

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum**  
Internationales Büro

**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum**  
**23. Dezember 2009 (23.12.2009)**

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer**  
**WO 2009/152990 A2**

---

**(51) Internationale Patentklassifikation:**  
**C12M 1/08 (2006.01)**      **C12M 3/02 (2006.01)**

**(21) Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2009/004200

**(22) Internationales Anmeldedatum:**  
10. Juni 2009 (10.06.2009)

**(25) Einreichungssprache:** Deutsch

**(26) Veröffentlichungssprache:** Deutsch

**(30) Angaben zur Priorität:**  
10 2008 029 307.5 20. Juni 2008 (20.06.2008) DE

**(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):** **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

**(72) Erfinder; und**

**(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):** **KAULING, Joerg** [DE/DE]; Seelsheiderweg 20, 51069 Köln (DE). **FRAHM, Björn** [DE/DE]; Schmiedestr. 1, 40699 Erkrath (DE). **JENNE, Marc** [DE/DE]; Saarstr. 12, 51375 Leverkusen (DE). **BROD, Helmut** [DE/DE]; Morgengraben 3, 51061 Köln (DE). **KIRCHNER, Stephan** [DE/DE]; Hatzfelder Str. 64, 42281 Wuppertal (DE). **BRAUN, Arndt** [DE/DE]; Doddestr. 40, 42859 Remscheid (DE).

**(74) Gemeinsamer Vertreter:** **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH**; 51368 Leverkusen (DE).

---

**(54) Title:** METHOD AND APPARATUS FOR RETAINING AND RECIRCULATING CELLS

**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR RÜCKHALTUNG UND RÜCKFÜHRUNG VON ZELLEN

**Fig. 5**

**(57) Abstract:** The invention relates to an apparatus and a method for retaining and recirculating cells in a continuous-flow or batch-flow vessel. The invention further relates to a method for producing an apparatus which allows cells to be retained and recirculated in a continuous-flow or batch-flow vessel.

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen in einem kontinuierlich oder absatzweise durchströmten Gefäß. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung, mit dem Zellen in einem kontinuierlich oder absatzweise durchströmten Gefäß zurückgehalten und zurückgeführt werden können.

## **Verfahren und Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen in einem kontinuierlich oder absatzweise durchströmten Gefäß, die innerhalb oder außerhalb eines Bioreaktors betrieben werden kann. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren

5 zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen innerhalb oder außerhalb eines Bioreaktors. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung, mit dem Zellen in einem kontinuierlich oder absatzweise durchströmten Gefäß zurückgehalten und zurückgeführt werden können.

Die Züchtung tierischer und pflanzlicher Zellen hat große Bedeutung bei der Herstellung

10 biologisch aktiver Substanzen und pharmazeutisch aktiver Erzeugnisse. Insbesondere die Züchtung von Zellen, welche häufig in einem Nährmedium in freier Suspension durchgeführt wird, ist anspruchsvoll, weil die Zellen im Gegensatz zu Mikroorganismen sehr empfindlich hinsichtlich mechanischer Scherbeanspruchung und unzureichender Versorgung mit Nährstoffen sind.

15 Meist werden tierische und pflanzliche Zelllinien absatzweise gezüchtet. Dies hat den Nachteil, dass eine optimale Versorgung der Zellen infolge der sich ständig verändernden Substrat-, Produkt- und Biomassekonzentrationen nur schwer zu erreichen ist. Am Ende der Fermentation reichern sich außerdem Nebenprodukte an, z.B. Bestandteile abgestorbener Zellen, die meist unter großem Aufwand bei der späteren Aufarbeitung 20 entfernt werden müssen. Aus den genannten Gründen, insbesondere aber bei der Herstellung instabiler Produkte, die z.B. durch proteolytische Angriffe beschädigt werden können, werden daher bevorzugt kontinuierlich betriebene Bioreaktoren verwendet.

Mit kontinuierlichen Bioreaktoren lassen sich hohe Zelldichten und eine damit verbundene hohe Produktivität erreichen, wenn folgende Anforderungen erfüllt sind:

- 25
- eine ausreichende und scherarme Versorgung der Zellen mit Substraten, insbesondere dem gelöstem Sauerstoff,
  - eine ausreichende Entsorgung des bei der Veratmung entstehenden Kohlendioxids,
  - ein effektives, scherarmes, verstopfungssicheres Zellrückhaltesystem zum Aufbau hoher Zellkonzentrationen,

- die Langzeitstabilität (Sterilität, Hydrodynamik) des Bioreaktors.

Neben der kontinuierlichen Fahrweise kann ein Bioreaktor mit einem effizienten Zellrückhaltesystem z.B. auch zur Anzucht von Vorkulturen mit besonders hohen Zelldichten verwendet werden. Man verwendet dann das Zellrückhaltesystem auf 5 diskontinuierliche Weise, um Zellkulturüberstand nahezu frei von Biomasse abzuziehen. Danach kann der Vorkulturreaktor wieder mit frischem Nährmedium aufgefüllt werden und die Kultur lässt sich auf diese Weise zu höheren Zelldichten bringen als bei einfachem absatzweisen Betrieb.

10 Häufig wird zur scherarmen Versorgung der Zellen mit gelöstem Sauerstoff eine blasenfreie Begasung mittels Membranen eingesetzt. Beispielsweise lassen sich Membranen als Schläuche auf zylindrischen Korbstatoren aufwickeln (Henzler, H.-J., Kauling, J., Oxygenation of cell cultures, Bioprocess Engineering, 9, 1993, 61-75, EP A 0172478, EP A 0240560). Zur Unterbringung großer Stoffaustauschflächen werden die Schläuche mit möglichst geringem Abstand dicht nebeneinander platziert.

15 Mit Hilfe scherarmer, radial fördernder Rührorgane wie Blatt- oder Ankerrührern werden die konzentrisch angeordneten Schlauchmembranen in radialer Richtung durchströmt, um den flüssigkeitsseitigen Stofftransportwiderstand zu reduzieren.

20 Eine weitere Möglichkeit, die Zellen mit gelöstem Sauerstoff zu versorgen, stellt die Blasenbegasung mit sauerstoffhaltigen Gasen dar. Der Einsatz einer grobblasigen Begasung und die Dispergierung der Blasen mit Hilfe eines Rührorgans sind jedoch wegen 25 der geringen spezifischen Phasengrenzfläche grober Blasen und des damit verbundenen geringen Stofftransports auf geringe Zelldichten beschränkt. Zudem leidet die Lebensfähigkeit der Zellen wegen der mechanischen Scherbeanspruchung, welche die Dispergierung der Blasen mit Hilfe eines Rührorgans in hohen, für die Züchtung von Zellen unüblichen Leistungsbereichen mit sich bringt (WO 03/020919 A2).

Aus diesem Grund hat sich in den letzten Jahren die feinblasige Begasung zur Versorgung 30 der Zellen mit gelöstem Sauerstoff etabliert (Nienow, A.W., Reactor Engineering in Large Scale Animal Cell Culture, Cytotechnology, 50, 1-3, 2006, 9-33, Varley, J., Birch, J., Reactor design for large scale suspension animal cell culture, Cytotechnology, 29, 3, 2004, 177-205).

Feinblasige Begasung wird mit Hilfe spezieller Sinterkörper aus metallischen und keramischen Werkstoffen, Filterplatten oder laserperforierten Platten erzeugt, wobei die Poren oder Löcher in der Regel kleiner als  $15 \mu\text{m}$  sind. Bei kleinen Gasleerrohrgeschwindigkeiten von weniger als  $0,5 \text{ m/h}$  werden sehr feine Gasblasen erzeugt, die in den 5 in der Zellkultur normalerweise eingesetzten Medien eine geringe Neigung zur Koaleszenz aufweisen. Dem Rührer kommt lediglich die Verteilung der feinen Gasblasen im Bioreaktor, nicht aber deren Erzeugung als Aufgabe zu.

Damit eine hohe Zelldichte ( $> 20$  Millionen lebende Zellen pro Milliliter) in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor erreicht werden kann, ist weiterhin eine effiziente 10 Rückhaltung der Zellen notwendig. Der erforderliche Rückhaltegrad hängt dabei von der Wachstumsrate der Zellen und der Perfusionsrate  $q/V$  (Mediendurchsatz  $q$  pro Bioreaktorvolumen  $V$ ) ab.

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Zellrückhaltesysteme für kontinuierlich betriebene Bioreaktoren vorgeschlagen, welche zumeist außerhalb des Bioreaktors 15 angeordnet werden. Grund hierfür ist die leichte Zugänglichkeit des Zellrückhaltesystems zu Wartungs- und Reinigungszwecken.

Um Schädigungen der Zellen insbesondere aufgrund unzureichender Sauerstoffversorgung und Kohlendioxidentsorgung außerhalb des Bioreaktors so klein wie möglich zu halten, sind Zellrückhaltesysteme mit kleinen Arbeitsvolumina und damit verbundenen kurzen 20 Verweilzeiten der Zellen wünschenswert.

Neben Membranfiltern, Apparaten, die nach dem Prinzip der Querstromfiltration mit feststehenden und beweglichen Membranen arbeiten, kommen spezielle Zentrifugen und Schwerkraftabscheider zum Einsatz.

Im Fall der Zellrückhaltung mit Hilfe von Membranfiltern werden Ablagerungen bzw. 25 Verschmutzungen beobachtet, die einen zuverlässigen und wartungsfreien Langzeitbetrieb verhindern. Die Ablagerungen können reduziert werden, sofern die Membranflächen schnell überströmt werden. Diese Forderung läuft jedoch der Grundvoraussetzung an eine scherarme Zellkulturfermentation zuwider.

Es wurden spezielle scherarme Zentrifugen zur Abscheidung von Zellen im Zentrifugalfeld 30 entwickelt. Allerdings arbeiten diese Zentrifugen nur über wenige Wochen ohne Wartungs-

aufwand. Durch den bei den Wartungsarbeiten erforderlichen Austausch von Zentrifugenelementen vergrößert sich das Risiko der Insterilität.

Eine weitere Möglichkeit, die Zellen aus der Zellkulturbrühe abzuscheiden, ist der Einsatz von Schwerkraftabscheidern. Die bei der Züchtung von Zellen überwiegend verwendeten

5 Schwerkraftabscheider sind Absetzbehälter und Schrägkanalabscheider. Verglichen mit einfachen Absetzbehältern haben die Schrägkanalabscheider den Vorteil eines beträchtlich geringeren Volumens. Eine Veröffentlichung (Henzler, H.-J., Chemie-Technik, 1, 1992, 3) beschreibt die Zellrückhaltung in Schrägkanalabscheidern, welche im Gegenstrom, Kreuzstrom und Gleichstrom betrieben werden können. Der durchströmte Kanalquerschnitt 10 kann mit Platten oder Rohren versehen sein. Die Patentschriften US 5,817,505 und EP 0 699 101 B1 beanspruchen den Einsatz von Schrägkanalabscheidern zur Rückhaltung von Zellen in Gegenstromabscheidern. In WO2003020919 A2 werden unter anderem Gegen- und Kreuzstromabscheider, sowie Kombinationen mit verschiedenen Vorabscheidern (z.B. Hydrozyklen) für die Rückhaltung von Zellen beschrieben.

15 Die Schrägkanalabscheider werden über einen externen Kreislauf an den Bioreaktor angeschlossen. Hierzu sind Schlauchleitungen und Pumpen erforderlich, deren Verwendung die Komplexität der Anlage und damit das Fehlerrisiko erhöht. Außerdem wird die Scherbeanspruchung der Zellen vergrößert.

Um die Stoffwechselaktivität und das Anbacken von Zellen in einem Schwerkraftabscheider zu vermindern, wird das Herunterkühlen der Zellkulturbrühe auf ihrem Weg 20 zum Schwerkraftabscheider vorgeschlagen. Eine reduzierte Stoffwechselaktivität bei niedriger Temperatur ist bei längerem Aufenthalt der Zellen außerhalb des Bioreaktors sicherlich von Vorteil. Die Ausbildung von Temperatur- und Dichtegradienten im Inneren des Schwerkraftabscheiders, die zum effizienzreduzierenden Strömungsphänomen der 25 freien Konvektion führen können, wird durch Begrenzung der Kühltemperatur vermieden.

Es werden auch Bioreaktoren beschrieben, bei denen das Zellrückhaltesystem innerhalb des Bioreaktors angeordnet ist. In EP 0 227 774 B1 ist ein kontinuierlich betriebener Fermentationskessel beschrieben, in welchem die Rückhaltung der Zellen innerhalb eines Airlift-Schlaufenreaktors erfolgt. Die Airlift-Schlaufenströmung leitet die Zellsuspension 30 um die interne, durch senkrechte Trennwände gebildete, strömungsberuhigte Absetzzone herum. Die in der Absetzzone abgeschiedenen Zellen werden in die bewegte Zellsuspension

sion zurückgeführt, während Kulturüberstand am Kopf der Absetzzone abgezogen wird. Der Nachteil der beschriebenen senkrecht wirkenden Rückhalteinrichtung besteht jedoch in deren schwieriger Skalierbarkeit. Diese führt zu einer überproportionalen Vergrößerung des Abscheidervolumens gegenüber der Fermentationszone. Die Folge sind hohe 5 Verweilzeiten der Zellen in nicht ausreichend versorgbaren Abscheidern mit der Konsequenz einer verringerten Produktivität des Reaktorssystems.

Es stellt sich damit ausgehend vom Stand der Technik die Aufgabe, eine effiziente Methode zur Rückhaltung und Rückführung von tierischen und pflanzlichen Zellen in einem kontinuierlich oder absatzweise betriebenen Verfahren bereitzustellen, die der 10 Empfindlichkeit der Zellen hinsichtlich mechanischer Scherbeanspruchung und der ausreichenden Versorgung der Zellen mit Nährstoffen Rechnung trägt, die den wartungs-, reinigungs- und steriltechnischen Anforderungen der pharmazeutischen Industrie gerecht wird und deren Verwendung die Komplexität und das Fehlerrisiko erniedrigt.

Gegenstand der Erfindung ist daher eine Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung 15 von Zellen in einem durchströmten Gefäß umfassend eine Vielzahl von nebeneinander angeordneten Kanälen, wobei die Kanäle einen stehenden Hohlzylinder bilden und gegenüber der Längsachse des Hohlzylinders um einen Winkel  $\beta$  zwischen  $10^\circ$  und  $60^\circ$ , geneigt sind.

Das durchströmte Gefäß kann ein Bioreaktor oder ein mit einem Bioreaktor verbundenes 20 Gefäß zur Zellrückhaltung und –rückführung sein.

Die Durchströmung des Gefäßes kann kontinuierlich oder absatzweise erfolgen, bevorzugt erfolgt sie kontinuierlich.

Die Kanäle sind am unteren Ende geöffnet. Am oberen Ende führen sie in einen gemeinsamen Ringraum, der über mindestens eine Leitung verfügt, über die ein Erntestrom 25 aus dem Gefäß befördert werden kann.

In den Kanälen erfolgt die Separation von Zellen und Zellkulturlösung. Durch die kontinuierliche Entnahme des Erntestroms aus dem Bioreaktor werden Zellkulturlösung und Zellen in die Kanäle eingesaugt. Die Zellen sedimentieren innerhalb der schräg angeordneten Kanäle und rutschen wie in klassischen Schrägkanalabscheidern im 30 Gegenstrom zum zufließenden Erntestrom wieder aus den Kanälen heraus und verbleiben

damit im Gefäß. Die von den Zellen getrennte Zellkulturlösung wird durch die Kanäle in den Ringraum oberhalb der Kanäle und schließlich aus dem Gefäß befördert.

Die Kanäle haben einen eckigen, elliptischen oder runden Querschnitt. Die nach dem Stand der Technik bekannten Schrägkanalplatten verfügen über ein rechteckiges Profil. Die 5 Abscheidefläche für die sedimentierenden Zellen ist bei rechteckigen Profilen eben ausgeführt. Ein quadratischer Kanal mit der Querschnittsbreite  $d$  verfügt über eine größere Abscheidefläche als ein runder Kanal mit demselben Durchmesser  $d$ . Überraschend wurde jedoch gefunden, dass die Effizienz bei der Rückhaltung und Rückführung von Zellen in runden Kanälen mit einem Durchmesser  $d$  trotz geringerer Abscheidefläche der Effizienz 10 von rechteckigen Kanälen mit der Querschnittsbreite  $d$  entspricht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Reibung zwischen den sedimentierten Zellen und der Kanalinnenwand bei einem runden Querschnitt infolge der geringeren Kontaktfläche geringer ist und so die Zellen leichter abrutschen können. Auch ist denkbar, dass Lawineneffekte eine Rolle spielen. Da die sedimentierenden Zellen in einem runden Kanalquerschnitt durch einen 15 zum niedrigsten Punkt auf der Vertikalachse hin gerichteten zusätzlichen Verdichtungsprozess vermehrt übereinander zu liegen kommen, reißen sie einander leichter mit als in einem rechteckigen Querschnitt. Dies führt letztlich zu einer Verringerung der im Abscheider vorhandenen Zellen und damit zu einer Vergrößerung der freien Strömungsquerschnitte.

20 Bevorzugt verfügen die Kanäle daher über einen zu ihrer Unterseite hin abnehmenden Querschnitt. Besonders bevorzugt hat der Kanalquerschnitt auf der Unterseite ein halbrundes oder elliptisches Profil. Die Verwendung von Kanälen mit zur Unterseite hin abnehmendem Querschnitt anstelle gerader Platten gemäß dem Stand der Technik führt zu einem deutlich beschleunigten Abrutschen der Zellen, so dass einer möglichen Auszehrung 25 an Gelöstsauerstoff in den Kanälen entgegengewirkt werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung haben die Kanäle einen runden Querschnitt.

Die Dimensionierung der Kanäle (Anzahl, Durchmesser, Länge) hängt jeweils von der Art der zurückzuhaltenen Zellen, der Größe des Bioreaktors und dem Durchsatz ab.

30 Die erforderliche Abscheidefläche  $A_{erf}$  ergibt sich aus der Sedimentationsgeschwindigkeit  $ws$ , der Perfusionsrate  $q/V$  (Mediendurchsatz  $q$  pro Bioreaktorvolumen  $V$ ) und dem

Bioreaktorvolumen nach Gl. 1. Ein Wirkungsgrad  $\eta$  berücksichtigt die Leistungsminderung von Schrägkanalabscheidern gegenüber Vertikalabscheidern (Gl. 2).

Die theoretische Anscheidefläche  $A_{th}$  bei rechteckigen und zylindrischen Querschnitten kann nach in der Literatur (H.-J. Binder, Sedimentation aus Ein- und Mehrkornsuspensionen in schräg stehenden, laminar durchströmten Kreis- und Rechteckrohren, Dissertation Berlin, 1980) veröffentlichten Ansätzen aus den Gl. 3 und Gl. 4 näherungsweise bestimmt werden:

$$A_{eff} = \frac{Perfusionsrate \cdot V}{ws} \quad (Gl. 1)$$

$$10 \quad A_{th} = \frac{A_{eff}}{\eta} \quad (Gl. 2)$$

$$\text{Rechteck: } A_{th} \approx Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (Gl. 3)$$

$$\text{Zylinder: } A_{th} \approx \frac{3 \cdot \pi}{16} \cdot Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (Gl. 4)$$

15 Hierbei sind  $Z$  die Anzahl der Kanäle,  $\beta$  der Winkel, um den die Kanäle gegenüber der Richtung der Schwerkraft gekippt sind,  $d$  der Innendurchmesser und  $L$  die Länge der Kanäle.  $\pi$  ist die Kreiszahl ( $\pi = 3,14159\dots$ ).

Der Winkel  $\beta$  richtet sich nach dem Absetz- und Abrutschverhalten der Zellen und liegt bevorzugt bei  $10^\circ \leq \beta \leq 60^\circ$ . In einer bevorzugten Ausführungsform liegt der Winkel  $\beta$  zwischen  $15^\circ$  und  $45^\circ$ , besonders bevorzugt zwischen  $25^\circ$  bis  $35^\circ$ . Zur Verbesserung des Abrutschverhaltens kann die Vorrichtung mit geeigneten Mitteln, beispielsweise pneumatischen oder elektrischen Vibratoren zur Vibration gebracht werden. Bei hohen Volumenkonzentration bzw. Zelldichten  $> 20$  Millionen Zellen/Milliliter und eingeschränkter Vibrationsmöglichkeit sind Winkel von  $20^\circ \leq \beta \leq 35^\circ$  besonders bevorzugt.

25 Es ist denkbar, den Winkel über die Länge des Kanals zu variieren.

Die Kanalbreite  $d$  (maximale Querschnittsbreite, bei rundem Profil der Durchmesser des Kanals) liegt bevorzugt bei  $d \geq 3$  mm, um eine Verstopfung der Kanäle zu verhindern. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Kanäle mit einer Kanalbreite von 3 mm bis 100 mm, bevorzugt von 5 mm bis 20 mm, besonders bevorzugt von 5 mm eingesetzt, um 5 einerseits Verblockungszustände sicher zu vermeiden, andererseits aber das die Raumzeitausbeute mindernde Volumenverhältnis von Abscheider- und Bioreaktorraum möglichst gering zu halten.

Bei der Dimensionierung der Kanallänge ist die Einhaltung laminarer Strömungsbedingungen ( $Re < 2300$ ;  $Re$  = Reynolds-Zahl) zu berücksichtigen. Bei einem Einbau in 10 einen Behälter richtet sich die Kanallänge nach der vertikal zur Verfügung stehenden Behälter-Innenabmessung, bzw. nach dem in den Reaktoren zu realisierenden Füllständen. Kurze Kanallängen können aufgrund der reduzierten Druckverluste zu Verteilungsproblemen führen, was insbesondere bei der Abnahme der Erntelösung aus dem oberen 15 Ringraum eine aufwändige Verteilungsvorrichtung zur Reduzierung der Abzugsgeschwindigkeiten erfordern kann. Der dynamische Druck an der Abzugstelle sollte dabei mindestens um das 5- bis 10- fache kleiner sein als der Druckverlust in den Kanälen. Insofern sind Kanallängen ab 0,1 m als technisch realisierbar anzusehen, während Kanallängen von 0,2 m bis 5 m bevorzugt bzw. von 0,4 m bis 2 m besonders bevorzugt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst 2 bis  $10^6$  Kanäle, bevorzugt 10 bis 100000, 20 besonders bevorzugt 100 bis 10000 Kanäle.

Der Mantel des durch die Kanäle gebildeten stehenden Hohlzylinders umfasst eine oder mehrere Lagen an Kanälen. Bevorzugt umfasst er 1 bis 100 Lagen, besonders bevorzugt - insbesondere beim Inneneinbau in einen Bioreaktor - 1 bis 10 Lagen. Die Lagen können ringförmig oder spiralförmig umeinander angeordnet sein. Die Lagen können mit einem 25 Stator verbunden sein, der mechanischen Halt bietet.

Der Zylinder hat bei seinem Einbau in den Bioreaktor bevorzugt eine Höhe von 30 % bis 95%, besonders bevorzugt von 60% - 90% der Füllhöhe des Bioreaktors. Dieser Einbau erlaubt eine gerichtete Umströmung des Zylinders. Die Umströmung des Zylinders bietet den Vorteil, dass die zylindrische Bioreaktorwand z.B. für den Wärmeaustausch oder zur 30 Unterbringung von Sensoren bei Einbau der Abscheidervorrichtung weiterhin genutzt werden kann. Durch die Umlaufströmung wird außerdem das Suspendieren von Partikeln

herbeigeführt oder begünstigt. Günstige Bodenformen des Bioreaktors besitzen abgerundete Ecken oder werden als Klöpper- bzw. Rundboden ausgeführt. Bei einer bodennahen, zentrischen Gaszufuhr werden die sedimentierenden Partikel, z.B. die mikrobiellen oder eukariotischen Zellen, durch die Umlaufströmung zum Bodenzentrum 5 transportiert, wo sie von der durch die Begasung induzierten aufwärtsgerichteten Strömung, ggf. unter Zuhilfenahme von Rührsystemen erfasst und resuspendiert werden. Unter den genannten Einbaubedingungen liegen günstige Zylinderdurchmesser je nach der unterzubringenden Abscheiderfläche bzw. der Anzahl der ring- oder spiralförmig aufzubringenden Kanallagen bei 50-85% des Reaktordurchmessers. Es muss dabei 10 sichergestellt sein, dass die zwischen Bioreaktorwand und Stator befindliche Ringfläche 5- 300% besonders bevorzugt 100% des Zylinderquerschnittes einnehmen kann. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass eine Umlaufströmung ohne allzu große Reibungsverluste mit hoher Effizienz induziert werden kann. Die erforderlichen Abscheiderflächen richten sich nach den Sedimentationseigenschaften der Zellen sowie den angestrebten 15 Perfusionsraten und Zellkonzentrationen. Bevorzugte Perfusionsraten liegen im Bereich zwischen 0,2 – 40 1/Tag, besonders bevorzugte zwischen 0,5 und 20 1/Tag. Bevorzugte Abscheiderflächen pro Bioreaktorvolumen liegen je nach Sedimentationseigenschaften der Zellen (abhängig von der Konzentration, Größe und Agglomerationsneigung der Zellen) im Bereich zwischen 0,1 und 100 m<sup>2</sup>/ m<sup>3</sup> besonders bevorzugte zwischen 2 und 20 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>.  
20 Die nach außen und nach innen gerichteten Mantelflächen des Zylinders sind bevorzugt versiegelt, um das Eindringen von Zellen in die Kanalzwischenräume und damit Fouling zu verhindern.

Ein Zylinder im Sinne der vorliegenden Beschreibung wird von zwei parallelen, ebenen Flächen (Grund- und Deckfläche) und einer Mantel- bzw. Zylinderfläche, die von 25 parallelen Geraden gebildet wird, begrenzt. Er entsteht durch Verschiebung einer ebenen Leitkurve entlang einer Geraden, die nicht in dieser Ebene liegt. Dementsprechend kann der durch die Kanäle gebildete Zylinder verschiedene Formen aufweisen. Es kann sich z.B. um einen Kreiszylinder, ein Zylinder mit elliptischer Grundfläche oder ein Prisma, d.h. ein Zylinder mit einem Vieleck (Dreieck, Viereck, Fünfeck,...) als Grundfläche handeln. Es 30 sind weitere Formen denkbar, wie z.B. die Anordnung der Kanäle in Form eines Kegelstumpfes. Bevorzugt handelt es sich um einen Zylinder mit kreisförmiger oder elliptischer Grundfläche. Der Zylinder weist einen inneren Kanal auf (Hohlzylinder), der

parallel zur Mantelfläche verläuft und bevorzugt dieselbe Querschnittsform wie die Grundfläche besitzt.

Bevorzugt werden Rohre oder Schläuche als Kanäle eingesetzt. Als Materialien kommen z.B. Kunststoffe oder Metalle in Frage. Bevorzugt werden dem Fachmann bekannte 5 Kunststoffe wie Teflon, Silikonkautschuk (im folgenden kurz Silikon genannt), Polyethylen oder Polypropylen eingesetzt. Es werden bevorzugt Materialien mit geringer Neigung zum Anhaften von Biomasse für die Rohre oder Schläuche verwendet. Besonders gut geeignet ist Silikon, da es sich sehr gut mit einer für Pharmaprozesse ausreichenden Güte verarbeiten lässt. Außerdem ist es sauerstoffdurchlässig, so dass sich eine 10 Sauerstoffversorgung bis zu einem gewissen Grad sogar innerhalb der Kanäle realisieren lässt. Dazu kann der Außenraum um die Kanäle mit sauerstoffhaltigem Gas gespült werden. Dieses wird mittels einer Gaszu- und -ableitung in den Zwischenraum der Kanäle, d.h. zwischen der oberen und unteren Kanalfassung eingespeist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung als Ganzes oder Teile der erfindungsgemäßen 15 Vorrichtung sind zur Vermeidung der Reinigungsproblematik bevorzugt als Einwegartikel ausgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden Silikonschläuche als Kanäle verwendet. Die Silikonschläuche sind bevorzugt zu Matten miteinander verbunden und bis zum Erreichen der gewünschten Abscheidefläche in einer 20 oder mehreren Lagen auf einen zylinderförmigen Stator gewickelt. Die Matten aus schräg angestellten Schläuchen sind bevorzugt als Einwegelement ausgeführt, was den Aufwand für die Bereitstellung eines nach den Pharmagrundsätzen gereinigten Rückhaltesystems auf ein Minimum reduziert.

In einer bevorzugten Methode zur Herstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird 25 als Kanal ein Schlauch oder Rohr über einen Zylinder gewickelt. Die einzelnen Windungen sind dabei bevorzugt eng aneinander anliegend. Es können mehrere Lagen an Schlauch oder Rohr übereinander gewickelt werden, wenn in der Vorrichtung mehrere Lagen an Kanälen erforderlich sind. Die einzelnen Windungen werden bevorzugt mechanisch z.B. mittels Klebung miteinander verbunden. Die Länge der späteren Kanäle entspricht dem 30 Umfang der Windungen um den Zylinder. Vernachlässigt man die Ausdehnung der Kanäle

so ergibt sich die Kanallänge  $L$  aus dem Umfang  $U$  des Zylinders annähernd nach Gl. 5 ( $\pi$  = Kreiszahl).

$$L = \frac{U}{\pi} \quad (\text{Gl. 5})$$

Die Zahl der Windungen ergibt die Zahl  $Z$  der späteren Kanäle.

- 5 Anschließend wird das aufgewickelte Rohr oder der aufgewickelte Schlauch quer zu den Windungen durchgetrennt. Dies erfolgt in einer Spirale um den Zylinder herum (siehe z.B. Figur 3). Dabei ergibt die Steigung der Spirale den späteren Winkel  $\beta$  der schräg stehenden Kanäle. Das Ergebnis ist eine Matte aus einer oder mehreren Lagen an schräg gestellten Kanälen (siehe z.B. Figur 4). Die Matte kann an den schrägen Enden verbunden werden, so  
10 dass ein Strumpf entsteht (Hohlzylinder). Dieser kann bei Bedarf auf einen Stützkörper (Stator) aufgezogen werden (siehe z.B. Figur 5). Während die Unterseite der Kanäle offen bleibt, wird die obere Seite mit einem Halter derart verbunden, dass oberhalb der Kanäle ein Ringraum entsteht, in den beim Betrieb der Vorrichtung die durch die einzelnen Kanäle fließenden Flüssigkeitsströme zusammenlaufen.
- 15 Es empfiehlt sich, die Innen- und Außenseite des Hohlzylinders nach außen hin abzudichten, um zu verhindern, dass Zellkulturlösung und Zellen in die Zwischenräume zwischen den Kanälen dringen und Fouling verursachen. Ebenso sollten die Zwischenräume zwischen den Kanälen an der Unter- und Oberseite des Hohlzylinders hermetisch verschlossen werden, um das Eindringen von Zellkulturlösung und Zellen zu  
20 verhindern. Durch dieses spezielle Ausführungsmerkmal des hermetisch abgedichteten Kanalaußensaums ist es möglich, diesen Raum mit sauerstoffangereichertem Gas zu spülen. Durch Verwendung von sauerstoffdurchlässigen Materialien für die Kanäle, bevorzugt von Silikon, können die zurückgehaltenen Zellen im Abscheiderraum mit Sauerstoff versorgt werden.
- 25 Gemäß einer weiteren bevorzugten Herstellungsmethode wird die erfindungsgemäße Vorrichtung aus einer profilierten Folie gebildet (siehe z.B. Figur 6). Eine profilierte Folie weist bevorzugt eine glatte Seite und eine Seite mit einer Folge von Stegen und Rinnen in gleichbleibenden Abständen auf. Kanäle bilden sich bei der spiralförmigen oder schalenförmigen Wicklung der Folie in einer oder mehreren Lagen z.B. auf einen Stator.

Dabei werden die Rinnen zur offenen Seite hin jeweils durch die glatte Seite einer benachbarten Lage bzw. durch die Wand des Stators verschlossen.

Die Geometrie der Kanäle wird durch das Verhältnis von Steghöhe  $hs$  zur Kanalbreite  $b$  festgelegt. Technisch realisierbare  $hs/b$ - Verhältnisse liegen je nach Beschaffenheit 5 (Formbarkeit, Elastizität, Tiefziehvermögen) zwischen 0,33 bis 5. Hierbei ist zu beachten, dass beide Abmessungen  $hs$  und  $b$  jeweils größer als oder gleich 3 mm, bzw. bevorzugt größer als oder gleich 5 mm sein sollten. Bevorzugte  $hs/b$  – Verhältnisse liegen bei 0,5 bis 10 3. Die Stegbreiten  $bs$  werden durch die mechanische Stabilität des Folienmaterials bestimmt. Die Stegbreiten  $bs$  sollten möglichst klein sein, um hohe Abscherflächen pro 15 Abscheidervolumen zu ermöglichen. Gleichzeitig sollten sie nicht zu gering gewählt werden, um eine kraftschlüssige Vermindung mit der unteren Lage ohne Formveränderung erlauben zu können.

Bei der spiralförmigen Aufwicklung werden rampenartige An- und Abschlüsse an die Matten benötigt, um an den Übergängen eine axiale Abdichtung zwischen Fermenterraum 15 und Abzugsraum zu erreichen.

Bei einer schalenartigen Aufwicklung kann es zur Vergrößerung der Stabilität der Einzellagen sinnvoll sein, von Lage zu Lage die Richtung der Kanäle abwechselnd zwischen einem positiven und negativen Anstellwinkel zu vertauschen. In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden Matten mit schräg angeordneten Kanälen 20 daher schalenartig angeordnet, wobei jede Schale durch eine zu einem Hohlzylinder geformte Matte gebildet wird und die einzelnen Matten gegenüber ihren benachbarten Matten um 180° gegenüber einer der Längsachsen der Matte gedreht sein können. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Matte jeder zweiten Schale um 180° gedreht.

Die profilierte Folie kann durch Formgebung unmittelbar bei der Folienherstellung oder 25 durch (z.B. klebetechnische) Verbindung einer geprägten, heiß oder kalt verformten Folie mit einer glatten Folie erfolgen. Die Materialeigenschaften der geprägten und glatten Folie können auf ihre unterschiedliche Funktionalität (gute Gleiteigenschaften und Formstabilität der geprägten Folie, gute Dichteigenschaften der glatten Folie) hin optimal, d.h. durch Wahl eines geeigneten, dem Fachmann bekannten Werkstoffes mit entsprechender 30 Oberflächengüte, angepasst werden.

Da bei der Herstellungsmethode unter Verwendung von Folienkanälen eine Vorrichtung entsteht, bei der eine Umspülung der Kanäle mit Gas und ein dadurch induzierbarer Stofftransport nur mit größerem Aufwand zu realisieren wäre, sind Vorrichtungen dieses Typs bevorzugt für die Verwendung außerhalb eines Bioreaktors vorgesehen.

- 5 Die beschriebenen Verfahren erlauben die einfache und kostengünstige Herstellung einer Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen. Durch die Wahl des Zylinders, um den das Rohr oder der Schlauch gewickelt wird, die Zahl der Windungen, den Windungsabstand, die Zahl der Lagen und die Steigung der Schnittspirale lässt sich die Geometrie der späteren Vorrichtung einfach und genau festlegen. Ebenso lässt sich die  
10 Geometrie der späteren Vorrichtung einfach und genau durch die Wahl der perforierten Folie und die Zahl der Wicklungen (Lagen) festlegen.

Die beschriebenen Verfahren erlauben insbesondere die kostengünstige Herstellung von Einwegelementen, durch deren Einsatz der Aufwand für die Bereitstellung eines nach den Pharmagrundsätzen gereinigten Rückhaltesystems auf ein Minimum reduziert werden kann.

- 15 Die erfindungsgemäße Vorrichtung lässt sich einfach innerhalb oder außerhalb eines Bioreaktors anschließen und betreiben. Der Anschluss, der Betrieb und die Wartung sind problemlos. Die Ausführung der erfindungsgemäßen Vorrichtung oder Teile der erfindungsgemäßen Vorrichtung als Einwegelement eliminiert Reinigungsprobleme.

- Die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung innerhalb eines Bioreaktors reduziert  
20 die Ausbildung von Temperatur- und Dichtegradienten innerhalb der Absetzzone, so dass unerwünschte Konvektionsströme und ein damit verbundener negativer Einfluss auf die Effektivität der Zellrückhaltung zuverlässig vermieden werden können. Auch reduziert die Anordnung innerhalb des Bioreaktors gegenüber beispielsweise der externen Anordnung eines Schrägkanal-Platten-Abscheiders die Komplexität und das Fehlerrisiko der Gesamt-  
25 installation.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Abscheidereinrichtung daher innerhalb eines Bioreaktors verwendet. Dort teilt sie die Fermentationszone in zwei Bereiche, in einen zylindrischen Innenraum und in einen ringförmigen Außenraum.

- Bevorzugt wird die erfindungsgemäße Vorrichtung mit Mitteln zur Erzeugung einer  
30 Umlaufströmung kombiniert. Die Umlaufströmung fördert die Zellkulturlösung mit den

- darin enthaltenden Zellen durch den zylindrischen Innenraum entlang der Außenfläche der zylinderförmigen Vorrichtung durch den ringförmigen Außenraum und wieder durch den zylindrischen Innenraum. Geeignete Mittel zur Erzeugung der Umlaufströmung sind beispielsweise mechanische Rührer oder Begasungssysteme. Besonders bevorzugt wird die
- 5 Umlaufströmung mittels eines Systems zur feinblasigen Begasung realisiert, so dass über die Blasenbegasung sowohl der Sauerstoffeintrag realisiert als auch ein natürlicher Umlauf zwischen beiden Fermentationsbereichen induziert werden kann, ohne dass ein zusätzliches Rührorgan verwendet werden müsste. Auf diese Weise führt der beschriebene, hochintegrierte Reaktor zu zahlreichen Vorteilen für die Zellkulturermentation:
- 10 • Der Umlaufreaktor ist scherarm und verfügt über ein ausgezeichnetes Vermischungs- und Gasversorgungsverhalten.
- Durch die Schlaufenströmung kann trotz des Abscheidereinbaus die Reaktorwand weiterhin für Wärmeaustausch genutzt werden, so dass eine Integration in bestehende Fermentationsanlagen sichergestellt ist.
- 15 • Durch die Installation einer skalierbaren (d.h. proportionale Vergrößerung des Abscheidervolumens mit dem Bioreaktorvolumen) Rückhaltefläche innerhalb des Bioreaktors entfällt die Kopplung von Bioreaktor und Abscheider nach der Autoklavierung, die mit einem erhöhten Infektionsrisiko behaftet ist. Außerdem kann auf sämtliche zelltransportierende Pumpen sowie auf zahlreiche externe Schlauchleitungen verzichtet werden. Dies hat u.a. eine Vermeidung der Temperaturwechsel zwischen gekühlter Abscheiderzone und wieder aufgeheizter Fermentationszone, eine Reduzierung der Scherbeanspruchung und eine Vergrößerung der Prozessrobustheit zur Folge.
- 20 • Die im Gegenstrom zum Erntestrom aus dem Abscheider in den Bioreaktor zurückrutschenden Zellen werden mit der Umlaufströmung unverzüglich und ohne zusätzliche Pumpen besonders scherarm in den gut versorgten Teilbereich des Bioreaktors zurücktransportiert.
- 25

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist ein Bioreaktor in Kombination mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung als Air-Lift-Bioreaktor ausgeführt (vgl. z.B. EP 0 227 30 774 B1), in welchem das Gas wie zum Beispiel Luft in einen aufwärts gerichteten Teil des

Bioreaktors, in der Fachwelt auch als Riser bekannt, eingeleitet wird. Vorzugsweise findet eine feinblasige Begasung statt, wobei der Einsatz von Tensiden zu Vermeidung von Schaum sowie zur Fernhaltung der Zellen von scherintensiven gasförmigen Grenzflächen hilfreich sein kann. Der Riser steht an dessen oberen und unteren Ende mit dem oberen und unteren Ende eines weiteren, aufwärts gerichteten Teils des Bioreaktors in Verbindung, in der Fachwelt als Downcomer bekannt. Eine weit verbreitete Variante des im Wesentlichen zylindrischen Air-Lift-Bioreaktors beinhaltet ein zentral angeordnetes zylindrisches Leitrohr, welches den Air-Lift-Bioreaktor in einen Auftriebsteil (Riser) innerhalb des Leitrohrs und einen Abtriebsteil (Downcomer) im Ringraum zwischen dem Leitrohr und der Behälteraußenwand des Air-Lift-Bioreaktors teilt. Genauso gut kann sich der Auftriebsteil im Ringraum zwischen dem Leitrohr und der Behälteraußenwand und der Abtriebsteil innerhalb des Leitrohrs befinden. Die Zufuhr von beispielsweise mit Sauerstoff angereichertem Gas am unteren Ende des Risers vermindert die mittlere Dichte der Suspensionskultur im Riser, was zu einer aufwärts gerichteten Flüssigkeitsströmung im Riser führt, welche in der Folge den Flüssigkeitsinhalt des Downcomers ersetzt, der wiederum zum unteren Ende des Risers zurückströmt. Auf diese Art und Weise wird eine Flüssigkeitszirkulation erzeugt, welche die Suspensionskultur ausreichend vermischt und die Zellen in Schweben, d.h. in freier Suspension hält. Der Vorteil eines solchermaßen gerührten Bioreaktors liegt darin, dass bei ausreichender Versorgung der Zellen mit im Nährmedium gelöstem Sauerstoff und ausreichender Entsorgung des bei der Veratmung entstehenden Kohlendioxids keine bewegten Teile wie ein mechanischer Rührer notwendig sind. Die Querschnittsflächen des Risers und des Downcomers sind im Wesentlichen die gleichen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bildet die erfindungsgemäße Vorrichtung ein Leitrohr zwischen Downcomer und Riser eines kontinuierlich betriebenen Air-Lift-Bioreaktors. Indem die erfindungsgemäße Vorrichtung von Suspensionskultur vergleichbarer Temperatur umströmt wird, werden Strömungsphänomene der freien Konvektion vermieden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist die räumlich getrennte Anordnung von Fermentationszone und Abscheiderzone, d.h. die erfindungsgemäße Vorrichtung wird extern an den Bioreaktor angeschlossen. Die Versorgung des Abscheidens wird durch mindestens zwei Pumpen, bevorzugt scherarmen Schlauchpumpen sichergestellt. Die Pumpen ermöglichen die Entnahme der Zellkulturlösung aus dem Bioreaktorraum, deren

Zuleitung nach Kühlung über einen Wärmeaustauscher zum Absetzapparat, die Entnahme des Erntestroms aus dem Absetzapparat und den Rücktransport des Konzentratstroms zum Bioreaktor.

Die zur Kühlung des Fermentationsmediums erforderliche Kühlvorrichtung kann in das Gehäuse des bevorzugt als Einwegelement ausgeführten Abscheiders integriert und damit ebenfalls als Einwegelement ausgeführt werden, so dass auch der für diese essentielle Vorrichtung erforderliche Reinigungsbedarf entfällt.

Ein Perfusionsreaktor bestehend aus Bioreaktor und interner oder externer Rückhalteinrichtung kann in bekannter Weise betrieben werden. Nährmedium wird kontinuierlich zugeführt, und zellarmer Zellkulturüberstand wird kontinuierlich abgeführt. Der Perfusionsreaktor kann bei hohen Perfusionsraten  $q/V$  (Mediendurchsatz  $q$  pro Bioreaktorvolumen  $V$ ) betrieben werden, wenn dies biologisch sinnvoll ist und eine ausreichende Abscheiderfläche zur Verfügung gestellt wird.

Ebenso kann ein Bioreaktor mit interner oder externer Rückhaltevorrichtung derart betrieben werden, dass man eine Kultur zunächst absatzweise hochwachsen lässt. Wenn das Medium so weit verbraucht ist, dass kein nennenswerter Aufbau von Biomasse mehr möglich ist, zieht man über die interne oder externe Rückhaltevorrichtung Kulturüberstand ab, der nahezu frei von Biomasse ist. Den im Bioreaktor gewonnenen Raum kann man dann nutzen, um frisches Nährmedium zuzuführen, wodurch weiteres Wachstum und damit eine höhere Gesamtbiomasseproduktivität ermöglicht werden. Dieses Verfahren bietet sich zum Beispiel für Vorkulturen an, mit denen sehr große Bioreaktoren angeimpft werden sollen, da es die Produktivität bestehender Vorkulturreaktoren erhöhen kann.

Der Bioreaktor kann zur Züchtung von Zellen eingesetzt werden, die in vitro und in freier Suspension oder auf Microcarriern wachsen. Zu den bevorzugten Zellen, gehören Protozoen sowie adhäsive und nicht-adhäsive eukariotische Zellen menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, die z.B. durch gentechnische Veränderung befähigt sind, spezielle pharmazeutische Wirkstoffe wie Viren, Proteine, Enzyme, Antikörper oder diagnostische Strukturen zu produzieren. Besonders bevorzugt werden für die pharmazeutische Hochleistungsproduktion geeignete Zellen verwendet, zum Beispiel Ciliaten, Insektenzellen, Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen, Chinese Hamster Ovary

(CHO) Zellen, HKB-Zellen (durch die Fusion von humaner HEK 293-Zelllinie mit der humanen Burkitt Lymphomzelllinie 2B8 entstanden) oder Hybridoma Zellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen in einem durchströmten Gefäß. Dem Gefäß wird kontinuierlich 5 oder absatzweise frisches und/oder aufbereitetes Medium zugeführt und gebrauchtes Medium durch die Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung der in dem Gefäß befindlichen Zellen abgeführt. Die Vorrichtung besteht aus einer Vielzahl von schräg angeordneten Kanälen, die einen stehenden Hohlzylinder bilden und gegenüber der Längsachse des Hohlzylinders um einen Winkel  $\beta$  zwischen  $10^\circ$  und  $60^\circ$ , bevorzugt um 10 einen Winkel  $\beta$  zwischen  $15^\circ$  und  $45^\circ$ , besonders bevorzugt um einen Winkel zwischen 15  $25^\circ$  bis  $35^\circ$  geneigt sind.

In den schräg gestellten Kanälen herrscht bevorzugt eine Strömungsgeschwindigkeit, welche die Wahrung laminarer Strömungszustände gemäß  $Re < 2300$  gestattet, womit eine effizienzmindernde Resuspendierung der abgeschiedenen Zellen gegen das Erdschwerefeld 15 vermieden wird.

Die Reynolds-Zahl  $Re$  kann nach Gl. 6 aus der über den Querschnitt gemittelten Strömungsgeschwindigkeit  $w$ , der kinematischen Viskosität  $\nu$  des strömenden Mediums und dem Innendurchmesser  $d$  eines Kanals berechnet werden:

$$Re = (w \cdot d / \nu) \quad (\text{Gl. 6})$$

20 In diesem Fall herrscht an den Kanalinnenwänden eine geringere Strömungsgeschwindigkeit als in den Kanalmitten. Die Zellen sedimentieren in den Kanälen und rutschen an der Unterseite der Kanäle entgegen der Strömungsrichtung den unteren Kanalenden entgegen. Bevorzugt herrscht in dem Gefäß eine Umlaufströmung, welche die Zellen an den unteren Kanalenden mitreißt und im Gefäß verteilt. Die Umlaufströmung verläuft bevorzugt als 25 Schlaufenströmung um die Innen- und die Außenfläche des stehenden Hohlzylinders aus Kanälen herum. Das erfindungsgemäße Verfahren wird daher bevorzugt mit einer Umlaufströmung im kontinuierlich durchströmten Gefäß kombiniert. Die von den Zellen befreite Zellkulturlösung wird durch die Kanäle in einen Ringraum, der oberhalb der Kanäle angeordnet ist, und schließlich aus dem Gefäß befördert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann innerhalb eines Bioreaktors ausgeführt werden. Hierbei werden die Zellen innerhalb des Bioreaktors zurückgehalten. Im Bioreaktor und in der Abscheiderzone liegen einheitliche Temperaturen vor, so dass Konvektionsströmungen im Abscheider ausgeschlossen sind. Unter diesen Bedingungen sind die Zellen andererseits 5 jedoch auch in der Lage, ihren Stoffwechsel fortzusetzen und Sauerstoff zu veratmen. Durch die Spülung des Außenraums der Vorrichtung mit einem mit Sauerstoff angereicherten Gas, kann der Sauerstoffzehrung entgegengewirkt und deren biologische Folgen gemildert werden. In diesem Fall diffundiert der Sauerstoff durch die 10 sauerstoffdurchlässigen Kanalwände in den Strömungskanal, der zumindest in den unteren Kanalquerschnitten, im Bereich hoher Zellkonzentration also, durch die dort intensiv ablaufenden Einlauf- und Sedimentationsvorgänge als relativ gut durchmischt angesehen werden kann. Die in diesen Bereichen befindlichen abrutschenden Zellen haben nur eine 15 geringe Aufenthaltszeit im System, so dass auch eine kurzzeitige Unterschreitung der optimalen Versorgungskonzentration von den Zellen zumeist unbeschadet überstanden wird. Die Zellenversorgung in den oberen Kanalquerschnitten ist aufgrund der zum Teil sehr langen Verweilzeiten von 10 – 45 Minuten erheblich kritischer, so dass sich eine Sauerstoffversorgung in diesen Bereichen als besonders hilfreich erweisen kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch außerhalb eines Bioreaktors ausgeführt werden. Hierzu wird die Zellkulturlösung mit Zellen aus dem Bioreaktor in ein Gefäß 20 befördert, in dem eine Vielzahl von schräg gestellten Kanälen in Form eines stehenden Hohlzylinders angeordnet ist. In diesem Gefäß erfolgt die Trennung von Zellen und Zellkulturlösung, in dem die Mischung durch die Kanäle befördert wird, wo die Zellen sedimentieren, entgegen der Strömungsrichtung zum Ende der Kanäle rutschen und schließlich in eine Absetzzone gelangen, aus der sie wieder zurück in den Bioreaktor 25 befördert werden können. Bevorzugt werden die Zellen in dem externen Gefäß gekühlt, um den Stoffwechsel zu verlangsamen und somit einer produktivitätsmindernden Unterversorgung der Zellen entgegenzuwirken. In gekühlter Suspension ist eine Sauerstoffversorgung der sedimentierenden Zellen durch Spülung der Kanäle von außen nicht zwangsläufig erforderlich. Zumeist ist eine Abkühlung der Zellkulturlösung auf die 30 Umgebungstemperatur der Abscheider völlig ausreichend, so dass neben dem gewünschten Stoffwechseleffekt Konvektionströmungen sicher vermieden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die effektive Rückhaltung und Rückführung von Zellen in einem kontinuierlich durchströmten Gefäß. Bei der Rückhaltung und

Rückführung wirken auf die Zellen nur moderate Scherkräfte, die zumeist von den Zellen gut vertragen werden. Die Zellen werden in den Kanälen auf Fermentationstemperatur oder einem erniedrigten Temperaturniveau gehalten und die Versorgung mit Nährstoffen ist gegeben. Der Stoffaustausch lässt sich bei Bedarf durch zusätzliche Begasung der 5 Zwischenräume der Kanäle oder der Außenseiten der Kanäle optimieren.

Ebenso erlaubt das Verfahren die Rückhaltung und Rückführung von Zellen in einem Gefäß, in dem durch kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Medientausch höhere Zelldichten erreicht werden sollen als in einem absatzweisen Kulturprozess ohne Medientausch. In dieser Weise kann das Verfahren vorteilhaft verwendet werden, um die 10 Produktivität von Vorkulturreaktoren zu steigern, deren Biomasse für das Animpfen von sehr großen absatzweise betriebenen Bioreaktoren verwendet wird. Außerdem kann das Verfahren die Einsatzmöglichkeiten von Fed-Batch Fermentern erweitern, in dem die Biomasse bei der Produkternte aufgefangen wird, um in einem sogenannten Repeated Fed-Batch Modus einen neuen Fermenter zu beimpfen .

15 Im Folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand von Zeichnungen näher erläutert ohne die Erfindung hierauf zu beschränken.

**Fig. 1** zeigt schematisch eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Kanäle (10) mit einem runden Querschnitt bilden einen hohlen Kreiszylinder (20). Der Mantel des Kreiszylinders umfasst eine Lage an schräg angeordneten Kanälen. Die Kanäle 20 sind in einem Winkel  $\beta$  gegenüber der Längsachse des Kreiszylinders gekippt. Im Betrieb ist die Längsachse bevorzugt identisch mit der Richtung der Schwerkraft. Fig. 1(a) Seitenansicht; Fig. 1(b) Ansicht eines Querschnittes entlang der gestrichelten Linie durch den Zylinder (20) in Fig. 1(a) von oben bzw. unten.

**Fig. 2** zeigt schematisch die Verhältnisse der Zellseparation in einem Kanal (10) mit 25 rundem Querschnitt. Der Kanal (10) wird von unten mit der Zellsuspension beaufschlagt (1). Der Erntestrom (2) wird am oberen Ende des Kanals abgezogen. Das Zellretentat (3) sedimentiert an der Unterseite des Kanals und rutscht entgegen der Strömungsrichtung dem unteren Kanalende entgegen.

**Fig. 3** zeigt schematisch eine Methode zur Herstellung einer Matte aus schräg 30 angeordneten Kanälen. Ein Rohr oder Schlauch (200) wird über einen Zylinder (300)

gewickelt. Dabei liegen zur Unterbringung möglichst großer Abscheiderflächen auf kleinem Raum die Windungen eng aneinander an. Die Windungen werden bevorzugt miteinander mechanisch verbunden, um beim späteren Schneiden die Beibehaltung der Kanalausrichtung zu gewährleisten. Dazu können die Kanäle punktuell oder flächig direkt 5 oder über die Zylinderaußenfläche mittels einer Trägerschicht, z.B. einem Gewebe oder Vlies, miteinander verbunden werden. Eine bevorzugte Verbindung erfolgt über Verklebung. Als Kleber eignen sich die dem Fachmann bekannten, auf die Material- und Oberflächeneigenschaften der Kanäle abgestimmten Klebekomponenten. Im Falle eines Silikonschlauches wird bevorzugt Silikonkleber verwendet, der in den geforderten FDA- 10 Güteklassen im Markt zur Verfügung steht. Bei der Verklebung ist darauf zu achten, dass die Schläuche nicht dichtend miteinander verbunden werden, um eine Gasumströmung der gasdurchlässigen Kanäle zu erlauben. Nach der Verklebung wird entlang der spiralförmig um den Zylinder verlaufenden, gestrichelten Schnittlinie (210) die Schlauchmatte 15 aufgetrennt und vom Zylinder abgezogen. Das Ergebnis ist eine Matte aus schräg angeordneten Kanälen, wie in Fig. 4 gezeigt.

**Fig. 4** zeigt schematisch eine Matte (220) aus schräg in einem Winkel  $\beta$  zu einer gedachten Linie entlang der Kanalunterseiten angeordneten Kanälen (10) mit rundem Querschnitt. Eine solche Matte (220) ist erhältlich nach einem in Figur 3 gezeigten und in der Beschreibung zur Figur 3 dargelegten Verfahren. Die schrägen Längsseiten (230, 231) 20 können miteinander verbunden werden, um eine Lage der Abscheiderkanäle der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen zu erhalten. Zur Flächenvergrößerung können mehrere Lagen schalenartig entlang ihrer Längsseiten (230, 231) aufeinander aufgeklebt werden. Ebenso ist es möglich, die Matte zu mehreren 25 Lagen spiralförmig übereinander aufzuwickeln. Dabei entsteht in beiden Fällen ein Strumpf (Hohlzylinder (20)) mit einer oder mehreren Lagen an schräg angeordneten Kanälen (10) (siehe z.B. Fig. 1, Fig. 5). Dieser kann auf einen mechanischen Stützkörper (Stator) aufgezogen werden.

**Fig. 5** zeigt schematisch die Unterseite einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in perspektivischer Darstellung. Eine Lage an Kanälen mit rundem Querschnitt (10) ist um 30 einen Schlauchstator (5) angeordnet. Die Kanäle sind um einen Winkel  $\beta$  gegenüber der Längsachse des Hohlylinders (20) gekippt.

**Fig. 6(a)** zeigt ein Beispiel einer profilierten Folie (250). Die Folie weist in einem gleichbleibenden Abstand eine Folge von Rinnen (251) und Stegen (252) auf.

**Fig. 6(b)** zeigt einen Querschnitt durch die Folie aus Fig. 6(a) entlang der Linie B-B. Die Folie kann zu Matten geschnitten werden. Eine solche Matte sieht im Querschnitt 5 beispielhaft so aus wie der Folienabschnitt in Fig. 6(b). Die Matten können flächig übereinander gelegt und miteinander verbunden werden, wobei die Stege (252) einer Matte mit der glatten Unterseite einer darüberliegenden Matte so verbunden werden, dass die Rinnen Kanäle bilden, die entlang der Stege geschlossen sind. Die verbundenen Matten können dann zu einem stehenden Hohlzylinder geformt und an den Seiten analog zu dem 10 Beispiel aus Fig. 4 verbunden werden. Ebenso ist es möglich, die profilierte Folie in einer oder mehreren Lagen um einen Stator zu wickeln. Hierbei werden die Rinnen (251) zur offenen Seite hin jeweils mit einer benachbarten Lage bzw. mit der Wand des Stators unter Ausbildung von Kanälen verschlossen.

Bei einer Folie des Typs aus Fig. 6(a) und (b) ergeben sich Kanäle mit einem rechteckigen 15 Querschnittsprofil. Ebenso ist es denkbar, Folien mit anderen Profilen zu verwenden. In Fig. 6(c) ist z.B. eine Folie mit einem halbrunden Rinnenprofil gezeigt. Hierdurch ergeben sich entsprechend andere Kanalgeometrien.

**Fig. 7(a)** zeigt beispielhaft eine profilierte Folie als Verbund aus einer geprägten Folie (260) und einer glatten Dichtfolie (265), die mittels Kleber (270) verbunden werden.

20 **Fig. 7(b)** zeigt die Verbindung dreier profilierter Folien (250), wobei jeweils die glatte Unterseite einer Folie mit den Stegen der darunterliegenden Folie verbunden wird, damit sich eine Vielzahl von nebeneinander angeordneten Kanälen (10) ergibt.

**Fig. 8** zeigt eine Ausführung der erfindungsgemäßen Vorrichtung im Querschnitt senkrecht 25 zur Längsachse des durch Kanäle (10-1, 10-2) gebildeten Hohlzylinders. Der Hohlzylinder mit kreisförmiger Grundfläche umfasst zwei ringförmig angeordnete Lagen an Kanälen mit rundem Querschnitt ((10-1) = Kanal in der ersten Lage, (10-2) = Kanal in der zweiten Lage). Nach außen und innen ist der Hohlzylinder bevorzugt durch einen Mantel (außen 13), innen (14)) abgedichtet, damit keine Zellen in die Zwischenräume (15) zwischen den Kanälen (10-1, 10-2) gelangen und Fouling verursachen.

In **Fig. 9** wird der Einbau des Zellrückhaltesystems (400) exemplarisch in einen blasenbegasten Bioreaktor (100) im Querschnitt gezeigt. Das Zellrückhaltesystem umfasst schräg angeordnete Kanäle (10), die um einen Schlauchstator (5) in mehreren Lagen angeordnet sind. In der Zeichnung sind die Kanäle (10) aus zeichnerischen Gründen 5 vertikal eingezeichnet. Erfindungsgemäß sind sie jedoch gegenüber der Längsachse des Schlauchstators (5) gekippt. Die über den Gasverteiler (40) erzeugten vorzugsweise mikrofeinen Gasblasen sorgen für einen natürlichen Umlauf zwischen der aufwärts durchströmten, begasten, im gezeigten Beispiel zentralen Reaktorzone (51) und der unbegasten abwärts durchströmten wandnahen Reaktorzone (52). Auf diese Weise ist 10 neben dem Sauerstofftransport gasförmig-flüssig für eine gute Durchmischung des Reaktors gesorgt. Der Erntestrom (2) wird nach der Zellseparation im Zellrückhaltesystem (400) am Kopfstutzen des Bioreaktors (100) abgenommen. Die im Zellrückhaltesystem (400) abgeschiedenen Partikel werden mit der Umlaufströmung in das begaste Reaktorzentrum zurücktransportiert. Eine Sedimentation im Reaktor wird durch die 15 Umlaufströmung gleichfalls wirkungsvoll verhindert. Das Abgas wird über Stutzen (42) am Kopf des Reaktors abgeführt. Die Begasung des Außenraums um die Abscheiderschläuche erfolgt mittels der mit dem Zellrückhaltesystem (400) verbundenen Gaszu- und -ableitungen (21) und (22). Weitere Zu- und Ableitungen zum/vom Schlaufenreaktor (100) sind die Medienversorgung (30) und die Temperiermittelzu- (61) 20 und ableitung (62) in einen Doppelmantel (60) zur Temperierung des Bioreaktors (100).

**Fig. 10** zeigt die Anordnung der Kanäle (10) in Form von Schläuchen, die zu mehreren Lagen (Schlauchmatten) gewickelt sind und in eine untere Verbundstelle (11) und eine obere Verbundstelle (12) eingefasst sind. In der Zeichnung sind die Kanäle (10) aus zeichnerischen Gründen vertikal eingezeichnet. Erfindungsgemäß sind sie jedoch gegenüber der Längsachse des Schlauchstators (5) gekippt. Das die Verbundstellen (11) 25 und (12) bildende Material ist z.B. ein dem Fachmann bekannter flexibler Klebstoff, z.B. bevorzugt auf Silikonbasis, das die bevorzugt aus Silikon hergestellten Schläuche, die die Kanäle (10) bilden, dicht umschließt und das in beiden radialen Richtungen zur Innen- und Außenseite glatte Abdichtflächen bereitstellt. Mit Hilfe der Abdichtflächen lässt sich eine 30 Dichtwirkung gegen den Schlauchstator (5) sowie gegen den Mantel (13) realisieren. Der Mantel (13) wird mit dem über die Schlauchmatten hinausragenden Kragen gegen das mit dem Schlauchstator (5) verbundene Kopfelement (27) gedichtet. Durch die in **Fig. 8** gezeigte gedichtete Konstruktion wird sichergestellt, dass sich der Raum um die Schläuche

nicht mit Flüssigkeit füllt. In einer bevorzugten Anordnung wird dieser Zwischenraum zwischen den Schläuchen mit einem sauerstoffangereicherten Gas gespült, um die Sauerstoffversorgung der sedimentierten Zellen während des Sedimentationsprozesses zu verbessern. Das Kopfteil (27) ist mit dem Schlauchstator (5) über eine Schräge (28) 5 verbunden, die eine Ablagerung von Zellen verhindern soll. Die in die Schräge (28) eingeschweißten Erntestutzen (22) münden in einem Ringraum (24) knapp oberhalb der Kanäle (10). Um bei begrenzter Anzahl von Erntestutzen eine günstige Flüssigkeitsverteilung zu gewährleisten, empfiehlt sich z.B. eine tangentiale Strömungsführung, eine fraktale Strömungsverteilung oder der Einbau von Prallplatten (25).

10 In **Fig. 11** ist das klassische Verfahrensschema bei externer Anordnung des in die Abscheidereinrichtung (110) integrierten Zellrückhaltesystems (400) gezeigt. Um die respiratorische Aktivität der Zellen im Bioreaktorablauf zu reduzieren, wird dessen Temperatur möglichst unmittelbar nach dem Abzug in einer Kühlvorrichtung (90) auf ein niedrigeres Niveau abgesenkt. Auf diese Weise wird verhindert, dass die Zellen im 15 Zellrückhaltesystem (400) zu lange in einem Sauerstoff-limitierten Zustand verweilen, was die Zellen physiologischen beschädigen könnte. Im gezeigten Beispiel besteht der Abscheider (110) aus einem Zellrückhaltesystem (400) und der integrierten Kühlvorrichtung (90). Die Flüssigkeitsströme zwischen Bioreaktor (100) und Abscheider (110) werden durch die scherarmen Pumpen (91) und (92) eingestellt. Andere Verschaltungen, 20 z.B. die Positionierung von einer der beiden Pumpen (91) und (92) im Bioreaktorablauf, wären ebenso denkbar.

In **Fig. 12** ist der in das Gehäuse (80) integrierte Abscheider (110) aus Zellrückhaltesystem (400) und Kühlvorrichtung (90) dargestellt. Die Zellkulturlösung (1) wird über das ggf. zu entlüftende Fallrohr (72) unterhalb des Zellrückhaltesystems (400) in den Abscheider 25 gekühlt eingeleitet. Die Kühlung erfolgt entlang des Steigrohrs (77) in dem die Kühlflüssigkeit im Gegenstrom zur abwärts fließenden Zellkulturlösung emporsteigt. Für einen besonders guten Wärmetransport und somit eine kompakte Bauweise des Kühlers sorgen die niedrige Wandstärke des Steigrohres (77), eine hohe Geschwindigkeit des Kühlmediums im Spalt zwischen Steig- und Tauchrohr (76) und (77) sowie ein wendelförmiger Strömungseinbau für die Zellkulturlösung zwischen dem Fallrohr (72) und Steigrohr (76). Vor dem Eintritt in den Konus empfiehlt es sich, die Geschwindigkeit der Zellkulturlösung zu reduzieren, um ein Wiederaufwirbeln der konzentrierten, bereits 30 abgeschiedenen Zellmasse zu verhindern. Um große Eintrittsquer schnitte zu gewährleisten,

sollte die Kühlvorrichtung nicht bis in den Einlaufbereich heruntergezogen werden. Je nach Geschwindigkeit empfiehlt sich der zusätzliche Einbau einer Prallplatte (74). Nach dem Zurückrutschen des Zellsedimentes aus dem Zellrückhaltesystem (400) in den Konus (70) kann das Zellretentat (3) an der Konusspitze abgeführt werden. Konuswinkel von 20°-70° 5 haben sich als anwendbar erwiesen. Um eine zu große Bauhöhe zu verhindern, sollte ein möglichst kleiner Konuswinkel bevorzugt werden, mit dem Verstopfungszustände jedoch sicher vermieden werden können. Daher gehören Konuswinkel von 40°-60° zu den bevorzugten Ausführungsformen. Bei ausreichender Vibration wird ein Konuswinkel von 10 45° besonders bevorzugt. Zur Sauerstoffversorgung der sedimentierten Zellmasse können eine Gaszufuhr (21) und Gasabfuhr (22) von außen über in das Gehäuse (80) eingeschweißte Anschlussstutzen zugeführt werden. Zur Begasung ist die Verwendung von aus Schläuchen aufgebauten Kanälen (10) erforderlich.

**Bezugszeichen**

- 1 Zellkulturlösung
- 2 Ernte
- 3 Zellretentat
- 5 5 Schlauchstator
- 10 Schrägkanal
- 11 untere Verbundstelle
- 12 obere Verbundstelle
- 13 Mantel außen
- 10 14 Mantel innen
- 15 Zwischenraum
- 20 Zylinder
- 21 Gaszufuhr
- 22 Gasabfuhr
- 15 24 Ringkanal
- 25 Prallplatte
- 27 Kopfteil
- 28 Abrutschfläche
- 30 Medienzulauf
- 20 40 Gasverteiler
- 41 Gasversorgung
- 42 Gasableitung
- 50 Schlaufenströmung
- 51 Aufwärtsströmung
- 25 52 Abwärtsströmung
- 60 Doppelmantel
- 61 Zulauf Temperiermedium
- 62 Ablauf Temperiermedium
- 70 Konus
- 30 71 Konuswinkel
- 72 Fallrohr
- 73 Wendel
- 74 Prallplatte
- 76 Tauchrohr

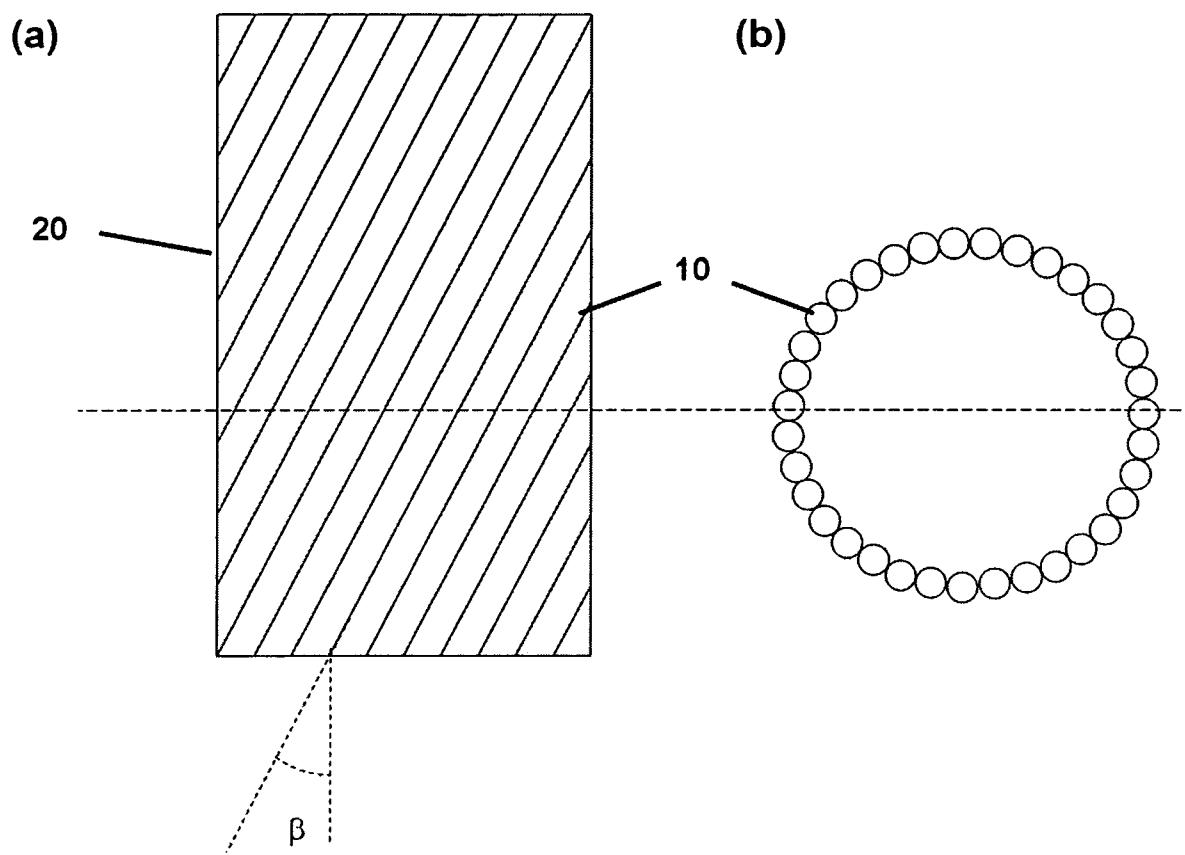
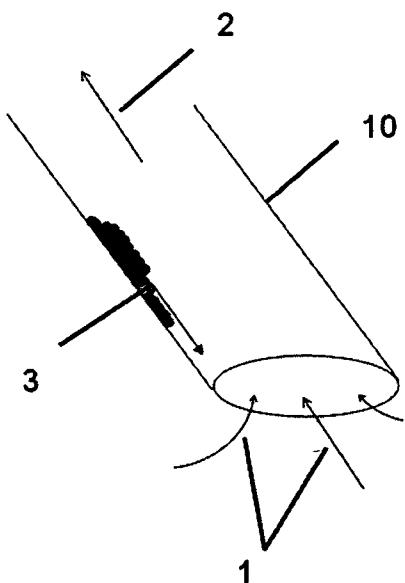
- 77 Steigrohr
- 80 Gehäuse
- 81 Gestell
- 82 Vibrator
- 5 90 Kühler
- 91 Rücklaufpumpe
- 92 Erntepumpe
- 100 Bioreaktor
- 110 Integrierter Abscheider
- 10 200 Rohr/Schlauch
- 210 Schnittlinie
- 220 Matte aus Rohren / Schläuchen
- 230 Längsseite der Matte
- 231 Längsseite der Matte
- 15 250 profilierte Folie
- 251 Rinne
- 252 Steg
- 260 geprägte Folie
- 265 Dichtfolie
- 20 270 Kleber
- 300 Zylinder
- 400 Zellrückhaltesystem

**Patentansprüche**

1. Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen in einem kontinuierlich oder absatzweise durchströmten Gefäß umfassend eine Vielzahl von nebeneinander angeordneten Kanälen, wobei die Kanäle einen stehenden Hohlzylinder bilden und gegenüber der Längsachse des Hohlzylinders um einen Winkel  $\beta$  zwischen  $+10^\circ$  und  $+60^\circ$  geneigt sind.  
5
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kanäle einen Querschnitt mit zu ihrer Unterseite hin abnehmender Breite, bevorzugt einen runden oder elliptischen Querschnitt aufweisen.
- 10 3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Mantel des Hohlzylinders 1 bis 100 Lagen an Kanälen aufweist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Kanäle einen Innendurchmesser von 3 mm – 30 mm aufweisen.
- 15 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Kanäle aus Schläuchen, bevorzugt aus Silikonschläuchen gebildet sind.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, weiterhin umfassend Mittel zur Begasung der Außenflächen und/oder Zwischenräume der Kanäle.
- 20 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, weiterhin umfassend Mittel zur Erzeugung einer Umlaufströmung durch den Hohlzylinders hindurch und entlang der Außenfläche des Hohlzylinders.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kühlvorrichtung integriert ist.
9. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Leitrohr eines kontinuierlich betriebenen Air-Lift-Bioreaktors.
- 25 10. Verfahren zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen in einem kontinuierlich oder absatzweise durchströmten Gefäß, bei dem ein Zellen enthaltendes Medium durch eine Vielzahl von nebeneinander angeordneten Kanälen gefördert wird, in

denen die Zellen sedimentieren und aus denen die Zellen wieder herausrutschen, dadurch gekennzeichnet, dass die Kanäle einen stehenden Hohlzylinder bilden und gegenüber der Längsachse des Hohlzylinders um einen Winkel  $\beta$  zwischen 10° und 60° geneigt sind.

- 5 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass durch Begasen und/oder Rühren eine Umlaufströmung des Mediums durch den Hohlzylinder und entlang seiner Außenfläche hervorgerufen wird.
- 10 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Außenfläche der Kanäle und/oder die Zwischenräume zwischen den Kanälen zusätzlich begast werden.
- 15 13. Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung zur Rückhaltung und Rückführung von Zellen dadurch gekennzeichnet, dass eine Folie oder Matte umfassend nebeneinander angeordnete Kanäle oder Rinnen durch spiralförmige oder schalenförmige Wicklung zu einem Hohlzylinder mit einer oder mehreren Lagen an schräg gegenüber der Längsachse des Hohlzylinders gestellten Kanälen geformt wird.
- 20 14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Matte umfassend nebeneinander angeordnete Kanäle dadurch gebildet wird, dass ein Rohr oder Schlauch in 1 bis 100 Lagen um einen Zylinder gewickelt wird, benachbarte Windungen miteinander mechanisch verbunden werden und der Verbund aus Windungen entlang einer spiralförmig um den Zylinder verlaufenden Schnittlinie aufgetrennt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Folie umfassend nebeneinander angeordnete Rinnen dadurch gebildet wird, dass eine geprägte oder heiß oder kalt geformte Folie mit einer glatten Folie zu einem Folienverbund verbunden wird.

**Figuren****Fig. 1**5 **Fig. 2**

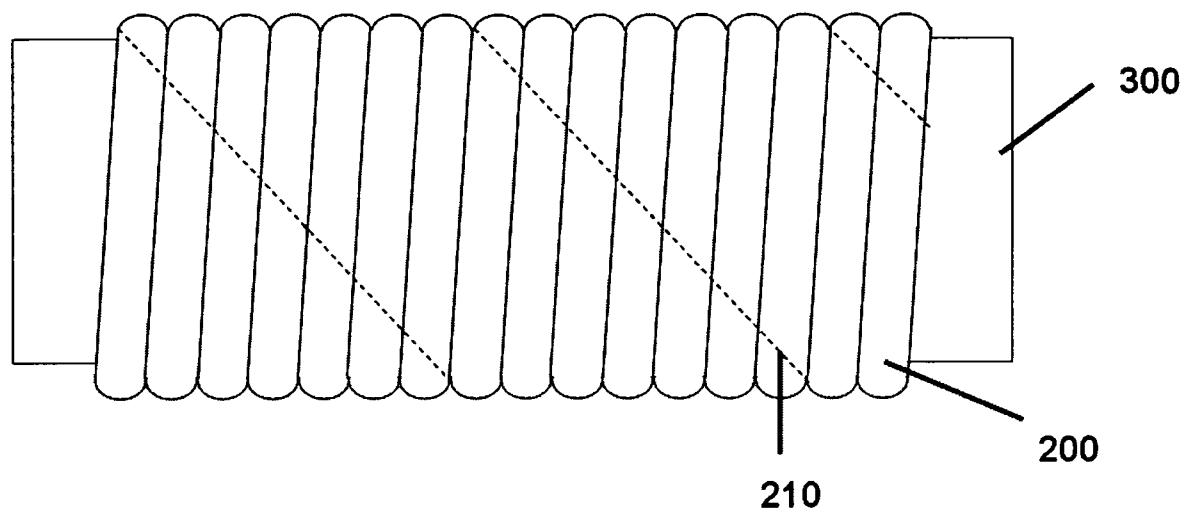
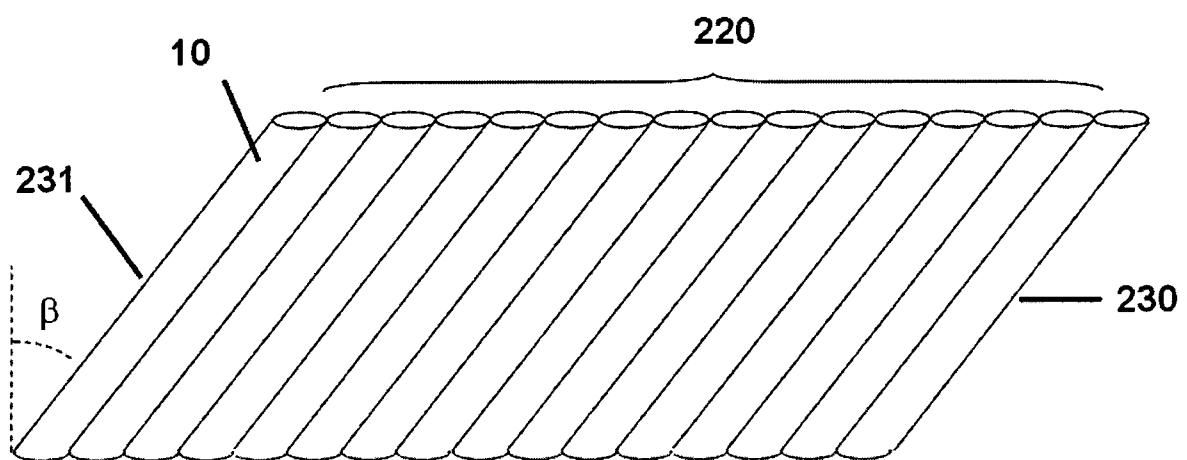


Fig. 3



5 Fig. 4

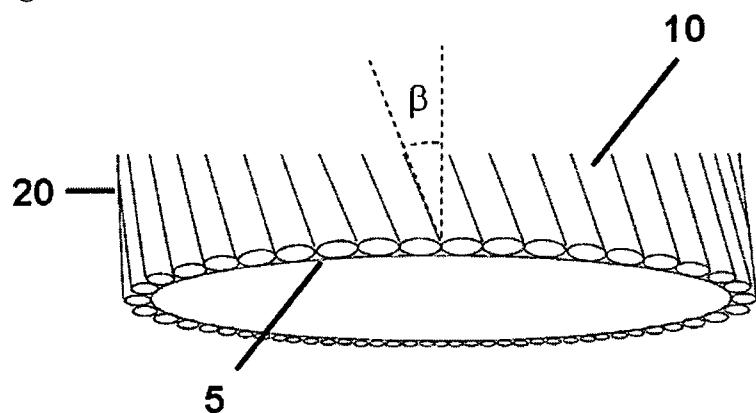


Fig. 5

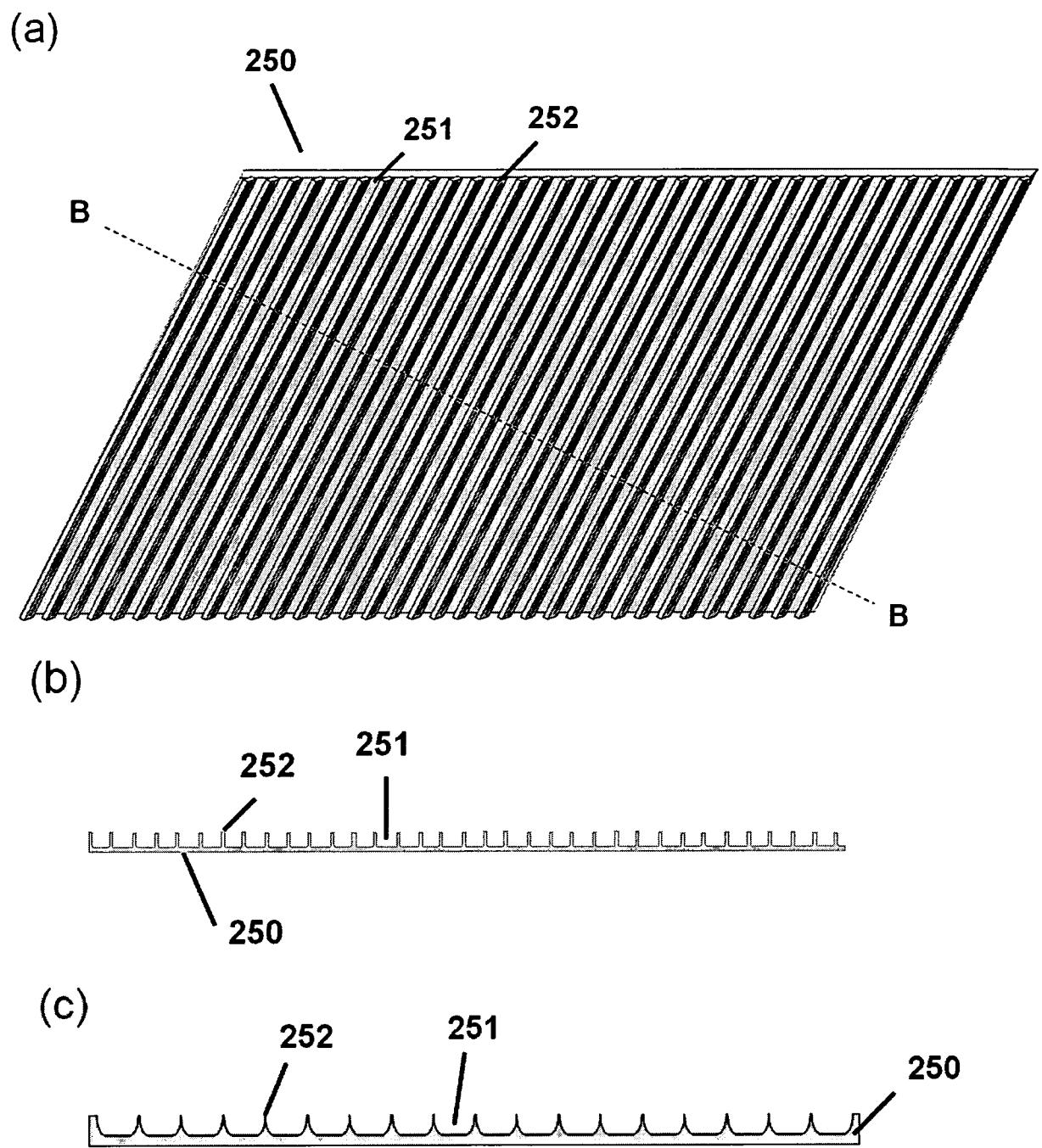


Fig. 6

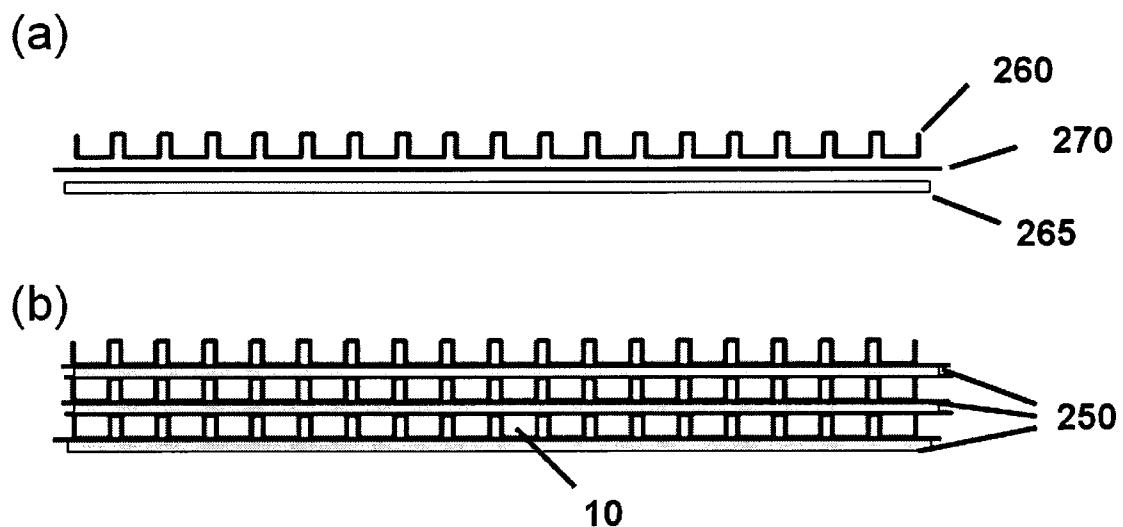


Fig. 7

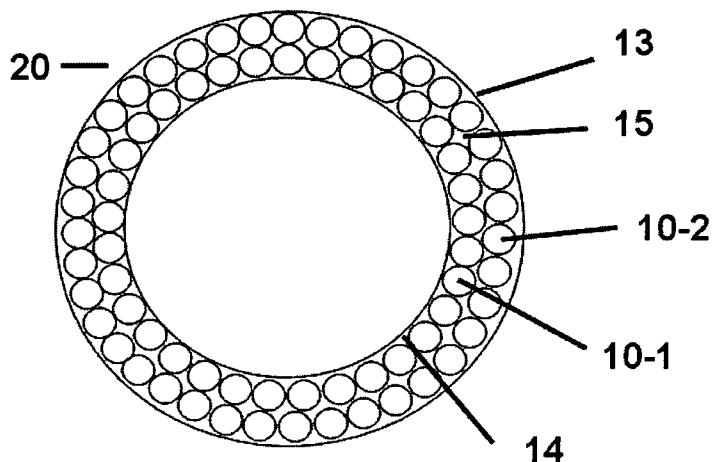


Fig. 8

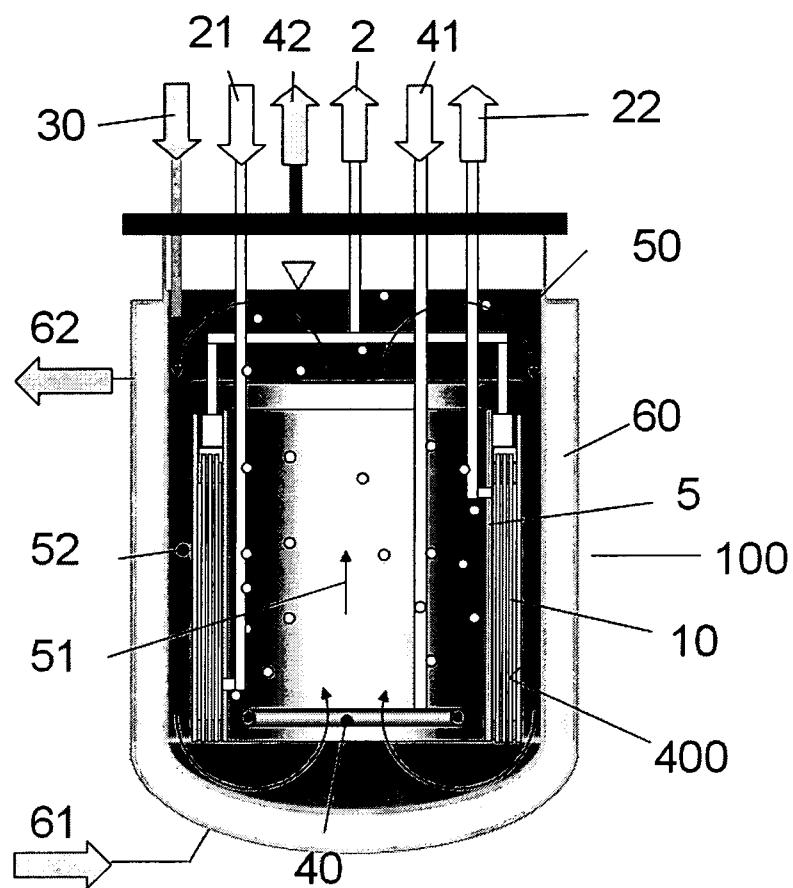


Fig. 9

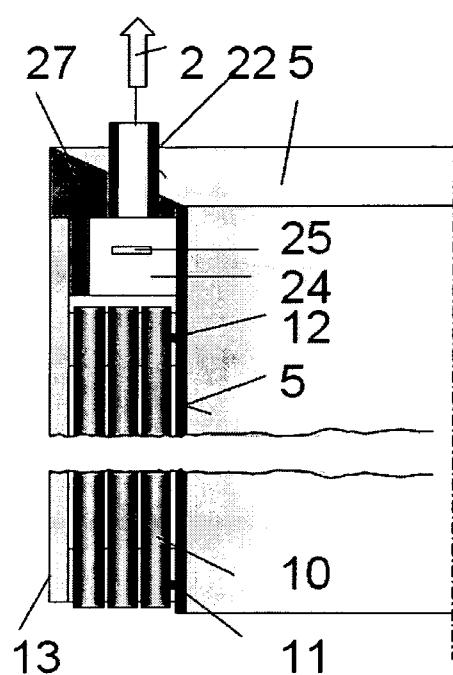


Fig. 10

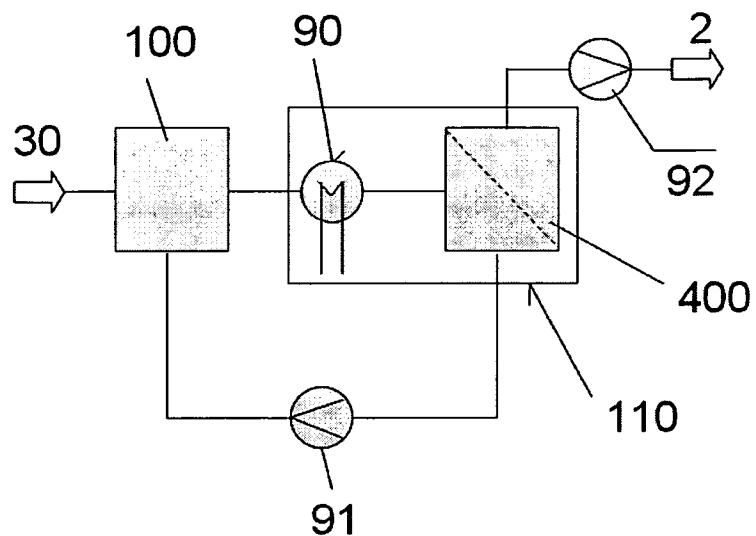


Fig. 11

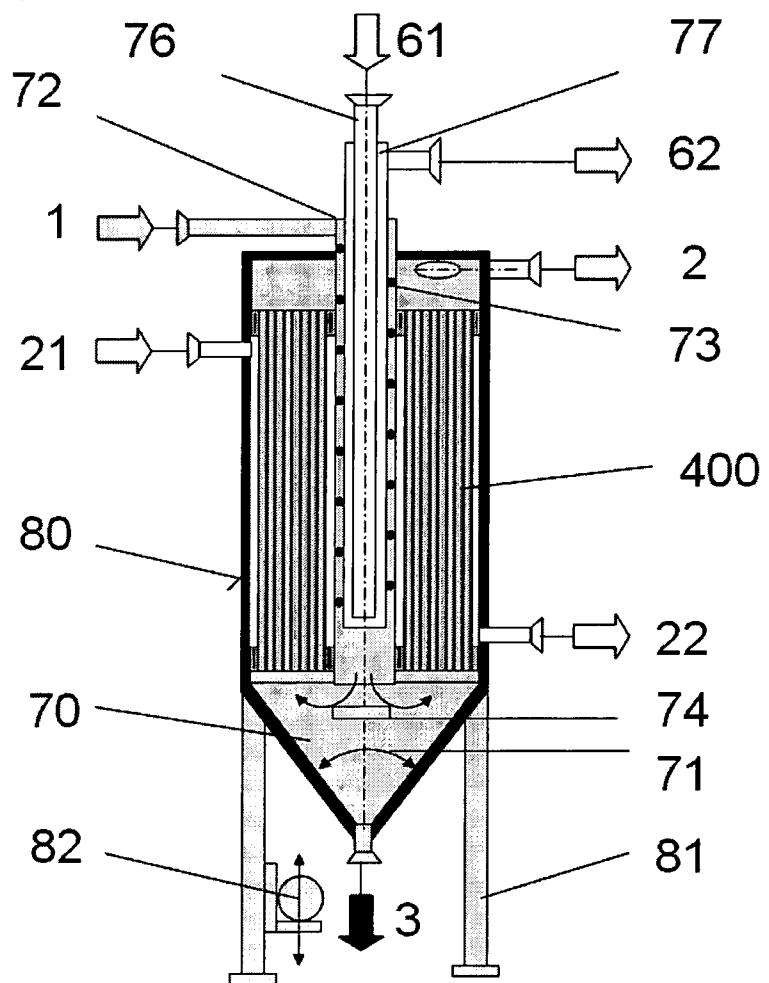


Fig. 12