



(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2023 002 232.2**  
(22) Anmeldetag: **01.06.2023**  
(43) Offenlegungstag: –  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **13.06.2024**

(51) Int Cl.: **C12M 3/04 (2006.01)**  
**C12M 3/00 (2006.01)**

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**Zellwerk GmbH, 16727 Oberkrämer, DE**

(74) Vertreter:  
**Scheunemann, Detlef, Dipl.-Ing., 12689 Berlin, DE**

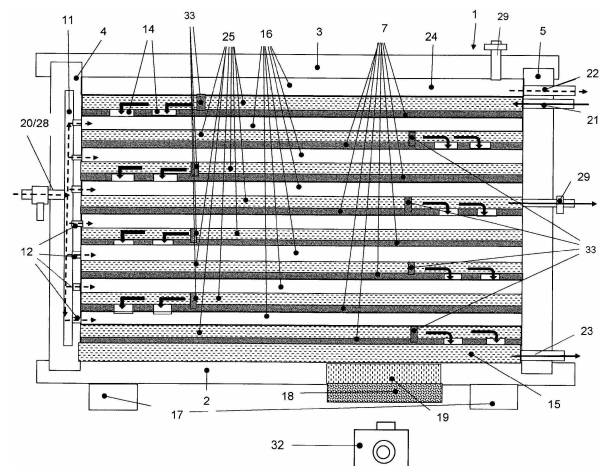
(72) Erfinder:  
**Hoffmeister, Hans, Prof. Dr., 32549 Bad  
Oeynhausen, DE; Mausolf, Rainer, 16515  
Oranienburg, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

DE	20 2018 000 370	U1
DE	20 2018 004 857	U1

(54) Bezeichnung: **Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor für die Expansion von Zellen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor für die Expansion von Zellen, insbesondere von nicht adhären wachsenden Zellen, wie nicht wachsende adhären T- Lymphozyten oder invariante T- Lymphozyten und NK-Zellen aber auch weiteren Immunzellen z. B. tumorinfiltrierte NK-Zellen (TINK) und schleimhautassoziierten invarianten T-Zellen (MAIT), wobei im Perfusions-Plattenmäander- Bioreaktor die Kulturmedien zu den Overlay- Medien im Gegenstrom geführt sind. Der Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor besteht aus eine Bioreaktorgefäß 1, in dem mehrere übereinander angeordnete Kultivierungsträger 7 mit durch Stege 13 gebildete Gerinne 10, mit einem oder mehreren Überläufe 14 sowie mit vor den Überläufen 14 angeordneten Überlaufsteg 33 über Spannmutter 9 und einem Spannbügel 8 befestigt sind, wobei die Kultivierungsträger 7 untereinander um 180° verdreht sind. Über Luer- Lock-Verbindere werden die Overlay-Medien und das Kulturmedium geregelt zu- und abgeführt.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft einen Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor für die Expansion von Zellen, insbesondere von nicht adhärent wachsenden Zellen, wie nicht adhärent wachsende T- Lymphozyten oder invariante T- Lymphozyten oder NK- Zellen aber auch weiteren Immunzellen z. B. tumorinfiltrierte NK-Zellen (TINK) und schleimhautassoziierten invarianten T-Zellen (MAIT), wobei das Kulturmedium von den Overlay- Medien an der Oberfläche überströmt wird und das Gasgemisch bei diesem Überströmungsprozess in das Kulturmedium diffundiert, so dass das durch das Zellwachstum verbrauchte Overlay- Medium kontinuierlich ersetzt wird.

**[0002]** Die CN 10 806 0081 A beschreibt einen mehrschichtigen Flachplatten- Bioreaktor. Der mehrschichtige Bioreaktor für flache Platten besteht aus einem Hohlraum und einem Kulturmechanismus, wobei der Kulturmechanismus in einem Behälter angeordnet ist und aus mehreren Schichten flacher Platten besteht. Ein Kulturflüssigkeitseinlassrohr und ein Kulturflüssigkeitsaustragsrohr sind auf dem Behälter angeordnet. Der Behälter ist in einen Kultivierungsraum und einen Pufferraum unterteilt. Der Kulturmechanismus ist in dem Kultivierungsraum angeordnet. Ein Auslass des Kulturflüssigkeitseinlassrohrs erstreckt sich bis zu einer Position unterhalb des mittleren Teils des Pufferraums. Der obere Teil des Pufferraums kommuniziert mit dem Kulturhohlraum. Die Erfindung zielt darauf ab, den Bioreaktor bereitzustellen, der für zellgroße In-vitro-Kultur verwendet werden kann und eine gleichmäßigere Fließfeldscherkraftumgebung für die Zellkultur bietet.

**[0003]** In der WO 2017 025 620 A1 wird ein Bioreaktor zur Kultivierung und/oder Züchtung künstlicher oder natürlicher Gewebe offenbart, der eine obere Platte und eine Bodenplatte aufweist. Die obere und die untere Platte bilden zusammen eine Perfusionskammer zur Aufnahme und Unterstützung eines künstlichen oder natürlichen Gewebes, wobei die obere Platte eine Vielzahl von Einlassstrukturen und eine Vielzahl von Auslassstrukturen umfasst. Die Einlass- und Auslassstrukturen stehen in flüssiger Kommunikation mit der Perfusionskammer, um den Fluss von mindestens einem Medium durch die Perfusionskammer zu ermöglichen. Die Bodenplatte umfasst weiter einen höhenverstellbaren Teil zur Einstellung des Volumens der Perfusionskammer.

**[0004]** Die US 49 31 401A- beschreibt einen Bioreaktor zur biochemischen Behandlung von Flüssigkeiten, die organische Stoffe enthalten. Er besteht aus einem Behälter mit einem Einlass zur Aufnahme von Flüssigkeit, die mit mindestens einer horizontalen Platte behandelt werden soll, um ein Bett von Mikroorganismenzellen zu unterstützen, die mit der

organischen Substanz reagieren, um ein flüchtiges Gas zu bilden. Eine Öffnung ist in der Platte vorgesehen, um die Flüssigkeitsflusskommunikation zwischen den oberen und unteren Fächern auf beiden Seiten der Platte zu gewährleisten. Ein Blockierungselement erstreckt sich über die Öffnung, um zu verhindern, dass die Flüssigkeit und die Mikroorganismenzellen durch die Öffnung in das untere Kompartiment zurückkehren. Ein Auslass ist für die Freisetzung des Gases aus dem Behälter vorgesehen, während ein weiterer Auslass für die Freisetzung der behandelten Flüssigkeit verwendet wird.

**[0005]** In der US 10 590 374 B2 wird ein Bioreaktorsystem offenbart, bestehend aus einem geschlossenen Kulturgefäß, wobei das Kulturgefäß mehrere Schalen besitzt, die mindestens zwei rechteckige Zellkulturflächen mit einem Deckel, einem Boden, zwei Seiten und zwei Enden umfasst, die in einer gestapelten Ausrichtung zueinander angeordnet und so konfiguriert sind, dass sich Zellen als Monoschicht auf der Unterseite anheften und wachsen können. Das Kulturgefäß weist mindestens einen Anschluss für Medium oder Gas in und aus dem Behälter auf, wobei für jedes Zellkulturfach das Gas/Fluid-Kommunikation zwischen allen Zellkulturflächen über einem Gas/Fluid-Strömungsweg erfolgt, damit Gas/Flüssigkeit durch einen Verteiler und in jedes Zellkulturfach fließen kann; einem Längsstützgefäß, wobei ein Rohr so positioniert ist, dass es entlang einer Längsachse des Rohres liegt und das Rohr Enden mit mindestens einer Endöffnung hat, damit Kulturmaterial oder-gas in das Rohr ein- oder ausströmen können; einer Plattform, die so konfiguriert ist, dass sie mindestens ein geschlossenes Kulturgefäß hält, sichert und manipuliert, wobei die Plattform eine Wippenplattform ist, die entlang der Achse senkrecht zum Drehpunkt mit einem Neigungswinkel von weniger als 90 Grad auf jeder Seite des Drehpunktes geschwenkt ist und der Drehpunkt auf dem Rohr befestigt ist und eine treibende und rotierende Baugruppe, die so konfiguriert ist, dass die Position des Stützgefäßes und des Kulturgefäßes um die Längsachse des Rohrs in einer Winkelposition von weniger als 360 Grad und während einer Haltezeit gedreht und geändert wird, wobei die Achse senkrecht zur ersten Achse steht, die von der Wippenplattform geschwungen wird.

**[0006]** In der DE 42 06 585 A1 wird ein Gerät zur Behandlung von Zellkulturen, insbesondere Hepatozyten beschrieben, wobei auf plattenartigen Kulturobjektträgern zumindest ein Teil der Oberflächen dieser Objektträger gaspermeabel ist und Sauerstoff in sie eingebracht werden kann. Auf den Kulturträgern wird eine Beschichtung aus Kollagen aufgetragen, auf oder in der sich die Zellkultur befindet. Der nächste Zellkulturträger ist dicht über der Kollagenbeschichtung angeordnet. Das Kulturmedium kann

in den Raum zwischen der Kollagenbeschichtung und dem nächsten Kulturträger eingebracht werden.

**[0007]** Die DE 69 434 052 T2 offenbart eine Vorrichtung für das Abscheiden von Säugetier-Zellen aus einer Zellüberstandsflüssigkeit unter aseptischen oder sterilen Bedingungen, wobei die Vorrichtung aus einem Kastenelement besteht, das aus Mitteln, die mehrere entfernbare, aus spiegelpolierem rostfreiem Stahl erzeugte Platten bilden und die zur Vertikalen geneigt sind, besteht und Mittel aufweist, die bewirken, dass Flüssigkeit, in der die Zellen enthalten sind, nach oben über die Platten mit einer solchen Geschwindigkeit fließt, dass die Zellen von der Flüssigkeit abgeschieden werden können, um Sedimentschichten auf den Platten zu bilden und an diesen hinunterzugleiten, wobei die Platten in einem Gehäuse enthalten sind, das mit einem am Boden der Platten angeordneten Einlass für Flüssigkeiten, in der die abzuscheidenden Zellen enthalten sind, einem Auslass für Flüssigkeit, aus den Zellen abgeschieden wurden und einem Sammelauslass für abgeschiedene Zellen ausgestattet ist und wobei jeder Einlass und jeder Auslass mit einem Sanitärverbinder versehen ist,

**[0008]** Die DE 10 2018 000 561 B4 beschreibt einen Mäander- Bioreaktor bestehend aus einem rechteckigen Bioreaktorgefäß aus vorzugsweise klarem Polymermaterial, das mit einem Deckel steril verschlossen ist, wobei das Bioreaktorgefäß in drei übereinander angeordneten Kammern unterteilt ist und die unterste Kammer als Underlay- Kammer, die über der Underlay-Kammer angeordnete Kammer als Mäander- Perfusions- Kammer und die über der Mäander- Perfusions- Kammer angeordnete Kammer als Overlay- Kammer ausgebildet sind. Die Underlay- Kammer und die Mäander- Perfusions- Kammer sind durch eine gelochte Bodenplatte mit einer unten an der gelochten Bodenplatte angeordneten semipermeablen Folie voneinander getrennt, wobei Sauerstoff bevorzugt gegenüber anderen Gasen durch die Folie diffundiert.

**[0009]** Bei diesem Mäander- Bioreaktor fließt das Kulturmedium horizontal durch die parallel liegenden Mäander- Gerinne, wobei die Züchtung der Anzahl von Zellen begrenzt ist. Um eine hohe Anzahl von Zellen, insbesondere von T- Lymphozyten für eine therapeutische Behandlung zu züchten, ist es erforderlich mehrere Bioreaktoren hintereinander oder parallel zu schalten. Dies erfordert einen hohen apparativen Aufwand mit einem hohen Aufwand zur Erreichung der erforderlichen Sterilität.

**[0010]** In der eigenen früheren DE 10 2022 000 456 B3 wird ein Plattenmäander-Bioreaktor zur Isolierung und Vermehrung von Zellen, insbesondere von adhären wachsenden mesenchymalen Stroma-Zellen, bestehend aus

einem Mäander-Bioreaktorgefäß mit einem Deckel, zwei Seitenwänden, zwei Stirnseiten, einem Boden mit Fußleisten, wobei in dem Plattenmäander- Bioreaktorgefäß mehrere, aber mindestens zwei übereinander, in engen Abstand zueinander, angeordnete, Kultivierungsplatten angeordnet sind, wobei auf den Kultivierungsplatten Stege zur Bildung eines oder mehrerer Gerinne in einem Abstand a voneinander und in einem Abstand b von Stirnwänden angeordnet sind, die Kultivierungsplatten einen oder mehrere Überläufe aufweisen, die Kultivierungsplatten in im Plattenmäander-Bioreaktorgefäß angeordnete Spannbügeln gehalten werden, jede zweite Kultivierungsplatte um 180° mit ihren Überläufen zu der über ihr liegenden Kultivierungsplatte gedreht angeordnet ist und über und unter den Kultivierungsplatten eine obere und eine untere Auffangkammer für das Kulturmedium angeordnet sind. Der Abstand a der Stege voneinander ist so gewählt und die zugeführte und abgeführte Menge an Kulturmedium ist so eingestellt, dass sich in dem Stromfaden, in dem durch die Stege gebildeten Gerinne, eine gemittelte laminare Oberströmung mit einer Froudezahl von 0,1 bis < 0,005 bildet und die Bodenströmung dabei nahe einer Froudezahl 0 verbleibt. Die Kulturmedien und die Overlay- Medien werden über oben im Plattenmäander- Bioreaktor angeordnete und die Kulturmedien über unten im Plattenmäander- Bioreaktor angeordnete Schnellverschlusskupplungen im Gleichstromprinzip geführt.

**[0011]** Die Froude-Zahl beschreibt das Verhältnis von Fließgeschwindigkeit und der Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Flachwasserwelle. Die Welle breitet sich gleichmäßig in alle Richtungen, also kreisförmig aus und zeigt ein parabelförmiges Muster. Sie gibt keine Auskunft über die Rückvermischung und ermöglicht keine Aussagen darüber, ob und wie stark sich Volumenelemente oder Stoffe, wie die Overlay- Atmosphäre und das Kulturmedium innerhalb eines Reaktors durch die herrschenden Strömungen vermischen und damit auch keine Aussage, ob die Zellen zur Expansion genügend mit den Overlay- Medien versorgt werden.

**[0012]** Auch ist es mit den im Stand der Technik beschriebenen Lösungen nicht möglich, nicht adhären Zellen, wie nicht adhären T- Lymphozyten oder invarianten T- Lymphozyten und NK- Zellen aber auch weiteren Immunzellen z. B. tumorinfiltrierte NK- Zellen (TINK) und schleimhautassoziierten invarianten T- Zellen (MAIT), in solchen Mengen zu expandieren, die für therapeutischen Anwendungen erforderlich sind, da sie nur ungenügend mit Overlay- Medien versorgt werden können.

**[0013]** Aufgabe der Erfindung ist es, einen Perfusions- Mäander- Bioreaktor zur Verfügung zu stellen, mit dessen Hilfe die Mängel aus dem Stand der Technik beseitigt werden und für eine therapeutischen

Behandlung genügende Menge an nicht adhären ten wachsenden Zellen, wie nicht adhären ten wachsende T- Lymphozyten oder invarianten T- Lymphozyten und NK- Zellen aber auch weiteren Immunzellen z. B. tumorinfiltrierte NK-Zellen (TINK) und schleimhautassoziierten invarianten T-Zellen (MAIT) zur Verfügung zu stellen.

**[0014]** Die Aufgabe der Erfindung wird durch einen Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor gelöst, der aus einem Bioreaktorgefäß 1 aus glasklarem Polymermaterial mit einem Boden 2, einem Deckel 3, Stirnwänden 4 und 5, Seitenwänden 6, und Füßen 17 besteht, wobei im Bioreaktorgefäß 1 mittels Spannmuttern 9 und einem Spannbügel 8 mehrere übereinander angeordnete Kultivierungsträger 7 befestigt sind, auf denen durch Stege 13 gebildete Gerinne 10, ein oder mehrere Überläufe 14 und vor den Überläufen 14 über die gesamte Breite der Kultivierungsträger 7 ein Überlaufsteg 33 mit einer Höhe von 3 bis 5 mm angeordnet sind. Jeder zweite Kultivierungsträger 7 ist mit seinen Überläufen 14 zu dem über ihm liegenden Kultivierungsträger 7 um 180° gedreht und im Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor sind unter den Kultivierungsträgern 7 eine untere Auffangkammer für das Kulturmedium 15 und oberhalb der Kultivierungsplatten 7 eine Overlay- Auffangkammer 24 angeordnet. Das Kulturmedium wird im Bioreaktorgefäß 1 in den Gerinnen 10 auf den Kultivierungsträgern 7 des Bioreaktorgefäßes 1 horizontal geführt und durch die Überläufe 14 sowie über den Überlaufsteg 33 auf den darunterliegenden Kultivierungsträger 7 vertikal mäandrierend von Kultivierungsplatte 7 zu Kultivierungsplatte 7 bis zum Abfluss 23 für das Kulturmedium geführt. Die Overlay-Medien sind zur Gasdiffusion der Overlay-Medien in das Kulturmedium und zur Konstanthaltung der Konzentration der gelösten Overlay- Medien in dem Kulturmedium oberhalb der Oberfläche des Kulturmediums in den Gerinnen 10 bis zur Overlay-Auffangkammer 24 geführt.

**[0015]** In die Stirnwand 4 ist ein Zufuhrkanal 11 mit einem Luer-Lock-Verbinder 20 für Overlay-Medien eingearbeitet, der über Zuführungen 12 mit den Overlay- Räumen 16 über dem Kulturmedium 25 verbunden ist. In der Stirnwand 5 ist ein, mit einer, sich über den Kultivierungsträgern 7 befindlichen Overlay- Auffangkammer 24 verbundener Luer- Lock-Verbinder 22 für den Abfluss der Overlay- Medien angeordnet. In der Stirnwand 5 sind ein Luer- Lock-Verbinder 21 für die Zuführung des Kulturmediums und ein Luer- Lock-Verbinder 23 für die Abführung der Kulturmedien angeordnet, wobei der Luer-Lock-Verbinder 23 mit der unter den Kultivierungsplatten 7 angeordneten Auffangkammer 15 für Kulturmedien verbunden ist. Außen am Boden 2 des Bioreaktorgefäßes 1 ist unter einem poliertem Lichtfenster 19 eine Lichtquelle mit einer Wellenlänge von zwischen 750 nm und 950 nm, insbesondere mit

einer Wellenlänge im Fluoreszenzspektrum für Blut von 830 nm, mit einer Kamera 32 befestigt, wobei das Bioreaktorgefäß 1 auf einem Rütteltisch 30 angeordnet sein kann.

**[0016]** Auf den Kultivierungsträger 7 sind Stege 13 zur Bildung eines oder mehrerer Gerinne 10 in einem Abstand a voneinander und in einem Abstand b von Stirnwänden 4 und 5 und ein oder mehrere Überläufe 14 sowie eine Überlaufsteg 32 angeordnet, wobei der Abstand a der Stege 13 voneinander so gewählt und die zugeführte und abgeführte Menge an Kulturmedien so eingestellt ist, dass sich in dem Stromfaden in dem durch die Stege 13 gebildeten Gerinne 10 eine laminare Strömung mit einer Bodensteinzahl von 0,001 bis 0,1 und die Bodenströmung dabei nahe bei einer Bodensteinzahl 0 verbleibt. Der Abstand b der Stege 13 von den Stirnwänden ist so gewählt, dass das Kulturmedium ohne Strömungsverluste über die Überläufe 14 abfließen kann.

**[0017]** Die Bodenstein-Zahl ist eine dimensionslose Kennzahl, die das Verhältnis der konvektiv zugeführten zu den durch Diffusion zugeführten Molen beschreibt. Damit charakterisiert die Bodenstein-Zahl die Rückvermischung innerhalb eines Systems (je größer die Bodenstein-Zahl, desto geringer die Rückvermischung) und ermöglicht Aussagen darüber, ob und wie stark sich Volumenelemente oder Stoffe innerhalb der Gerinne 10 durch die herrschenden Strömungen vermischen.

**[0018]** Bei der Bodensteinzahl 0 oder nahe 0 ist die Rückvermischung am größten, das heißt, dass bei einer Bodensteinzahl nahe 0 die Overlay- Medien optimal mit dem Kulturmedium vermischt sind und so die Zellen bei ihrer Expansion optimal mit den Overlay- Medien versorgt werden können.

**[0019]** Die Kultivierungsträger 7 mit den Stegen 13 und die damit gebildeten Gerinne 10 können aus einem hydrophilen mit Niedertemperatur- Plasma behandelten Kunststoff mit einer zelladhäsiven Beschichtung, wie Fibronectin, RetroNectin, Collagen, Gelatine, Laminin, Chitin und/oder aus Kombinationen davon, bestehen, wobei in die zelladhäsive Beschichtung aktivierende Antikörper, wie Immunglobuline, Lymphozyten, Anti CD 16, Anti CD3, Anti CD28, AntiCD137, Anti CD39, Anti CD103 und/oder aus Kombinationen davon, insbesondere 4-1 bb in Kombination mit den Cykinen Interleukin 12 oder mit einem Gemisch aus Interleukin 12 und Interleukin 2 eingearbeitet sein können.

**[0020]** In einer Auslegung der Erfindung kann anstelle der Luer- Lock Verbinder 20 in der Stirnwand 4 ein Dreiwegekükenhahn 28 und in der Stirnwand 5 über dem mittig angeordneten Kultivierungsträger 7 ein mit dem Raum für das Kulturmedium 25 dieses Kultivierungsträgers 7 verbundener Luer- Lockver-

binder 29 angeordnet sein, wobei das Dreiwegekükenhahn 28 und der Luer- Lockverbinder 29 über einen Bypass 26 miteinander verbunden sein können und wobei um den Bypass 26 eine elektromagnetische Schlauchklemme 27 angeordnet sein kann.

**[0021]** In einer weiteren Auslegung der Erfindung ist eine Rüttelvorrichtung in Form eines Rütteltisches 30 und eines Impulsgebers 31 vorgesehen, auf der der Bioreaktor derart befestigt ist, dass die Plattenebene der Kultivierungsträger 7 horizontal liegen und mechanisch bevorzugt elektromechanisch bei Bedarf gerüttelt wird. Der Perfusions-Plattenmäander Bioreaktor wird auf dem Rütteltisch 30 befestigt und das Kulturmedium wird in Schwerkraftrichtung durch den Impulsgeber 31 einem Ruck ausgesetzt. Der eingebrachte Ruck (Änderung der Beschleunigung pro Zeiteinheit) soll bevorzugt zwischen 2-5 m/s<sup>3</sup> betragen.

**[0022]** Dadurch wird die Segregation der Zellen infolge Sedimentation während der Strömung in den Gerinnen verringert, die Vermehrungsrate gesteigert und die Durchlaufzeit der geplanten Zellvermehrung gesenkt. Die kritische Schichtdicke innerhalb eines Zellhaufens, ab der die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen problematisch wird, beträgt ca. 1 mm. Wird die Schichtdicke überschritten gehen die Zellen wegen Nährstoff- und Overlay-Medienmangel zugrunde. Die Kompensation dieser Nachteile der kritischen Schichtdicke des Zellhaufens wird durch Vertikalrütteln durch den Impulsgeber 31 erreicht.

**[0023]** Dies führt zu einem früheren Therapiebeginn der Behandlung mit dem positiven Effekt der höheren Heilungschancen, sowie auch zu geringeren Kosten.

**[0024]** Die Erfindung wird anhand von Beispielen näher erläutert, wobei die **Fig. 1** ein Schema der Fluid- und Begasungsströmung des Bioreaktors, die **Fig. 2** eine schematische Seitendarstellung des Bioreaktors, die **Fig. 3** eine schematische Seitendarstellung mit dem Bypass 26 des Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor mit Rütteltisch 30 und Impulsgeber 31, die **Fig. 4** eine 3- D- Draufsicht auf den Bioreaktor und die **Fig. 5** eine Darstellung des Kultivierungsträgers 7 darstellen, wobei

- |   |                     |
|---|---------------------|
| 1 | Bioreaktorgefäß     |
| 2 | Boden               |
| 3 | Deckel              |
| 4 | Stirnwand           |
| 5 | Stirnwand           |
| 6 | Seitenwand          |
| 7 | Kultivierungsträger |
| 8 | Spannbügel          |

- |    |  |
|----|--|
| 9  | Spannmutter  |
| 10 | Gerinne  |
| 11 | Zufuhrkanal Overlay- Medien                                |
| 12 | Zuführungen Overlay- Medien                                |
| 13 | Stege  |
| 14 | Überlauf   |
| 15 | Auffangwanne Kulturmedien                                  |
| 16 | Raum für Overlay- Medien                                   |
| 17 | Fuß  |
| 18 | Lichtquelle  |
| 19 | Lichtfenster   |
| 20 | Luer- Lock-Verbinder für die Zuführung der Overlay- Medien |
| 21 | Luer- Lock-Verbinder für die Zuführung des Kulturmediums   |
| 22 | Luer- Lock-Verbinder für die Abführung der Overlay- Medien |
| 23 | Luer- Lock- Verbinder für die Abführung der Kulturmedien   |
| 24 | Overlay- Auffangkammer                                     |
| 25 | Kulturmedien   |
| 26 | Bypass   |
| 27 | elektromagnetische Schlauchklemme                          |
| 28 | Dreiwegekükenhahn  |
| 29 | Luer Lock- Verbinder                                       |
| 30 | Rütteltisch  |
| 31 | Impulsgeber  |
| 32 | Kamera   |
| 33 | Überlaufsteg   |

bedeuten.

#### Beispiel1

**[0025]** Der Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor besteht aus einem Bioreaktorgefäß 1 aus Polystyrol, das aus einem Boden 2, einem Deckel 3, aus Stirnwänden 4,5 und aus Seitenwänden 6 gebildet wird. In dem Bioreaktorgefäß 1 sind über die Spannmuttern 9 und einem Spannbügel 8 mehrere, insbesondere acht Kultivierungsträger 7 mit einem Abstand von 11,5 mm befestigt. Auf den Kultivierungsträgern 7 werden durch Stege 13 Gerinne 10 gebildet, durch die das Kulturmedium geführt wird und wobei das Kulturmedium über einen Überlaufsteg 33 von 3 mm Höhe und durch einen oder mehrere Überläufe 14 auf den darunterliegenden Kultivierungsträger 7 abgeführt wird. Dieser darunterliegende Kultivie-

Träger 7 ist mit seinem Überläufen 14 und seinem Überlaufsteg 33 gegenüber dem darüber liegenden Kultivierungsträger 7 um 180 ° gedreht, so dass das Kulturmedium mäanderartig von oben nach unten in die Auffangkammer 15 für das Kulturmedium fließt und über den Luer-Lock-Verbinder 23 aus dem Bioreaktorgefäß 1 abgeführt wird. Der Abstand  $a$  der Stege 13 voneinander ist so gewählt und die zugeführte und abgeführte Menge an Kulturmedium ist so eingestellt, dass sich in dem Stromfaden, in dem durch die Stege 13 gebildeten Gerinne 10 zur optimalen Versorgung der expandierenden Zellen eine laminare Strömung mit einer Bodensteinzahl von 0,001 bis 0,1 ausbildet und die Bodenströmung dabei nahe bei einer Bodensteinzahl 0 verbleibt. Dies wird maßgeblich durch den Überlaufsteg 33 von bis zu 3 mm erreicht.

**[0026]** In die Stirnwand 4 ist ein Zufuhrkanal 11 für Overlay-Medien eingearbeitet, der über Zuführungen 12 für Overlay-Medien mit Overlay-Räumen 16 verbunden ist, die sich über den Kultivierungsträger 7 mit den fließenden Kulturmedium befinden. Über den Luer-Lock-Verbinder 20, der mit dem Zufuhrkanal 11 für Overlay-Medien verbunden ist, werden die Overlay-Medien im Gegenstrom über das Kultivierungsmedium bis in die Auffang-Kammer 24 für Overlay-Medien geführt und über den Luer-Lock-Verbinder 22 für die Abführung der Overlay-Medien aus dem Bioreaktorgefäß 1 abgeführt. Das Kulturmedium besteht aus einem Zellwachstums-Medium, das mit einem spezifischen Gemisch aus AB Humanserum, Cytokinen, Antikörpern und irradierten humanen Feeder Zellen zeitweilig supplementiert ist. Diesem Kulturmedium werden die während einer Operation vom Patienten entnommenen und zerkleinerten autologen Tumor-Gewebestücke in einer Größe von 1 bis 2 mm<sup>3</sup> zugegeben und mit dem Kulturmedium über den Luer-Lock-Verbinder 21 für die Zuführung von Kulturmedium dem Bioreaktorgefäß 1 zugeführt. Die zerkleinerten Gewebestücke werden im Bioreaktor gleichmäßig verteilt und im Perfusionsbetrieb kultiviert, wobei das Kulturmedium durch die über den Zufuhrkanal 11 und die Zuführungen 12 für Overlay-Medien in die Overlay-Räume 16 zugeführten Overlay-Medien mit der entsprechenden Overlay-Atmosphäre geregelt versorgt wird. In einem Kultivierungslauf über 7 bis 14 Tage wachsen Zellen (TIL oder andere Zellen) in ausreichender Menge aus. Mit zunehmender Zellzahl wird im Verlauf der Vermehrung der Zellmenge (TIL oder andere Zellen) die Zufuhr von frischem Medium kontinuierlich erhöht, wobei das erhöhte Zuführen von frischem Medium durch einen entsprechenden Algorithmus automatisch gesteuert wird.

**[0027]** Der Boden 2 des Bioreaktorgefäßes 1 weist ein Lichtfenster 19 auf, unter dem eine Lichtquelle 20 mit einer Wellenlänge im Fluoreszenzspektrum für Blut von 830 nm mit einer Videokamera 32 ange-

bracht ist, mit dessen Hilfe die Rückvermischung der Overlay-Medien in den Kulturmedien kontrolliert und gesteuert werden kann, wobei die Kulturmedien mit geeigneten Mitteln zur Erkennung der Rückvermischung versehen sind.

**[0028]** Anstelle des Luer-Lock-Verbinder 20 kann in der Stirnwand 4 ein Dreiwegekükenhahn 28 und in der Stirnwand 5 kann über dem mittig angeordneten Kultivierungsträger 7 ein mit dem Raum für das Kulturmedium 25 dieses Kultivierungsträgers 7 verbundener Luer-Lock-Verbinder 29 angeordnet sein, wobei der Dreiwegekükenhahn 28 und der Luer-Lock-Verbinder 29 über einen Bypass 26 miteinander verbunden sind und wobei um den Bypass 26 eine elektromagnetische Schlauchklemme 27 angeordnet ist.

Damit kann durch Umschalten des Dreiwegekükenhahns 28 und des Luer-Lock-Verbinder 29 ein Teil der Kulturmedien über den Bypass 26 geführt und durch die Verengung des Querschnitts des Bypasses 26 auf die expandierenden Zellen in den Kulturmedien ein definierbarer Scherstress ausgeübt werden. Die Aktivierung von Zellen, insbesondere von T-Zellen, ist sowohl eine mechanischer als auch ein biochemischer Prozess. Mit der elektromagnetischen Schlauchklemme 27 wird ein reproduzierbarer definierter Scherstress auf die Zellen, insbesondere T-Zellen, ausgeübt und so die Aktivierung mechanisch stimuliert.

Das Bioreaktorgefäß 1 ist auf einen Rütteltisch 30 mit einem Impulsgeber 31 angeordnet, wobei am Boden 2 des Bioreaktorgefäßes 1 unter einem poliertem Lichtfenster 19 eine Lichtquelle 18 mit einer Wellenlänge von zwischen 750 nm und 950 nm, insbesondere mit einer Wellenlänge im Fluoreszenzspektrum für Blut von 830 nm, mit einer Kamera 32 befestigt sind.

Beispiel 2:

**[0029]** In einem für aus Gewebestücke auswachsenden Zellen, insbesondere von nicht adhären wachsende T-Lymphozyten, wie tumorinfiltrierte NK-Zellen (TINK) und schleimhautassoziierten invariante T-Zellen (MAIT), geeigneter ersten (nicht dargestellten) Bioreaktor, wie z.B. der in der DE 10 2019 007 815 B3 beschriebenen, wachsen Zellen aus zerkleinerten Gewebestücken aus, wobei als Ausgangsmaterial dafür Gewebeteile eingesetzt werden, die beispielsweise bei operativer Entfernung eines Tumors, von Tumormetastasen oder von Tumorzellen befallenen Lymphknoten anfallen. Die zerkleinerten Gewebestücke werden durch den größer dimensionierten und mit einem steril verschließenden Stopfen eingefüllt und durch Schwenken des mit Medium gefüllten ersten Bioreaktors gleichmäßig verteilt. Nach 3 bis 7 Tagen wachsen die in den tumorösen Gewebestücken enthaltenen Tumor-infiltrierten T-Lymphozyten (TIL) in

Mengen aus.

Je nach gewähltem Medium und zugesetzten Supplementen werden die TIL in dieser Prozess-Phase aktiviert und durch weiteren Kontakt mit dem anfangs noch vorhandenen Gemisch von mutierten Tumorzellen aus einem individuellen Tumorstück (gewonnen aus einem Tumor-Resektat) mutierten Tumorzellen spezifisch geprimt. In der Regel wachsen innerhalb einer Woche  $1,5$  bis  $2 \times 10^9$  TIL im ersten Bioreaktor hoch. Nach Aufschütteln der im ersten Bioreaktor ausgewachsenen TILs werden die TILs durch den mit einem Siebgewebe versehenen Auslass-Stutzen dieses ersten (nicht dargestellten) Bioreaktors über den im Deckel 3 des Bioreaktorgefäßes 1 angeordneten Luer-Lockverbinder 29 dem erfindungsgemäßen Perfusions-Plattenmäander-Bioreaktor für die weitere Expansion von TILs gemäß Beispiel 1 geführt. Die Gewebestücke, aus denen die TILs ausgewachsen sind, werden vollständig vom Siebgewebe des zum Auswachsen von Zellen geeigneten ersten (nicht dargestellten) Bioreaktors zurückgehalten.

### Patentansprüche

1. Perfusions-Plattenmäander-Bioreaktor für die Expansion von Zellen, insbesondere von nicht adhären Zellen, wie nicht adhären T-Lymphozyten oder invarianten T-Lymphozyten und NK-Zellen aber auch weiteren Immunzellen z. B. tumorinfiltrierte NK-Zellen (TINK) und schleimhautassoziierten invarianten T-Zellen (MAIT), bestehend aus einem Bioreaktorgefäß (1) aus glasklarem Polymermaterial mit einem Boden (2), einem Deckel (3), Stirnwänden (4,5), Seitenwänden (6), und Füßen (17), wobei im Bioreaktorgefäß (1) mittels Spannmutter (9) und einem Spannbügel (8) mehrere übereinander angeordnete Kultivierungsträger (7) befestigt sind, auf denen durch Stege (13) gebildete Gerinne (10) und ein oder mehrere Überläufe (14) angeordnet sind, wobei jeder zweite Kultivierungsträger (7) mit den Überläufen (14) um  $180^\circ$  zu dem über ihm liegenden Kultivierungsträger (7) gedreht sind und wobei unter den Kultivierungsträgern (7) eine untere Auffangkammer (15) für das Kulturmedium angeordnet ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- auf den Kultivierungsträger (7) vor den Überläufen (14) über die gesamte Breite der Kultivierungsträger (7) ein Überlaufsteg (33) mit einer Höhe von 3 bis 5 mm und
- oberhalb der Kultivierungsträger (7) eine Overlay-Auffangkammer (24) angeordnet ist,
- das Kulturmedium im Bioreaktorgefäß (1) in den Gerinnen (10) auf den Kultivierungsträgern (7) des Bioreaktorgefäßes (1) horizontal und durch die Überläufe (14) und über den Überlaufsteg (33) auf den darunterliegenden Kultivierungsträger (7) mäanderförmig vertikal von Kultivierungsplatte (7) zu Kultivierungsplatte (7) bis zum Luer-Lock-Verbinder (23) für die Abführung des Kulturmedium und

die Overlay-Medien zur Gasdiffusion der Overlay-Medien in das Kulturmedium und zur Konstanthaltung der Konzentration der gelösten Overlay-Medien in dem Kulturmedium oberhalb der Oberfläche des Kulturmediums in den Gerinnen (10) geführt sind,

- in die Stirnwand (4) ein Zuführungskanal (11) mit einer Luer-Lock-Verbinder (20) für Overlay-Medien eingearbeitet ist, der über Zuführungen (12) mit den Overlay-Räumen (16) über dem Kulturmedium (25) verbunden ist,
- in der Stirnwand (5) ein, mit einer, sich über den Kultivierungsträgern (7) befindlichen, Overlay-Auffangkammer (24) verbundenen Luer-Lock-Verbinder (22) für Abführung der Overlay-Medien, ein Luer-Lock-Verbinder (21) für die Zuführung von Kulturmedium und ein Luer-Lock-Verbinder (23) für die Abführung des Kulturmediums, der mit der unter den Kultivierungsplatten (7) angeordneten Auffangkammer (15) für das Kulturmedium verbunden ist, angeordnet sind und
- außen am Boden (2) des Bioreaktorgefäßes (1) unter einem poliertem Lichtfenster (19) eine Lichtquelle mit einer Wellenlänge von zwischen 750 nm und 950 nm mit einer Kamera (32) angeordnet ist.

2. Perfusions-Plattenmäander-Bioreaktor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Perfusions-Plattenmäander-Bioreaktor (1) auf einer Rüttelvorrichtung bestehend aus einem Rütteltisch (30) und einem Impulsgeber (31) angeordnet ist, wobei die Plattenebene der Kultivierungsträger (7) horizontal liegend angeordnet ist und das Kulturmedium durch den Impulsgeber (31) mechanisch in Richtung der Schwerkraft einem Ruck zwischen  $2-5 \text{ m/s}^3$  ausgesetzt ist.

3. Perfusions-Plattenmäander-Bioreaktor nach Anspruch 1-2, gekennzeichnet dadurch, dass die Wellenlänge der Lichtquelle (20) im Fluoreszenzspektrum in Blut bei ca. 830 nm liegt.

4. Perfusions-Plattenmäander-Bioreaktor nach Anspruch 1-3, **dadurch gekennzeichnet**, dass anstelle des Luer-Lock-Verbinders (20) in der Stirnwand (4) ein Dreiwegekükenhahn (28) und in der Stirnwand (5) über dem mittig angeordneten Kultivierungsträger (7) ein mit dem Raum für das Kulturmedium (25) dieses Kultivierungsträgers (7) verbundener Luer-Lock-Verbinder (29) angeordnet ist, wobei der Dreiwegekükenhahn (28) und der Luer-Lock-Verbinder (29) über einen Bypass (26) miteinander verbunden sind und wobei um den Bypass (26) eine elektromagnetische Schlauchklemme (27) angeordnet ist.

5. Perfusions-Plattenmäander-Bioreaktor nach Anspruch 1-2, **dadurch gekennzeichnet**, dass auf den Kultivierungsträger (7) Stege (13) zur Bildung eines oder mehrerer Gerinne (10) in einem Abstand

a voneinander und in einem Abstand b von Stirnwänden (4,5) angeordnet sind und die Kultivierungsträger (7) ein oder mehrere Überläufe (14) aufweisen.

6. Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Abstand a der Stege (13) voneinander so gewählt ist und die zugeführte und abgeführte Menge an Kulturmedium so eingestellt ist, dass sich in dem Stromfaden, in dem durch die Stege (13) gebildeten Gerinne (10), eine laminare Strömung mit einer Bodensteinzahl von 0,001 bis 0,1 und die Bodenströmung dabei nahe einer Bodensteinzahl 0 verbleibt.

7. Perfusions-Plattenmäander- Bioreaktor nach Anspruch 1 bis 2 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Kultivierungsträger (7) mit den Stegen (13) und den Gerinnen (10) aus einem hydrophilen mit Niedertemperatur- Plasma behandelten Kunststoff mit einer zelladhäsiven Beschichtung bestehen und in die zelladhäsive Beschichtung aktivierende Antikörper eingearbeitet sind.

8. Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass als aktivierende Antikörper Immunglobuline, Lymphozyten, Anti CD 16, Anti CD3, Anti CD28, AntiCD137, Anti CD39, Anti CD103 und/oder aus Kombinationen davon in die zelladhäsive Beschichtung eingearbeitet sind.

9. Plattenmäander- Bioreaktor nach Anspruch 7-8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zelladhäsive Beschichtung aus Flbronektin, RetroNectin, Collagen, Gelatine, Laminin, Chitin und/oder aus Kombinationen davon besteht.

10. Plattenmäander- Bioreaktor nach Anspruch 7-9, **dadurch gekennzeichnet**, dass in die zelladhäsive Beschichtung, als aktivierende Antikörper der Antikörper 4-1bb in Kombination mit den Cyklingen Interleukin 12 oder mit einem Gemisch aus Interleukin 12 und Interleukin 2 eingearbeitet sind.

11. Perfusions- Plattenmäander- Bioreaktor nach Anspruch 1-10, **dadurch gekennzeichnet**, dass in dem Deckel (3) des Bioreaktorgefäßes (1) ein Luer-Lock- Verbinder (29) angeordnet ist, der mit der Overlay- Auffangkammer (24) verbunden ist und über den ein zum Auswachsen von Zellen aus Gewebestücken geeigneter (nicht dargestellter) erster Bioreaktor angeschlossen sein kann, wobei der zum Auswachsen von Zellen geeignete (nicht dargestellte) erste Bioreaktor mit einem Auslaufstutzen mit einem Siebgewebe für das Zurückhalten der Gewebestücke ausgestattet ist

Es folgen 3 Seiten Zeichnungen



Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

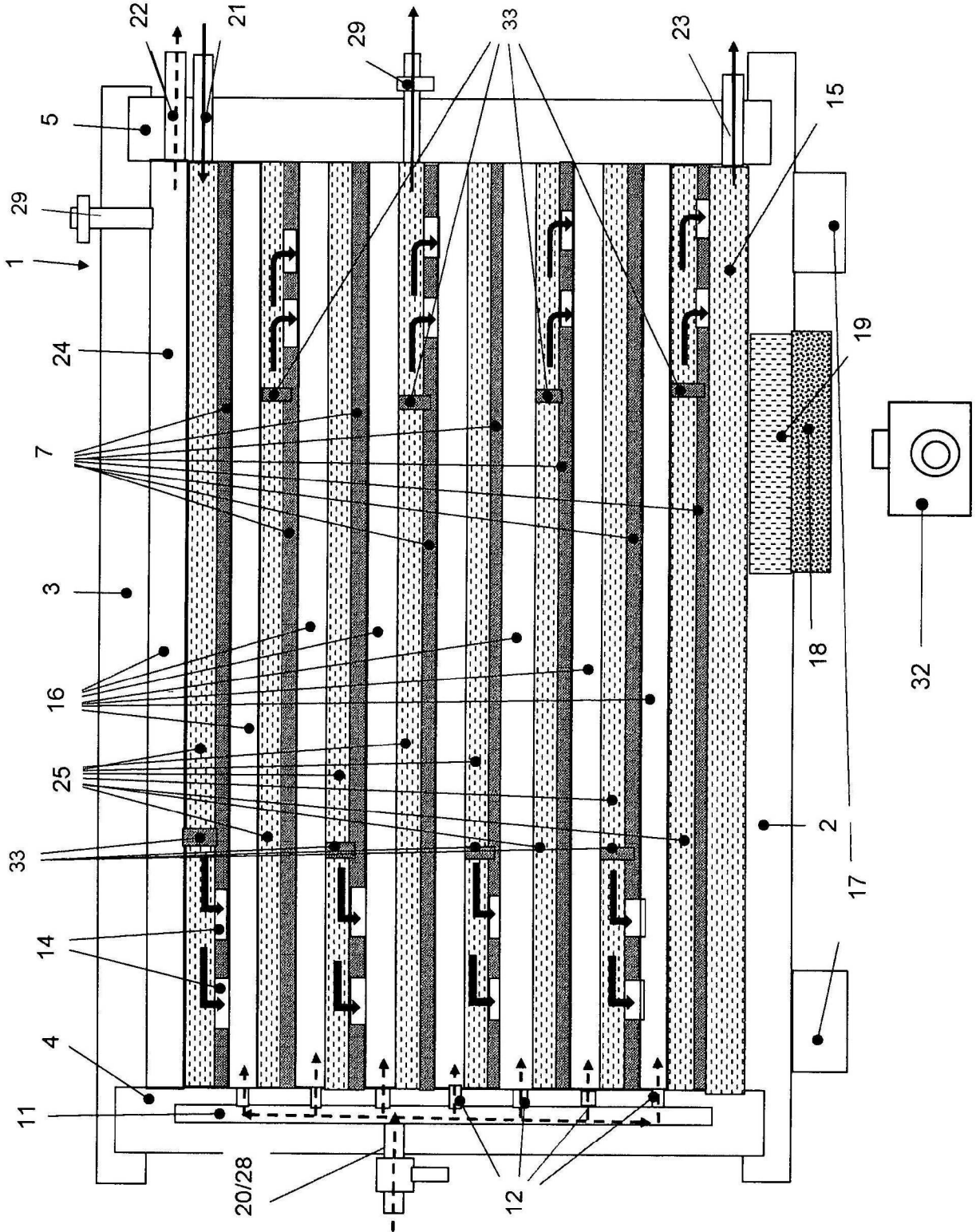


Fig. 2

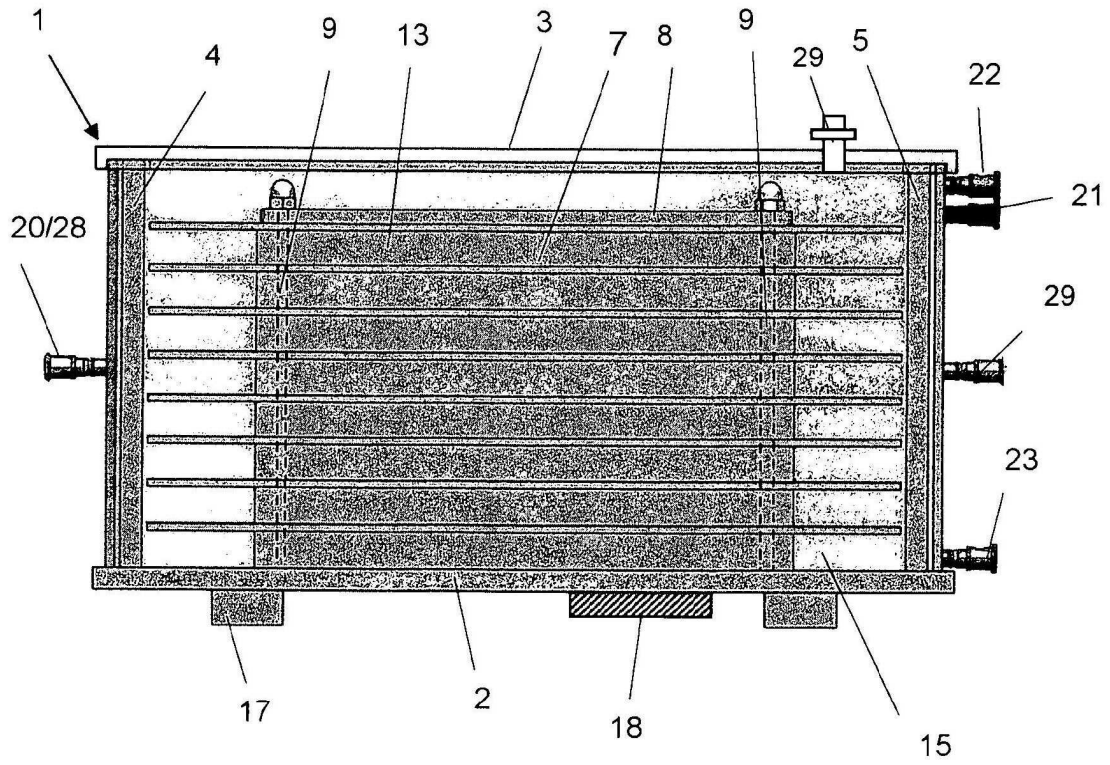


Fig. 3

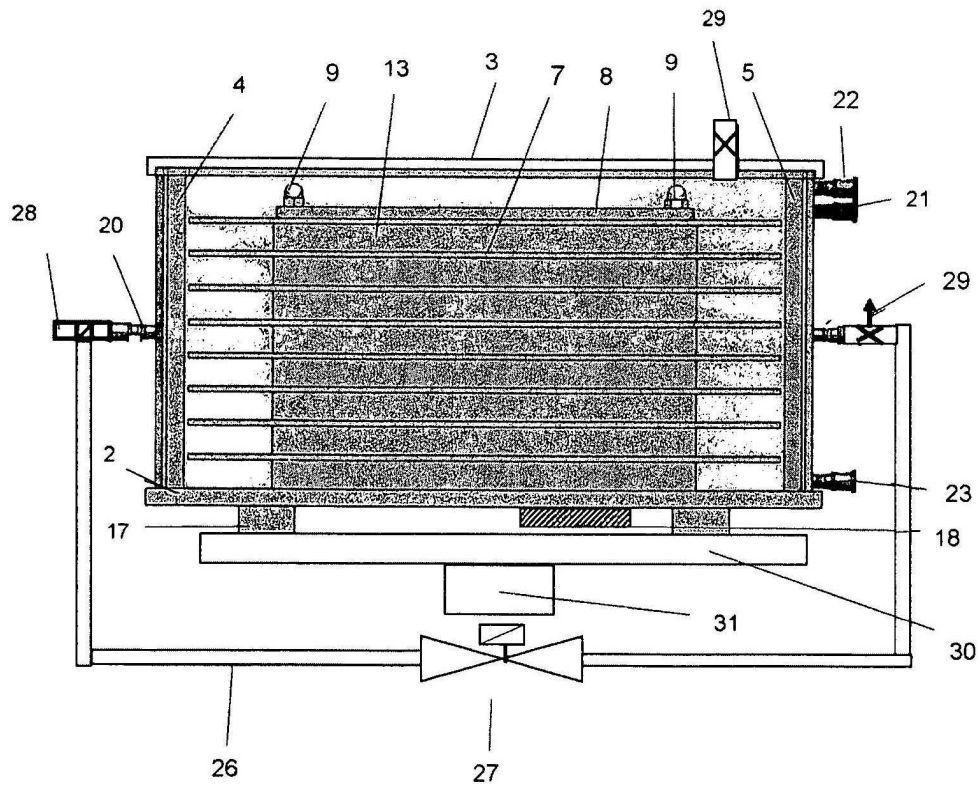


Fig.4

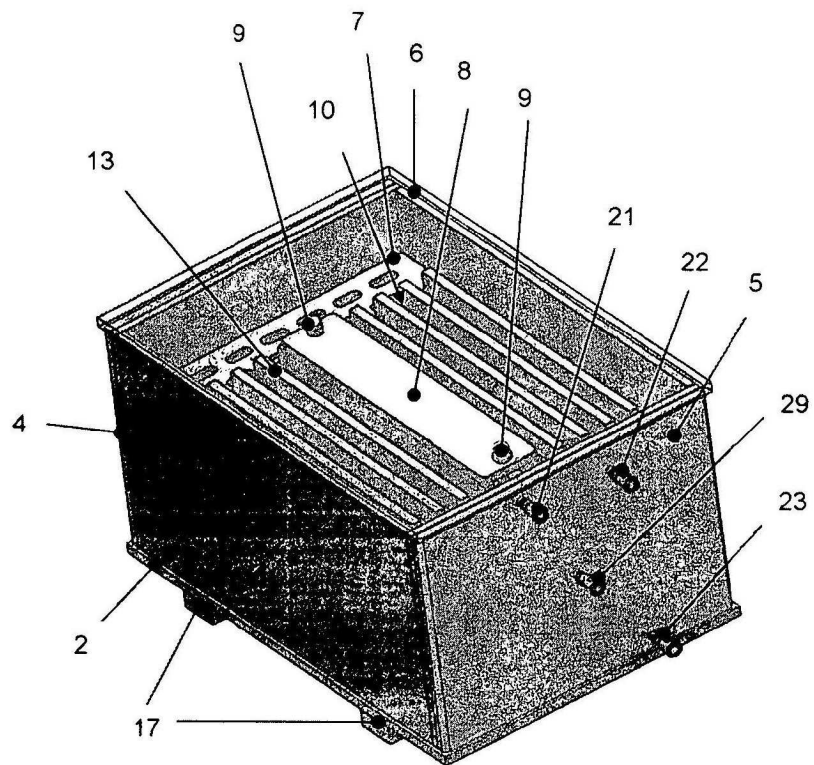


Fig. 5

