

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145613 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(21) Ansøgning nr. 4209/73

(51) Int.Cl.³ C 12 M 3/04

(22) Indleveringsdag 31. jul. 1973

(24) Løbedag 31. jul. 1973

(41) Alm. tilgængelig 1. feb. 1974

(44) Fremlagt 27. dec. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 31. jul. 1972, 276616, US

(71) Ansøger ABBOTT LABORATORIES, North Chicago, US.

(72) Opfinder Ronald Eugene Weiss, US.

(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.

(54) Apparat til dyrkning af vævs=
kulturceller.

DK 145613 B

Opfindelsen angår et apparat til dyrkning af vævskulturceller og bestående af en beholder, som er indrettet til at indeholde væskeformet kulturmedium, og som har et par lodrette endevægge ved modsatte ender og yderligere lodrette sidevægge, som forbinder de ved modsatte ender værende lodrette endevægge, og hvilken beholder har en eller flere stationære plader, som er anbragt med indbyrdes afstand, og som hver strækker sig i hovedsagen parallelt med beholderens vandrette bund, og tilvejebringer i det mindste en overflade, på hvilken der kan forekomme cellevækst.

Dyrkning af vævskulturer i stor målestok er ønskværdig, når henses til de store mængder levende celler, der kræves ved udvikling og produktion af biokemiske stoffer og vacciner, og de store mængder af biokemiske stoffer, celler og virusarter, der kræves til forskningsstudier. Imidlertid har det meste af tidligere teknik og udstyr til dyrkning af vævskulturer på overflader ikke været tilpasset produktion i stor målestok, og navnlig ikke i en enkelt produktionsenhed.

En almindelig vævskulturfremgangsmåde til virusproduktion af vacciner går ud på celledyrkning på bunden af 1 liters store, rektangulære flasker. Flaskerne tilsættes et steriliseret vævskulturmedium, der indeholder en suspension af celler. Cellerne inkuberes så, indtil cellevæksten danner et sammenhængende lag på den neddykkede glasoverflade, hvorefter mediet til celledyrkning ombyttes med et friskt medium, der indeholder det ønskede virus. Efter at dette virus har gennemtrængt cellerne, og viruskoncentrationen i mediet har opnået et tilstrækkeligt niveau gennem den reproducerbare proces, oparbejdes mediet, der indeholder viruset, så man får vacciner. Denne fremgangsmåde kræver en celledyrkning på bunden af et stort antal flasker, når man vil opnå kendelige mængder af vævskulturer.

Fra beskrivelsen til tysk patent nr. 1.215.303, tilhørende

Wiegand et al., kendes et apparat til dyrkning af vævskulturceller i stor målestok, og som i det væsentlige består af en stabling af specielle flasker, som automatisk kan fyldes og tømmes.

- 5 Fra beskrivelsen til U.S. patent nr. 3.407.120, tilhørende Weiss et al., kendes ligeledes et apparat til dyrkning af vævskulturceller i stor målestok. Dette apparat består i korte træk af flere rumligt adskilte plader eller skiver, der er fremstillet af glas, plast eller andet egnet materiale, hvorpå cellerne kan hæfte og formere sig. Pladerne er indeholdt i en beholder eller en tanklignende container. Der forefindes midler til blanding og oxidering af et flydende kulturmedium såvel som tilhørende målings- og registreringsindretninger til styring af de rette dyrkningsbetingelser.
- 15 Den metode til celledyrkning, der anvender et sådant apparat, forudsætter, at man har en lukket selvstændig enhed, i hvilken celledyrkningen kan gennemføres under i det væsentlige ensartede, kontrollerede omgivelser. Der er her tilvejebragt et stort overfladeareal, på hvilket celledyrkning kan finde
- 20 sted i et relativt lille totalt volumen i sammenligning med det store, totale volumen, der kræves til opnåelse af et tilsvarende celledyrkningsoverfladeareal i en mængde glasflasker eller kolber.

- Vævskulturdyrkningsapparatet ifølge Weiss et al. tillader
- 25 desuden anvendelse af en justerbar mængde medium pr. cellepladeareal, tilvejebringer en selvstændig enhed, som kan steriliseres på stedet, tilvejebringer midler for en simpel og bekvem adskillelse af vævskulturcellerne fra væsken, tillader periodisk eller kontinuerlig prøveudtagning af ind-
- 30 hold til analyse og kontrol, muliggør rensning og genanvendelse på stedet af de adskilte plader, tilvejebringer midler til at opretholde kontrol med ensartede omgivelser, formindsker mængden af arbejde pr. cellepladeareal i sammenligning med behandlingen af et stort antal glasflasker eller
- 35 kolber og fremskaffer et automatiseret system i sammenlig-

ning med tidligere kendte metoder og apparater.

Selv om dyrkningsapparatet ifølge Weiss et al. er meget velegnet til dyrkning af celler, har det vist sig, at strømningsegenskaberne ikke er ensartede. Derfor har hver dyrkningsplade ikke samme volumen af flydende kulturmedium, der passerer hen over den pr. tidsenhed. Da det cirkulerende medium tilvejebringer midlerne til opretholdelse af pH-værdi- kontrol og fremskaffer den nødvendige oxygenmængde til metabolisme og respiration af de dyrkede celler såvel som fjernelse af carbondioxid, der produceres ved cellernes metabolisme, må et minimalt volumen af medium flyde over hver plade pr. tidsenhed, hvis der skal opretholdes en ønsket celle- vækst, virusproduktion eller lignende skal opretholdes. For at fremskaffe dette minimale volumen af mediumstrømning i dyrkningsapparatet ifølge Weiss et al. har man fundet det nødvendigt at holde mellemrummet mellem de opstablede plader på en vis minimal størrelse i direkte overensstemmelse med volumenet af det specielle dyrkningsapparat, det anvendte flydende kulturmedium og den omhandlede celledyrkning eller anden produktion.

På grund af denne begrænsning af afstanden imellem vækstpladerne kræves der et relativt stort volumen medium pr. celleoverflade i apparatet ifølge Weiss et al., sammenlignet med det, der kræves i de tidligere anvendte flaskesystemer. Dette er en betydelig ulempe i betragtning af de høje omkostninger til flydende kulturmedium. Fremdeles bevirker manglende ensartede strømningsegenskaber i apparatet ifølge Weiss et al. en ineffektiv vaskning eller fjernelse af de dyrkede celler.

Fra beskrivelsen til svensk patentskrift nr. 339.075 kendes en cylindrisk beholder med åbninger ved modsatte ender, og som virker på den måde, at inden i cylinderen drejeligt lejrede plader bringes til at rotere ned i og op af et kulturmedium, som udfylder halvdelen af beholderen, idet pla-

dernes omdrejningsakse herunder er vandret. Herved sikres ikke en ensartet strømning hen over vævskulturcellerne og ej heller en tilfredsstillende styring af disses vækst.

5 Apparatet ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved, at hver plade er således anbragt i afstand fra de nævnte modsatte lodrette endevægge i beholderen, at der dannes en første lodret kanal og en anden lodret kanal i beholderen ved de modsatte endevægge, medens de strækker sig til umiddelbar nærhed af sidevæggene, og at der findes
10 en indgangsledning til beholderen, som munder direkte ind i den første lodrette kanal, og en afgangsledning fra beholderen, som munder direkte ud fra den nævnte anden lodrette kanal og er indrettet til fjernelse af kulturmediet fra beholderen på en sådan måde, at kulturmediet bringes til at strømme på tværs af pladerne fra den
15 ene til den anden ende, når det ledes ind i og fjernes fra kanalerne.

Herved opnås et apparat, som sikrer, at der strømmer et i hovedsagen ensartet volumen af væskeformet kulturmedium med
20 i hovedsagen samme sammensætning hen over hver vækstplade eller -overflade pr. tidsenhed. Da der således opnås en ensartet strømning igennem hele beholderen, kan mængden af det væskeformede medium, der strømmer hen over hver plade pr. tidsenhed og en måling af opløst oxygenindhold i mediet, når
25 det strømmer ind i og ud fra beholderen, anvendes til at måle væstkulturcellernes respiration. Da der samtidigt åbnes mulighed for at styre pH-værdien i mediet, efterhånden som det cirkulerer igennem beholderen, kan der ledes en forudbestemt minimal mængde af medium hen over hver plade. Det
30 har vist sig, at et dyrkningsapparat ifølge opfindelsen kan arbejde med fra en femtedel til en tiendedel af den mængde medium, der kræves i det apparat, der er udviklet af Weiss, et. al.. Samtidigt er der også opnået forbedret cellevaskning. Derudover kan der foretages mikroskopiske observationer af cellerne under dyrkningen på grund af, at de er stationære.
35

Ifølge opfindelsen kan beholderen være aflang og rektangulær, hvorved tilvejebringes et apparat, som er billigere at bruge, end f.eks. en cylindrisk beholder. Særligt hensigtsmæssigt kan pladerne være stablet oven på hinanden, hvorved apparatet er let at fremstille.

Derudover kan ifølge opfindelsen pladerne dannes af de parallelle dele af et strimmelformet materiale, som idet det danner en bølgeformet bane, er anbragt omkring to sæt af understøtningsdele, som er anbragt vinkelret på bunden og på parret af lodrette sidevægge, idet det strimmelformede materiales kanter vender hen imod disse sidevægge, hvorved apparatet bliver særligt billigt at fremstille.

Særlig hensigtsmæssigt i denne forbindelse kan ifølge opfindelsen understøtningsdelene omfatte et par indbyrdes adskilte stænger, som er anbragt vinkelret på beholderens bund, idet den ene af stængerne er anbragt i afstand fra den ene endevæg og en sidevæg i beholderen, medens den anden er anbragt i afstand fra den anden endevæg og den samme sidevæg, og hver af disse stænger være indrettet til at bære et stativ af stænger, stave, knager, tråde, virer, liner eller snore til tilvejebringelse af en række bæreorganer, som strækker sig i hovedsagen parallelt med beholderens bund.

For at lette overvågningen og styringen af vævskulturcellernes vækst, kan pladerne være af glas. Alternativt kan pladerne også være af polycarbonat.

Opfindelsen forklares nedenfor under henvisning til tegningen, hvor

fig. 1 viser et langsgående snit igennem en udførelsesform for et apparat ifølge opfindelsen,

fig. 2 et snit efter linien 2-2 i fig. 1,

fig. 3 en afbildning af en opsats omfattende to understøtningsdele placeret langs en sidevæg i en udførelsesform for den omhandlede opfindelse og bærende strenge beregnet til at bære plader,

- 5 fig. 4 et partielt tværsnit set fra en endevæg, og som viser plader dannet af et strimmelformet materiale viklet om strengene på de i fig. 3 viste understøtningsdele, og

fig. 5 en skematisk afbildning af et system til dyrkning af vævskulturceller og omfattende et dyrkningsapparat ifølge opfindelsen.

- 10 Den i fig. 1 og 2 viste udførelsesform for apparatet ifølge opfindelsen omfatter en beholder 9, der danner et i det væsentlige rektangulært reservoir 11. Et flertal af i det væsentlige rektangulære plader 13 er opstablede og indbyrdes adskilte med i det væsentlige lige store mellemrum
15 i hele højden af reservoiret 11. Hver plade 13 har i det væsentlige samme udstrækning som begge de vandrette dimensioner af reservoiret 11, som det kan ses af figurerne 1 og 2.

- Imellem hver plade 13 og den nærliggende lodrette endevæg i reservoiret 11 er der i langsgående retning en afstand,
20 som tilvejebringer en kanal, gennem hvilken et flydende kulturmedium kan passere, når det cirkulerer gennem reservoiret 11. For at muliggøre at hver plade 13 tilvejebringer den størst mulige vækstflade som følge af ensartet strømning af medium hen over hver plade, må afstanden mellem hver plade 13 og de lodrette endevægge i reservoiret 11 fortrinsvis
25 ikke være større end den dimension, som muliggør et tilstrækkeligt stort trykfald over pladerne 13 til at strømmingen kan foregå. Hvis afstanden imellem de lodrette endevægge og pladerne er større, vil trykfaldet i de lodrette kanaler
30 mellem beholderen 9 og pladerne 13 være større end trykfaldet mellem hver af de efter hinanden følgende plader. Følgelig vil den foretrukne afstand mellem pladerne 13 og de lodrette endevægge i reservoiret 11, der dannes af be-

holderen 9, variere med afstanden mellem pladerne 13. Fortrinsvis er, som det fremgår af fig. 2, pladerne 13 i tværetningen nøjagtigt af samme udstrækning som afstanden mellem reservoirets sidevægge langs den anden vandrette dimension.

Ledninger 15 og 17, der er fremstillet af et passende materiale, f.eks. siliconkautsjuk eller rustfrit stål, fremskaffer mulighed for af- og tilløb til reservoiret 11 til cirkulation af det flydende kulturmedium gennem reservoiret 11.

Som vist på fig. 5 er det meningen, at strømmen gennem dyrkningsapparatet i form af beholderen 9 skal anvendes i forbindelse med midler 21 til styring af pH-værdien af det flydende kulturmedium inden for et forudbestemt interval, når det cirkulerer gennem reservoiret 11, midler 22 til indføring af oxygen og til kontrol af CO_2 -koncentrationen i det flydende kulturmedium og midler til cirkulering af det flydende kulturmedium gennem reservoiret 11, bestående af en pumpe 25, som beskrevet af Weiss et al. Fig. 3 hos Weiss et al. og den hertil hørende detaljerede beskrivelse i spalte 3, linie 41 ff., illustrerer og beskriver mere fuldstændigt et system, i hvilket beholderen 9 let kan inkorporeres.

Beholderen 9 og pladerne 13 kan fremstilles af ethvert ikke-toxisk materiale eller en kombination af materialer, der er velegnet til dyrkning af celler, og som har tilstrækkelig styrke til at modstå de væsketryk, som optræder ved sterilisation af apparatet eller vask eller fjernelse af cellerne fra disse. Højtemperaturmaterialer kan anvendes, hvis dette er nødvendigt for sterilisationsmetoden. Fortrinsvis kan materialet være gennemsigtigt,

så væksten af cellerne på pladerne kan observeres med mikroskop. Adskillige glasarter og plaststoffer er velegnede hertil, og især har plast af polycarbonat vist sig at være velegnet.

5 Endvidere har det vist sig, at pladerne 13 med fordel kan dannes af en kontinuerlig strimmel af materiale anbragt på bølgeformet måde omkring et stativ til dette formål, og som er anbragt inden i reservoiret 11. Den kontinuerlige materialestrimmel bør have de ovenfor angivne egenskaber for pladerne 13 og må være tilstrækkelig bøjelig
10 til let at kunne foldes uden at blive beskadiget. Alternativt kan den kontinuerlige materialestrimmel være et bølgeformet eller foldet materiale, der har tilstrækkelig styrke til at være selvbærende. Mange stativer omfattende gitre af stænger, stave, knager, tråde, virer, liner, snore eller plader, der er således anbragt, at der tilvejebringes et antal horisontale, parallelle understøtningsdele, der strækker sig i hovedsagen vinkelret på
15 de modstående lodrette endevægge, i hvilke indgangs- og udgangsledningerne 15, 17 er anbragt, kan anvendes til
20 at holde den kontinuerlige materialestrimmel i form af stablede, indbyrdes adskilte plader.

Fig. 3 og 4 viser en udførelsesform for understøtningsdele, der er velegnet til at montere eller til at holde
25 en kontinuerlig materialestrimmel i form af plader 13. Stænger 41 og 43, som kan være fremstillet af rustfrit stål, er fastgjort til reservoiret 11's bundvæg. Fortrinsvis er stængerne 41 og 43 også anbragt i det væsentlige i umiddelbar nærhed af en i reservoiret 11 værende lodret
30 væg, som støder op til en af de lodrette endevægge, på

hvilke tilgangs- og afgangsledningen 15, 17 er anbragt. Stængerne 41 og 43 har et kontinuerlig spiralformet gevind langs med hele deres ydre overflade. Alternativt kan man anvende horisontale riller i stedet for gevindet. En kontinuerlig streng 31, der er vundet meget stramt skiftevis rundt om stængerne 41 og 43, danner et flertal af vandrette, parallelle understøtninger med lige stor indbyrdes afstand og anbragt i det væsentlige vinkelret på de lodrette endevægge, ved hvilke tilgangs- og afgangsledningen 15, 17 er anbragt.

Stænger, som svarer til stængerne 41 og 43, er også fastgjort til bunden af reservoiret 11 ved den modsatte sidevæg, og en anden streng er vundet omkring disse. Som vist i fig. 4 kan der være anbragt en kontinuerlig materialestrimmel, som følger en bølgeformet bane rundt om understøtningsstrengene 31, hvorved pladerne 13 fremkommer.

Beholdere 9 og plader 13, som er blevet konstrueret ved varmluftssvejsningsteknik af polycarbonatplast, fremstillet af General Electric Company under navnet Lexan, har modstået autoklaving og har tilstrækkelig styrke til at modstå de tryk, der dannes ved væskernes cirkulation gennem dyrkningssystemet. Lexan-polycarbonatplader kan fås i ark op til 2,5 meters længde og 1,5 meters bredde og muliggør konstruktionen af meget store beholdere 9 og plader 13 af et enkelt stykke af polycarbonatplasten, hvis det ønskes. Imidlertid er konstruktionen af beholderen 9 og pladerne 13 ikke begrænset til komponenter af ét stykke, da det er muligt at konstruere dem af flere stykker, som støder op til hinanden eller er forenede på anden måde. Der synes således ikke at være nogen begrænsning for størrelsen af beholderen 9 og pladerne 13, som man kan konstruere.

Fremdeles kan beholderen 9 være permanent bundet sammen, når pladerne 13 er anbragt i reservoiret 11, eller, hvis

det foretrækkes, kan beholderen 9 samles på en sådan måde, at den let kan adskilles eller åbnes, når det ønskes. På samme måde kan pladerne 13 være monteret permanent eller aftageligt i beholderen 9.

5 I den foretrukne udførelsesform for opfindelsen, der er vist på fig. 1 og 2, er strømmningen af det flydende kulturmedium over hver plade i det væsentlige den samme gennem hele reservoiret 11, når det er helt fyldt med mediet, fordi pladerne 13 er anbragt med samme afstand. Ensartet
10 strømning gennem reservoiret 11 kan let påvises ved hydrostatiske principper, og ensartet strømning tværs over pladerne 13 kan empirisk demonstreres ved farveinjektionsundersøgelser.

Når der er opnået en ensartet strømning gennem reservoiret
15 11, kan mængden af det strømmende medium over hver enkelt plade 13 pr. tidsenhed bestemmes meget nøjagtigt. På samme måde muliggør en måling af det opløste oxygenindhold i mediet, når det strømmer ind i og ud af beholderen en måling af vævskulturcellernes respiration. Således kan der
20 ved regulering af hastigheden af strømningen af mediet gennem reservoiret 11 ledes en forudbestemt minimal mængde medium over hver plade 13 pr. tidsenhed for ethvert interval, når pladerne har samme indbyrdes afstand. Man har fundet, at når apparatet ifølge opfindelsen er udformet som vist på fig. 3 og 4, kan man opnå en meget til-
25 fredsstillende cellevækst, når pladerne 13 har en indbyrdes afstand på 1,5 mm eller endnu mindre.

Afstanden eller mellemrummet mellem pladerne 13 er direkte proportionalt med mængden af flydende kulturmedium,
30 der kræves til at neddykke eller oversvømme hver plade i apparatet. Følgelig muliggør enhver reduktion af afstanden mellem pladerne 13, at samme overfladeareal oversvømmes af en tilsvarende reduceret mængde flydende kulturmedium.

På samme måde har man fundet, når andre betingelser er de samme, at et apparat ifølge opfindelsen kan bringes til at arbejde korrekt med $1/5$ til $1/10$ af den mængde medium, der kræves ved et apparat ifølge Weiss et al., når vækstpladearealet er det samme.

I den udførelsesform for opfindelsen, der er vist på fig. 1 og 2, er pladerne 13 stablet oven på hinanden ved hjælp af afstandsstykker 31 af i det væsentlige ens tykkelse. Fortrinsvis kan afstandsstykker 31 laves af en siliconkautsjuk. Der kan imidlertid også anvendes andre midler til at understøtte og adskille pladerne 13. F.eks. kan hver plade 13 have en ribbe eller et afstandsstykke, som er tildannet ud i ét, og som har bundfladen hvilende på overfladen af pladen umiddelbart nedenunder.

Vævsdykningsprocessen kan udføres med det ovenfor beskrevne apparat på følgende måde. Først renses, samles og steriliseres apparatet. Derpå forberedes næringsmediet og de ønskede celler til podning. Der fremstilles en mængde næringsvæske, som er tilstrækkelig til at dække antallet af plader, og som indeholder egnede næringsmidler, saltopløsninger, stødpuder, sera, pH-værdiangivere og antibiotika. For de fleste celler er det ønskeligt at opretholde en pH-værdi på mellem 6,6 og 7,6. Cellerne til podning fås ved en proces for celleadskillelse, hvor individuelle celler frigøres fra finskårne stykker væv. Disse kan fremstilles ved påvirkning med trypsin eller andre egnede enzymer eller ved ethvert andet passende system, som kan være mekanisk eller kemisk. De individuelle celler vaskes i næringsvæsken til fjernelse eller neutralisering af proteolytiske enzymer. Cellerne resuspenderes så i mediet til den ønskede koncentration til podning.

Suspensionen sættes til vævskulturdykningsapparatet på aseptisk måde ved pumpe, vakuum eller gravitation.

Cellerne får så lov til at bundfælde sig i en periode, der er tilstrækkelig lang til at tillade fasthæftelse til overfladerne på pladerne. Om ønsket kan man ved at vende op og ned på beholderen 9, efter at en del af cellerne har sat sig fast på oversiden af pladerne 13, også få celler til at hæfte til undersiden af pladerne 13, hvorved man fordobler det til rådighed stående areal for dyrkning, der findes i beholderen 9.

Udstyret til mediumcirkulationen sættes derpå igang. Ved nogle celler kan mediets cirkulation startes straks. En ensartet pH-værdi, opløst oxygenmængde og kulsyre-mængde i beholderen 9 fås ved regulering af hastigheden af væsecirkulationen.

Temperaturen hos det cirkulerende, flydende medium kan styres ved hjælp af en beholder forsynet med en kappe og ydre midler til varmeoverføring, eller ved at man anbringer beholderen 9 i et vandbad med konstant temperatur eller i et rum med konstant temperatur. Væksten af cellerne på pladerne følges og kontrolleres ved udtagning af kemikalier fra næringsmediet såvel som ved mikroskopiske iagttagelser af egnede kontrolbeholdere og/eller én eller flere observationsplader i systemet. På grund af at reservoiret 11 normalt er helt fyldt med væske under dets anvendelse, lettes den optiske iagttagelse af cellevæksten på pladerne, i mod-sætning til ved apparatet ifølge Weiss et al., hvor et lag af gas findes mellem beholderen og det flydende medium.

Efter en passende forudbestemt tid er der fremkommet et sammenhængende monolag af celler på overfladen af pladerne. På dette tidspunkt fjernes næringsvasken ved tryk, vakuum eller tyngdekraft, og vævet kan vaskes til fjernelse af spor af næringsmedier eller serum og efterfyldes med nyt medium, alt under aseptiske betingelser. Derpå kan cellerne studeres eller anvendes til vaccine-

fremstilling, biokemisk produktion, næringsmæssige observationer og lignende.

Selvom opfindelsen er beskrevet og illustreret i dens foretrukne udførelsesformer, kan der foretages mange ændringer, selvom effektiviteten af sådanne andre udførelsesformer kan være mindre end den hos den foretrukne udførelsesform. Medens den foretrukne udførelsesform ifølge opfindelsen omhandler et rektangulært reservoir 11, kan der således også anvendes reservoirer, der har andre geometriske former. Tilsvarende kan der, selvom pladerne 13 i den foretrukne udførelsesform er stablede og indbyrdes adskilte med i det væsentlige lige store afstande i hele reservoirets højde, anvendes mindre effektive udførelsesformer for opfindelsen, hvor pladerne ikke har i det væsentlige lige stor afstand eller ikke spænder over hele højden af reservoiret. Endelig kan der, selvom pladerne 13 i den foretrukne udførelsesform er rektangulære ligesom reservoiret 11, anvendes udførelsesformer, hvor pladerne ikke har nøjagtig samme geometriske form som reservoiret.

Den omhandlede opfindelse skal fremdeles belyses ved følgende eksempler (MEM, BME, medium 199 og Earl's saltopløsninger, der refereres til i eksempel 1 og 2, er velkendte inden for vævskulturdyrkning og er forklaret detaljeret i en rapport i publikationen In Vitro med titlen "A Survey of Commercially Available Tissue Culture Media", udgivet af H.C. Morton, vol. 6, nr. 2, side 89-108, 1970).

Eksempel I

Man fjernede og halshuggede 10 dage gamle kyllingefostre og anbragte dem i cylinderen på en 20 ml sprøjte, hvorfra der blev ekstruderet tre gange. Denne embryonsuspension blev derpå vasket tre gange med fosfat, en

- stødpudesaltopløsning, og derpå trypsineret tre gange i 10 min. ved stuetemperatur. Ethvert løsrevet stykke blev udtrukket fra celledisuspensionen, som så centrifugeredes ved 1500 omdrej./min. i 10 min. Den ovenpå
- 5 svømmende stofmængde dekanteredes, og cellerne resuspenderes i en standardopløsning af Minimal Essential Medium (MEM) indeholdende Earl's salte og 6% fosterkalveserum ved 100.000 celler/ml. 2,5 liter af denne celledisuspension blev derpå pumpet ind i et autoklaveret
- 10 apparat ifølge opfindelsen, konstrueret af Lexan-polycarbonatplast, der var svejset med varm luft, og hvor den blev inkuberet i 24 timer uden cirkulation for at muliggøre fastgørelse af celler.
- Apparatet var 7,5 cm bredt, 20 cm højt og 24 cm langt og
- 15 fyldt med 35 plader med dimensionerne 7,5 x 20 cm af Penn-vernion B vinduesglas, stablet og anbragt med mellemrum på 0,3 cm på mellemrumsstykker af siliconkautsjuk. En 5% CO₂-luftblanding blev ledt gennem et pulserende luftningsapparat med en hastighed af 50 ml/min. Efter 24 ti-
- 20 mer blev mediet cirkuleret med 100 ml/min. med en pumpe. Efter 8 dages væksttid blev pladerne fjernet fra apparatet, og det blev iagttaget, at der på hver plade var vokset et flydende monolag af celler, ækvivalent med de, der voksede i tidligere kendte vævskulturf-
- 25 flasker.

Eksempel II

- En suspension af menneskefosternyreceller blev fremstillet ved trypsinisering af menneskefosternyrer og frosset i en opløsning af dimethylsulfoxid og standard Basal Medium
- 30 Eagle's opløsning (BME) med 20% kalvefosterserum og opbevaret i flydende nitrogen. Suspensionen blev så suspenderet i en 1 liter medium 199-opløsning indeholdende 5% oksefosterserum med 18.000 celler/ml. 1,1 liter celledisuspension blev pumpet ind i et apparat ifølge opfin-

delsen, konstrueret af svejsede Lexan polycarbonatkunststofplader ved siderne og rustfri stålplader ved enderne, og blev inkuberet i 48 timer uden cirkulation for at lade cellerne fastgøres på vækstpladerne. Apparatet blev steriliseret ved autoklaving og dannede et rektangulært reservoir, der var 37 mm bredt, 87 mm højt og 600 mm langt, indeholdende 37 x 575 mm Lexan polycarbonatplader med indbyrdes afstand på 1,5 mm ved hjælp af siliconkautsjukskiver. Man førte en 5% CO₂-luftblanding gennem en pulserende aerator med en hastighed af 50 ml/min. Efter 48 timer blev mediet cirkuleret med 50 ml/min. gennem reservoiret ved hjælp af en pumpe. Cellevæksten på pladerne kontrolleredes ved en mikroskopisk undersøgelse af pladerne gennem apparatets gennemsigtige overside og ved glycoseanalyse af periodisk udtagne mediumprøver. Efter 8 dages dyrkningstid fik man et sammenhængende monolag af celler på hver plade.

P a t e n t k r a v

1. Apparat til dyrkning af vævskulturceller og bestående af en beholder (9), som er indrettet til at indeholde væskeformet kulturmedium, og som har et par lodrette endevægge ved modsatte ender og yderligere lodrette sidevægge, som forbinder de ved modsatte ender værende lodrette endevægge, og hvilken beholder (9) har en eller flere stationære plader (13), som er anbragt med indbyrdes afstand, og som hver strækker sig i hovedsagen parallelt med beholderens (9) vandrette bund, og tilvejebringer i det mindste en overflade, på hvilkender kan forekomme cellevækst, k e n d e t e g n e t ved, at hver plade (13) er således anbragt i afstand fra de nævnte modsatte lodrette endevægge i beholderen (9), at der dannes en første lodret kanal og en anden lodret kanal i beholderen (9) ved de modsatte endevægge, medens de strækker sig til umiddelbar nærhed af sidevæggene, og at der fin-

des en indgangsledning (15) til beholderen, som munder direkte ind i den første lodrette kanal, og en afgangsledning (17) fra beholderen, som munder direkte ud fra den nævnte anden lodrette kanal og er indrettet til fjernelse af kulturmediet fra beholderen (9) på en sådan måde, at kulturmediet bringes til at strømme på tværs af pladerne fra den ene til den anden ende, når det ledes ind i og fjernes fra kanalerne.

2. Apparat ifølge krav 1, kendet ved, at beholderen er aflang og rektangulær.

3. Apparat ifølge krav 1, kendet ved, at pladerne (13) er stablet oven på hinanden.

4. Apparat ifølge krav 1, kendet ved, at pladerne dannes af de parallelle dele af et strimmelformet materiale, som, idet det danner en bølgeformet bane, er anbragt omkring to sæt af understøtningsdele, som er anbragt vinkelret på bunden og på parret af lodrette sidevægge, idet det strimmelformede materiales kanter vender hen imod disse sidevægge.

5. Apparat ifølge krav 4, kendet ved, at understøtningsdelene omfatter et par indbyrdes adskilte stænger (41, 43), som er anbragt vinkelret på beholderens (9) bund, idet den ene af stængerne er anbragt i afstand fra den ene endevæg og en sidevæg i beholderen (9), medens den anden er anbragt i afstand fra den anden endevæg og den samme sidevæg, og at hver af disse stænger (41, 43) er indrettet til at bære et stativ af stænger, stave, knager, tråde, virer, liner eller snore til tilvejebringelse af en række bæreorganer, som strækker sig i hovedsagen parallelt med beholderens (9) bund.

Fremdragne publikationer:

DE patent nr. 1215303

SE fremlæggeskrift nr. 339075

US patent nr. 3407120.

Fig.1

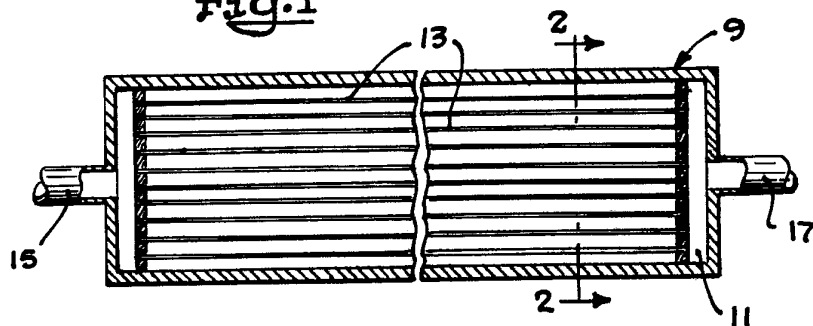


Fig.2

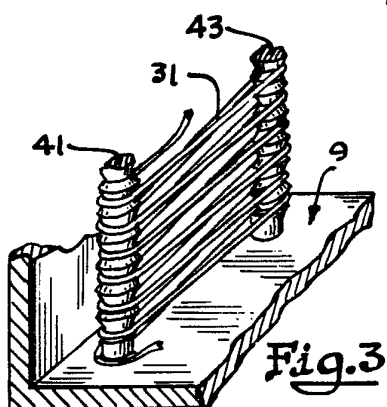
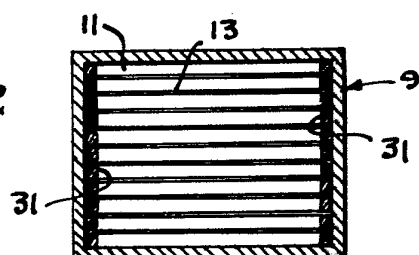


Fig.4

