Octrooiraad

(10)A Terinzagelegging (11) 8303166

Nederland (19) NL

(54) **Toevoegsel voor een celgroeimedium.**

(51) Int.Cl³.: C12N 5/02.

(71) Aanvrager: Collaborative Research, Inc. te Lexington, Massachusetts, Ver. St. v. Am.

(74) Gem.: Ir. G. Jacobson c.s.
Octrooibureau Los en Stigter B.V.
Weteringschans 96
1017 XS Amsterdam.

(21) Aanvrage Nr. 8303166.

(22) Ingediend 14 september 1983.

(32) Voorrang vanaf 15 september 1982.

(33) Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 418522 .

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 2 april 1984.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Toevoegsel voor een celgroeimedium.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een toevoegsel voor een celgroeimedium voor de kweek van cellen in vitro.

Dierlijk serum en in het bijzonder serum uit kalverfoetussen is bekend als een toevoegsel voor gebruikelijke media voor weefselkweek. Zo is het bekend tot aan 20 vol.%, doorgaans 10 vol.%, runderserum toe te voegen aan een weefselkweek van dierlijke cellen bij standaard media voor weefselkweek, als Ham's F12, Dulbecco's gemodificeerde Eagle's Media en dergelijke. Het serum blijkt te zorgen voor enige wezenlijke materialen voor de weefselkweek, die niet eenvoudig of in het geheel niet worden geleverd door de bekende vervangingsmiddelen. Het gebruik van dierlijk serum als een toevoegsel aan groeimedia helpt meestal de cellen zich uit te drukken in een gedifferentieerde functie, tot de gewenste concentraties te groeien en de groei en levensvatbaarheid gedurende lange perioden te behouden.

Het gebruik van dierlijk serum kan echter bepaalde problemen bij weefselkweek veroorzaken. Het belangrijkste probleem is de wisselvalligheid van de samenstelling van het serum. Zo kan het vermogen de groei te bevorderen van aparte monsters serum wijd uiteenlopen. De leveranciers van dierlijk serum trachten deze variatie tot een minimum te beperken door serum van een groot aantal dieren samen te voegen en donorkudden van dieren, die serum met bepaalde hoedanigheden opleveren, in stand te houden en/of door de gehalten aan hormonen, groeifactor en andere serumbestanddelen te ziften of te analyseren. Dergelijke pogingen kunnen echter kostbaar zijn en leiden niet altijd met succes tot vermindering van de problemen betreffende de wisselvalligheid. Deze problemen kunnen het gebruik beperken en kunnen leiden tot afwijkingen bij onderzoeksresultaten. Gebruikers moeten vaak uitgebreide beproeving van serum uitvoeren voor gebruik, hetgeen zowel veel tijd als geld kan kosten. De beschikbaarheid van runderserum in grote hoeveelheden kan een probleem zijn, aangezien de beschikbare hoeveelheden afhangen van het wel en wee van de

rundvleesindustrie. Het serum uit kalverfoetussen alsmede ander runderserum is namelijk beschikbaar als een bijproduct en hangt af van de afmetingen van de kudden, die cyclisch variëren.

Men heeft beseft, dat het gebruik van dierlijk serum als een toevoegsel aan normale groeimedia nadelen heeft. Daarom heeft men reeds getracht de hoeveelheid in weefselkweken te gebruiken serum te verlagen of het gebruik van serum geheel na te laten. Zo heeft men reeds groeimedia samengesteld vrij van serum voor specifiek gebruik voor bepaalde soorten cellen. Evenzo werd een verlaagde toevoeging van serum toegepast in combinatie met de toevoeging van groeifactoren bij andere toevoegsels, die waren samengesteld voor specifieke celsoorten. Zo hing in alle gevallen, waar toegevoegde hoeveelheden serum werden verlaagd of het serum geheel werd weggelaten bij gebruikelijke weefselgroei in het verleden, dit samen met bepaalde soorten cellen. In de stand der techniek is nog geen vrijwel universeel te gebruiken toevoegsel voor weefselkweek bekend, dat door de betrokken industrie aanvaard is voor toepassing bij een groot aantal verschillende soorten cellen, zowel getransformeerd als niet-getransformeerd primair materiaal van zowel fibroblastoïde en epithelioïde oorsprong, alsmede getransformeerde en niet-getransformeerde continue celtakken.

De onderhavige uitvinding heeft tot doel een toevoegsel voor een celgroeimedium te verschaffen, dat dierlijk serum en een combinatie van vervangingsmiddelen voor de bestanddelen van het dierlijk serum bevat, en bruikbaar is voor de bevordering van de celgroei in een kweek.

Verder heeft de uitvinding tot doel een toevoegsel voor een celgroeimedium te verschaffen, dat bereid kan worden met vrijwel constante eigenschappen in ieder gewenst volume voor toepassing bij de celgroei in uiteenlopende media, terwijl de cellen uit wijduiteenlopende celsoorten gekozen kunnen worden.

Verder is een doel van de uitvinding toevoegsels voor celgroeimedia te verschaffen, die in combinatie met gebruikelijke weefselkweekmedia kunnen worden gebruikt voor de groei

van cellen.

Voorts heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor de bereiding van het genoemde toevoegsel voor een celgroeimedium en op de toepassing ervan.

Dienovereenkomstig bestaat volgens de uitvinding het toevoegsel voor een celgroeimedium in wezen uit een ondergeschikte hoeveelheid dierlijk serum, bij voorkeur serum uit juist geboren kalveren, en als hoofdbestanddeel een mengsel van peptide- en thyroïdehormonen, estrogenen, androgenen, corticoïden, voedingsstoffen, groeifactoren, transportfactoren, anorganische zouten, aminozuren, vitamines, suiker en andere bijkomende bestanddelen.

Het toevoegsel volgens de uitvinding wordt opgenomen in een waterbasis en maakt een snelle en overvloedige groei van een groot aantal celsoorten in primaire en continue celkweektakken, getransformeerde en niet-getransformeerde celtakken uit fibroblastoïde en epithelioïde cellen bevattende weefsel mogelijk.

Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is het gebruikte serum serum uit juist geboren kalveren, is het peptidehormoon insuline, is de transportfactor transferrine, zijn de groeifactoren afkomstig uit de epidermis of het endotheel, terwijl de voedingsstoffen selenigzuur en O-fosforylethanolamine omvatten en het thyroïdehormoon trijoodthyroxine is, het corticoïde hydrocortison is, het estrogeen estradiol-17 of progresteron is en het androgeen testosteron is.

Bij voorkeur wordt het toevoegsel volgens de uitvinding uit zijn bestanddelen samengesteld, grondig gemengd en wordt gefiltreerd voor sterilisatie van het mengsel. De filtratie wordt bij voorkeur uitgevoerd als laatste trap van de vorming van het toevoegsel.

Het is een eigenschap van het toevoegsel volgens de uitvinding, dat dit de problemen die samenhangen met de wisselvalligheid van de samenstelling van verschillende serummonsters, kan verminderen of opheffen. De geringe gebruikte hoeveelheid serum kan gewisseld worden zonder dat dit een grote invloed heeft, aangezien het serum slechts een gering bestanddeel van de weefselkweek vormt, doorgaans een kwart of

minder van de hoeveelheid die gewoonlijk werd gebruikt. Hoewel slechts een geringe hoeveelheid serum wordt gebruikt, verschaft dit geheel verrassend de noodzakelijke bestanddelen voor een universeel te gebruiken medium voor weefselgroei, zoals bijvoorbeeld celhechtingsfactoren en dragerproteïnen voor in water onoplosbare stoffen. De geringe toevoeging op basis van serum draagt andere factoren voor de celvermenigvuldiging bij. Aangezien de hoeveelheid serum gering is, zijn er verlaagde gehaltes aan giftige stoffen, die doorgaans in serum aanwezig zijn. Aangezien het proteïnegehalte in de uiteindelijke celkweek verlaagd is ten opzichte van de op uitsluitend serum gebaseerde kweken, wordt de afscheiding van proteïne uit het eindproduct eenvoudiger. De concentratie aan in de kweekmedia gegroeid celproduct kan bij gebruik van het toevoegsel volgens de uitvinding worden verhoogd met daardoor verbetering van de opbrengst. De verlaging van het totale gehalte aan proteïnes van het celgroeimedium kan tevens leiden tot een verhoogde doelmatigheid en eenvoud van het winnen en de zuivering van de gewenste celproducten. Dit kan van buitengewoon groot belang zijn in de farmaceutische industrie en bij de bereiding van vaccins. De reproduceerbaarheid van een constant product wordt verhoogd met het toevoegsel volgens de uitvinding. Dit kan de wisselvalligheid van de groeibevordering, die doorgaans wordt waargenomen bij verschillende charges met uitsluitend dierlijk serum, opheffen en de noodzaak opheffen een groot aantal serummonsters te beproeven om daaruit een geschikt monster te kunnen selecteren. Zo kan een aanzienlijke besparing in kosten en tijd worden bereikt.

Het toevoegsel voor een celgroeimedium volgens de onderhavige uitvinding wordt gebruikt in plaats van dierlijk serum bij de kweek van cellen en weefsel. Gewoonlijk werd dierlijk serum gebruikt in celkweek in hoeveelheden van 5-20 vol.% van normale weefselkweekmedia; het verdient evenwel de voorkeur het toevoegsel voor een celgroeimedium volgens de onderhavige uitvinding te gebruiken in hoeveelheden van 1-25 vol.% van gebruikelijke weefselkweekmedia. Bij bepaalde celtakken kunnen hogere of lagere gehalten aan toevoegsel ten opzichte van het gebruikelijke medium worden ge-

bruikt zoals bijvoorbeeld 0,1-40% toevoegsel ten opzichte van 99,9-60% gebruikelijk medium. Zulke normale weefselkweekmedia, die reeds tevoren met enkel serum werden gebruikt en ook geschikt zijn voor gebruik samen met het toevoegsel volgens de uitvinding, zijn onder andere de volgende:

McCoy's 5a Medium
McCoy, T.A., Maxwell, M. en Kruse, P.F., Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 100, 115-118 (1959)

Medium met minimaal essentiële bestanddelen - MEM
Eagle, H., Science 130, 432 (1959)

Gemodificeerd Eagle-Medium
Daniel, M.D. en Melendez, L.V., Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med., 127, No. 3 (maart 1969)

Dulbecco's gemodificeerd Eagle-Medium
Dulbecco, R. en Freeman, G., Virology 8, 396 (1959)
Smith, J.D., Freeman, G., Vogt, M. en Dulbecco, R., Virology 12, 185-196 (1960)
Tissue Culture Standards Committee, In Vitro 6, No. 2, 93

L-15 (Leibovitz) Medium
Leibovitz, A., Am. J. Hyg. 78, 173-180 (1963)

Voedingsstoffenmengsels - F-10 en F-12 Media
Ham, R.G., Exp. Cell Res. 29, 515-526 (1963)
Ham, R.G., Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 288-293 (1965)

Waymouth's Medium
Waymouth, C., J. Nat. Cancer Inst. 22, 1003-1017 (1959

Voorbeelden van waterige mengsels op basis van dergelijke media zijn als volgt:

Ham's Voedingsstoffenmedium F-12 (verkrijgbaar bij Gibco Laboratories)

7607133

BESTANDDEEL	mg/l
Anorganische zouten:	
$CaCl_2 . 2H_2O$	44,00
$CuSO_4 . 5H_2O$	0,00249
$FeSO_4 . 7H_2O$	0,834
KCl	223,60
$MgCl_2 . 6H_2O$	122,00
NaCl	7599,00
$NaHCO_3$	1176,00
$Na_2HPO_4 . 7H_2O$	268,00
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,863
Andere componenten:	
D-glucose	1802,00
Hypoxanthine	4,10
Linoleïnezuur	0,084
Lipoïnezuur	0,21
Fenol-rood	1,20
Putrescine . 2HCl	0,161
Natriumpyruvaat	110,00
Thymidine	0,73
Aminozuren:	
L-alanine	8,90
L-arginine . HCl	211,00
L-asparagine . H_2O	15,01
L-aspartinezuur	13,30
L-cysteïne . HCl . H_2O	35,12
L-glutaminezuur	14,70
L-glutamine	146,00
Glycine	7,50
L-histidine . HCl . H_2O	20,96
L-isoleucine	3,94
L-leucine	13,10
L-lysine . HCl	36,50
L-methionine	4,48
L-fenylalanine	4,96
L-proline	34,50
L-serine	10,50
L-threonine	11,90
L-tryptofaan	2,04
L-tyrosine	5,40
L-valine	11,70
Vitamines:	
Biotine	0,0073
D-Ca-pantotenaat	0,4800
Cholinechloride	13,9600
Folinezuur	1,300
i-Inositol	18,000
Niacinamide	0,0370
Pyridoxine.HCl	0,0620
Riboflavine	0,0380
Thiamine.HCl	0,3400
Vitamine B_{12}	1,3600

9307106

Dulbecco's gemodificeerd Eagle-Medium (in H_2O)

BESTANDDEEL	mg/l
Anorganische zouten:	
$CaCl_2$ (watervrij)	200,00
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0,10
KCl	400,00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200,00
NaCl	6400,00
$NaHCO_3$	3700,00
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	125,00[a]
Andere componenten:	
D-glucose	1000,00
Fenol-rood	15,00
Natriumpyruvaat	110,00
Aminozuren:	
L-arginine . HCl	84,00
L-cystine	48,00
L-glutamine	584,00
Glycine	30,00
L-histidine . HCl . H_2O	42,00
L-isoleucine	105,00
L-leucine	105,00
L-lysine . HCl	146,00
L-methionine	30,00
L-fenylalanine	66,00
L-serine	42,00
L-threonine	95,00
L-tryptofaan	16,00
L-tyrosine	72,00
L-valine	94,00
Vitamines:	
D-Ca-pantotenaat	4,00
Cholinechloride	4,00
Folinezuur	4,00
Myo-inositol	7,20
Nicotinamide	4,00
Pyridoxal . HCl	4,00
Riboflavine	0,40
Thiamine . HCl	4,00
Vitamine B_{12}	--

[a] De weergegeven waarden zijn in overeenstemming met de voorschriften van het Tissue Culture Standards Committee, In Vitro, 9, No. 6 (1970).

Andere standaardmedia voor weefselkweek kunnen worden gebruikt samen met het toevoegsel volgens de uitvinding voor de groei van cellen. De variaties in dergelijke media zijn talloos. Voorwaarde is slechts, dat het toevoegsel wordt

gebruikt met media, die voor de bevordering van de groei in aanwezigheid van dierlijk serum bekend zijn.

Serum uit juist geboren kalveren verdient de voorkeur als het serumgedeelte van het toevoegsel volgens de onderhavige uitvinding, omdat het universelere toepassingen kent dan andere dierlijke serums. Dit serum wordt genomen van kalveren van ten hoogste tien dagen oud. In sommige gevallen kan het serum uit juist geboren kalveren worden vervangen door ander runderserum of ander dierlijk serum, zoals paardeserum, runderserum, kippeserum, konijneserum, varkensserum, schapeserum, of geiteserum of een combinatie daarvan. Bij het groeien van celtakken, welke doorgaans in andere serums groeien dan die van juist geboren kalveren, kan het andere serum worden gebruikt als het serumgedeelte van het toevoegsel voor de celgroei volgens de onderhavige uitvinding.

In alle gevallen verdient het de voorkeur een combinatie van bestanddelen in het toevoegsel te verschaffen, dat een grote veelzijdigheid heeft en bruikbaar is voor een groot aantal celtakken. Zo worden de hormonen en andere bestanddelen zo gekozen, dat hoewel sommige daarvan niet noodzakelijk zijn voor gebruik in alle celtakken, geen ervan de werking van de andere bij enige celtak verstoren.

De peptidehormonen, als bestanddeel van het onderhavige toevoegsel, kunnen insuline omvatten. De transportfactor is transferrine, dat ook een peptidehormoon is. De thyroïdehormonen zijn trijoodthyroxine en thyroxine.

De te gebruiken groeifactors zijn bij voorkeur groeifactors uit de epidermis, zoals deze door Collaborative Research, Inc. te Waltham, Massachusetts, U.S.A., onder de aanduiding CR-EGF op de markt worden gebracht. Dit EGF wordt beschreven in de literatuurplaats Savage, C.R. en Cohen, S., J. Biol. Chem., 247, 7609-7611 (1972). Een celgroeitoevoegsel uit het endotheel, dat bruikbaar is en celgroeifactoren uit het endotheel bevat, is verkrijgbaar bij Collaborative Research, Inc. onder de aanduiding CR-ECGS. Deze groeifactor wordt verder beschreven in de literatuurplaats Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P.R., en Forand, R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 5674-5678 (1979).

Het gebruikte androgeen kan testosteron, dihydrotestosteron, nandrolon of oxymetholon zijn, terwijl het gebruikte estrogeen progresteron, 17-(beta)estradiol of estron kan zijn.

Het corticoïde is bij voorkeur hydrocortison, maar andere materialen, zoals cortison, dexamethason, prednisolon en corticosteron kunnen ook worden gebruikt. De voedingsstoffen omvatten bij voorkeur selenigzuur, O-fosforylethanolamine en andere materialen, die een rol spelen bij de enzymatische functies van de cel.

De bruikbare anorganische zouten zijn die, welke gewoonlijk gebruikt worden in weefselkweekmedia, zoals bijvoorbeeld calcium-, koper-, ijzer-, mangaan-, ammonium-, kalium-, magnesium-, natrium- en zinkzouten van chloor, sulfaat, fosfaat en dergelijke, waarvan enkele gehydrateerd kunnen zijn.

Gebruikelijke toe te voegen aminozuren voor weefselkweekmedia, zoals L-alanine, L-arginine.HCl, L-asparagine, L-aspartinezuur, L-cysteïne.HCl.H_2O, L-isoleucine, L-lysine.HCl, L-methionine, L-fenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tryptofaan, L-tyrosine, L-valine, L-glutaminezuur, L-glycine, L-glutamine, L-histidine en L-leucine zijn ook bruikbaar.

Essentiële vitamines zijn d-biotine, D-Ca-pantothenaat, cholinechloride, folinezuur, myo-inositol, nicotinamide, pyridoxine.HCl, riboflavine, thiamine.HCl en vitame B_{12}. Verdere nog te noemen bestanddelen omvatten suikers, zoals glucose, hypoxanthine, linoleïnezuur, fenol-rood, putrescine.2 HCl, natriumpyruvaat, thymidine, ascorbinezuur, calciferol, nicacine, para-aminobenzoëzuur, pyridoxal.HCl, vitame A. Bij voorkeur wordt gedeïoniseerd gedestilleerd water met bij voorkeur een soortelijke weerstand boven 8 $M\Omega/cm^3$ gebruikt. Overigens kan iedere waterkwaliteit, die doorgaans geschikt wordt geacht voor weefselkweek, worden gebruikt.

Natuurlijk worden daarbij sommige van de bestanddelen gebruikt in hun in water oplosbare vorm, zoals bijvoorbeeld de zoutvorm van de betrokken hormonen, aminozuren, vitamines en dergelijke.

8303133

Het toevoegsel volgens de onderhavige uitvinding wordt bij voorkeur gebruikt in plaats van serum zoals dit gewoonlijk wordt gebruikt in weefselkweek. Zo kan bij voorkeur het toevoegsel worden gebruikt in hoeveelheden van 1-25 vol.% van de totale oplossing van een gebruikelijk weefselkweekmedium, zoals bijvoorbeeld in Ham's F-12 of in Eagle's medium, en wel in een verhouding van 1:99 tot 1:4. Zo ligt het gehalte aan kalverserum, wanneer dit als dierlijk serum wordt gebruikt, bij voorkeur tussen 0,25 en 6,25 vol.% van het totale weefselkweekmedium. Zo is dit serumgehalte volgens de onderhavige uitvinding voldoende laag om enige aanmerkelijke toevoeging van toxische factoren te vermijden, wordt de invloed van de variatie van de serumkwaliteit verlaagd en worden de voor de celgroei vereiste materialen, anders dan uit een geheel op proteïne gebaseerd materiaal, verschaft.

Het toevoegsel voor een celgroeimedium volgens de uitvinding, dat als universeel vervangingsmiddel voor serum de voorkeur verdient, heeft de volgende samenstelling:

SAMENSTELLING 1

Bestanddeel	Concentratie
Serum uit juist geboren kalveren	25 vol.% van het toevoegsel
	mg/l
Insuline	25
Transferrine	50
EGF	5
ECGS	77,5
Selenigzuur	0,1612
O-fosforylethanolamine	56,44
L-3,5,3'-trijoodthyroxine	$1,683 \times 10^{-4}$
Hydrocortison	$4,33 \times 10^{-3}$
Estradiol-17	$3,41 \times 10^{-3}$
Progesteron	$3,93 \times 10^{-3}$
Testosteron	$3,61 \times 10^{-3}$
Anorganische zouten	
$CaCl_2$	23,24
$CuSO_4.5H_2O$	0,00174
$FeSO_4.7H_2O$	0,58
KCl	156,56
$MgCl_2.6H_2O$	85,40
NaCl	5319,30
Na_2HPO_4	99,40
$ZnSO_4.7H_2O$	0,60

8305139

Aminozuren	mg/l
L-alanine	6,24
L-arginine.HCl	153,73
L-asparagine	10,50
L-aspartinezuur	9,32
L-cysteïne.HCl.H_2O	24,58
L-glutaminezuur	10,30
Glycine	5,26
L-histidine.HCl.H_2O	14,67
L-isoleucine	2,76
L-lysine.HCl	25,56
L-methionine	3,13
L-fenylalanine	3,47
L-proline	24,17
L-serine	7,36
L-threonine	8,34
L-tryptofaan	1,43
L-tyrosine	3,81
L-valine	8,20
Vitamines	
d-Biotine	0,0051
D-Ca-pantothenaat	0,18
Cholinechloride	9,77
Folinezuur	0,93
Myo-inositol	12,61
Nicotinamide	0,026
Pyridoxine.HCl	0,043
Riboflavine	0,026
Thiamine.HCl	0,24
Vitamine B_{12}	0,95
Verdere bestanddelen	
Glucose	1261,12
Hypoxanthine	2,86
Linoleïnezuur	0,059
Fenol-rood	0,87
Putrescine.2HCl	0,11
Natriumpyruvaat	77,07
Thymidine	0,51
Natriumbicarbonaat	1176,00
Gedeïoniseerd gedestilleerd water met een soortelijke weerstand boven 8 MΩ/cm^3 tot aan een volume van 1 liter.	

De voorkeurssamenstelling kan worden bereid in grote hoeveelheden of in kleine monsters van bijvoorbeeld 1 l, mits de bovenstaand gegeven verhoudingen worden aangehouden.

Terwijl deze specifieke samenstelling gebleken is de voorkeur te verdienen, zijn variaties mogelijk. Zoals reeds gezegd, kunnen andere dierlijke serums worden gebruikt in plaats van serum uit juist geboren kalveren. De bovengenoemde samenstelling kan worden gebruikt in alle gevallen, waar

9503160

runderserum reeds werd gebruikt als een toevoegsel aan gebruikelijke weefselkweekmedia. Zo kan 0,1-40 vol.% van de bovengenoemde samenstelling worden toegevoegd aan gebruikelijke weefselkweekmedia voor een groot aantal verschillende celtakken, die anders gekweekt zouden zijn met een gelijk volume toegevoegd dierlijk serum. De toegepaste groeiomstandigheden voor de cellen zijn in hoofdzaak dezelfde als die welke van toepassing zijn wanneer uitsluitend dierlijk serum als het toevoegsel wordt gebruikt.

Gebruikelijke weefselkweekomstandigheden worden toegepast, wanneer de toevoegsels volgens de uitvinding worden vermengd met de weefselkweekmedia en worden toegepast voor de groei van cellen in weefselkweek. Zo kan bijvoorbeeld de gebruikelijke groeitemperatuur van 30-38°C worden gebruikt. De perioden van celgroei liggen doorgaans wijd uiteen doch meestal boven 6 h. De wijzen van celkweek kunnen de gebruikelijke zijn, waaronder suspensiekweek, celgroei gebonden op een substraat, celgroei gebonden op microdragerkorrels, groei in zachte agar, celgroei met collagen en andere biomatrixdragers. Rol-, schud- of stationaire suspensiekweektechnieken kunnen worden toegepast. Het medium dat met het toevoegsel volgens de onderhavige uitvinding is aangevuld, wordt bij voorkeur bij een pH van ca. 6,5 tot ca. 7,8 gehouden voor een maximale celgroei. Doorgaans bufferen in gebruikelijke media zoals F12 of gemodificeerd Eagle-medium buffers de celweefselgroeimedia tot een pH in het fysiologische gebied. De gasatmosfeer boven de groeimengsels volgens de onderhavige uitvinding kunnen als gebruikelijk zijn voor de betrokken celtak die wordt gekweekt. Zo kunnen kooldioxideatmosferen van 0-15% worden gebruikt als gemengde gasatmosferen uit zuurstof, stikstof, kooldioxide en lucht.

Variaties van de boven aangegeven hoeveelheden in de voorkeurssamenstelling van het toevoegsel die met gunstig resultaat mogelijk zijn, worden onderstaand aangegeven:

Bestanddeel	Gebied
Serum van juist geboren kalveren	5-25 vol.%
	mg/l
Insuline	5-10
Transferrine	20-100
EGF	2-100
ECGS	2-100
Selenigzuur	0,013-0,13
O-fosforylethanolamine	1,4-140
L-3,5,3'-trijoodthyroxine	$6{,}73 \times 10^{-7}$-$6{,}73 \times 10^{-4}$
Hydrocortison	$3{,}46 \times 10^{-4}$-$3{,}46 \times 10^{-2}$
Estradiol-17	$2{,}72 \times 10^{-4}$-$2{,}72 \times 10^{-2}$
Progresteron	$3{,}15 \times 10^{-4}$-$3{,}15 \times 10^{-2}$
Testosteron	$2{,}88 \times 10^{-4}$-$2{,}88 \times 10^{-2}$

De overige bestanddelen, welke gebruikelijke additieven voor weefselkweekmedia zijn, kunnen in grotere mate gevarieerd worden met grotere mogelijkheden voor vervanging dan de boven opgesomde bestanddelen. Deze overige bestanddelen zijn die welke verder nog onder samenstelling 1 zijn opgesomd onder anorganische zouten, aminozuren, vitamines en overige bestanddelen.

De hoeveelheid van ieder van de bestanddelen kan nog variëren tot buiten de voorkeursgebieden bij bepaalde celtakken.

Bij het bereiden van een toevoegsel voor een celgroeimedium volgens de onderhavige uitvinding, worden de materialen op gebruikelijke wijze samen gemengd. Het verdient echter de voorkeur, het materiaal na de mengbewerking te filtreren om te zorgen voor een uiteindelijke sterilisatie.

Een voorkeurswerkwijze voor het bereiden van de voorkeurssamenstelling 1 wordt uiteengezet in onderstaand voorbeeld I:

Voorbeeld I

Het toevoegsel voor een celgroeimedium volgens de onderhavige uitvinding met de bestanddelen in hoeveelheden als boven onder samenstelling 1 aangegeven, werd als volgt bereid:

1. Bevroren serum uit juist geboren kalveren werd ontdooid en opgewarmd tot 37°C om het oplosbaar worden van koud onoplosbaar globuline te verzekeren.

2. Anorganische zouten, aminozuren, vitamines en overige bestanddelen werden opgelost in het gedeïoniseerde ge-

destilleerde water bij een temperatuur in het gebied van 31-35°C.

3. Een gedeelte (∿25%) van de in trap 2 verkregen oplossing werd verwijderd voor het in oplossing brengen van de overige bestanddelen. Aan dit monster werd het serum uit juist geboren kalveren toegevoegd tot een uiteindelijke concentratie van 2 vol.%.

4. Voorraadoplossingen van de volgende bestanddelen werden bereid onder toepassing van gedestilleerd gedeïoniseerd water: runderinsuline (25 mg/l); transferrine (25 mg/l); EGF, receptorkwaliteit (10 mg/l); ECGS (1,5 mg/l); selenigzuur (16,12 µg/l); O-fosforylethanolamine (56,44 mg/l) in natriumhydroxide; trijoodthyroxine (168,25 µg/l) en in absolute ethanol: hydrocortison (4,12 µg/l); estradiol-17 (3,41 µg/l); progresteron (3,93 µg/l); testosteron (3,61 µg/l).

5. Het juiste volume van iedere voorraadoplossing werd langzaam toegevoegd onder constant roeren aan de oplossing van trap 2 in de volgende volgorde: insuline, transferrine, EGF, ECGS, selenigzuur, O-fosforylethanolamine, trijoodthyroxine worden allereerst verdund in een gering volume van de oplossing van trap 2 vóór toevoeging aan de uiteindelijke samenstelling. Op eendere wijze werden hydrocortison, estradiol, progesteron en testosteron verdund in de oplossing van trap 2 vóór toevoeging aan de uiteindelijke samenstelling.

6. Het tot 37°C verwarmde serum uit juist geboren kalveren werd langzaam onder roeren toegevoegd.

7. De uiteinde pH van de samenstelling lag in het gebied van een pH van 7,2-8,0 en had een osmolariteit van 330-350 milliosmol.

8. De uiteindelijke oplossing werd tweemaal gefiltreerd over een 0,2 µm filter onder oplevering van een gesteriliseerd eindproduct met de samenstelling als boven gegeven.

In specifieke voorbeelden voor de toepassing van het universele voorkeurstoevoegsel voor serum met bovengenoemde samenstelling, werden verscheidene celtakken als volgt gekweekt:

8303133

Voorbeeld II

Het toevoegsel voor een groeimedium met samenstelling 1 werd gebruikt voor de groei van BHK-21-cellen uit de American Type Culture Collection, Rockville, U.S.A., MD ATCC No. CCL-10 (niercellen van hamsterbabies). Dulbecco's gemodificeerd Eagle's medium (DMEM) werd in porties van 5 ml gebracht op een eerste set van petrischalen van 60 mm en aangevuld met 10% kalverserum. De cellen werden gekweekt gedurende 6 d bij 37°C onder een vochtig gemaakte 5% CO_2-95% luchtatmosfeer.

Op een tweede set petrischalen van 60 mm werden onder dezelfde omstandigheden BHK-21-cellen gekweekt in DMEM aangevuld met 10% van het groeitoevoegsel met samenstelling 1 volgens de onderhavige uitvinding.

De eerste en de tweede set bestonden uit verscheidene petrischalen met telkens monster A, monster B of monster C van het toevoegsel en monster A, B en C van het gemodificeerde medium met kalverserum. Na 3 d en na ca. 5 d werden de media met het toevoegsel met samenstelling 1 en de media met serum vervangen door een verse voorraad in ieder van de schalen.

De doelmatigheid van de vervanging met het toevoegsel volgens de onderhavige uitvinding voor de celgroei van BHK-21 wordt toegelicht in de grafiek van fig. 1. Daaruit blijkt, dat de ontwikkelingsduur bij het toevoegsel voor een celgroeimedium volgens de onderhavige uitvinding 13,1 h te zijn in vergelijking met 16,5 h in een medium waaraan 10% kalverserum is toegevoegd. De generatietijd of verdubbelingstijd van de cellen wordt gebruikt voor meting van de groeisnelheid of verdubbelingssnelheid van de celpopulatie. De generatietijd van de cellen is dus een kwantitatieve maatstaf voor het vermogen van het toevoegsel voor een weefselkweekmedium de groei te bevorderen. De celdichtheid op de zesde dag bedroeg $2,23 \times 10^5$ cellen per cm^2 in 10% toevoegsel voor de celgroei met samenstelling 1 in DMEM, en $1,59 \times 10^5$ cellen per cm^2 in 10% kalverserum in DMEM.

Zo blijkt de samenstelling 1 een grotendeel universeel celgroeitoevoegsel te zijn voor toevoeging aan een weefselkweekmedium.

Andere cellen, die met positief resultaat zijn gekweekt onder toepassing van het mengsel met samenstelling 1 als toevoegsel volgens de onderhavige uitvinding, zijn de volgende:

A431 - Menselijk epidermoïde adenocarcinoom
BALB 3T3 - Fibroblast uit muize-embryo's
C6 - Glioma uit ratten
CV-1 - Niercellen van de Afrikaanse groene aap
Endotheel (niet getransformeerd) - Aorta-endotheel uit muizen
F9 - Carcinoom uit muize-embryo's
FS-1230 - Menselijke diploïde fibroblasten
HeLa - Menselijk hersencarcinoom
Hybridoma Sp-2 - "Mouse Myeloma Parent - continued antibody production"
Hybridoma NS-1 - "Parent Mouse Myeloma"
KB - Carcinoom uit menselijke mondepidermis
L6 - Myoblast uit skeletspieren van ratten
MCF-7 - Menselijk borstcarcinoom
Sarcoom uit muizen
Myoblastoïde (niet getransformeerd) uit muizen
SV403T3 - SV-40 Virus Transformed BALB C 3T3
TR-M - Testikeltumor uit ratten
TR-ST - Testikeltumor uit ratten
TM-4 - Sertoli uit muizen
TR-1 Testikelcellen (niet getransformeerd) uit ratten
VERO - Niercellen van Afrikaanse groene aap
WI-38 - Menselijke diploïde fibroblast
MRC-5 - Menselijke diploïde fibroblast
OMTW9PL - Borsttumor uit ratten - 6 onafhankelijke klonen
Primaire culturen van menselijk fibroblast
Primaire culturen uit tumorbiopsie bij mensen

Terwijl sommige celtakken, zoals fibroblastcellen uit ratte-embryo's gewoonlijk niet groeien in het celgroeimedium volgens de onderhavige uitvinding, wordt het laatste desondanks gezien als een universeel toevoegsel, aangezien het de groei bevordert in wijd uiteenlopende celculturen.

"Groeien" zoals in de onderhavige beschrijving gebruikt, heeft betrekking op de verbreiding van de celdeling

tot hogere dichtheden in media bij kweek op vaste dragers of vrij in suspensie. Wanneer het toevoegsel volgens de onderhavige uitvinding wordt gebruikt bij gebruikelijke media van het bovenbeschreven type, in de in brede zin aangegeven verhoudingen, bij 0,1-40% toevoegsel voor het celgroeimedium volgens de uitvinding op 99,9-60% medium en bij voorkeur 1-25 vol.% toevoegsel volgens de uitvinding op 99-75 vol.% gebruikelijk medium, wordt de celgroei van een groot aantal celtakken bevorderd. Het toevoegsel volgens de onderhavige uitvinding kan gedurende lange tijd worden opgeslagen zonder significant verlies aan activiteit. Het toevoegsel kan bijvoorbeeld worden bevroren bij een temperatuur van -20°C. Het toevoegsel bleek gedurende tenminste perioden van 4 weken stabiel te zijn bij temperaturen van 4°C. Zelfs na vermenging met gebruikelijke media behoudt het toevoegsel zijn de celgroei bevorderende activiteit gedurende een lange tijdsduur. Hoewel het toevoegsel is beschreven als een aparte oplossing, die moet worden toegevoegd aan een gebruikelijk medium, is het natuurlijk duidelijk, dat de samenstelling van het toevoegsel zelf direct kan worden gevormd in gebruikelijk medium door toevoeging in porties daaraan. In alle gevallen verdient het de voorkeur het te gebruiken serum toe te voegen als laatste trap nadat eerst tenminste een gedeelte van het serum is oplosbaar gemaakt in een gedeelte van de oplossing van anorganische zouten, aminozuren, vitamines en overige bestanddelen.

C O N C L U S I E S

1. Toevoegsel voor een celgroeimedium voor de kweek van cellen in vitro, m e t h e t k e n m e r k, dat het toevoegsel in wezen bestaat uit een ondergeschikte hoeveelheid dierlijk serum en als hoofdbestanddeel een mengsel van peptide- en thyroïdehormonen, estrogenen, androgenen, corticoïden, voedingsstoffen, groeifactoren, transportfactoren, anorganische zouten, aminozuren, vitamines, suiker en andere bijkomende bestanddelen.

2. Toevoegsel voor een celgroeimedium volgens conclusie 1, m e t h e t k e n m e r k, dat het dierlijke serum, de hormonen, de estrogenen, de androgenen, de corticoïden, de groeifactoren, de voedingsstoffen en de transportfactoren in wezen bestaan uit serum uit zoogdieren, insuline, transferrine, EGF, ECGS, selenigzuur, O-fosforylethanolamine, trijoodthyroxine, hydrocortison, estradiol-17, progesteron, resp. testosteron.

3. Toevoegsel voor een celgroeimedium volgens conclusie 1 of 2, m e t h e t k e n m e r k, dat het serum runderserum is.

4. Toevoegsel voor een celgroeimedium volgens conclusies 1-3, m e t h e t k e n m e r k, dat genoemde bestanddelen in de volgende hoeveelheden van het toevoegsel worden gebruikt:

Bestanddeel	Gebied
Runderserum	5-25 vol.%
	mg/l
Insuline	5-10
Transferrine	20-100
EGF	2-100
ECGS	2-100
Selenigzuur	0,013-0,13
O-fosforylethanolamine	1,4-140
L-3,5,3'-trijoodthyroxine	$6{,}73 \times 10^{-7}$-$6{,}73 \times 10^{-4}$
Hydrocortison	$3{,}46 \times 10^{-4}$-$3{,}46 \times 10^{-2}$
Estradiol-17	$2{,}72 \times 10^{-4}$-$2{,}72 \times 10^{-2}$
Progesteron	$3{,}15 \times 10^{-4}$-$3{,}15 \times 10^{-2}$
Testosteron	$2{,}88 \times 10^{-4}$-$2{,}88 \times 10^{-2}$

5. Toevoegsel voor een celgroeimedium, m e t h e t k e n m e r k, dat het in wezen bestaat uit: een ondergeschikte hoeveelheid runderserum en als hoofdbestanddeel een mengsel van peptide- en thyroïdehormonen, estrogenen, androgenen, corticoïden, voedingsstoffen, groeifactoren, transport-

factoren, anorganische zouten, aminozuren, vitamines, suiker en andere bijkomende bestanddelen, terwijl het toevoegsel bruikbaar is om de groei te bevorderen van een groot aantal uiteenlopende soorten cellen, waaronder getransformeerde en niet-getransformeerde primaire cellen van zowel fibroblastoide en epithelioïde oorsprong en getransformeerde en niet-getransformeerde continue celtakken.

6. Toevoegsel voor een celgroeimedium volgens conclusie 5, m e t h e t k e n m e r k, dat het runderserum, de hormonen, de estrogenen, de androgenen, het corticoïde, de groeifactor, de voedingsstoffen en de transportfactor in wezen bestaan uit runderserum, insuline, transferrine, EGF, ECGS, selenigzuur, o-fosforylethanolamine, trijoodthyroxine, hydrocortison, estradiol-17, progesteron resp. testosteron.

7. Toevoegsel voor een celgroeimedium volgens conclusie 5 of 6, m e t h e t k e n m e r k, dat het serum serum uit juist geboren kalveren is.

8. Toevoegsel voor een celgroeimedium, m e t h e t k e n m e r k, dat het in wezen bestaat uit:

Bestanddeel	Concentratie
Dierlijk serum	0,1-40 vol.%
	mg/l
Insuline	25
Transferrine	50
EGF	5
ECGS	77,5
Selenigzuur	0,1612
O-fosforylethanolamine	56,44
L-3,5,3'-trijoodthyroxine	$1,683 \times 10^{-4}$
Hydrocortison	$4,33 \times 10^{-3}$
Estradiol-17	$3,41 \times 10^{-3}$
Progesteron	$3,93 \times 10^{-3}$
Testosteron	$3,61 \times 10^{-3}$
Anorganische zouten	mg/l
$CaCl_2$	23,24
$CuSO_4.5H_2O$	0,00174
$FeSO_4.7H_2O$	0,58
KCl	156,56
$MgCl_2.6H_2O$	85,40
NaCl	5319,30
Na_2HPO_4	99,40
$ZnSO_4.7H_2O$	0,60

Aminozuren	mg/l
L-alanine	6,24
L-arginine.HCl	153,73
L-asparagine	10,50
L-aspartinezuur	9,32
L-cysteïne.HCl.H_2O	24,58
L-glutaminezuur	10,30
Glycine	5,26
L-histidine.HCl.H_2O	14,67
L-isoleucine	2,76
L-lysine.HCl	25,56
L-methionine	3,13
L-fenylalanine	3,47
L-proline	24,17
L-serine	7,36
L-threonine	8,34
L-tryptofaan	1,43
L-tyrosine	3,81
L-valine	8,20
Vitamines	
d-Biotine	0,0051
D-Ca-pantothenaat	0,18
Cholinechloride	9,77
Folinezuur	0,93
Myo-inositol	12,61
Nicotinamide	0,026
Pyridoxine.HCl	0,043
Riboflavine	0,026
Thiamine.HCl	0,24
Vitamine B_{12}	0,95
Overige bestanddelen	
Glucose	1261,12
Hypoxanthine	2,86
Linoleïnezuur	0,059
Fenol-rood	0,87
Putrescine.2HCl	0,11
Natriumpyruvaat	77,07
Thymidine	0,51
Natriumbicarbonaat	1176,00
Gedestilleerd water tot aan een volume van 1 liter.	

9. Toevoegsel voor een celgroeimedium volgens conclusies 5-8, met het kenmerk, dat het dierlijk serum serum uit juist geboren kalveren is en wordt toegevoegd in een hoeveelheid van 5-25 vol.%

10. Toevoegsel voor een celgroeimedium volgens conclusies 5-9, met het kenmerk, dat het serum uit juist geboren kalveren wordt gebruikt in een hoeveelheid van 25%.

11. Combinatie omvattende

(a) 99,9-60 vol.% van een celkweekmedium met alle groeicomponenten, die noodzakelijk zijn voor de groei van dierlijke

cellen, wanneer het wordt samengevoegd met dierlijk serum, en

(b) 0,1-40 vol.% van een toevoegsel volgens een der conclusies 1-10.

12. Werkwijze voor het kweken van cellen in vitro, waarbij cellen worden gekweekt in aanwezigheid van een celkweekmedium waarmee in een hoeveelheid van 0,1-40 vol.% van het totale mengsel een toevoegsel volgens een der conclusies 1-10 is gemengd.

13. Werkwijze voor het kweken van cellen in vitro, m e t h e t k e n m e r k, dat de cellen worden gekweekt in een mengsel dat in wezen bestaat uit een weefselkweekmedium en een toevoegsel voor een celgroeimedium, dat bruikbaar is in plaats van zuiver dierlijk serum, welk mengsel in staat is de groei te bevorderen van cellen waaronder getransformeerde en niet-getransformeerde primaire cellen van zowel fibroblastoïde en epithelioïde oorsprong en getransformeerde en niet-getransformeerde continue celtakken, waarbij het toevoegsel essentiële materialen verschaft, die noodzakelijk zijn voor de celgroei en die anders zouden zijn verschaft door zuiver dierlijk serum, en waarbij het toevoegsel verder tenminste een ondergeschikt gedeelte aan dierlijk serum bevat.

14. Werkwijze voor de bereiding van een toevoegsel voor een celgroeimedium, dat voor een gedeelte uit dierlijk serum bestaat, m e t h e t k e n m e r k, dat een gedeelte van het dierlijk serum wordt opgelost in een gedeelte van het toevoegsel, dat de vermenging van de bestanddelen van het toevoegsel wordt voltooid en dat als vrijwel laatste trap de rest van het dierlijk serum wordt toegevoegd, en dat het toevoegsel ter sterilisatie wordt gefiltreerd.

N/31.677-Kp/Pf/cs

Behoort bij O.A.
t.n.v. Collaborative Research, Inc.
te Lexington, Mass., Ver.Staten v. Amerika

