ZELLKULTUR IN HOHLFASER-MODULEN

Günter Eiteljörge

Amicon GmbH, Witten

Zusammenfassung:
Schon zu Beginn der 70er Jahre entwickelten und testeten Knazek und Mitarbeiter Hohlfaser - Einheiten zum Einsatz in der Zellkultur. Die Idee war dabei, lebendigem Gewebe ähnliche Strukturen und Zellzahlen in vitro nachzubilden. Schon 1974 brachte Amicon eine optimierte Hohlfaserpatrone heraus. Mittlerweile sind um einen Faktor 100 größere Patronen aus verschiedenen Membranmaterialien und mit unterschiedlichem Cut-Off erhältlich. Die Spannweite reicht von sehr einfachen, ungeregelten, Systemen bis zu nahezu vollautomatischen Anlagen für die industrielle Produktion von z.B. monoklonalen Antikörpern.

Eine Vielzahl von Beispielen belegen, daß Vitafiber-Kulturpatronen sowohl für adhärente wie auch nicht-adhärente Zellarten geeignet sind. Es gelingt meistens, die Zellen bis zu Zellzahlen hochwachsen zu lassen, wie man sie in Gewebe vorfindet, und sie über längere Zeit (2 Monate bis zu 1 Jahr) produzieren zu lassen. Die mögliche Chemostat-Betriebsweise, die Gewinnung von fast sauberem Produkt, sowie die vergleichsweise geringen Anforderungen ans Medium lassen eine sichere und wirtschaftliche Nutzung von Säuger-Zellkulturen in industriellen Größenordnungen zu. Gleichzeitig wird dem Gedanken des Tierschutzes Rechnung getragen; man denke nur an die für die Produktion monoklonaler Antikörper aus Ascites-Flüssigkeit benötigten Mäuse.

Historischer Überblick

1972 begann R. Knazek (1) damit, erste Vesuche mit einem kleinen Hohlfasermodul durchzuführen. Die zugrundeliegende Idee war, in vitro Zellen möglichst ähnlich dem natürlichen Vorbild zu halten. Man wollte

Zellzahlen von ca. $10^{10}/cm^3$, Nahrungsversorgung über eingelagerte Kapillaren mit semipermeabler Trennwand, hohe Produktions- und Anreicherungsraten der interessierenden Stoffe und gleichzeitig lange Lebensdauer der Zellen erzielen. Schon die ersten Arbeiten (2,3) belegten das Funktionieren ihres Moduls. 1974 brachte dann Amicon die Vitafiber-I - Patrone heraus. Sie dient als kleine Zellkultureinheit und gestattet, hauptsächlich für analytische Zwecke, über längere Zeit Zellen zu studieren und Produkt zu gewinnen. 1981 wurde eine um einen Faktor 10 größere Patrone, die Vitafiber - II, für Produktionsmengen von mehreren g/Monat vorgestellt. 1983 schließlich wurde mit der Vitafiber-III Patrone eine nochmals um den Faktor 10 vergrößerte Einheit herausgebracht, Amicon reagierte damit auf den wachsenden Bedarf an Zellkultur - Produkten, vor allem monoklonalen Antikörpern. Zugleich mit der Einführung der VF III wurde in USA ein halbautomatisches Produktionsgerät (Pumpen, Elektroden, Medienvorrat usw.) vorgestellt, das Manipulationen an der laufenden Einheit nur etwa alle 14 Tage nötig macht.

Funktionsweise der Hohlfaser-Zellkulturpatrone

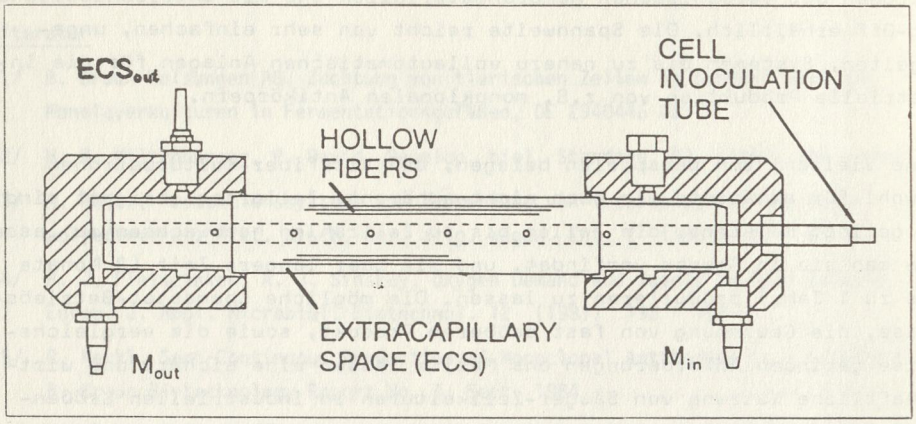

Abb. 1: Schematische Darstellung einer Kulturpatrone.Ein zylindrisches Polysulfon-Gehäuse umgibt Hohlfasern und Extrakapillarraum.Es gibt Anschlüsse für Mediumein-(M_{in}) und Auslaß (M_{out}),sowie Produktauslaß (ECS_{out})und einen Inokulationsport.Der Inokulationseingang führt von der rechten Seite durch die Patrone hindurch bis zum anderen Ende,wo die Röhre abgedichtet ist.Löcher in dieser Röhre gestatten eine gleichmäßige Verteilung der inokulierten Zellen im gesamten Hohlfaserbündel.

Faserzusammensetzung und Struktur, wie auch Packungsdichte und Abmessungen der Patrone sind für optimale Funktion von entscheidender Bedeutung. Amicon setzt anisotrope Polysulfonmembranen mit einem Cut-Off

von 10 000 D oder 100 000 D ein. Die extrem dünne Ultrafiltrationsschicht geht nahtlos in eine hochporöse, ca. 0,07mm dicke Wandung über. In einer VF II-Einheit befinden sich etwa 1000 Fibern mit einem freien Innendurchmesser von 0,2mm. Bedingt durch die poröse Außenstruktur steht für die Zellen eine Oberfläche von ca. 10 000cm^2 zur Verfügung. Die Fibern sind mit Epoxy-Harz an beiden Enden verklebt. Hierdurch werden 2, durch eine semipermeable Membran getrennte, Räume geschaffen. Die Innenseite der Hohlfasern dient dem Mediumtransport, der Extrakapillarraum enthält die Zellen und angehäuftes Produkt. Ein Stofftransport zwischen den beiden Räumen ist nur möglich für relativ kleine Moleküle: Nährstoffe, Salze, gelöste Gase, Peptide, kleine Proteine und Abbauprodukte der Zellen. Zum aktiven Transport dieser Moleküle durch die Membran wird eine Pumpe eingesetzt, die das Medium beständig mit z.B. 100ml/min(für VF II) umpumpt. Die Druckverhältnisse in der Patrone gestalten sich dabei so, daß im Eingangsbereich frische Lösung von innen nach außen die Zellen umströmt, im Ausgangsbereich kehrt sich die Flußrichtung um, dadurch werden Abbauprodukte aus der Einheit entfernt. Durch Erhöhung der Pumpleistung wird entweder kontinuierlich oder ca. alle 2-3 Tage 25 ml (bei VF II) Produktlösung abgenommen. Die Minimalkonfiguration für eine funktionstüchtige Produktionseinheit besteht aus der Patrone, einem Mediumreservoir, in dem temperiert, begast und gemischt wird, einer leistungsfähigen Pumpe (Schlauch- oder langsamlaufende Zahnradpumpe, sie muß für Dauerbetrieb, höhere Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten geeignet sein) und diversen Schläuchen, Sterilfiltern und Mehrwegehähnen.

Biologische Aspekte

Zellen eignen sich üblicherweise unterschiedlich gut für die traditionellen Massenkulturmethoden. Die Tabelle 1 zeigt, daß nahezu alle Zellarten, ob adhärent oder nicht adhärent, in Hohlfaser-Einheiten erfolgreich hochgezogen werden können. Da in einer solchen Kultureinheit die Bedingungen nahezu ideal sind, füllen die inokulierten Zellen (10^6-10^7 bei Start mit einer VF II) innerhalb von 1-3 Wochen allen verfügbaren Raum, besonders die poröse Wandstruktur der Fasern, aus. Man erhält dann einen steady state für einen Zeitraum von mehreren Monaten bis zu einem Jahr mit einer Gesamtzellzahl von 10^{10}- 10^{11}/Patrone. Selbst Zellen, die üblicherweise nur als Monolayer wachsen oder nicht-adhärente Zellen, wachsen um die Fasern herum bis zu einer Dicke von 10 Zellschichten (3,11,13,14,15,17,18,23,24). Tabelle 2 zeigt, daß so Zelldichten erreicht werden, die um eine Größenordnung höher liegen als bei anderen Massenkulturmethoden. Obwohl die rasche Zellteilung nach eini-

gen Wochen aufhört, bleibt die Produktionsrate für lange Zeit auf einem erhöhten Plateau. Während dieser Zeit ist die Sekretionsrate von Makromolekülen, Viren oder Oberflächenparikeln meist höher als in den mehr traditionellen Systemen (17,18,21,24,9,15,23). Manchmal läßt sich diese Situation sogar mit Basalmedium mit nur 1-2% Serum aufrechterhalten. Wichtig ist weiter, daß die Zellen während dieser langen Zeit morphologisch intakt und karyotypisch stabil bleiben (11,14,21,24) .

Tabelle 1: Erfolgreich in Hohlfasern kultivierte Zellarten

Organismus	Gewebe,Zellart	Referenz
Huhn	Embryo,Primärkultur	10
Ente	" "	10
Maus	Zusammenh.Gewebe(L-929)	1,3,11
	Embryo(3T3/SV3T3)	9,14
	Myeloma/Spleen Hybridoma	15,19
	Brusttumor(66/67/168/G8H)	17
Ratte	Hypophysentumor(MtTW5)	3
	Leberhepatom (Reuber H4-11-E)	4
Hamster	Niere (BHK-21)	10,11
	Ovar (Ha-1)	18
Affe	Lunge, Rhesus Diploid	10
	Niere, Vero	14
	Niere, Rhesus MK-2	14
Mensch	Vorhaut, HFF/HR 218	22,23
	Hypophysentumor, Primärkultur	5
	Choriocarcinom, JEG-7	1,2,3
	Brustcarcinom, BT-20/HBT-3	3
	B Lymphoma, NC-37	7
	Dickdarm-Adenocarcinom, LS-174 T	6,8,12
	" " , SW403/480/620/707	13
	Dickdarm-Carcinom, DLD-1	16,20,24
	Lymphom,Myelom,Leukom,Melanom u. Dickdarmcarcinom	16
	Cervikal-Carcinom, HeLa	11
	Lunge, WI-38	14
	Myeloma/Spleen Hybridoma	19
	Leberhepatom, Alexander PLC/PRF/5	21

Tabelle 2: Zellwachstum in verschiedenen Massenkultursystemen

Kultursystem	Zellzahl($\times 10^5$)	
	pro cm^2	pro ml
Suspension	-	25.0
Rollflaschen	2.5	7.5
Microcarrier Beads	1.0	10.0
Hohlfasern	25.0	1000[x]

x Im Extrakapillarraum, wo die Zellen leben und Produkt sekretieren. 12.5 im Gesamt-Rezirkulationsvolumen, das die Zellen versorgt.

Zusammenfassung

Die Hohlfaser-Produktionsmethode eignet sich sowohl für die Gewinnung von Zellen, Viren, hoch-und niedermolekularen Biomolekülen. Hauptanwendungsgebiet in der letzten Zeit ist dabei die Produktion monoklonaler Antikörper. Eine Hohlfaseranlage erfordert nur geringen Arbeitsaufwand (auch geringen Kapitaleinsatz), sie liefert meist preiswerteres Produkt als vergleichbare Massenkulturen, die Antikörper werden weitgehend sauber gewonnen. Im Vergleich zur Ascites-Kultur kann man auf die Haltung von einigen 100-1000 Mäusen verzichten. Außerdem ist gewährleistet, daß wirklich über lange Zeit der gleiche Antikörper gebildet wird, man muß nicht ständig reklonieren. Ein scale-up bis zu mehreren 100g Produkt ist durch Einsatz größerer Patronen bzw. Parallelschaltung leicht möglich. Messung und Regelung der wichtigen Parameter ist unkompliziert.

Literatur

1) R.A. Knazek et al., Science 178 (1972), S.65
2) R.A. Knazek et al., Exp.Cell Res. 84 (1974), S.251
3) R.A. Knazek, Fed.Proc.Am.Soc.Fed.Biol. 33 (1974), S.1978
4) C.F.W. Wolf et al., Trans.Am.Soc.Artif.Int.Organs 21 (1975), S.16
5) R.A. Knazek et al., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 151 (1976), S.561
6) R.A. Reisfeld et al., Cancer Res. 37 (1977), S.2860
7) R.M. Fike et al., In Vitro 13 (1977), S.170
8) G.S. David et al., J.Natl.Cancer Inst. 60 (1978), S.303
9) P.L. Ratner et al., J.Virol. 26 (1978), S.536
10)A.D. Johnson et al., Appl.Environ.Microbiol. 35 (1978), S.431
11)K.C. Ehrlick et al., In Vitro 14 (1978), S.443
12)L.P. Rutzky et al., J.Natl.Cancer Inst. 63 (1979), S.893
13)J.M. Quarles et al., In Vitro 16 (1980), S.113
14)K. Ku et al., Biotechnol.Bioeng. 23 (1981), S.79
15)P.Calabresi et al., Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 22 (1981), S.362
16)M.C. Wiemann et al., Proc.Am.Soc.Clin.Oncol. 1 (191982), S.4
17)J.C. Hager et al., J.Natl.Cancer Inst. 69 (1982), S.1359
18)R. Gonzales-Mendez et al., Biochim.Biophys.Acta 720 (1982), S.274
19)M.C. Wiemann et al., Clin.Res. 31/2 (1982), S.511
20)M.C. Wiemann et al., In Vitro 19 (1983), S.260
21)W.J. McAleer et al., J.Virol.Methods 7 (1983), S.263
22)J.M. Strand et al., Biotechnol.Bioeng. 26 (1984), S.503
23)J.M. Strand et al., Biotechnol.Bioeng. 26 (1984), S.508
24)M.C. Wiemann et al., Am.Chem.Soc.Abstracts MBTD (1984), S.15