CH 630 408 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 12 M 3/02
C 12 N 5/02

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11) **630 408**

(21) Gesuchsnummer: 7291/77

(22) Anmeldungsdatum: 15.06.1977

(30) Priorität(en): 15.07.1976 AT 5213/76

(24) Patent erteilt: 15.06.1982

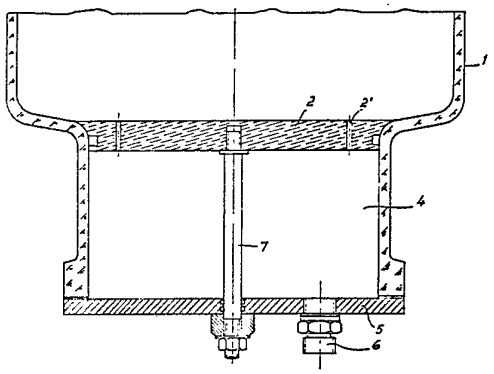
(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.06.1982

(73) Inhaber:
Chemap AG, Männedorf

(72) Erfinder:
Dipl.-Ing. Hermann Katinger, Wien (AT)
Winfried Scheirer, Wiener Neudorf (AT)

(54) Verfahren und Vorrichtung zum Züchten von tierischen und humanen Gewebezellen.

(57) In einem Verfahren und einer Vorrichtung zum Züchten von tierischen und humanen Gewebezellen werden die Gewebezellen durch Zufuhr eines sauerstoffhaltigen Gases in Suspension derart gehalten, dass sich die Zellen nicht absetzen können und trotzdem ausreichend mit Nährlösung und Gas versorgt werden. Die Vorrichtung besteht aus einem geschlossenen Behälter mit einer zylindrischen Leiteinrichtung, die so dimensioniert ist, dass innerhalb und ausserhalb der Leiteinrichtung (8) im wesentlichen gleich grosse Strömungsquerschnitte vorhanden sind. Eine im Boden des Behältnisses (1) vorgesehene Lochplatte (2) weist Öffnungen (2') im Bereich des inneren Umkreises der Leiteinrichtung auf, deren Durchmesser so dimensioniert sind, dass eine optimale Arbeitsweise gewährleistet wird. Ein Diagramm zeigt das Zellwachstum von lymphoblastoiden Zellen.



PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Züchten von tierischen und humanen Gewebezellen in einem geschlossenen Behälter, in dem sie in einer Nährsubstratlösung in Suspension gehalten werden, unter Zufuhr eines sauerstoffhaltigen Gases, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in dem Behälter nur durch die Gaszufuhr so in einer eine Umwälzströmung ausführenden Suspension gehalten werden, dass die Suspension durch die Gaszufuhr in einer Zirkulationsbewegung zwischen zwei Zonen geringfügig unterschiedlichen hydrostatischen Drucks zu einer Umwälzströmung mit einer Geschwindigkeit veranlasst werden, die ausreicht, um ein Absetzen der Zellen aus der Suspension zu vermeiden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das sauerstoffhaltige Gas der Nährsubstratlösung in Form von aufsteigenden, in ihrer Grösse einstellbaren Gasblasen zugeführt wird.

3. Vorrichtung zur Ausübung des Verfahrens nach Anspruch 1, bestehend aus einem Behältnis zur Aufnahme von in einer flüssigen Nährsubstratlösung suspendierten Zellen, wobei im Behältnis eine in die fluide Nährsubstratlösung eingetauchte Leiteinrichtung für eine Zirkulationsbewegung der Nährsubstralösung angeordnet ist und auf deren einen Seite eine Einrichtung in das Behältnis mündet, mit welcher in die Nährsubstratlösung sauerstoffhaltiges Gas einblasbar ist und das Behältnis und die Leiteinrichtung zylindrisch ausgebildet sind und die Leiteinrichtung in einem solchen Abstand vom Boden und von der Seitenwandung des Behältnisses angeordnet ist, dass innerhalb und ausserhalb der Leiteinrichtung im wesentlichen gleich grosse Strömungsquerschnitte vorhanden sind, dadurch gekennzeichnet, dass die Gaszuführeinrichtung eine im Boden des Behältnisses (1) vorgesehene Lochplatte (2) aufweist, deren Öffnungen (2′) innerhalb der Projektion des Umkreises der Leiteinrichtung (8) liegen.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Lochplatte (2) 2 bis 10, vorzugsweise 4 Öffnungen (2′) aufweist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Öffnungen einen Durchmesser von 0,5–5,0 mm aufweisen.

6. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis (1) einen in der Seitenansicht im wesentlichen U-förmigen, durch ein Rohr gebildeten Behältnisteil aufweist, wobei die Rohrinnenseite die Leiteinrichtung (8) bildet und die Lochplatte (2) in einen der vertikalen Rohrschenkel ausmündend ist.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Züchten von tierischen und humanen Gewebezellen in einem geschlossenen Behältnis, in dem sie in einer Nährsubstratlösung in Suspension gehalten werden, unter Zufuhr eines sauerstoffhaltigen Gases.

Bei der Züchtung von tierischen und humanen Gewebezellen werden die Zellen in der Regel in einer fluiden Nährsubstratlösung suspendiert gehalten, wobei zugleich die für das Wachstum erforderlichen Parameter, wie Temperatur, Sauerstoffkonzentration usw. eingestellt werden.

Wenn die die Gewebezellen enthaltende fluide Nährsubstratlösung in einem Behältnis ruhig steht, so setzen sich die Zellen wegen ihres grösseren spezifischen Gewichtes am Behältnisboden ab bzw. lagern sich an der Behältniswand an, was infolge der sich ergebenden hohen Zelldichte zur Folge hat, dass die Diffusion zum Nährstoffnachschub nicht ausreicht und die Zellen absterben. Es muss deshalb für eine ständige Aufrechterhaltung der Suspension gesorgt werden. Dies wird bisher dadurch erreicht, dass die Nährlösung durch mechanische Rührer, Magnetrührer oder Vibrationsmischer unter Sauerstoffzufuhr in Bewegung versetzt wird.

Die bekannten Vorrichtungen arbeiten zufriedenstellend, solange es sich um relativ kleine Behältnisse und Fluidmengen handelt. Probleme ergeben sich jedoch, wenn die Züchtung in grösserem Massstab durchgeführt werden soll. Zunächst übt bei den bekannten Rührern, Mischern und dgl. das Rührorgan, z.B. ein Rührblatt, relativ grosse Scherkräfte auf die Zellen aus, was zu starken mechanischen Zellschädigungen und damit zu schlechten Wachstumsraten führt. Ausserdem haben grössere Vorrichtungen den Nachteil eines relativ grossen appparativen Aufwandes zum Bewegen des Rühr- bzw. Mischorganes, wobei als nachteilig bei mechanischen Rührern noch hinzukommt, dass die Rührerwelle aus dem Behältnis herausgeführt werden muss, d.h. eine Schmierung erfordernde Wellenlagerung vorgesehen werden muss, wodurch eine Sterilhaltung des Behältnisinhaltes nur mit Schwierigkeiten erreicht werden kann. Schliesslich muss bei grösseren Behältnissen und Behältnisinhalten Sauerstoff zwangsweise durch Einleiten eines sauerstoffhaltigen Gases zugeführt werden, wodurch sich in Verbindung mit der Wirkung des Rührers, Mischers oder dgl. in der Regel eine beträchtliche Schaumbildung ergibt, weil alle Nährlösungen für Zellkulturen eiweisshaltig sind.

Es ist auch bekannt, Gewebezellen auf einer Trägeroberfläche in Form einer Schicht aufzubringen und diese durch die Nährsubstratlösung langsam hindurchzuführen. Als Trägeroberflächen können z.B. Glasrohre dienen. Die erforderliche Apparatur ist im Vergleich zur Leistung verhältnismässig gross.

Aus der AT-PS 295 477 ist ferner bekannt, bei der Züchtung von Mikroorganismen, einen Fermenter einzusetzen, der als sogenannter Schlaufenreaktor ausgebildet ist. Der Fermenter ist in zwei Abteilungen unterteilt, und zwar in ein Steigrohr und in ein Fallrohr. Im Steigrohr wird bei höherem Druck Luft und/oder Sauerstoff zugeführt und aufgelöst und im Fallrohr bei niedrigem Druck Kohlendioxid, das während der Fermentierung erzeugt wird, abgeführt, wobei ausserdem Oxidationswärme abgeleitet wird. Im Fallrohr wird gegenüber dem Steigrohr eine reativ niedrige Strömungsgeschwindigkeit aufrechterhalten. Das Gas wird zur Erzielung einer staren Turbulenz mit einer hohen, vorzugsweise 0,5 bis 2 m/sec betragenden Strömungsgeschwindigkeit eingeblasen, so dass die die Mikroorganismen und die Nährsalze enthaltende Flüssigkeit durch das Einblasen aufgeschäumt wird. Dieses Verfahren eignet sich nicht für die Züchtung von tierischen und humanen Gewebezellen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Züchten von tierischen und humanen Gewebezellen zu schaffen, bei welchen die vorstehend geschilderte Gefahr der Zerstörung von Zellsubstanz bei ausreichender Sauerstoffversorgung vermieden ist und die sich für Gewebezellkulturen in beliebiger Grösse eignen.

Ein diese Aufgabe lösendes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in dem Behälter nur durch die Gaszufuhr so in einer eine Umwälzströmung ausführenden Suspension gehalten werden, dass die Suspension durch die Gaszufuhr in einer Zirkulationsbewegung zwischen zwei Zonen geringfügig unterschiedlichen hydrostatischen Druckes zu einer Umwälzströmung mit einer Geschwindigkeit veranlasst werden, die ausreicht, um ein Absetzen der Zellen aus der Suspension zu vermeiden.

Durch die Erfindung wird erreicht, dass praktisch keine mechanische Schädigung der hochempfindlichen Gewebezellen auftreten kann und eine Schaumbildung im wesentlichen hintangehalten wird. Eine gleichmässige, im wesent-

lichen turbulenzfreie Suspension wird über das gesamte Behältnis aufrechterhalten. Die Umwälzströmungsgeschwindigkeit ist an allen Stellen des Behältnisses im wesentlichen gleich gross. Da das zugeführte Gas gleichzeitig als Antriebsmittel und als Träger für den erforderlichen Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid dient, kann ein ausreichender Stoffaustausch ohne Schwierigkeiten gewährleistet werden. Ein wesentlicher Vorteil der Erfindung besteht darin, dass sich die erläuterte Verfahrensweise auf beliebig grosse Behältnisinhalte anwenden lässt.

In günstiger Weise wird das sauerstoffhaltige Gas der Nährsubstratlösung in Form von Gasblasen zugeführt, deren Grösse einstellbar ist.

Eine diese Aufgabe lösende Vorrichtung zum Ausüben des angegebenen Verfahrens, die ein Behältnis zur Aufnahme von in einer fluiden Nährsubstratlösung suspendierten Zellen aufweist und ist dadurch gekennzeichnet, dass die Gaszuführeinrichtung eine im Boden des Behältnisses vorgesehene Lochplatte aufweist, deren Öffnungen innerhalb der Projektion des Umkreises der Leiteinrichtung liegen.

Bei einer zweckmässigen Ausführungsform der Vorrichtung sind das Behältnis und die Leiteinrichtung im wesentlichen zylindrisch ausgebildet und die Leiteinrichtung ist in einem solchen Abstand vom Boden und von der Seitenwandung des Behältnisses angeordnet, dass innerhalb und ausserhalb der Leiteinrichtung im wesentlichen gleich grosse Strömungsquerschnitte vorhanden sind.

Bewährt hat sich eine Ausgestaltung, bei der die Gaszuführeinrichtung eine im Boden des Behältnisses vorgesehene Lochplatte aufweist, deren Öffnungen innerhalb der Projektion des Umkreises der Leiteinrichtung liegen, wobei die Lochplatte zwei bis zehn, am besten vier Öffnungen, insbesondere mit einem Durchmesser von 0,5–5,00 mm, vorzugsweise 1,5 mm aufweist.

Bei einer anderen Vorrichtung ist vorgesehen, dass das Behältnis einen in der Seitenansicht im wesentlichen U-förmigen, durch ein Rohr gebildeten Behältnisteil aufweist, wobei die Rohrinnenseite die Leiteinrichtung bildet, und die Lochplatte in einen der vertikalen Rohrschenkel ausmündet.

Die Erfindung ist mit vorteilhaften Ausgestaltungen an mehreren Ausführungsbeispielen anhand einer Zeichnung näher erläutert, in der zeigt:

Fig. 1 eine schematische Ansicht einer Vorrichtung gemäss der Erfindung

Fig. 2 einen vergrösserten Längsschnitt durch einen Teil der Vorrichtung nach der Linie 2–2 in Fig. 1

Fig. 3 und 4 in schematischer Darstellung abgewandelte Ausführungsformen der Vorrichtung gemäss der Erfindung

Fig. 5 ein Diagramm, welches die Wirksamkeit des erfindungsgemässen Verfahrens veranschaulicht.

Die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung weist einen aufrecht stehenden, zylindrischen Behälter 1, z.B. aus Glas, auf, der an seiner Unterseite durch einen Boden aus einer äusseren Ringscheibe und einer mittigen Lochplatte 2 und an seiner Oberseite durch einen Deckel 3 verschlossen ist. Unterhalb der Lochplatte 2 ist ein Zylinderraum 4 kleineren Durchmessers als der Behälter 1 und etwa mit dem Durchmesser der Lochplatte 2 vorgesehen, der mit einer nicht gezeigten Quelle für unter Druck stehendes sauerstoffhaltiges Gas in Verbindung steht.

Wie Fig. 2 zeigt, ist der Zylinderraum 4 nach unten hin durch eine Metallplatte 5 abgeschlossen, welche ein Anschlussstück 6 für eine Druckgaswelle führende Druckgaszufuhrleitung enthält und an der zugleich über einen mittigen Bolzen 7 die Lochplatte 2 verankert ist.

Im Behälter 1 ist eine im wesentlichen zylindrische Leiteinrichtung 8 angeordnet, deren Durchmesser so gewählt ist, dass die Querschnittsfläche der Leiteinrichtung etwa halb so gross wie die gesamte Querschnittfläche des Behälters 1 ist. Die Leiteinrichtung 8 wird vom oberen Deckel 3 getragen und ist so angeordnet, dass sie mit dem Boden und der Wandung des Behälters 1 im wesentlichen gleich grosse Strömungsquerschnitte begrenzt. An der Aussenseite des Behälters 1 ist im unteren Abschnitt desselben eine Heizwicklung 9 vorgesehen. In dem Deckel 3 ist ein Gasauslass 10 angeordnet.

Im Betrieb der Vorrichtung wird der Behälter 1 mit einer Zellen in Suspension enthaltenden Nährsubstratlösung so hoch gefüllt, dass der Fluidspiegel in einem etwa dem Abstand der Leiteinrichtung vom Behälterboden entsprechenden Abstand vom oberen Ende der Leiteinrichtung liegt. Durch die Lochplatte 2 wird Sauerstoff und Kohlendioxid enthaltendes Gas, dessen Zusammensetzung in Abhängigkeit vom Stoffbedarf der Kultur laufend eingeregelt wird, nur mit einem solchen Druck eingeblasen, der erforderlich ist, um das Gewicht der Fluidsäule über den Öffnungen 2′ der Lochplatte zu überwinden und das Fluid in eine Zirkulationsbewegung zu versetzen. Das zugeführte sauerstoffhaltige Gas wird von dem an der Lochplatte 2 vorbeiströmenden Fluid in gleich grosse Blasen zerteilt, die im Innern der Leiteinrichtung unter Sauerstoffabgabe aufsteigen und einen Auftrieb der Nährsbustratlösung bewirken. Infolge der erläuterten Ausbildung und Anordnung der Leiteinrichtung 8 wird eine gleichmässige Zirkulationsströmung erzielt, die im Innern der Leiteinrichtung aufwärts und an der Aussenseite der Leiteinrichtung abwärts gerichtet ist. Die Gasblasen treten aus dem Fluidspiegel infolge der relativ geringen Strömungsgeschwindigkeit nahezu ohne Schaumbildung aus.

Die Löcher 2′ der Lochplatte 2 sind beim gezeigten Beispiel auf einem Kreis angeordnet, der innerhalb der Projektion des Umkreises der Leiteinrichtung 8 liegt. Die Anzahl und Grösse der Öffnungen wird bei vorgegebenem Gasdruck je nach der gewünschten Gasblasengrösse bzw. der durchzusetzenden Gasmenge gewählt.

Wie aus Fig. 1 ersichtlich ist, besteht die Leiteinrichtung 8 beim dargestellten Beispiel aus zwei unter Bildung einer ringförmigen Austrittsöffnung 11 ineinandergreifenden Abschnitten 8′, 8″, die miteinander über Stege 12 verbunden und von der Behälterwandung im Abstand gehalten sind. Diese Konstruktion ermöglicht es, bei einem Chargewechsel einen Teil, z.B. die Hälfte, der Kultur bzw. der Nährsubstratlösung abzuziehen und dabei den Vorrichtungsbetrieb mit verringerter Behälterfüllhöhe aufrecht zu erhalten.

Es kann beispielsweise die Lochplatte ringförmig ausgebildet und so angeordnet sein, dass die Strömung an der Aussenseite der Leiteinrichtung aufwärts gerichtet ist, d.h. die Zirkulationsströmung umgekehrt wird. Die Lochplatte 2 kann aber auch bezüglich des Behälters exzentrisch angeordnet und die Leiteinrichtung 8 als eine den Behälter mit Abstand vom Boden vertikal durchsetzende Trennwand ausgebildet sein, wie dies schematisch in Fig. 3 gezeigt ist.

Eine andere Ausführungsform der Vorrichtung ist in Fig. 4 dargestellt. Bei dieser weist der Behälter 1 einen in der Seitenansicht im wesentlichen U-förmigen, z.B. durch ein Rohr im Kreisquerschnitt gebildeten Behälterteil auf. Die Rohrinnenseite bildet die Leiteinrichtung 8, und die Lochplatte 2 mündet in einen der vertikalen Rohrschenkel aus.

Das in Fig. 5 dargestellten Diagramm erläutert die Wirkungsweise der Vorrichtung nach den Fig. 1 und 2. Die durch Kreise bezeichneten Kurvenabschnitte veranschaulichen das Zellwachstum, z.B. von lymphoblastoiden Zellen, über der Zeit, wobei jeweils jedoch durch Pfeile Entnahme aus der Zellkultur angedeutet sind.

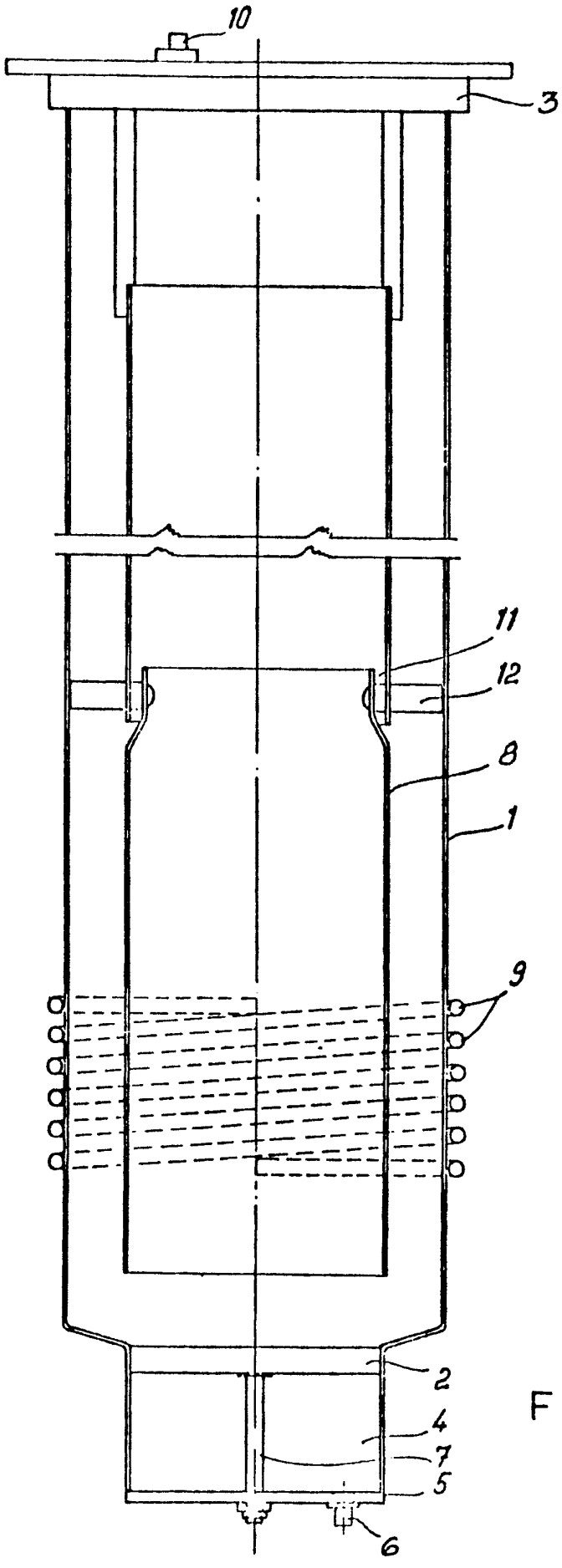


FIG. 1

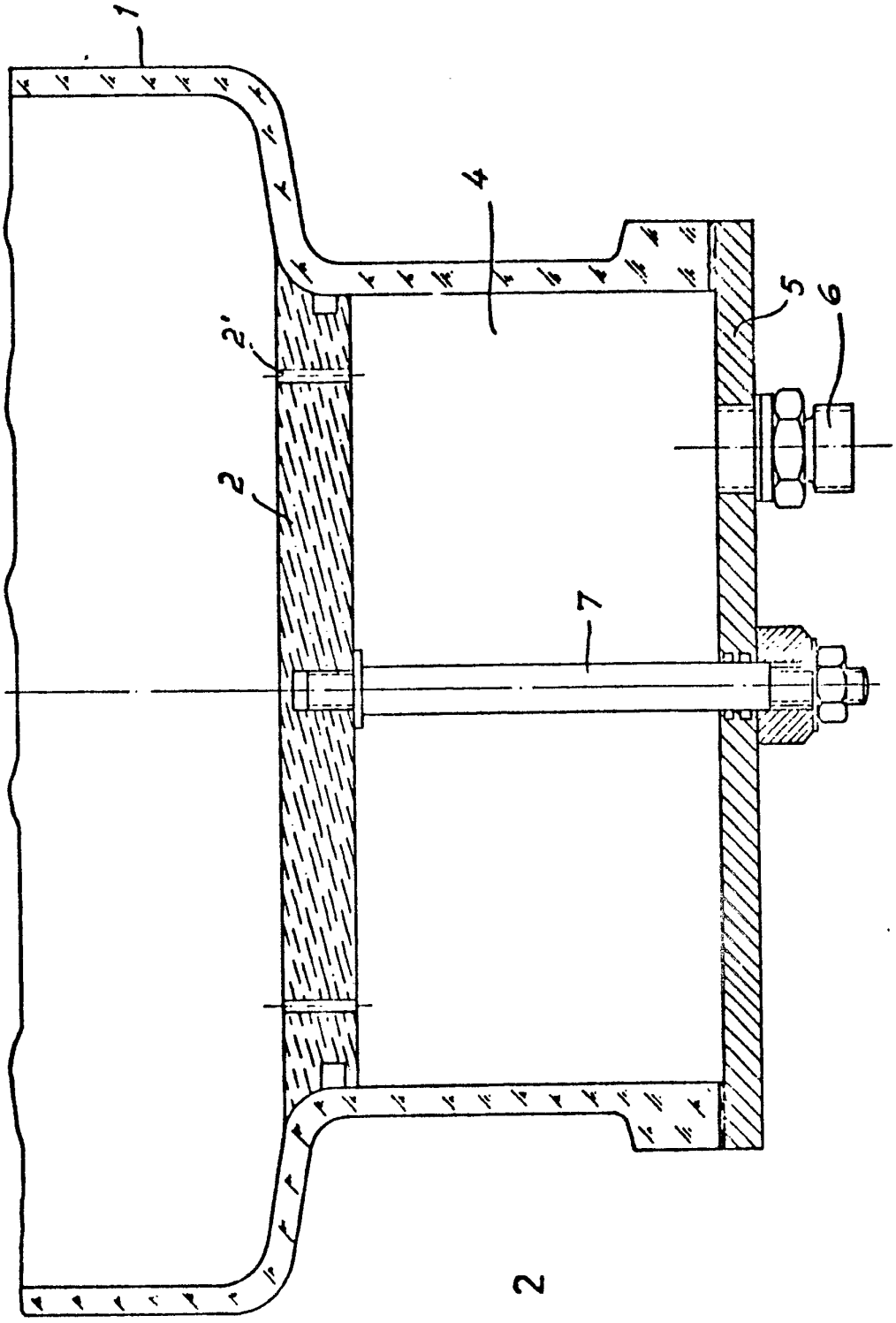


FIG. 2

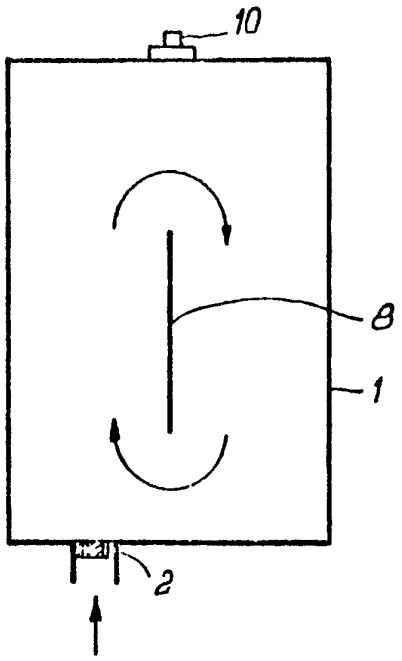


FIG. 3

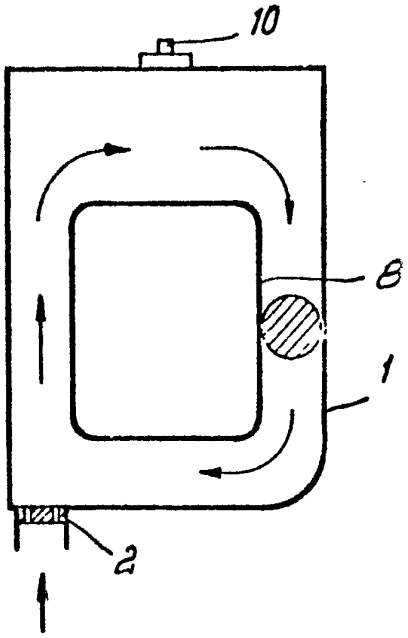


FIG. 4

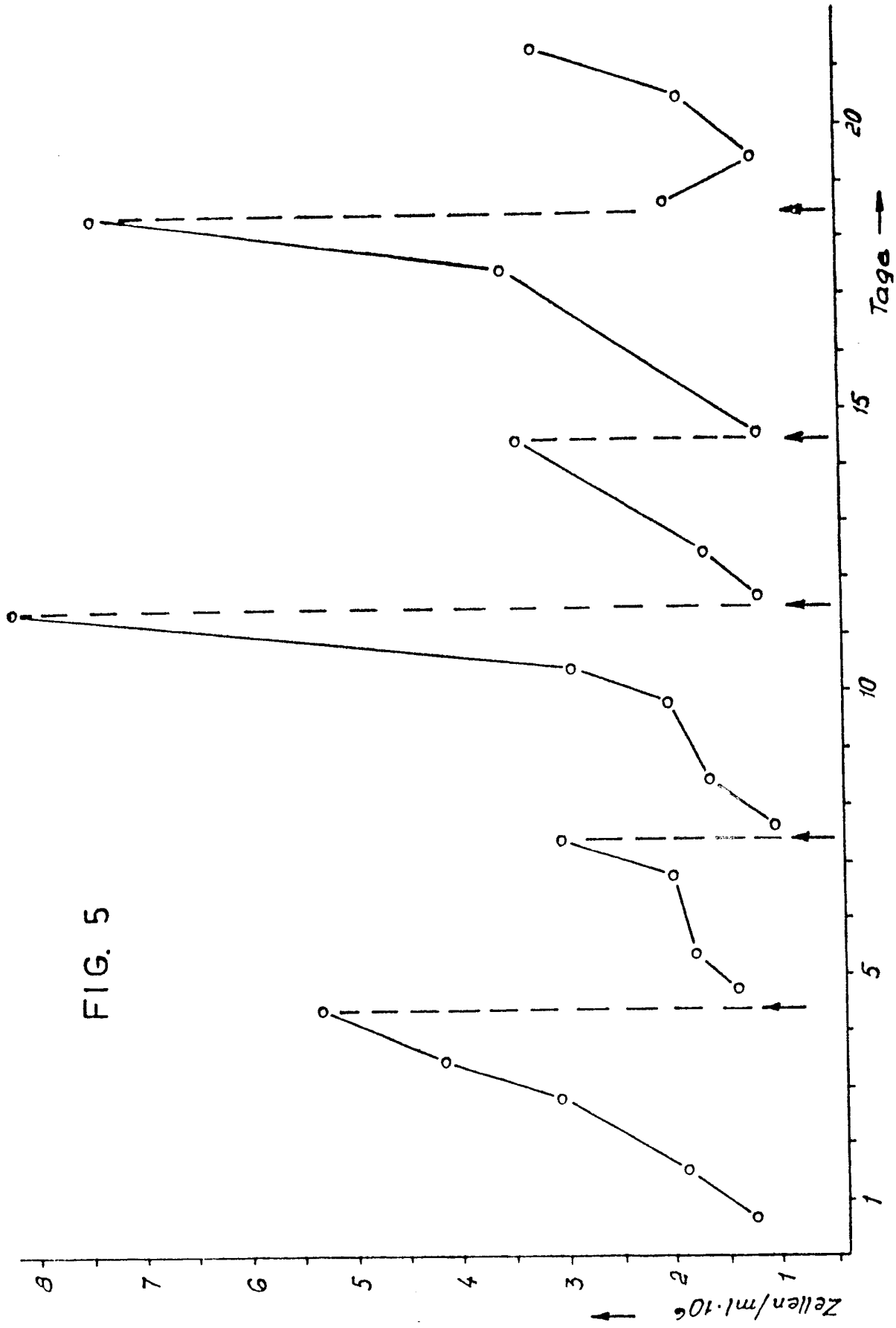


FIG. 5