres ind- og udgange er opadvendt. I denne vandrette inkubationsstilling fordeler mediet sig ensartet på de enkelte kamres nytteflade. De to kanaler er altså på denne måde i lodret stilling og åbningerne for de enkelte kamre befinder sig i en vandret stilling tæt ved kammerets øverste del, ikke langt under bunden for det ovenover liggende kammer, hvorved væskens sammenhæng er afbrudt og den oprindelig enkelte væskesøjle (vist skraveret i den nedre del af fig. 1) er opdelt i et antal lave væskesøjler (vist skraveret i fig. 2), således at væskens bortflydning nedefter forhindres. I denne position er det muligt at foretage luftning fx med CO_2.

Til tømning bringes kammersystemet på den beskrevne måde, men i omvendt retning i lodret stilling (den i fig. 1 viste). Til tilførsel af yderligere stoffer kan næringsmediet overføres til en udtømningsbeholder hvor de ønskede stoffer kan tilsættes, hvorpå væsken kan føres tilbage til kammersystemet.

Ved en særlig hensigtsmæssig udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen anbringes kammersystemet under inkuberingen på en vippeindretning, hvorved mængden af næringsmedium kan nedsættes og cellernes vækst forbedres.

Et antal kammersystemer med fælles central forsyning kan forbindes på en fælles vippeindretning til en større enhed og be-

arbejdes som sådan. Det hele kan indbygges i et inkuberingsskab.

Eksempel på beregning af celleproduktionen

		1 cm^2 =	10^5 celler
1 kar	= 20 x 30 cm =	600 cm^2 =	6 x 10^7 celler
20 kar	= 1 stabel =	12.000 cm^2 =	1,2 x 10^9 celler
1 batteri	= 20 stabler =	240.000 cm^2 =	2,4 x 10^{10} celler

Mediumforbrug

	for 1 kar	1 stabel	1 batteri
til 1 mm - højde	60 ml	1.200	24.000 ml
til 2 mm - højde	120 ml	2.400	48.000 ml
til 3 mm - højde	180 ml	3.600	72.000 ml

De tekniske fordele ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og det til udøvelse af det tjenende kammersystem er navnlig følgende:

1. Ved forstørrelsen af den overflade der står til rådighed for cellevæksten og ved ensartetheden af betjeningsprocesserne sikres der ensartede betingelser for cellevæksten i hele systemet bestående af en stabel eller et batteri, hvorved den teoretiske sandsynlighed af celletransformation ved mutation på steder med afvigende betingelser nedsættes.
2. Den simple centrale forsyning og luftning nedsætter risikoen for såkaldt "biohazards" navnlig på tidspunktet for udsåningen, og risikoen for formering eller nedsat formering af cellerne ved mikrobiel eller cellulær forurening osv. til det mindst mulige.
3. Miljøfaktoren såsom CO_2, O_2, N_2, pH, næringsstoffer osv. kan let måles, kontrolleres, overvåges og reguleres.
4. Der muliggøres en forhøjet sterilitet ved alle arbejdsprocesser hvorved man kan undgå tilsætning af antibiotika.
5. Der sker en overordentlig god udnyttelse af rummet, dvs. at der muliggøres et godt forhold mellem dyrkningsflade og rumkrav.
6. Anvendelse af cellevenligt formstofmateriale, hensigtsmæssigt polystyren, hvor cellerne vokser bedst.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til massedyrkning af diploide celler og af den art, ved hvilken man

a) indfører cellesuspension, næringsmedium og andre opløsninger gennem en central forsyningskanal (1) i den nedre del af et ved stabling af ensrettede flade kar dannet system af indbyrdes kommunikerende kamre (2) med i det væsentlige lodretstillede karbunde (3) og lader den eller dem fordele sig efter princippet for kommunikerende rør, idet der samtidig gennem en i den øvre del af kammersystemet værende central luftnings- og udluftningskanal (4) sker lufttrykudligning, og

b) efter lukning af ventiler (5 og 6) der regulerer nævnte tilførsel og luftningen eller udluftningen ved svingning af kammersystemet til vandret stilling fordeler cellesuspensionen, næringsmediet og andre opløsninger på de nu i det væsentlige vandrette kars nytteflade (3) og gennemfører dyrkningen af cellerne, k e n d e t e g n e t ved at man efter afslutning af cellernes vækst og tilbageføring af kammersystemet til den lodrette stilling udvinder cellesuspensionen eller celleprodukterne.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at man under dyrkningen af cellerne holder det i hovedsagen vandret anbragte kammersystem i bevægelse ved hjælp af en vippeindretning.

3. Apparat til udøvelse af den i krav 1-2 angivne fremgangsmåde, k e n d e t e g n e t ved at et antal flade kar (7) under dannelse af en stabel med deres fri ydervægge er anbragt luft- og væsketæt på hinanden, at der i to hjørner af hvert kar er et i afstand over karbunden (3) anbragt åbent overløb (10) til det nærmest derunder værende kar, at de ensbeliggende overløb for de forskellige kar i det mindste tilnærmelsesvis ligger i flugt med hinanden, at overløbene i øverste og nederste kar er indrettet til at kunne lukkes og at de enkelte kar er forbundet med hinanden.

Fremdragne publikationer:
Tyske fremlæggelsesskrifter nr. 1924191, 2236240.

Fig.1
(A)

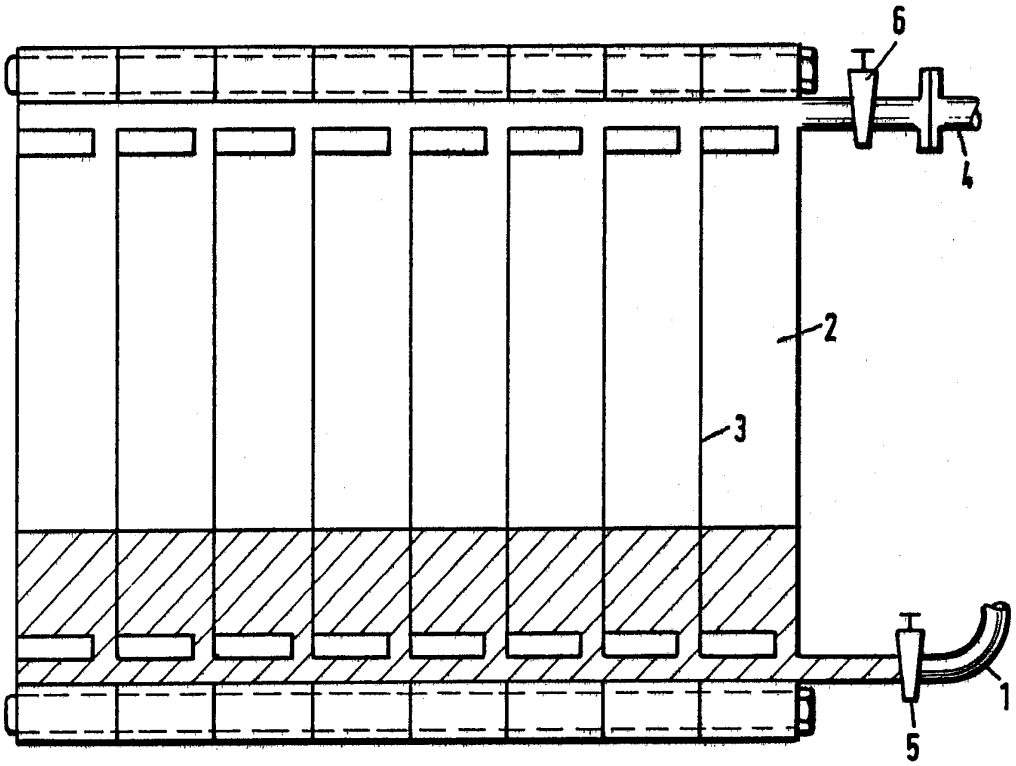


Fig.2
(B)

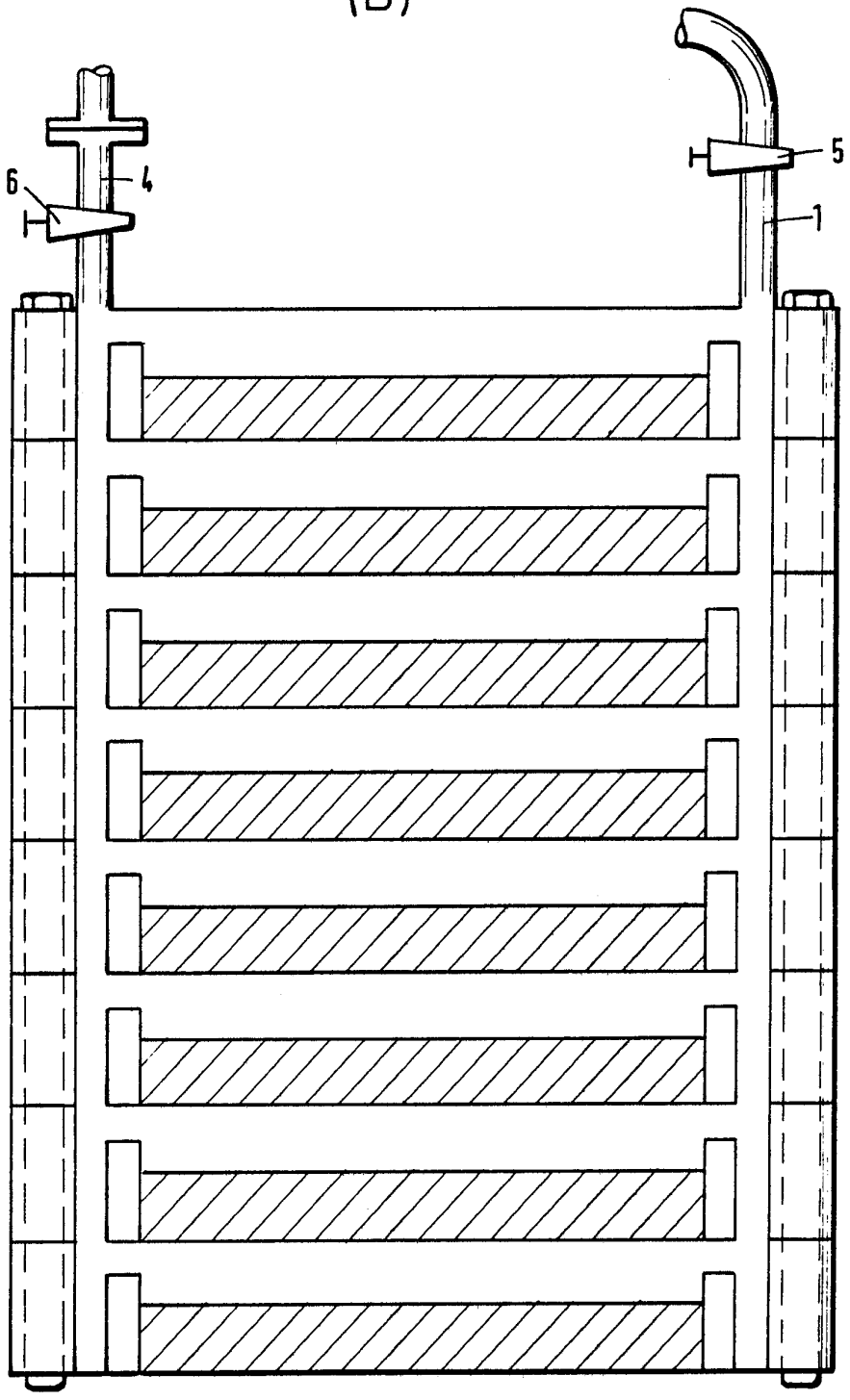


Fig.3

