



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4439/85

(51) Int.Cl.6

C 12 M 3/00

(22) Indleveringsdag: 30 sep 1985

(41) Alm. tilgængelig: 02 maj 1986

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 17 nov 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 01 nov 1984 US 667319

(73) Patenthaver: *BECTON DICKINSON AND COMPANY; Mack Centre Drive; P.O.Box 2224; Paramus, New Jersey 07652-1149, US

(72) Opfinder: T Andrew *Guhl; US, Luther R *Johnson; US

(74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S

(54) Dyrkningsindretning med flere rum til dyrkning af væv og med midler til reducere af fordampningen af dyrkningssubstrat

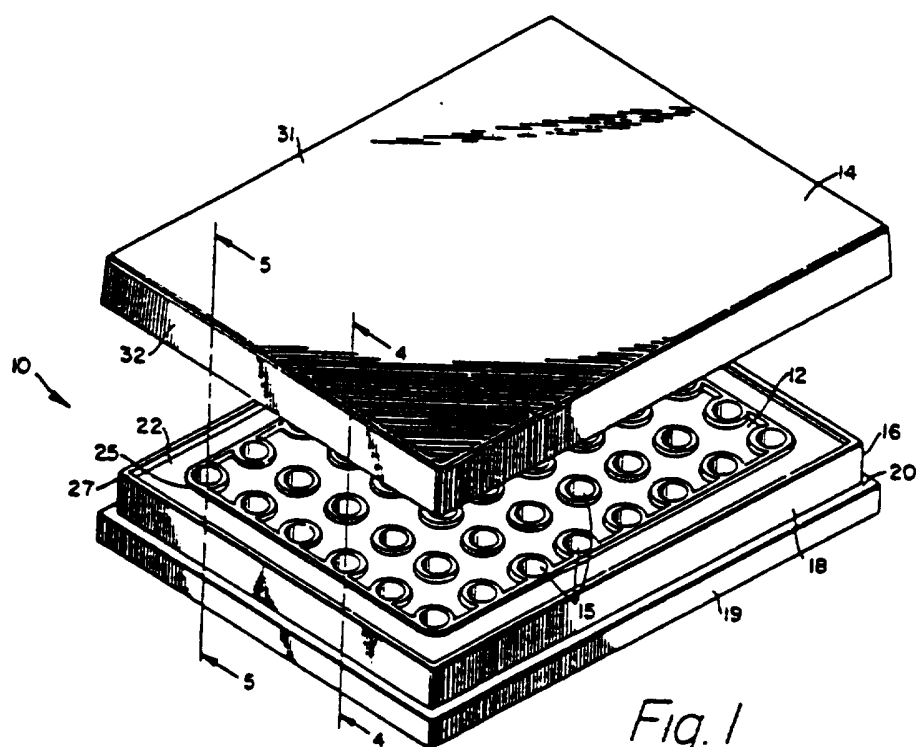
(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4439-85

En dyrkningsindretning (10) med flere rum til dyrkning af væv omfatter en plade (12) og et låg (14). Pladen (12) omfatter et antal rum (15) til optagelse af væske. Pladens (12) ydre rand dannes af opretstående sidevægge (16). Inden for sidevæggene (16) er der med afstand til disse anbragt en afsats (22), der strækker sig rundt langs pladen mellem sidevæggene (16) og rummene (15). Låget (14), der aftageligt kan anbringes på pladen (12), har et i hovedsagen plant dækorgan (31), der strækker sig hen over rummene (15). Ved hjælp af dækorganet (31), sidevæggene (16), afsatsen (22) og rummene (15) dannes der en labyrinthpassage, som muliggør en luftudveksling mellem rummene og de ydre omgivelser med henblik på at opretholde en ligevægt herimellem, men som dog delvis forhindrer en lufttilgang til rummene, med henblik på at minimere fordampningen af væske fra rummene.

4439-85



Opfindelsen angår en vævsvækstindretning, især en flerrumsvækstindretning til in vitro dyrkning af celler i et dyrkningssubstrat, og som har midler til reducere af substratfordampning under brugen.

- 5 Vækstindretninger, ofte benævnt vævsvækstplader, benyttes ofte til in vitro dyrkning af celler, især til forsøgsformål. Flerrumsvækstplader med 6, 12, 24, 48 og 96 rum har været benyttet til disse formål. Sådanne flerrumsvækstplader er hensigtsmæssige at benytte ved
- 10 gennemførelse af undersøgelser til udskillelse af individuelle cellekulturer, idet kulturerne forbliver tæt ved hinanden (de befinder sig alle i en plade med et fælles låg) ved gennemførelse af undersøgelser eller analyser med relation til hinanden på alle kulturerne.
- 15 Kendte låg, hvormed flerrumsvækstplader kan dækkes tjener mindst følgende tre formål: 1) opretholde steriliteten af indholdet i rummene, 2) eliminere den forurening, som kan finde sted mellem de enkelte rum på grund af kondensering på lågets underside, og 3) opretholde en passende atmosfærisk
- 20 ventilering eller luftudskiftning mellem rummene og det omgivne miljø. De to førstnævnte formål opfyldes af de kendte låg til flerrumsvækstplader, medens det sidstnævnte formål endnu ikke er blevet opfyldt tilstrækkelig godt. Især tillader kendte låg til flerrumsvækstplader at der
- 25 strømmer for meget luft ind i rummene fra det ydre miljø. Ved større flerrumsvækstplader forårsager denne luftudskiftning normalt ingen problemer, hvad angår substratet og cellekulturerne i de indre rum. Derimod forstyrres de rum, der befinder sig ved vævsvækstpladens hjørner eller periferi
- 30 af for stor luftstrøm fra omgivelserne. Denne luftstrøm bevirker en fordampning af celledyrkningssubstratet, hvilket resulterer i en koncentration af substratbestanddelene. Dette bevirker, at osmosen i substratet ikke er i balance med den cellulære protoplasma. Som følge heraf hæmmes cellevæksten i
- 35 de rum, hvor der på grund af denne for store luftudskiftning

er sket en fordampning af substratet. Derfor må der enten oftere efterfyldes med substrat for at kompensere for fordampningen eller også må det undlades, at benytte de rum, der befinder sig ved periferien eller ved hjørnerne, til celledyrkningen.

Der kendes flerrumsvævsvækstindretninger fra US-patentskrift nr. 4.349.632, 4.038.149, 4.012.288, 4.010.078, 3.597.326 og 3.107.204. Ligeledes kendes en vækstenshed fra US-patentskrift nr. 4.358.908. Ingen af de ovenfor nævnte patentskrifter beskriver en opfindelse, som løser problemet med substratfordampning på grund af for stor luftudskiftning mellem rummene og de ydre omgivelser.

Der er derfor stadig et behov for en flerrumsvævsvækstindretning, som med henblik på at reducere fordampningen af substratet i cellerne, er i stand til at reducere luftstrømmen til rummene samtidigt med, at der opretholdes tilstrækkeligt luftstrøm til at give en ligevægt mellem vækstsubstratet i rummene og de atmosfæriske forhold uden for flerrumsvævsvækstindretningen. Opfindelsen angår en flerrumsvævsvækstindretning, som løser de ovenfor beskrevne problemer.

Dette er opnået ved vækstensindretningen defineret i de selvstændige krav 1 og 7.

Ved flerrumsvævsvækstindretningen ifølge opfindelsen er der tilvejebragt væsentlige forbedringer i forhold til kendte indretninger. Mest vigtigt er det, at opfindelsen eliminerer eller kraftigt reducerer problemerne ved den store substratfordampning, som finder sted ved kendte flerrumsvævsvækstplader og låg. Selv om opfindelsen har denne nye egenskab er der ikke gået på akkord med tilvejebringelsen af andre væsentlige egenskaber. Således er steriliteten af indholdet i flerrumspladen opretholdt og der er tilvejebragt en passende gasudskiftning mellem rummene og de ydre omgivelser. Substratet, især fra rum, der befinder sig ved hjørnerne og ved

periferien, kan reduceres med op til 50% i forhold til tabet ved kendte flerrumsplader. Som følge heraf optimerer indretningen ifølge opfindelsen betingelserne for celledyrkning. Opfindelsen forklares nedenfor under henvisning til tegningen,
5 hvor

fig. 1 viser i perspektiv en udførelsesform for en flerrumsvævsværkningsindretning ifølge opfindelsen, idet låget er fjernet fra pladen,

fig. 2 samme, set fra siden, idet et hjørne er vist delvis i
10 snit,

fig. 3 et snit efter linien 3 - 3 i fig. 2 af låget til vævsværkningsindretningen,

fig. 4 i større målestok et delsnit efter linien 4 - 4 i fig. 1, hvor låget er samlet med pladen, og

15 fig. 5 i større målestok et delsnit efter linien 5 - 5 i fig. 1, hvor låget er samlet med pladen.

Tegningen og i særdeleshed i figurerne 1 - 3 viser en repræsentativ udførelsesform for en flerrumsvævsværkningsindretning 10 ifølge opfindelsen. Indretningen 10 består af to hoveddele:
20 en plade 12 og et låg 14.

Pladen 12 er i den viste udførelsesform for opfindelsen en flerrumsplade med et antal rum 15 til optagelse af væsker 13. Disse væsker kan være flydende celledyrkningssubstrater, som udgør et vækstmiljø ved celledyrkning. Der kan være forskellige
25 ge antal rum 15 i pladen 12. Der kendes plader med 6, 12, 24, 48 og 96 rum. Fig. 1 viser en plade med 48 rum. Ved de fleste flerrumsplader er rummene anbragt i rækker og søjler, som står vinkelret på hinanden, således at det er muligt let at identificere de rum, som bliver benyttet. Placeringen af rummene i
30 pladen 12 er ikke et udtryk for en begrænsning af indretningen

ifølge opfindelsen, idet enhver placering af rummene kan tænkes.

Rummene er omgivet af vægge 16, som danner pladens 12 ydre rand. I den viste udførelsesform er pladen rektangulær, således at den har fire sidevægge 16. De fleste kendte vævsdyrkningsplader er firkantede. Det ligger dog inden for opfindelsens idé at fremstille pladerne med enhver praktisk anvendelig udformning. Sidevæggene 16 har en øvre del 18 og en nedre del 19. Som det fremgår i figuren danner den nedre del 19 af sidevæggene et trin med sidevæggenes øvre del 18, således at der fremkommer en rundtgående skulder 20 mellem de øvre og de nedre dele. Den nedre del 19 udgør et rundtgående fundament for pladen 12, når flerrumsvævsdyrkningsindretningen bliver benyttet.

Som det fremgår af fig. 4 og 5 samt fig. 1 og 2 er der inden for og med afstand til sidevæggenes øvre del og rundt om pladens 12 øvre overflade indrettet en med udtagning forsynet afsats 22. Denne afsats 22 danner en rand rundt om rummene i pladens 12 indre. Som det fremgår af tegningen strækker udtagningen i afsatsen 22 sig ned under niveauet for rummenes 15 åbninger 24. Rummenes åbninger ligger typisk i i hovedsagen samme horisontale plan, der strækker sig langs med flerrumspladens øvre overflade. Den med udtagning forsynede afsats 22 begrænses af to opretstående kantdele 25 og 27, hvor kantdelen 25 er anbragt indvendigt og kantdelen 27 udgør det øverste stykke af den øvre del 18 af sidevæggene, som strækker sig op til et område, der ligger over den med udtagning forsynede afsats. Selv om afsatsen 22 er vist plan og i hovedsagen ligger i et horisontalt plan, er det klart, at denne kan være forsynet med en indskæring, f.eks. med en V-form, eller den kan have et let buet forløb eller være udformet på andre hensigtsmæssige måder.

Låget 14 er en separat aftagelig del, som dækker alle rummene i flerrumspladen. Selv om låget 14 er vist i alle figurerne,

fremgår udformningen af dette bedst i fig. 3, 4 og 5. Låget 14 omfatter et i hovedsagen plant dækorgan 31, der er tilstrækkelig stor til at dække alle rummene i flerrumspladen. Dækorganets 31 facon modsvarer pladens 12 facon. Rundt langs dækorganet 31 er der et nedadvendende svøb 32, som danner en rand rundt langs låget 14. Svøbet 32 har fire sider, som hver strækker sig nedad i hovedsagen parallelt med den nærliggende sidevæg af flerrumspladen. Når låget 14 er anbragt over pladen 12 ender svøbet 32 i et område, som ligger op til, men som ikke er i berøring med flerrumspladens skulder 20, hvorved der opstår et mellemrum 34 mellem svøbet 32 og skulderen 20. Yderligere fremgår det af figurerne, at der også mellem svøbet 32 og den øvre del 18 af flerrumspladens sidevægge er et mellemrum 35.

På undersiden af dækorganet 31 er der tildannet et antal ringe 36 i form af små fremspring. Hver ring 36 er indrettet til at ligge over et rums åbning 24, således at hvert rum bliver isoleret og en indbyrdes forurening af indholdet i rummene forhindres. Når låget er anbragt på flerrumspladen, skal ringene 36 befinde sig lige oven over åbningerne ved rummenes top, men de må ikke forhindre, at der kan foregå en udskiftning af luften mellem rummene og de ydre omgivelser.

Med henblik på at holde låget 14 på plads på flerrumspladen 12, er hver af lågets hjørner forsynet med en lågpude 38. Disse puder hviler på toppen af pladens kantdel 27 og holder låget i den rigtige position, når flerrumsvævstyrkningssamlingen bliver benyttet. Med afstand til svøbet 32 er der indvendigt i låget anbragt en ribbe 40, der strækker sig nedad fra dækorganets 31 bundflade. Denne ribbe, der i hovedsagen forløber parallelt med hver af svøbets 32 fire sider, er anbragt således på dækorganet, at den strækker sig nedad og ind i udtagningen af den med udtagning forsynede afsats 22 uden at komme i kontakt med afsatsen. Herved opstår der et mellemrum 41 mellem ribben 40 og afsatsen 22, når låget er korrekt anbragt på flerrumspladen. Dette fremgår mest tydeligt i fig. 4.

I hver af lågets 14 fire hjørner strækker ribben 40 sig derimod nedad i form af en flange 42. Flangen har i hovedsagen i hvert hjørne to ben, der danner en vinkel med hinanden, svarende til hjørnevinklerne. Idet flangen 42 strækker sig længere nedad, kommer hver flange i berøring med den med udtagning forsynede afsats 22 ved flerrumspladens hjørner. Herved bidrager både flangerne 42 og puderne 38 til at understøtte låget 14 i den korrekte position på flerrumspladen 12. I denne position er dækorganet 31 hævet så meget op over åbningerne 24 af rummene, at der mellem åbningerne 24 og dækorganet 31 er et mellemrum 44. Med undtagelse af i hjørnerne, hvor flangerne 42 er i berøring med den med udtagning forsynede afsats 22, står mellemrummene 34, 35, 41 og 44 i forbindelse med hinanden, således at der tilvejebringes en luftpassage. Denne luftpassage tillader en luftudskiftning mellem rummene 15 og de ydre omgivelser. Som det fremgår i figurerne er passagen udformet labyrintlignende, således at luftstrømmen mellem rummene og de ydre omgivelser minimeres. Yderligere styrer den nedadvendende ribbe, der strækker sig ind i udtagningen på flerrumspladens med udtagning forsynede afsats, luftstrømmen og leder denne væk fra flerrumspladens ydre periferi.

I pladens hjørner spærres luftstrømmen fuldstændig på grund af flangernes 42 berøring med pladens med udtagning forsynede afsats 22. Alle disse træk og lågets og pladens dele minimerer således fordampningen af flydende dyrkningssubstrat fra rummene, især fra rummene ved pladens hjørner og rundtgående kanter. De indre rum er normalt ikke udsat for det ovenfor beskrevne fordampningsproblem. Ud over at styre problemet med substratfordampning opfylder indretningen ifølge opfindelsen også en flerrumsvævsdyrkningsindretningens øvrige hovedfunktioner. Således bibeholdes steriliteten af indholdet i rummene, og der tilvejebringes en passende luftudskiftning mellem rummene og det omgivne miljø til at opretholde en ligevægt herimellem. Dette skyldes den delvise blokering af luftudskiftningen mellem rummene og labyrintpassagen mellem pladens og lågets samvirkende dele.

Selv om låget og pladen til flerrumsvævsvækstindretningen kan fremstilles i mange forskellige materialer foretrækkes det at benytte plast, især et transparent og stift plast, som f.eks. polystyren. Det foretrækkes at låget og pladen hver
 5 støbes ud i ét.

Flerrumsvævsvækstindretningen ifølge opfindelsen er således en væsentlig forbedring af eksisterende vævsvækstindretninger. Ifølge opfindelsens træk begrænses luftstrømmen til vækstrummene ved hjælp af en hidtil ukendt labyrintagtig
 .10 luftpassage. Begrænsningen af luftstrømmen sørger for optimale betingelser til celledyrkning, primært på grund af en reduktion af substrattabet på grund af fordampning.

P a t e n t k r a v .

15 1. Dyrkningsindretning med flere rum, og som omfatter en plade (12) og et låg (14), k e n d e t e g n e t ved, at pladen omfatter:

et antal med åbninger forsynede rum (15) til optagelse af vævsvækstsubstrat,

20 opretstående sidevægge (16), der danner en mangekantet ydre rand på pladen, og

en afsats (22), som er beliggende inden for og med afstand til sidevæggene (16), og som forløber rundt langs pladen mellem sidevæggene (16) og rummene (15), hvilke sidevægges (16) øvre
 25 del (18) strækker sig op over afsatsen (22) til dannelse af en rand (27), der omgiver afsatsen (22), hvilket låg (14), der aftageligt kan anbringes på pladen (12), omfatter:

et i hovedsagen plant dækorgan (31), der strækker sig hen over rummene (15),

et svøb (32), som omslutter dækorganet (30) under dannelse af et antal hjørner på låget, og som strækker sig nedad i afstand fra pladens (12) sidevægge (16), og et antal flanger (42), som hver er anbragt indvendigt for og med afstand til svøbet (32),
 5 og som fra hver af dækorganets (31) hjørner strækker sig nedad til berøring med pladens (12) afsats (22), så at dækorganet (31) er hævet op over rummenes åbninger og randen (27) er beliggende mellem svøbet (32) og flangerne (42) og

mellem flangerne (42) beliggende ribber (40), der fra dækorganet (31) strækker sig nedad og ind i udtagningen af den med udtagning forsynede afsats (22), men som ikke kommer i berøring med afsatsen (22), idet flangerne (42) strækker sig længere nedad end ribberne (40), således at de kommer i berøring med afsatsen (22) i dennes hjørner,

15 hvorved der ved brug af indretningen kan finde en udveksling af luft sted mellem rummene og de ydre omgivelser på grund af mellemrummene mellem låget (14) og pladen (12), idet flangerne (42) dog fremkalder en delvis blokering af luftudvekslingen med rummene, så at fordampning af substrat for disse minimeres.
 20 res.

2. Dyrkningsindretning ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pladens afsats (22) er forsænket til et niveau under rummenes åbninger.

3. Dyrkningsindretning ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
 25 ved, at pladen (12) yderligere har et rundtgående fundament (19), som danner den nedre del af sidevæggene (16), og som danner et trin med sidstnævnte med henblik på at tilvejebringe en rundtgående skulder (20) mellem fundamentet (19) og den øvre del af sidevæggene (18).

30 4. Dyrkningsindretning ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at svøbet (32) strækker sig ned til pladens skulder (20) uden at komme i berøring med denne.

5. Dyrkningsindretning ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at rummene er anbragt i rækker og søjler, der i hovedsagen står vinkelret på hinanden.

6. Dyrkningsindretning ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pladen (12) og låget (14) er fremstillet af gennemsigtig plast.

7. Dyrkningsindretning med flere rum til dyrkning af væv og som består af en plastplade (12) og et plastlåg (14), k e n d e t e g n e t ved, at pladen omfatter:

10 et antal rum til optagelse af dyrkningssubstrat,

et antal opretstående sidevægge (16), der danner en mangekantet rand på pladen, hvilke sidevægges nedre del (19) udgør et rundtgående fundament, der danner et trin på sidevæggene, således at der tilvejebringes en rundtgående skulder (20) mellem fundamentet (19) og sidevæggenes øvre del (18), en inden for og med afstand til sidevæggene (16) anbragt afsats (22), der strækker sig rundt langs pladen mellem den øvre del (18) af sidevæggene (16) og rummene, hvilken afsats (22) er forsynet med en udtagning, der strækker sig nedad til et niveau under rummenes åbninger og hvilke sidevægges (16) øvre del (18) strækker sig op over den med udtagning forsynede afsats (22) i form af en rand (27), der omslutter afsatsen (22), hvilket låg (14), der aftageligt kan anbringes på pladen (12), omfatter:

25 et i hovedsagen plant dækorgan (31), der strækker sig hen over rummene,

- et svøb (32), som omslutter dækorganet (31) under dannelse af et antal hjørner på låget (14), og som strækker sig nedad med afstand til den øvre del (18) af pladens (12) sidevægge, og som uden at komme i berøring med denne ender nær ved pladens (12) ringformede skulder (20), således at der dannes et mel-

lemrum mellem skulderen (20) og svøbet (32),

en ribbe (40), som er anbragt inden for og med afstand til svøbet (32) og som strækker sig nedad fra dækorganet (31) i retning mod den med udtagning forsynede afsats (22) uden dog
5 at komme i berøring med denne, og

en flange (42), som fra hvert af dækorganets (31) hjørner strækker sig længere nedad end ribben (40) i form af en forlængelse af denne, idet den kommer i berøring med pladens (12) med udtagning forsynede afsats (22), således at dækorganet
10 (31) bliver hævet op over åbningerne til rummene,

hvorved ved brug af indretningen mellemrummene mellem låget (14) og pladen (12) danner en labyrintpassage, som muliggør en luftudveksling mellem rummene og de ydre omgivelser, og som i forbindelse med flangerne (42) bevirker en delvis blokering af
15 lufttilførslen til rummene, så at fordampningen af substrat fra rummene minimeres.

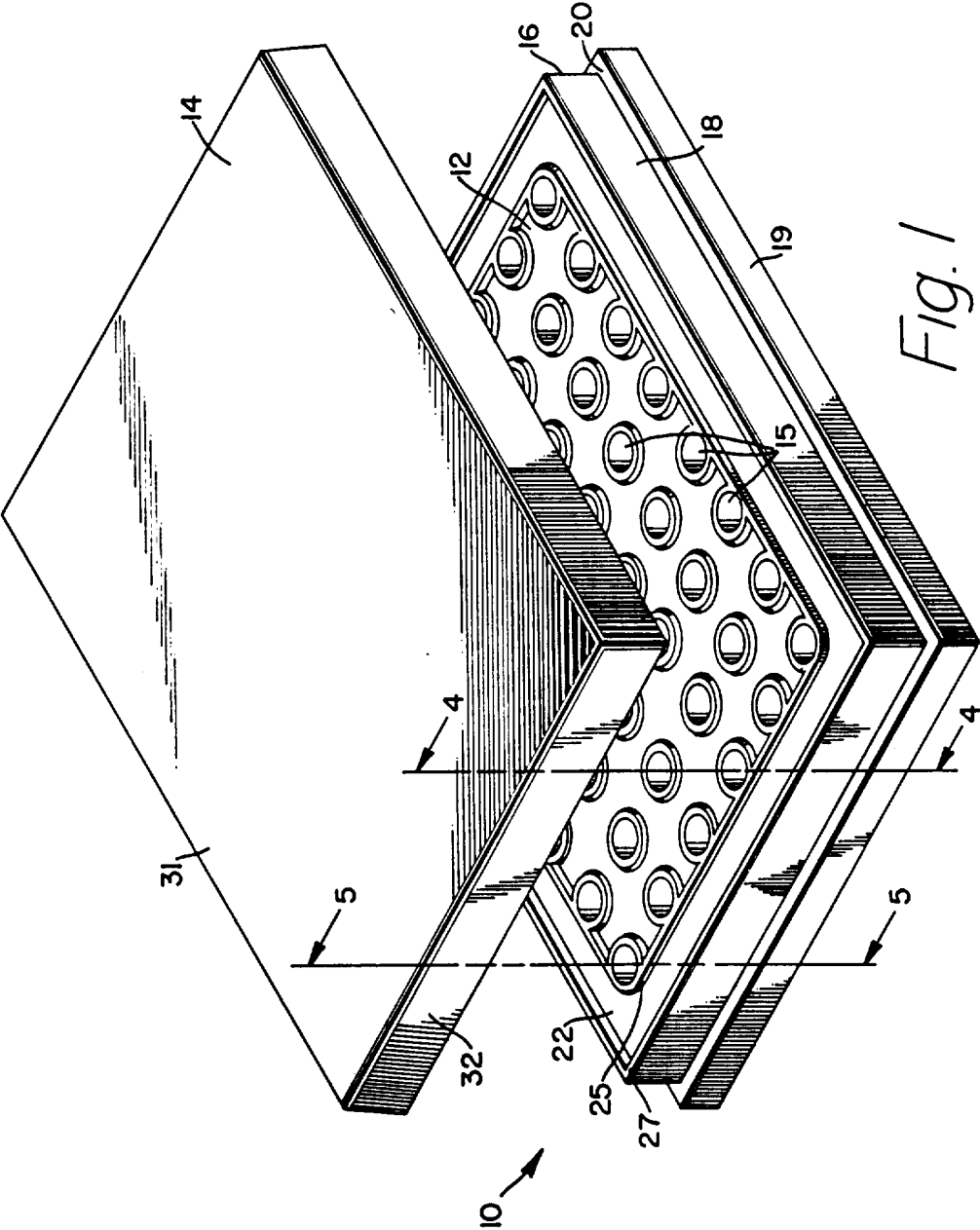
8. Låg (14) til brug i en dyrkningsindretning ifølge krav 1 til 7, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter:

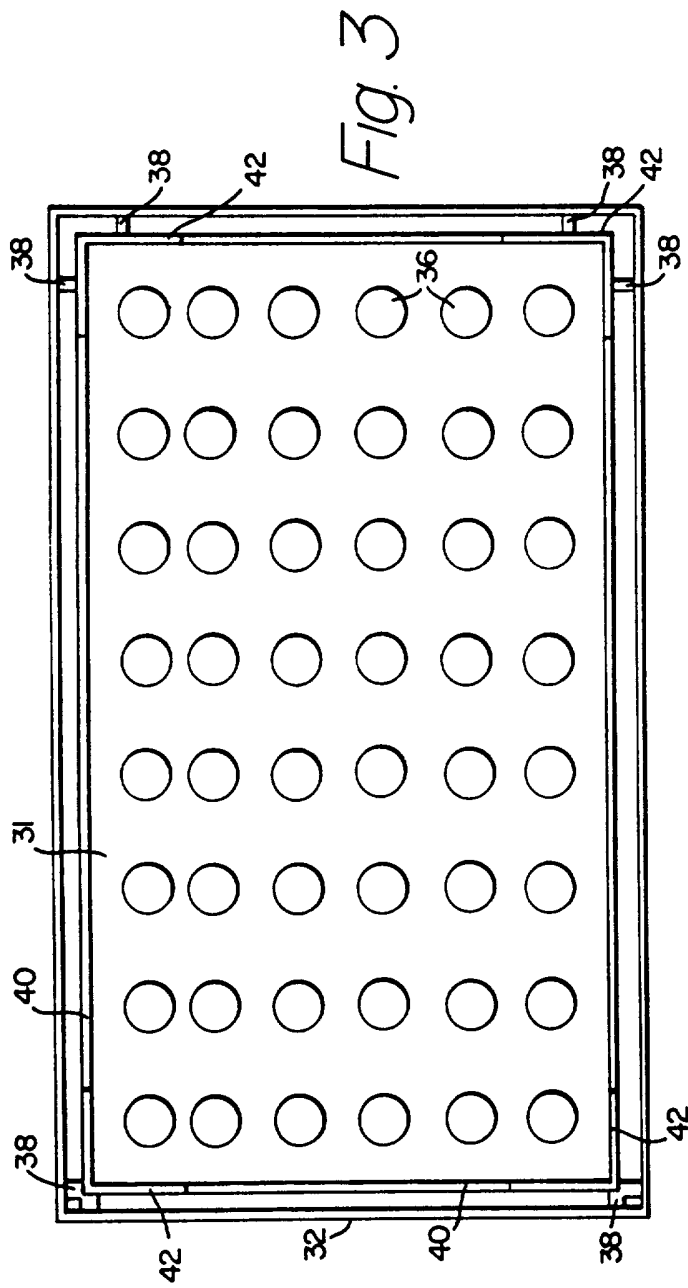
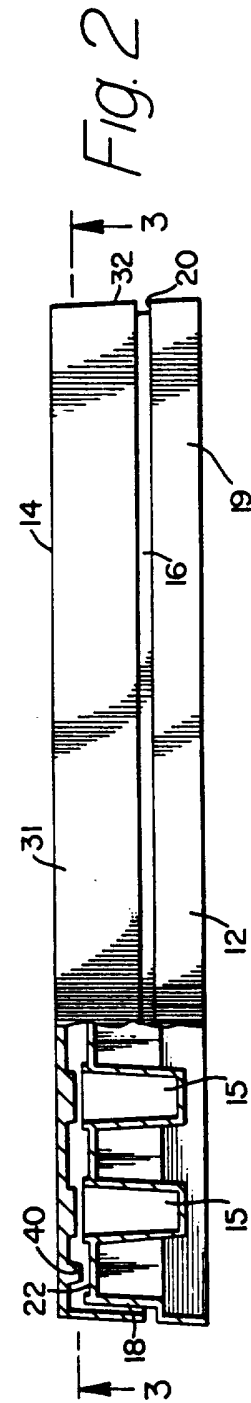
et i hovedsagen plant dækorgan (31),

20 et svøb (32), som omslutter dækorganet (31), og som strækker sig nedad til dannelse af sidevægge, ✓

en kontinuerligt forløbende ribbe (40), som er anbragt inden for og med afstand til svøbet (32), og som strækker sig nedad fra dækorganet (31), og

25- en flange (42), der strækker sig nedad fra hver af dækorganets (31) hjørner i form af en forlængelse af ribben (40).





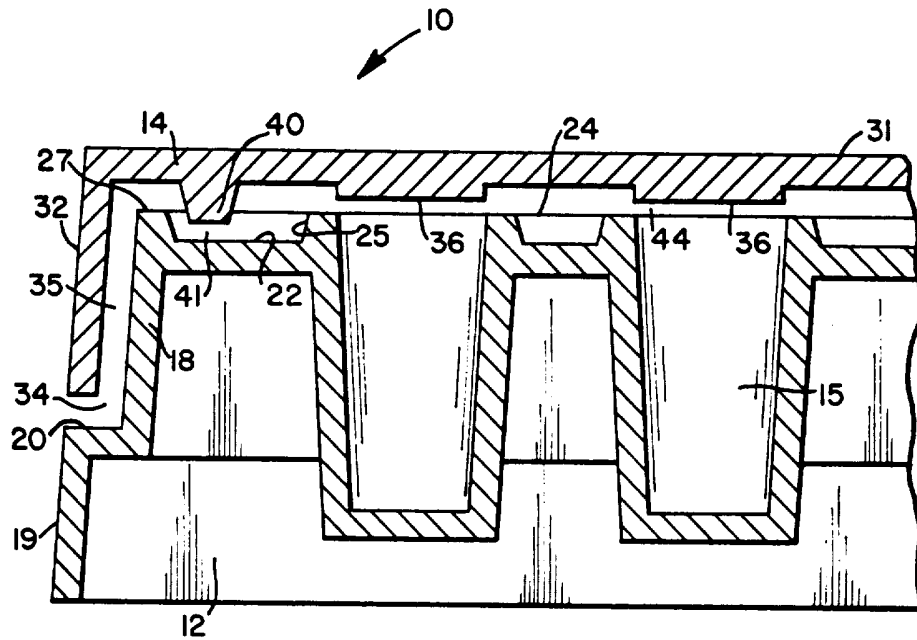


Fig. 4

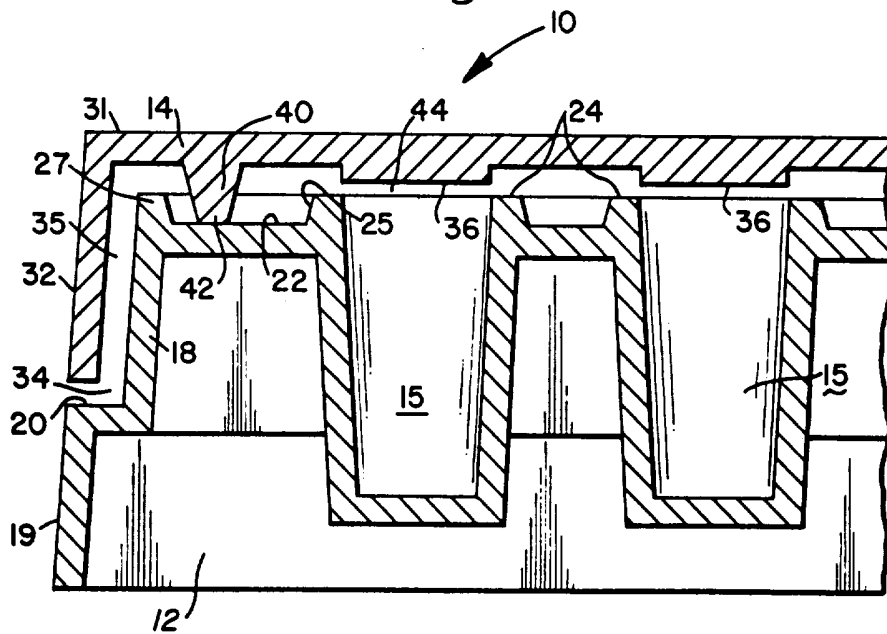


Fig. 5