



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>: C 12 N 1/00  
C 12 N 5/02

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



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

**624 712**

<p>⑰ Gesuchsnummer: 4873/74</p> <p>⑳ Anmeldungsdatum: 08.04.1974</p> <p>⑳ Priorität(en): 09.04.1973 US 349330</p> <p>㉔ Patent erteilt: 14.08.1981</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 14.08.1981</p>	<p>⑦③ Inhaber: BIO-Response, Inc., Scarborough/NY (US)</p> <p>⑦② Erfinder: Sam Rose, Eggertsville/NY (US)</p> <p>⑦④ Vertreter: E. Blum &amp; Co., Zürich</p>
--	--

**⑤④ Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Massensuspensionskultur von Zellen sowie Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten in vitro.**

⑤⑦ Es wird ein Verfahren sowie eine Vorrichtung für die kontinuierliche Massensuspensionskultur von Zellen sowie Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten in vitro beschrieben. Dabei unterwirft man die zu kultivierenden Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten und eine lymphzellfreie Lymphflüssigkeit als Kulturmedium einer Zentrifugation. Dann wird die abgetrennte Lymphflüssigkeit durch frische, lymphzellfreie Lymphflüssigkeit ersetzt und im Medium bildet sich eine Dispersion der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten, die man periodisch abtrennt und sammelt. Das beschriebene Verfahren eignet sich zur Diagnostik kranker Zellen, die z.B. aus einer Fistel abgezogen wurden, ausserhalb des menschlichen und tierischen Körpers.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur kontinuierlichen Massensuspensionskultur von Zellen sowie Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten in vitro, dadurch gekennzeichnet, dass man

- aus den zu kultivierenden Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten und einer lymphzellfreien Lymphflüssigkeit ein Gemisch herstellt,
- das Gemisch zur Abtrennung der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten von der lymphzellfreien Lymphflüssigkeit unter Bildung einer dünnen, länglichen Schicht von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten zentrifugiert,
- die abgetrennte Lymphflüssigkeit durch frische zellfreie Lymphflüssigkeit ersetzt, während die Zellen sowie Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten in dünner Schicht gehalten werden,
- die dünne Schicht aus Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten unter Bildung einer Dispersion in der frischen Lymphflüssigkeit aufhebt,
- die erhaltene Dispersion eine Zeitlang aufrechterhält,
- die Dispersion zur Abtrennung der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten von der frischen Lymphflüssigkeit unter Bildung einer dünnen, länglichen Schicht von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten zentrifugiert,
- die letztgenannten vier Schritte in der angegebenen Reihenfolge mehrmals wiederholt und
- periodisch einen Teil der gezüchteten Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten abzieht, während sich diese in Dispersion befinden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Dispersion von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten in frischer zellfreier Lymphflüssigkeit dadurch eine bestimmte Zeit aufrechterhält, dass man die Dispersion um eine horizontale Achse mit einer Geschwindigkeit zentrifugiert, die zum Anlegen einer Kraft entsprechend einer Beschleunigung von  $(1+X)G$  an die Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten während der ersten Halbumdrehung und einer Kraft entsprechend einer Beschleunigung von  $(1-X)G$  während der zweiten Halbumdrehung führt, wobei X eine Zahl kleiner als 1 und G die Erdbeschleunigung ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Dispersion der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten in frischer zellfreier Lymphflüssigkeit während einer vorgegebenen Zeitdauer dadurch aufrechterhält, dass man die Dispersion unter periodischem Beschleunigen und Verzögern während der betreffenden Zeitdauer zentrifugiert.

4. Anwendung des Verfahrens gemäss Anspruch 1 zur kontinuierlichen Massensuspensionskultur von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten eines kranken Organismus in vitro, dadurch gekennzeichnet, dass man aus Lymphe, die aus einer Brustkanal-Fistel kontinuierlich abgezogen wurde, die Lymphzellen unter Bildung einer dünnen Schicht dieser Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten zentrifugiert; dass man mindestens einen Teil der abgetrennten Flüssigkeit abzieht, während die Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten in der dünnen Schicht gehalten werden; dass man den abgezogenen Anteil von Lymphflüssigkeit mit Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten eines von einer spezifischen Krankheit befallenen Organismus vermischt, das Gemisch zentrifugiert, um die Krankheitszellen sowie Krankheitsgewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten von der Lymphflüssigkeit zu trennen, wobei man eine dünne längliche Schicht dieser Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten bildet, diese Lymphflüssigkeit durch frische zellfreie Lymphflüssigkeit, die von einer anderen Quelle

stammt, ersetzt, die Krankheitszellen, -gewebe, Mikroorganismen und Parasiten in dieser frischen Lymphflüssigkeit unter Aufhebung der dünnen Schicht aus Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten redispersiert, die Dispersion eine vorgegebene Zeitlang aufrechterhält, die Dispersion zur Abtrennung der Krankheitszellen, -gewebe, Mikroorganismen und Parasiten aus der frischen Lymphflüssigkeit zentrifugiert unter Bildung einer dünnen, länglichen Schicht dieser Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten, und dass man die

5. Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1, gekennzeichnet durch

- a) Mittel zum Zentrifugieren des genannten Gemisches unter Abtrennung der Zellen, Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten vom Kulturmedium und unter Bildung einer dünnen, länglichen Schicht aus Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten,
- b) Mittel zum Ersatz des abgetrennten Kulturmediums mit frischem Kulturmedium unter Aufrechterhaltung der genannten dünnen Schicht,
- c) Mittel zur Aufhebung der dünnen Schicht unter Bildung einer Dispersion der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten im frischen Kulturmedium und unter Aufrechterhaltung der Dispersion während einer Zeitdauer, und
- d) Mittel zur periodischen Entnahme eines Teils der gezüchteten Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten, während sich diese in Dispersion befinden.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zentrifuge eine Glocke mit einer inneren Wandung, die eine praktisch zylindrische Höhlung bildet, einen Einlass in diese Höhlung und einen Auslass aus der Höhlung aufweist; Lagervorrichtungen, in denen die Glocke für eine Rotation um die Achse der Höhlung gelagert ist, vorhanden sind, und dass ein praktisch zylindrischer Kern im Inneren der Höhlung anwesend ist, der mit der Glocke verbunden ist und dessen äussere Zylinderfläche zusammen mit der Fläche der inneren Wandung der Glocke eine dünne zylindrische Ringkammer bildet, die sich zwischen der inneren Wandung der Glocke und der äusseren Fläche des zylindrischen Kerns erstreckt.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und Vorrichtung zur kontinuierlichen Massensuspensionskultur von Zellen sowie Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten in vitro.

In der nachfolgenden Beschreibung werden unter «Zellen» Zellen und Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten verstanden.

Es wurde eine neue Apparatur gefunden, die in der biochemischen Forschung sehr wertvoll ist und sich besonders gut zur Ausführung des neuen erfindungsgemässen Verfahrens eignet.

Diese Erfindung der neuen Apparatur macht wiederum neuartige Verbesserungen des Verfahrens zur kontinuierlichen Massensuspensionskultur von «Zellen» in vitro möglich, und es besteht die Möglichkeit, neue Methoden zur Krebsbehandlung bei Säugetieren und neue Methoden zur Kulturbehandlung zwecks Entwicklung von Impfstoffen zu entwickeln.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man

- aus den zu kultivierenden Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten und einer lymphzellfreien Lymphflüssigkeit ein Gemisch herstellt,

– das Gemisch zur Abtrennung der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten von der lymphzellfreien Lymphflüssigkeit unter Bildung einer dünnen, länglichen Schicht von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten zentrifugiert,

– die abgetrennte Lymphflüssigkeit durch frische zellfreie Lymphflüssigkeit ersetzt, während die Zellen sowie Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten in dünner Schicht gehalten werden,

– die dünne Schicht aus Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten unter Bildung einer Dispersion in der frischen Lymphflüssigkeit aufhebt,

– die erhaltene Dispersion eine Zeitlang aufrechterhält,

– die Dispersion zur Abtrennung der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten von der frischen Lymphflüssigkeit unter Bildung einer dünnen, länglichen Schicht von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten zentrifugiert,

– die letztgenannten vier Schritte in der angegebenen Reihenfolge mehrmals wiederholt und

– periodisch einen Teil der gezüchteten Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten abzieht, während sich diese in Dispersion befinden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass man die Dispersion von «Zellen» in frischer zellfreier Lymphflüssigkeit dadurch eine bestimmte Zeit aufrechterhält, dass man die Dispersion um eine horizontale Achse mit einer Geschwindigkeit zentrifugiert, die zum Anlegen einer Kraft entsprechend einer Beschleunigung von  $(1+X)G$  an diese «Zellen» während der ersten Halbumdrehung und einer Kraft entsprechend einer Beschleunigung von  $(1-X)G$  während der zweiten Halbumdrehung führt, wobei  $X$  eine Zahl kleiner als 1 und  $G$  die Erdbeschleunigung ist.

Die «Zelldispersion» in frischer, zellfreier Lymphflüssigkeit kann während einer vorgegebenen Zeitdauer dadurch aufrechterhalten werden, indem man die Dispersion unter periodischem Beschleunigen und Verzögern während der betreffenden Zeitdauer zentrifugiert.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann zur kontinuierlichen Massensuspensionskultur von «Zellen» eines kranken Organismus *in vitro* angewendet werden, indem man aus Lymph, die aus einer Brustkanal-Fistel kontinuierlich abgezogen wurde, die Lymphzellen unter Bildung einer dünnen Schicht dieser «Zellen» zentrifugiert; dass man mindestens einen Teil der abgetrennten Flüssigkeit abzieht, während die «Zellen» in der dünnen Schicht gehalten werden; dass man den abgezogenen Anteil von Lymphflüssigkeit mit «Zellen» eines von einer spezifischen Krankheit befallenen Organismus vermischt, das Gemisch zentrifugiert, um die Krankheitszellen von der Lymphflüssigkeit zu trennen, wobei man eine dünne längliche Schicht dieser «Zellen» bildet, diese Lymphflüssigkeit durch frische zellfreie Lymphflüssigkeit, die von einer anderen Quelle stammt, ersetzt, die Krankheitszellen in dieser frischen Lymphflüssigkeit unter Aufhebung der dünnen Schicht aus «Zellen» redispersiert, die Dispersion eine vorgegebene Zeitlang aufrechterhält, die Dispersion zur Abtrennung der Krankheitszellen aus der frischen Lymphflüssigkeit zentrifugiert unter Bildung einer dünnen länglichen Schicht dieser «Zellen», und dass man die letztgenannten vier Verfahrensschritte in der angegebenen Reihenfolge mehrmals wiederholt und periodisch einen Teil der gezüchteten «Zellen» abzieht, während sich diese «Zellen» in Dispersion befinden.

Die Vorrichtung zur Ausführung des erfindungsgemässen Verfahrens ist gekennzeichnet durch

a) Mittel zum Zentrifugieren des genannten Gemisches unter Abtrennung der «Zellen» vom Kulturmedium und unter

Bildung einer dünnen, länglichen Schicht aus Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten,

b) Mittel zum Ersatz des abgetrennten Kulturmediums mit frischem Kulturmedium unter Aufrechterhaltung der dünnen Schicht aus den «Zellen»,

c) Mittel zur Aufhebung dieser dünnen «Zellschicht» unter Bildung einer Dispersion der Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten im frischen Kulturmedium und unter Aufrechterhaltung der Dispersion während einer Zeitdauer, und

d) Mittel zur periodischen Entnahme eines Teils der gezüchteten Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten, während sich diese in Dispersion befinden.

Eine bevorzugte Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zentrifuge eine Glocke mit einer inneren Wandung, die eine praktisch zylindrische Höhlung bildet, einen Einlass in diese Höhlung und einen Auslass aus der Höhlung aufweist, dass Lagervorrichtungen, in denen die Glocke für eine Rotation um die Achse der Höhlung gelagert ist, vorhanden sind, und ein praktisch zylindrischer Kern im Innern der Höhlung anwesend ist, der mit der Glocke verbunden ist und dessen äussere Zylinderfläche zusammen mit der Fläche der inneren Wandung der Glocke eine dünne, zylindrische Ringkammer bildet, die sich zwischen der inneren Wandung der Glocke und der äusseren Fläche des zylindrischen Kerns erstreckt.

Fig. 1 ist ein Grundriss einer im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Zentrifuge.

Fig. 2 ist ein Grundriss der in Fig. 1 gezeigten Zentrifuge, inklusive deren Antriebsvorrichtung und den nötigen Verbindungen.

Der Grundaufbau des neuartigen Zentrifugalseparators, der Zentrifuge 40, zur Trennung der Lymphzellen von der Lymphflüssigkeit ist in Fig. 1 dargestellt. Obwohl man auch an sich bekannte Zentrifugalseparatoren zur Ausführung des Verfahrens verwenden kann, führen diese bekannten Apparaturen zur Sammlung der Lymphzellen in einen kleinen Körper. Dadurch wird es gewöhnlich schwierig, alle Lymphzellen im Körperchen richtig zu ernähren. Weiterhin sind grosse Kräfte erforderlich, diese Zellen in eine Suspension zu bringen.

Die neuartige Zentrifuge 40 trennt jedoch die Zellen unter Bildung einer derartigen dünnen Schicht, dass praktisch sämtliche Zellen durch die Lymph, welche hinter ihnen fliesst, normal ernährt werden können.

Wenn die «Zellen» unter Bildung einer dünnen, länglichen Schicht zentrifugiert werden und nicht als Klumpen oder dicke Schicht, ist in der Regel nur eine geringere Schwerkraft zu ihrer Dispergierung erforderlich, und dadurch wird die Schädigung der «Zellen» weiter herabgedrückt. Das Zentrifugieren der «Zellen» unter Bildung einer dünnen länglichen Schicht kann in bekannten Zentrifugen nicht erreicht werden, ist aber in der vorliegenden Zentrifuge 40 wegen der grossen Oberfläche der inneren Fläche 41 der äusseren Wandung 42 der Zentrifugenglocke 45 möglich, und die gesamte Oberfläche hat vom Rotationszentrum 43 überall den gleichen Abstand.

Eine bevorzugt aufgebaute Zentrifuge 40 (Fig. 1) weist einen inneren Kern 44 auf, der durch zwei Bolzen 47 (von denen nur einer dargestellt ist) mit der Zentrifugenglocke 45 verbunden ist, sowie einen Deckel 46, der in eine Ausnehmung am Unterteil des Kernes 44 eingesetzt ist. Eine Nabe 48 mit einer Welle 49 ist mit dem Deckel 46 durch Bolzen 47 (von denen nur einer dargestellt ist) verschraubt.

Die Welle 49 ist in den Lagerblöcken 50 (Fig. 2) gelagert. Am entfernten Ende der Welle 49 ist eine elektromagnetische Bremse 51 und eine Antriebsscheibe 52 angebracht. Ein Riemen 53 verbindet die Scheibe 54, welche vom Motor 55 angetrieben wird, mit der Scheibe 52, damit die Welle 49 um die Achse 43 (Fig. 1) angetrieben werden kann.

Die zu trennenden Materialien werden z.B. der Zentrifuge

40 durch den Polytetrafluoräthylenschlauch 56a zugeführt, welcher mit der Glocke 45 durch einen Stopfen 45a des gleichen Materials verbunden ist (Fig. 1). Der Schlauch 56a endet in der Ringkammer 40a, die durch die Wände des Kernes 44 und die innere Wandung 41 der Glocke 45 gebildet wird; die Ringkammer 40a stellt die Zentrifugenkammer dar. Ein O-Ring 44c dient als Dichtung für diese Kammer.

Radialbohrungen 44a am unteren Ende des Kernes 44 öffnen sich in die Zentrifugenkammer 40a. Die entfernten Enden 44b der Bohrungen 44a münden in einen Polytetrafluoräthylenschlauch 56b, der mit dem Kern 44 durch einen Pressitz im Innern eines Rohres 56c aus dem gleichen Werkstoff befestigt ist. Zwischenführungen 57 (Fig. 2) aus Polytetrafluoräthylen unterstützen die Enden der Rohre 56a und 56b, welche jeweils mit bekannten Drehdichtungen 58a und 58b verbunden sind.

Beim Betrieb fliesst ein Gemisch von zu kultivierenden «Zellen» und einer lymphzellfreien Lymphflüssigkeit durch den Einlass 59a in die Zentrifuge 40. Die Glocke wird um ihre Achse 43 mit einer solchen Geschwindigkeit gedreht, die zur Ausübung einer ausreichenden Gravitationsbeschleunigung auf die zu kultivierenden «Zellen» genügt, um sie quer über die Zentrifugenkammer 40a auf die innere Wandung 41 der Zentrifugenglocke 45 treten zu lassen, wo sie eine dünne Schicht auf der Oberfläche der Wandung 41 bilden. Die Bildung einer dünnen, länglichen Schicht aus Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten kann dadurch erreicht werden, dass man die Anzahl dieser «Zellen» regelt, welche in die Zentrifuge eintreten, unter Berücksichtigung der Oberflächengrösse der inneren Wandung 41. Die Bildung einer dünnen, länglichen Schicht wird z.B. durch die Regelung der Geschwindigkeit erleichtert, mit welcher die Lymphflüssigkeit der Zentrifuge zugeführt wird, unter Bezugnahme auf die Gravitationsbeschleunigung in der Zentrifuge.

Nach einer bestimmten Zeit kann während der Rotation der Glocke die zellfreie Lymphflüssigkeit am Ausgang 59b (Fig. 2) abgenommen werden, und es wird frische zellfreie Lymphflüssigkeit zugeführt.

Die Zentrifuge wird dann in der Regel mittels der elektromagnetischen Bremse 51 gestoppt, um die zu kultivierenden «Zellen», die sich in einer dünnen Schicht auf der inneren Wandung 41 befinden, in der zugegebenen Lösung zu dispergieren. Dann kann die Zentrifuge zur Trennung der «Zellen» von der zugeführten Lösung wieder in Betrieb gesetzt werden, und die Lösung kann zwecks Zufuhr weiterer Flüssigkeit abgezogen werden. Die Zentrifuge wird vorzugsweise wiederum angehalten, um die «Zellen» in der neuen Lösung zu dispergieren. Die so gebildete Dispersion wird z.B. aus der Zentrifuge abgezogen.

Fig. 3 und 4 zeigen eine andere Zentrifugenkonstruktion 400. Die Zentrifuge weist einen Kern 401 auf, der aus Aluminium bestehen kann und eine herausragende Hohlwelle 402 aufweist, die sich in Lagern 403 und 404 zur Rotation um die Achse 405 drehen kann.

Die Hohlwelle 402 kann auf übliche, nicht dargestellte Weise angetrieben werden; am Kern 401, nämlich an dessen Ende 407, ist auf übliche Weise eine Frontplatte 406 angebracht. Das Ende 407 des Kernes 401 weist eine eingeschnittene Nut 408 auf, welche das Flüssigkeitsrohr 409 aufnehmen kann.

Ein Ende des Rohres 409 ist mit einer üblichen Drehdichtung 410 verbunden, geht durch die Bohrung 411 in der Frontplatte 406 und liegt in der Nut 408, wie aus Fig. 4 hervorgeht. Das Rohr 409 geht dann durch die Bohrung 412 des Kernes 401 und durch die Hohlwelle 402 bis zu einer zweiten üblichen Drehdichtung 413.

Beim Betrieb gelangt ein Gemisch von zu kultivierenden «Zellen» und einer lymphzellfreien Lymphflüssigkeit in das Zentrifugenrohr 409 durch die Dichtung 413. Die Drehung

des Kernes 401 um die Achse 405 verursacht eine Trennung dieser «Zellen» von der Lymphflüssigkeit in den Bereichen des Rohres 409, die in der Ringnut 408 liegen.

Bei einer Ausführungsform der Zentrifuge 400, wie sie zurzeit mit Erfolg im Betrieb steht, wurde das Rohr 409 aus Polytetrafluoräthylen hergestellt, besass einen rechtwinkligen Querschnitt und eine Dicke von etwa 0,75 mm. Der Kern 401 bestand aus Aluminium und die Frontplatte 406 aus durchsichtigem Kunststoff.

Bevorzugte kontinuierliche in-vitro-Massensuspensionskultur:

Die neue Zentrifuge 40 ist in der Lage, «Zellen» von einer Flüssigkeit, in welcher sie suspendiert sind, sehr schnell abzutrennen und sie in eine sehr dünne Oberflächenschicht zu überführen. Diese Zentrifuge kann mit Vorteil im vorliegenden neuen Verfahren zur kontinuierlichen Suspensionskultur von Zellen in vitro verwendet werden. Es folgt eine Beschreibung dieses neuen Verfahrens. Die folgenden Ausdrücke haben die nachstehend angegebenen Bedeutungen: Gewebe, Zellen, Mikroorganismen und Parasiten von Säugetieren und anderen Tieren werden in der vorliegenden Beschreibung als «Zellen» bezeichnet. Eine Züchtung von «Zellen» ausserhalb des Körpers des Wirtstieres wird als Züchtung in vitro bezeichnet. Wenn die gezüchteten «Zellen» nicht an eine Fläche gebunden sind, sondern ständig oder absatzweise frei suspendiert sind und im Kulturmedium umgerührt werden, so wird diese Züchtung als Suspensionskultur bezeichnet. Ist die Anzahl von gezüchteten «Zellen» sehr gross, so nennt man diese Züchtungstechnik Massenkultur. Setzt man die Züchtung über lange Zeiträume fort, beispielsweise Tage, Wochen oder Monate, so wird diese Kultur als kontinuierliche Kultur bezeichnet. Wenn schliesslich das Kulturmedium kontinuierlich durch das Kulturgefäss strömt, so nennt man dieses Verfahren kontinuierliche Umwälzung des Kulturmediums.

Die Massenkultur von «Zellen» ist sehr wertvoll, wenn man eine grosse Anzahl von «Zellen» oder ihrer Produkte für diagnostische oder therapeutische Zwecke für Tiere oder Menschen benötigt. Die Massenkultur ist ebenfalls sehr wertvoll zur Erzeugung von «Zellen» oder ihren Produkten für wissenschaftliche Untersuchungen.

Weiterhin ist eine Suspensionskultur in Form der Massenkultur sehr zweckmässig, weil die Umgebung um jede «Zelle» die gleiche ist, und weil jede «Zelle» seine Nahrung aus dem Medium um die gesamte Oberfläche der «Zelle» entnehmen und seine Produkte in dieses Medium abgeben kann. Weiterhin gestattet das Umrühren in der Suspensionskultur die Züchtung einer grossen Anzahl von Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten in jedem Züchtungsbehälter.

Eine kontinuierliche Züchtung ist weiterhin sehr vorteilhaft, weil eine grosse Anzahl von Abkömmlingen der ursprünglichen «Zellpopulation» erzeugt und gewonnen werden kann. Weiterhin ist eine schnelle Umwälzung des Kulturmediums bei einem kontinuierlichen Umwälzverfahren sehr zweckmässig, weil die Zusammensetzung des Kulturmediums während der Züchtungsdauer relativ konstant bleibt. Eine Konstanz des Kulturmediums ist ein Erfordernis für die Erzeugung und Gewinnung von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten, die das gleiche Wachstumsverhalten und andere Eigenschaften wie die ursprüngliche «Zellpopulation» zeigen. Eine Gewinnung von «Zellen» mit konstanten Eigenschaften ist wichtig, wenn diese oder deren Produkte für wissenschaftliche Untersuchungen oder zur Diagnose oder Therapie verwendet werden sollen.

Vor der Erfindung wurde die Massensuspensionskultur von «Zellen» durch Umrühren der «Zellen» und der Medien durch verschiedene Arten von Rührern oder durch Bewegungen der Kulturgefässe erzielt. Dabei floss das Medium in den Kulturbehälter und verliess ihn wieder. Ein Mitführen von «Zellen»

wurde durch Einsetzen eines Filters geeigneter Porengrösse in die Ausflussleitung des Mediums erreicht. Bei diesem Verfahren tritt die Schwierigkeit auf, dass sich das Filter sehr schnell verstopft. Die Geschwindigkeit des Filterverstopfens hängt von der Art der zu züchtenden «Zellen» ab und auch vom jeweils verwendeten Kulturmedium. Wenn das Kulturmedium bei einem solchen bekannten Verfahren aus frischer, zellfreier Lymphe besteht, tritt ein besonders schnelles Verstopfen ein, welches nur wenige Minuten benötigt. Das verstopfte Filter hat einen erhöhten Widerstand gegenüber dem Durchfluss zellfreier Lymphe und führt schnell zu einem Stillstand des Durchflusses. Es wurde nun gefunden, dass frische, zellfreie Lymphe für bestimmte Kulturen besonders wertvoll ist, beispielsweise *Treponema Pallidum*, und seine Verwendung zu diesem Zweck ist unten beschrieben.

«Zellen» werden bevorzugt in einer Zentrifuge 40, die oben unter Bezugnahme auf Fig. 1 beschrieben ist, gezüchtet. Die Apparatur ist so programmiert, dass Aktivitätszyklen kontinuierlich wiederholt werden. Erfindungsgemäss besteht jeder Zyklus aus verschiedenen Perioden.

Während der ersten Periode, welche als Zentrifugierperiode bezeichnet wird, lässt man die Zentrifugenglocke mit einer solchen Geschwindigkeit rotieren, dass am Umfang der Glocke eine passende Gravitationskraft  $G$  erzeugt wird, beispielsweise an der inneren Oberfläche 41. Demgemäss werden die Zellen durch die Kraft  $G$  an der inneren Fläche 41 festgehalten. Die Grösse und Anzahl der zu züchtenden Zellen und die Flächen-grösse der inneren Oberfläche 41 der äusseren Wandung der Zentrifugenglocke bestimmt die Dicke  $T$  der Schicht von Zellen, Geweben, Mikroorganismen und Parasiten beim Zentrifugieren.

Derjenige Anteil der «Zellschicht», der unmittelbar in Berührung mit dem Kulturmedium ist, erhält eine optimale Ernährung durch das Medium. Demgegenüber sind die «Zellen» in unmittelbarer Berührung mit der Wandung 41 der Glocke mit einer Schicht gepackter «Zellen» bedeckt und erhalten ihre Ernährung durch einen relativ ungünstigen Prozess der Diffusion durch die gepackte «Zellschicht». Da jedoch die Zentrifugierperiode des Zyklus kurz sein kann, ist es möglich, die ungünstigen Bedingungen der letztgenannten «Zellen» in jedem Zyklus auf einer biologisch unbedeutenden Grösse zu halten.

Die Verfahrensdurchführung in Zyklen gewährleistet jedoch, wie weiter unten näher beschrieben wird, dass sich diese «Zellen» in jeder Schicht bei aufeinanderfolgenden «Zellpackungen» statistisch verteilen.

Die Dicke  $T$  der gepackten «Zellschicht», die Dauer der Zentrifugierperiode und die statistische Verteilung der «Zellen» in ihren Packungen während aufeinanderfolgender Zyklen wird so geregelt, dass man ungünstige biologische Effekte aus ungenügender Ernährung begrenzt oder beseitigt. Die Beseitigung der ungünstigen biologischen Effekte einer Packung der «Zellen» in Intervallen führt dazu, dass man sich den Bedingungen annähert, welche in einer kontinuierlichen Kultur herrschen, wo die «Zellen» ständig in Suspension verbleiben.

Während der Zentrifugierperiode wird ein Volumen von Kulturmedium durch die Kulturkammer 40a derart gepumpt, dass ein fast vollständiger Ersatz mit frischem Medium in der Kammer 40a stattfindet. Die Durchflussgeschwindigkeit des Mediums ist so gross wie möglich, um die Dauer der Zentrifugierperiode so kurz wie möglich zu halten. Die Strömungsgeschwindigkeit wird allerdings begrenzt, um die durch die Gravitation festgehaltenen Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten nicht zu stören und zu bewegen. Eine solche Bewegung kann zu unerwünschtem Verlust an gezüchteten «Zellen» führen, die mit dem druckgepumpten Kulturmedium verlorengehen. Der Verlust an «Zellen» kann vermindert oder vermie-

den werden, indem man die Gravitation und die Strömungsgeschwindigkeit entsprechend einstellt, die Kulturkammer 40a entsprechend auslegt und die Pumpentechnik des Mediums geeignet wählt, derart, dass ein laminarer Durchfluss durch die Kammer 40a stattfindet und keine Turbulenzen oder Pulsierungen der Flüssigkeit auftritt.

Die zweite Periode des Zyklus wird als «Zell»-Dispersionsperiode bezeichnet. Während dieser Periode wird der Durchfluss von Kulturmedium durch die Kulturkammer 40a angehalten, und der Zugang zur Kulturkammer 40a in der Zentrifuge 40 wird geschlossen. Die Drehung der Kultur-glocke wird nun in einem geregelten Mass verzögert. Das kinetische Energie-moment der gezüchteten «Zellen» und des Kulturmediums führt zusammen mit der Verzögerung der Zentrifugenglocke zu einer geregelten Relativbewegung zwischen der Glocke und seinem Inhalt. Als Folge dieser Bewegung wird die Zufuhr stabile Lage der gezüchteten «Zellen» auf der inneren Oberfläche 41 gestört. Das Ausmass der Glockenverzögerung bestimmt das Ausmass der Zellstörung; diese Störung erreicht einen Wert, bei dem die «Zellen» fast gleichförmig im Kulturmedium dispergiert werden.

Die dritte Periode des Zyklus, bei der kein Durchfluss von Medium durch die Kammer 40a stattfindet, wird als Aufrechterhaltung der «Zell»-Dispersion bezeichnet. Es wurden zwei Methoden zur Aufrechterhaltung der «Zell»-Dispersion entwickelt, wobei man die Suspensionsbedingungen der bekannten Wirbelkulturtechnik erhält.

Bei der ersten Arbeitsweise lässt man die Glocke um die horizontale Achse 43 mit einer konstanten niedrigen Geschwindigkeit rotieren, wobei ein Gravitationsfeld  $X$  erzeugt wird, worin  $X$  eine Zahl kleiner als eins bedeutet. Wenn sich die «Zellen» in der unteren Hälfte der Glocke befinden, stehen sie unter dem Einfluss einer Kraft  $(1+X)G$ , welche auf den Umfang der Glocke gerichtet ist. Wenn sich die «Zellen» in der oberen Hälfte der Glocke befinden, wirkt auf sie eine Kraft  $(1-X)G$ , welche auf das Zentrum der Glocke gerichtet ist. Der kontinuierliche Wechsel dieser Kräfte, welche sowohl in Grösse als auch in Richtung verschieden sind, hält die «Zellen» in der frischen Lymphflüssigkeit in Suspension.

Bei der zweiten Arbeitsweise lässt man die Glocke kontinuierlich unter Beschleunigen und Verzögern rotieren. Beide Perioden erzeugen eine Relativbewegung zwischen dem Inhalt der Glocke und der Glocke selbst. Es wird also auf die Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten ein kontinuierlicher Disperionseffekt ausgeübt, so dass sie während dieser dritten Periode in der frischen Lymphflüssigkeit in Suspension verbleiben.

Die vierte Periode des Zyklus wird als «Zellpackungsperiode» bezeichnet. Während dieser Periode strömt kein Medium durch die Glocke. Die Zentrifugenglocke wird beschleunigt, bis sie eine vorgegebene Rotationsgeschwindigkeit erreicht hat, welche solange aufrechterhalten wird, bis die in Suspension befindlichen «Zellen» unter Bildung einer dünnen Schicht auf der Oberfläche der inneren Wandung 41 zentrifugiert sind. Es ist manchmal vorteilhaft, die so erzeugte Gravitationskraft zu vermindern, um die richtige Packungsdichte zu erzielen oder um diese Bedingung aufrechtzuerhalten, wenn die Zellen gepackt worden sind. Eine Verminderung der Gravitationskraft verkleinert die Packungsdichte und vermindert die Schwierigkeit, die «Zellen» anschliessend neu zu dispergieren.

Am Ende der vierten Periode beginnt ein weiterer Zyklus. Periodisch sammelt man statistische Aliquote der gezüchteten Zellen, Gewebe, Mikroorganismen und Parasiten, indem man Kulturmedium durch die Zentrifuge fliessen lässt, wenn die «Zellen» in Suspension sind.

Das oben beschriebene neue Verfahren zur kontinuierlichen Massensuspensionskultur von Zellen, Geweben, Mikroorganis-

men und Parasiten in vitro ist als Methode zur Herstellung von Impfstoffen für aktive Immunisierung beispielsweise gegen *Treponema Pallidum*, Leptosie und Parasiten in Menschen und Tieren wertvoll.

Das erste Erfordernis für die Erzeugung solcher Vakzine, beispielsweise gegen Syphilis, ist die Züchtung des Organismus *Treponema Pallidum* in grossen Mengen derart, dass seine Antigenität und andere Eigenschaften nicht verändert werden. Viele Versuche in dieser Richtung vor der vorliegenden Erfindung waren erfolglos. Dies ist mit grosser Wahrscheinlichkeit auf die Tatsache zurückzuführen, dass eine geeignete Kulturumgebung bisher nicht erzielt werden konnte.

Das angegebene neue Kulturverfahren unterscheidet sich grundsätzlich von den bisher bekannten Verfahren, da es genau die Bedingungen simuliert, bei denen der Organismus im Körper wächst.

Bei dem bevorzugten Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen werden Zellen sowie Gewebe von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten, in extrazellulärer Flüssigkeit, in zellfreier Lymphe aufgeschwemmt.

Die bekannten Gewebekulturen und die zugehörigen Arbeitsweisen sind in doppelter Hinsicht fehlerhaft, nämlich bezüglich der Zusammensetzung des Mediums und seiner Veränderlichkeit von Stunde zu Stunde und von Tag zu Tag. So können z.B. die Einschränkungen einer Gewebekultur überwunden werden, wenn man die Gewebe in unveränderter, frischer, zellfreier Lymphe wachsen lässt, unter der Voraussetzung, dass das verwendete System die passenden zellulären Wechselwirkungen zulässt. Der Nachdruck, der bei dem Verfahren auf unveränderte, frische, zellfreie Lymphe gelegt wird, gibt das Erfordernis einer konstant gehaltenen Umgebung wieder sowie die Tatsache, dass viele wichtige Regulatoren der Zellaktivität in Blut oder Lymphe labil sind.

Die grundlegende Zielsetzung des neuen Verfahrens ist die Züchtung von Zellen sowie Geweben von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten ausserhalb des Körpers, auf eine solche Weise, dass sie sich z.B. so verhalten wie Gewebe, welches im Körper wächst. Dieses Verfahren kann auch zum Studium des Wachstums, des Verhaltens, der Funktion und der Reaktion auf exogene und endogene Agenzien verschiedener Gewebe angewendet werden; beispielsweise Lymphocyten, Lymphoidgewebe, Knochenmarkzellen, Thyroid- und Krebszellen, wenn sie in unveränderter, frischer, fliessender, zellfreier Lymphe gezüchtet werden; und zum Vergleich dieser «Zellen» mit denjenigen, die nach bekannten Gewebekulturverfahren erzeugt wurden.

Bei einer weiteren Ausführungsform wurde eine neuartige Suspensionskultur entwickelt. Diese Ausführungsform besitzt die folgenden Merkmale: (a) Lymphe strömt durch die Kultur, ohne dass Zellen aus der Kultur verlorengehen; (b) es sind geregelte, wiederholte Intervallperioden von Zelldispersion und Zellenkontakt möglich, beispielsweise wenn man eine gemischte Population von Phagocyten und Lymphocyten züchtet, wobei die Phagocyten an kleinen Glas- oder Kunststoffkugeln gebunden bleiben und die Lymphocyten alternierend in Suspension oder in Berührung mit den Phagocyten gebracht werden; diese Arbeitsweise hat zum Zweck, den Lebenszyklus der Lymphocyten in vivo nachzuahmen, welche alternierend frei in Lymphe oder Blut sind und dann in Berührung mit Phagocyten und anderen Zellen gelangen; und (c) es ist eine

wiederholte Probenahme der gezüchteten Zellen auf einfache Weise möglich. Diese Arbeitsweise hängt davon ab, ob eine Kulturkammer zur Verfügung steht, die um eine horizontale Achse 43 drehbar ist, beispielsweise eine solche gemäss Fig. 1.

Die Umdrehungsgeschwindigkeit kann nacheinander und automatisch verändert werden, um eine Kraft von etwa 0,9 G zu erzeugen, welche eine schwache Bewegung erzeugt, wodurch die Zellen in Suspension gehalten werden, und eine Kraft von 100 G gefolgt von einer Kraft von 5 G, um die Zellen vorsichtig zur Erzeugung eines Zellkontaktes in eine Packung zu überführen.

Es werden nun Möglichkeiten, die das Verfahren zur Züchtung von Zellen sowie Geweben von Tieren, Mikroorganismen und Parasiten ausserhalb des Körpers bietet, gegeben, derart, dass sie sich so verhalten und derart auf exogene und endogene Stimulanzen reagieren, als ob sie sich im Körper befinden würden. Diese Beispiele sind im allgemeinen so ausgelegt, dass die Morphologie des Gewebe-Wachstums, die enzymatische Aktivität, die synthetische Fähigkeit und die Reaktion auf Agenzien beim Wachstum in vitro unter standardisierten Gewebekulturbedingungen mit denen in frischer, strömender, zellfreier Lymphe verglichen werden können.

#### *Lymphocyten und Lymphoidgewebe*

Lymphocyten wurden mit und ohne kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Kontakt mit Phagocyten gezüchtet und werden durch Morphologie, Reaktion auf Antigen und Phytohämagglutinin und durch ihre Fähigkeit, eine primäre Immunreaktion einzuleiten, bestimmt. Die Immunreaktion wird durch die Plattenprobe nach Jerne auf RBC-Antigen oder durch eine Modifizierung dieser Plattenmethode auf lösliche Antigen gemessen.

#### *Ausführungsbeispiel*

Ein Gemisch aus zu kultivierenden Schafknochenmark-Zellen und einer lymphzellfreien Lymphflüssigkeit wurde in einem Testrohr hergestellt unter Verwendung von 50 bis 100 Millionen Markzellen (ungefähr 1 Liter pro Tag). Zentrifugieren mit 0,6 g ergab eine Suspension. Das nachfolgende Zentrifugieren mit 50 g während 4 bis 5 Minuten ergab Trennung und Bildung von dünnen Zellschichten. Während dem Zentrifugieren mit 50 g wurde frische Lymphflüssigkeit zugegeben, um 90% der abgetrennten Lymphflüssigkeit zu ersetzen (dies dauerte etwa eine Minute). Das Gemisch wurde dann durchschnittlich während 5 Minuten getrocknet, um die Zellen zu stören und um eine instandgehaltene Suspension oder Dispersion zu bilden, gefolgt von Zentrifugieren bei 50 g während 4 bis 5 Minuten, um eine Trennung der Zellen und die Bildung von dünnen verlängerten Zellschichten zu erreichen.

Die Schritte Lymphersatzung, Stören, Instandhalten der Dispersion und Zentrifugieren wurden über eine Periode von 4 bis 5 Tagen wiederholt (mit Zentrifugieren jede halbe Stunde), wobei jedes Mal 90% der Lymphflüssigkeit ersetzt wurden. Schafknochenmark unter Standard-Kultur-Bedingungen verliert die spezielle histologische Struktur und das Aussehen innert 1 bis 12 Tagen. Bei diesem Beispiel war dies beim Schafmark nach 4 bis 5 Tagen der Fall, wie ein Knochenmark-Spezialist unter Anwendung histologisch mikroskopischer Prüfung herausfand.

