



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: C 12 N 5/02  
C 12 M 3/04  
// C 12 N 1/34  
A 61 K 45/02



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

(12) **PATENTSCHRIFT** A5

(11)

**624 713**

(21) Gesuchsnummer:	6439/76	(73) Inhaber:	Beecham Group Limited, Brentford/Middx (GB)
(22) Anmeldungsdatum:	21.05.1976		
(30) Priorität(en):	21.05.1975 GB 21998/75	(72) Erfinder:	Colin Burbidge, Crawley/Sussex (GB)
(24) Patent erteilt:	14.08.1981		
(45) Patentschrift veröffentlicht:	14.08.1981	(74) Vertreter:	Bovard & Cie., Bern

(54) **Verfahren zum Züchten von Zellen von Lebewesen in einlagiger Schicht und Vorrichtung zur Ausführung dieses Verfahrens.**

(57) Zellen tierischer oder menschlicher Herkunft, die in vitro in Schichten wachsen, werden auf der Oberfläche einer festen porösen Matrix in der Weise gezüchtet, dass man das Nährmedium in Form eines dünnen Films auf die in einlagiger Schicht vorliegenden Einzelzellen aufbringt. Dabei wird das Nährmedium in Form eines Schaums zugefügt, der bei Berührung mit der Matrix zusammenfällt und dann als dünne Schicht durch die Matrix hindurch auf die Oberfläche der Zellen fließt, während das Gas in den Zwischenräumen belassen wird. Das Verfahren ist besonders zur Herstellung von Zellprodukten wie Interferon oder zur Erzeugung von Virusantigenen geeignet.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Züchten von Zellen von Lebewesen in einlagiger Schicht, die sich fest auf einer Oberfläche einer festen porösen Matrix befindet, dadurch gekennzeichnet, dass die sich fest auf der Matrixoberfläche befindlichen Zellen mit einer Schicht eines flüssigen Nährmediums in Berührung gebracht werden, das sich von einem zusammenfallenden Schaum ableitet, der aus dem Nährmedium und einem Gas gebildet worden ist.

2. Anwendung des Verfahrens nach Patentanspruch 1 zur Herstellung von Zellprodukten, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zellen mit einem Interferon-Induktor oder einem ansteckenden Virus behandelt, bevor die Zellen mit der Schicht des flüssigen Nährmediums in Berührung gebracht werden, oder dass man eine einlagige Schicht von Säugetierzellen, die auf der Oberfläche einer festen porösen Matrix verankert sind, mit einem flüssigen Medium in Berührung bringt, das eine Interferon-induzierende Substanz enthält, wobei das flüssige Medium in Form einer Schicht vorliegt, die sich von einem zusammengefallenen, aus einem flüssigen Medium und einem Gas erzeugten Schaum ableitet, und danach das Interferon abtrennt.

3. Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens nach Patentanspruch 1, bestehend aus einem die zur Anhaftung der Zellen feste poröse Matrix enthaltenden Reaktionsgefäß mit einem Einlass für das flüssige Medium und einem Auslass für das abgezogene flüssige Medium, dadurch gekennzeichnet, dass dem Reaktionsgefäß (2) ein Schaumerzeuger (1) und Mittel zum Aufbringen des erzeugten Schaums auf zumindest einen Teil der Oberfläche der festen porösen Matrix (3) zugeordnet sind.

4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Zellen von Säugetieren, mit Vorteil menschliche Zellen, züchtet.

5. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in dem Medium zusätzlich eine nicht-toxische grenzflächenaktive Verbindung verwendet.

6. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erzeugung des Schaums ein Gas verwendet, das bis zu 10% Kohlendioxid enthält.

7. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man einen ausreichend stabilen Schaum verwendet, der ohne wesentliches Zusammenfallen vom Erzeugungsort zum Anwendungsort auf der Matrix überführt werden kann.

8. Anwendung nach Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Zellen Haut- und/oder Muskelfibroblasten verwendet.

9. Anwendung nach Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Interferon-induzierende Substanz eine doppelstrangige Ribonucleinsäure aus einem Virus verwendet.

10. Anwendung nach Patentanspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man als doppelstrangige Ribonucleinsäure eine solche verwendet, die aus mit Virusteilchen infiziertem *Penicillium chrysogenum* isoliert worden sind.

11. Anwendung nach Patentanspruch 2 zur Herstellung eines Virus in vitro, dadurch gekennzeichnet, dass man eine einlagige Schicht von Zellen von Lebewesen, die auf der Oberfläche einer festen porösen Matrix verankert sind, mit einem flüssigen Medium in Berührung bringt, das den ansteckenden Virus enthält, wobei das Medium in Form einer Schicht vorliegt, die sich von einem zusammengefallenen, aus einem flüssigen Medium und einem Gas erzeugten Schaum ableitet, und danach das Virus abtrennt.

12. Anwendung nach Patentanspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Virus den Marek-Hühnerlähmungs-Virus oder den Maul-Klauenseuche-Virus verwendet.

13. Vorrichtung nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Matrix eine Masse fester Granulate, vorzugsweise zylindrische oder kugelige Granulate, in Form von

Kunststoffen, Keramik, Glas, einem inerten Metall, einem inerten Metalloxid, einem Phosphat, einem Silikat oder einem Carbide, verwendet.

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Züchtung von Zellen von Lebewesen in vitro in einer einlagigen Schicht sowie eine Vorrichtung zur Ausführung dieses Verfahrens.

Man kennt zwei Hauptverfahren zum Züchten von Einzelzellen oder Mikroorganismen in vitro, nämlich erstens als Suspension unter Rühren in einem Reaktionsgefäß und zweitens als einlagige Schicht, die auf einer Trägeroberfläche fest sitzend aufgebracht ist. Gewöhnlich ist das Züchten in Suspension nur bei ausgebildeten Zellen, Zellen des lymphozytischen Typs einschliesslich normaler Lymphozyten, Tumorzellen, wie den Burkitt-Lymphomzellen, und leukämischen Myoplasten geeignet. Zellen, die Schichten oder Fasern bilden, wie die Bindegewebszellen und Epithelzellen, wenn sie nicht überführt werden, erfordern einen festen Trägerstoff, auf dem sie wachsen können. Mit diesem letztgenannten Züchtungsverfahren befasst sich vorliegende Erfindung.

Das Züchten in einer Lage im Laboratoriumsmassstab ist ein einfaches Verfahren, bei dem sich die Zellen auf einem Träger befinden und an den Innenwänden einer ruhenden oder sich drehenden Flasche wachsen. Es ist bekannt, dass für eine einlagige Massenzüchtung ein grosser Oberflächenbereich für die Zellen vorgesehen sein muss. Das Drehgefäss ist für eine Erzeugung im grossen Massstab dadurch angepasst worden, dass man eine Anzahl von Züchtungsgefässen so miteinander verbindet, dass das Züchtungsmedium kontinuierlich durch eine Reihe von Gefässen gepumpt werden kann. Diese Verfahren jedoch, bei denen eine derartige Vorrichtung Anwendung findet, sind arbeitsaufwendig, da häufig eine Subkultur erforderlich ist, und ausserdem ist die Vorrichtung als solche teuer, umfangreich und mechanisch kompliziert.

Eine Vorrichtung, die innerhalb eines einzigen Züchtungsgefässes eine grosse Oberfläche schafft, ist von W. Wohler und Mitarbeitern in der Zeitschrift «Journal of Experimental Cell Research» 92 (1972), S. 571, beschrieben und ist auch Gegenstand der DT-OS 2 300 567. Diese Vorrichtung besteht aus einem Erlenmeyerkolben, der eine Matrix mit einem hohen Oberflächenbereich, wie Glasperlchen, enthält. Die Zellen werden auf die Matrix aufgebracht, die in dem Züchtungsmedium vollständig eingetaucht sind. Das Züchtungsmedium wird kontinuierlich ergänzt.

Die Nachteile dieses Submers-Züchtungsverfahrens sind, dass (1) die Vorrichtung, die zur Aufrechterhaltung der Eigenschaften des Mediums erforderlich sind, kompliziert ist, und dass (2) infolge von Unterschieden bei der Konzentration des die Zellen bedeckenden Züchtungsmediums im allgemeinen keine guten Wachstumsbedingungen, wie bei dem Drehgefäss, erreicht werden können, in denen die Zellen mit einem dünnen Film des Wachstumsmediums bedeckt sind.

Derartige Nachteile beim Züchten von Zellen auszuschalten, lag vorliegender Erfindung als Aufgabe zugrunde. Es wurde nun gefunden, dass man diese Schwierigkeiten dadurch umgehen kann, indem man einen dünnen Film eines Nährmediums auf Einzelzellen in einlagiger Schicht aufbringt.

Gegenstand vorliegender Erfindung ist demzufolge ein Verfahren zum Züchten von Zellen von Lebewesen in einlagiger Schicht, die sich fest auf einer Oberfläche einer festen porösen Matrix befindet, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die sich fest auf der Matrixoberfläche befindlichen Zellen mit einer Schicht eines flüssigen Nährmediums in Berührung gebracht

werden, das sich von einem zusammenfallenden Schaum ableitet, der aus dem Nährmedium und einem Gas gebildet worden ist.

Beim erfindungsgemässen Verfahren kann eine einlagige Schicht von Zellen zumindest teilweise auf der festen porösen Matrix festsitzend, erhalten werden, indem man beispielsweise die Matrix in eine Zellsuspension in einem flüssigen Medium eintaucht, die Zellen sich auf der Matrix festsetzen lässt und anschliessend das Suspensionsmedium abzieht. Dann wird in geeigneter Weise das Nährmedium in Form eines Schaums in einer genügend raschen Geschwindigkeit zugeführt, um ein Austrocknen der Matrix zu vermeiden, während die Zellen vorzugsweise auf der geeigneten physiologischen Temperatur, d. h. 35 bis 38 °C, gehalten werden. Sobald der Schaum mit der Matrix in Berührung kommt, fällt er zusammen und fliesst als dünne Schicht durch die Matrix hindurch auf die Oberfläche der Zellen, während Gas in den Zwischenräumen belassen wird. Das aus der Matrix fliessende Medium kann dann entweder abgezogen oder zweckmässigerweise wiederum eingesetzt werden. Die Zellen können so lange gezüchtet werden, bis die Matrix mit einer ausreichend grossen einlagigen Schicht Zellen bedeckt ist. Dann können die Zellen zum Entfernen des Nährmediums gewaschen werden, gegebenenfalls unter Anwendung einer dünnen Schicht eines Waschmittelschaums, worauf sie dann nach üblichen Verfahren entfernt, beispielsweise durch Behandeln mit Trypsin, gegebenenfalls mit schwachem Bewegen der Matrix, und dann gesammelt werden können.

Dieses Verfahren ist zum Züchten all derjenigen Zellen geeignet, die sich von Tieren, einschliesslich Säugetieren, Vögeln, Amphibien, Fischen und Insekten ableiten, die in vitro in Schichten wachsen. Als Beispiele derartiger Zellen werden Epithelgewebe, Bindegewebe, Muskelgewebe, Nervengewebe und Lymphgewebe genannt. Insbesondere ist das Verfahren zum Züchten von Haut- und Muskelfibroblasten geeignet, die sich von Säugetieren, einschliesslich Menschen, ableiten.

Die erfindungsgemäss einzusetzende Matrix ist porös. Die Zwischenräume der porösen Matrix sollen zweckmässig ausreichend gross sein, um (a) die einlagige Schicht der Zellen aufzunehmen, (b) das Züchtungsmedium als dünne Schicht über die Oberfläche der einlagigen Schicht der Zellen fliesen zu lassen, während das Gas in den Zwischenräumen zurückbleibt, und um (c) ein Entfernen der Zellen zu ermöglichen.

Die Oberfläche der porösen Matrix nach vorliegender Erfindung muss für die zu züchtenden Zellen einmal als Haftgrund dienen können und zum anderen auch ein leichtes Entfernen der Zellen ermöglichen, wenn das Züchtungsverfahren beendet ist. Es ist bekannt, dass tierische Zellen besonders gut an Oberflächen haften, die hohe Dichten an Natriumionen aufweisen. Sie haften deshalb an Substanzen, die eine negative Ladung aufweisen können und sich deshalb mit den Natriumionen verbinden. Die Matrix kann aus Substanzen gefertigt sein, an die die Zellen haften oder aus einem inerten Träger bestehen und mit einer derartigen Substanz beschichtet bzw. überzogen sein. Geeignete Substanzen umfassen Kunststoffe, wie Polyamide, Polycarbonate, Polystyrol, Epoxyharze, Silikon-Kautschuk, Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Zellglas, Polytetrafluoräthylen, Polyäthylen-terephthalat, Polyoxymethylen, fluorierte Äthylen/Propylen-Mischpolymerisate, Polyphenylenoxid, Polypropylen, Collagen, ferner Glimmer, Kohlenstoff, unlösliche inerte Metalloxide, Phosphate, Silikate oder Carbide, Siliciumcarbid, inerte Metalle, wie rostfreier Stahl, Aluminium, Titan oder Palladium oder keramische Substanzen oder Glas. Es ist gefunden worden, dass die verschiedenen Zelltypen an den Matrices mit unterschiedlichen Festigkeitsgraden haften. Beispielsweise haften einige Zellen so gut an manchen der vorgenannten Typen von Trägermaterialien, so dass man Schwierigkeiten bekommt, diese Zellen zu entfernen, wenn ein Gewinnen des Ertrags erforderlich ist. Aus diesem Grund ist es

manchmal notwendig, die Oberflächeneigenschaften dadurch zu modifizieren, dass man einen Überzug einer weniger stark an den Zellen haftenden Substanz aufbringt, die ein Entfernen der Zellen erleichtert. Wie gefunden worden ist, sind Überzugssubstanzen, die die Zellen leichter von den Matrixoberflächen entfernenbar machen, polyfluorierte Kohlenwasserstoffe, wie Polytetrafluoräthylen, oder Silicone, wie Polymethylhydrogensiloxan. Andererseits kann eine Oberfläche mit einer geringen Haftfähigkeit verändert werden, damit sie eine bessere Haftfähigkeit erhält, indem man einen geeigneten Überzug aufbringt.

Demzufolge hängt der besondere Oberflächenüberzug, der einzusetzen ist, von dem Typ der zu züchtenden Zellen und auch davon ab, ob ein Entnehmen des Ertrags von der Matrix erforderlich ist. Ein geeigneter Überzug oder eine Kombination von Überzügen kann für jeden besonderen Anwendungszweck empirisch bestimmt werden.

Substanzen, die – wie gefunden wurde – besonders für die Bildung von Matrices zum erfindungsgemässen Einsatz vorteilhaft sind, sind Polycarbonate, Polyamide, wie «Nylon 6», «Nylon 11» und «Nylon 12», ferner Glas, Polyoxymethylen, Polypropylen und 2,6-Dimethyl-phenylenoxid, überzogene bzw. beschichtete Matrices, die für die Bildung von Matrices zum erfindungsgemässen Einsatz besonders vorteilhaft sind, sind ein mit Polytetrafluoräthylen, Silikon oder Polymethylhydrogensiloxan beschichtetes Polycarbonat, ein mit Silikon, Polytetrafluoräthylen oder Stearinsäure beschichtetes Glas oder Polyäthylenterephthalat, «Nylon 6», «Nylon 11» und «Nylon 12», die mit Polytetrafluoräthylen beschichtet sind.

Bei einer besonderen Anwendung dieses Verfahrens kann die jeweils ausgewählte Substanz aufgrund von Nebenfaktoren bestimmt sein, wie bei einem Verfahren, bei dem die Matrix sterilisiert werden muss.

Die Matrix kann aus einem oder mehreren festen makroschwammskelettartigen Stücken hergestellt sein. Beispiele derartiger Matrices sind feste Schäume, die aus einer Substanz gebildet sind, welche die Zellen zu tragen vermögen, z. B. Kunststoffe, wie Polyamide, Polycarbonate, Polystyrol oder eine anorganische Substanz, wie Silicagel.

Gegebenenfalls kann die Matrix in Form eines Pfropfens aus Fasermaterialien, wie Metalldrahtwolle, Kunststoffwolle oder Glaswolle, vorliegen. Unter diesen Umständen würde die Substanz locker gepackt, um ein Zusammenlaufen des Dünnschichtflusses zu Flüssigkeitsströpfchen, wobei ein Teil der Matrix untergetaucht wird, zu verhindern. Ein weiterer Matrixtyp kann die Form von regulären Gittern oder Fäden, wie ein Netz, annehmen, die beispielsweise aus Kunststoff, Metall- oder Glasfäden gebildet sind.

Bei einer weiteren anderen Ausführungsform kann die Matrix aus einer Masse von regulären oder irregulären festen oder hohlen Granulaten bestehen, die aus den zuvor besprochenen Substanzen bestehen oder damit beschichtet sind. Die Form und Grösse der Granulate ist nicht kritisch. Reguläre Formen, wie Kügelchen oder Zylinder, werden irregulären Formen bevorzugt, da gefunden worden ist, dass Zylinder aus Polyamiden geeigneter sind als Kunststoffschnitzel oder -abfall, woraus sie hergestellt worden sind. Kügelchen sind zweckmässiger als Zylinder, da sie bei einem gegebenen Volumen einen grösseren Oberflächenbereich aufweisen.

Bei Kügelchen liegen die geeigneten Durchmesser im Bereich von 1 bis 10 mm, vorzugsweise im Bereich von 2 bis 4 mm. Die Durchmesser der Zylinder liegen zweckmässigerweise im Bereich von 1 bis 10 mm, vorzugsweise 3 bis 5 mm. Die Länge der Zylinder kann 1 bis 10 mm, vorzugsweise 3 bis 5 mm, betragen. Besonders geeignete Zylinder haben einen Durchmesser von 4 mm und eine Länge von 4 mm. Die aus kleineren als den vorgenannten Substanzstücken hergestellten Matrices weisen kleine Porengrössen auf, so dass ein vollständiges Entfernen der Zellen schwierig ist. Andererseits weisen

grössere Stücke einen kleineren Oberflächenbereich auf.

Das bei dem erfindungsgemässen Verfahren verwendete Nährmedium muss leicht assimilierbare Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffquellen enthalten. Das Medium ist auf den richtigen physiologischen pH-Wert von 6,5 bis 8,0 gepuffert und kann zusätzlich Metallsalze enthalten, wie Earlesche Salze, Ascorbinsäure, nicht-essentielle Aminosäuren, wie Alanin, Asparagin, Asparaginsäure, Glycin, Glutaminsäure, Prolin und Serin, oder ein Serum, wie das Rinderfötus-Serum. Erforderlichenfalls kann das Nährmedium auch Antibiotika, wie Penicilline, enthalten. Wenn man Zellen von Säugetieren züchten will, kann man beliebige Medien, die üblicherweise bei derartigen Zellen eingesetzt werden, beim vorliegenden Verfahren verwenden. Geeignete Nährböden sind solche nach Eagle, Fischer, Ham, Leibovitz, McCoy, Neumann und Tytell, Puck, Swim, Trowell oder Waymouth. Ferner eignen sich auch die 199-, NCTC 109-, NCTC 135-, CMRL 1066- oder die RPMI-Medien. Der Schaum kann in den Medien nach üblichen Verfahren zur Schaumerzeugung erzeugt werden, beispielsweise indem man ein Gas mittels eines oder mehrerer Rühr- oder Schlagbesen in das Nährmedium einbringt. Gegebenenfalls kann man den Schaum auch dadurch erzeugen, dass man sich auf das im Medium gelöste Gas verlässt. Durch Verwendung einer Hohlräume schaffenden Pumpe, wobei sich ein Rührer mit hoher Geschwindigkeit dreht, werden in dem flüssigen Medium Bereiche von niedrigem Druck geschaffen, in denen sich Gasblasen bilden, die den Schaum hervorrufen. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Gas in die Flüssigkeit mittels eines oder mehrerer, fest oder beweglich angeordneter Gaszuführungen oder durch eine Kugel aus gesintertem Glas eingeleitet werden.

Der Schaum kann aus einem beliebigen nicht-giftigen Gas oder Gasgemischen erzeugt werden. Der Schaum kann in dem Medium unter Verwendung eines völlig inerten Gases erzeugt werden, und die zur Züchtung der tierischen Zellen erforderlichen aeroben Bedingungen können durch anschliessendes Einbringen der erforderlichen Menge Sauerstoff in das System erzeugt werden. Es ist gefunden worden, dass sich durch Einleiten von Kohlendioxid in das Kulturmedium ein Gleichgewicht zwischen dem Kohlendioxid in der Gasphase und dem in der flüssigen Phase ausbildet. Dieses Gleichgewicht erzeugt eine Pufferwirkung, die ein Aufrechterhalten eines gleichmässigen pH-Wertes im gesamten Kulturmedium unterstützt. Wenn zuerst der Schaum in dem Kulturmedium mittels eines inerten Gases gebildet wird und wenn dann ein zweites Gas hinzukommt, ist es vorteilhaft, dass das zweite Gas in das Kulturmedium an einem Punkt eingeleitet wird, entgegengesetzt dem der Schaum mit der Matrix in Berührung gebracht und zusammengefallen ist, um dadurch jedwelle Verschlechterung des Schaums zu verhindern. Gegebenenfalls kann der Schaum unmittelbar durch Verwendung eines Gasgemisches mit einem Gehalt an Sauerstoff und gegebenenfalls Kohlendioxid erzeugt werden. Unter diesen Umständen muss ein inertes Verdünnungsgas mit eingesetzt werden, um sich innerhalb des Kulturmediums bildende Oxidationsbedingungen zu verhindern, die nachteilig auf die Zellen wirken würden. Wenn in ähnlicher Weise Kohlendioxid mitverwendet wird, ist gefunden worden, dass das Gasgemisch vorzugsweise keinen Sauerstoff und kein Kohlendioxid allein enthält, da häufig toxische Wirkungen beobachtet werden. Aus diesem Grund sollte als Verdünnungsgas Stickstoff zugegeben werden.

Für eine aerobe Züchtung von Zellen von Säugetieren, z. B. Fibroblasten, sind Gemische mit einem Gehalt von 1 bis 15 Volumenprozent Sauerstoff und 99 bis 85% Stickstoff geeignet. Ein bevorzugtes Gemisch besteht aus 10% Sauerstoff und 90% Stickstoff. Im Falle von Schäumen für aerobe Züchtungen, die aus Gasgemischen mit einem zusätzlichen Gehalt von Kohlendioxid erzeugt worden sind, sind zweckmässige Anteile 7 bis 10

Volumenprozent Sauerstoff, 0,5 bis 7,5 Volumenprozent Kohlendioxid und der Rest Stickstoff. Ein bevorzugtes Gemisch enthält 5% Kohlendioxid, 10% Sauerstoff und 85% Stickstoff.

Selbstverständlich kann der Schaum auch aus einem Gas erzeugt werden, das weder als solches noch zusätzlich Kohlendioxid enthält, wobei der pH-Wert des Mediums mittels Standardpuffersystemen eingestellt werden kann.

Der Schaum kann durch Ergänzen des Mediums mit einer nicht-toxischen grenzflächenaktiven Verbindung stabilisiert werden. Beispiele von grenzflächenaktiven Verbindungen, die in dieser Weise vorteilhaft sind, sind Sera, wie das Rinderfötus-Serum, ferner «Bactopecton», Liponsäure, Linolsäure, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose, Polyoxyalkylen-Derivate von Propylenglykol oder Äthylenoxid-Anlagerungsprodukte an Sorbitan-mono-oleat. Einige Medien, z. B. diejenigen nach McCoy oder nach Ham, und die Medien NCTC 109, NCTC 135, CMRL 1066 enthalten bereits grenzflächenaktive Verbindungen, wie «Bactopecton», Liponsäure, Linolsäure und Äthylenoxid-Anlagerungsprodukte an Sorbitan-mono-oleat. Es ist gefunden worden, dass, obwohl diese Medien zum Schäumen gebracht und als dünne Schicht fliessen können, ein weiterer Zusatz von grenzflächenaktiven Verbindungen vorteilhaft sein kann, um ein zufriedenstellendes Züchten zu erreichen. Die eingesetzte zusätzliche grenzflächenaktive Verbindung kann eine weitere Menge der bereits in dem Medium vorliegenden grenzflächenaktiven Verbindung oder eine beliebige andere, unterschiedliche grenzflächenaktive Verbindung der vorstehend genannten Art sein.

Wenn der Schaum erzeugt worden ist, wird er auf die feste Matrix aufgebracht. Um dies zu erreichen, ist der Schaumerzeuger so gelegen, dass der Schaum zu mindestens einem Teil der Matrix zugeführt werden kann. Die Überführung des Schaums vom Erzeuger zur Matrix wird entweder durch Pumpen des Schaums unter Verwendung beispielsweise einer peristaltischen Pumpe oder dadurch erreicht, dass man von dem durch den Erzeuger dem Schaum verliehenen Fliesen Gebrauch macht, beispielsweise wenn der Schaum in einer Kavitationspumpe oder durch Einblasen von Gas erzeugt wird. Gegebenenfalls kann der Ort bzw. die Stelle der Schaumerzeugung oberhalb des Anwendungspunktes gelegen sein, so dass der Schaum unter Einfluss der Schwerkraft durch Kanäle auf die Matrix fliessen kann.

Eine bevorzugte Eigenschaft, die von dem erfindungsgemäss verwendeten Schaum gefordert wird, liegt darin, dass er ausreichend stabil sein muss, um auf der Matrix anzukommen, ohne dass ein beträchtliches Zusammenfallen stattgefunden hat. Schäume niedriger Stabilität, die zwischen den Punkten der Erzeugung und der Anwendung zusammenfallen, neigen dazu, einen Flüssigkeitsstrom zu verursachen, der die Matrix untertaucht, so dass die Vorteile der Filmzüchtung nicht erreicht werden. Dieser unerwünschte Flüssigkeitsstrom kann vom Schaum abgeleitet werden, um zurückgeführt oder verworfen zu werden, bevor er auf der Matrix auftrifft, doch kann dadurch der wirksame Gebrauch des Mediums herabgesetzt werden.

Die Eigenschaften eines jeden einzelnen Schaums kann durch den Anteil der eingesetzten grenzflächenaktiven Verbindung und durch die Grösse der in die Flüssigkeit eingebrachten Gasblasen bestimmt werden. Die Schaumstabilität wird durch einen höheren Anteil an grenzflächenaktiver Verbindung und eine Herabsetzung der Gasblasengrösse gesteigert. Der jeweils gewählte Schaum hängt von der Entfernung ab, die der Schaum von Erzeuger zum Anwendungspunkt zurücklegen muss. Diese Merkmale hängen dann wieder von der jeweiligen zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens eingesetzten Vorrichtung ab, doch lassen sie sich in einfacher Weise durch Erzeugen eines Schaums und Beobachten des Grades seines Zusammenfallens beim Überführen bestimmen. Es ist

gefunden worden, dass ein Schaum, der unter Verwendung eines Nährmediums erzeugt worden ist, das mindestens 0,05% zusätzliche grenzflächenaktive Verbindung enthält und bei dem die Gasblasen Durchmesser innerhalb eines Bereiches von 0,1 bis 2 mm einschliesslich aufweisen, einen Weg von mindestens 175 cm zurücklegen muss, ohne dass der Schaum in beträchtlichem Masse zusammenfällt. Ein bevorzugter Schaum zur Verwendung unter den jeweiligen Umständen enthält 0,1% grenzflächenaktive Verbindung oder 5 oder 10% eines Serums und weist Gasblasen eines mittleren Durchmessers von hauptsächlich 0,5 mm auf.

Die Geschwindigkeit, mit der der Schaum auf die Matrix aufgebracht wird, muss ausreichen, um mit praktisch allen Zellen der einlagigen Schicht auf der Matrix in Berührung zu gelangen. Diese Geschwindigkeit hängt von der Art der verwendeten Matrix und der dem Schaum sich anbietenden Querschnittsfläche ab. Es ist gefunden worden, dass eine geeignete Fliessgeschwindigkeit des Schaums, der auf eine Matrix aus Kügelchen mit Durchmessern im Bereich von 2 bis 4 mm oder Zylindern mit Durchmessern von 1 bis 10 mm und Längen von 1 bis 10 mm aufgebracht werden soll, zwischen 20 und 320 cm<sup>3</sup>/Stunde je cm Bettquerschnittsfläche liegt.

Die Zellen können nach dem Züchten und vor dem Entfernen mit geeigneten physiologischen Pufferlösungen mit einem zusätzlichen Gehalt an grenzflächenaktiver Verbindung, z. B. mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung mit einem Zusatz an Methylcellulose, gewaschen werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist besonders zur Herstellung von Zellprodukten, wie Interferon, oder zur Erzeugung von für einen Einschluss in Vaccinen geeigneten Virusantigenen vorteilhaft.

Somit können die Zellen, die sich fest in einer einlagigen Schicht auf der Matrix befinden, vor einem Inberührungbringen mit dem Film eines flüssigen Nährmediums nach vorliegender Erfindung mit einem Interferon-Induktor oder mit einem ansteckenden Virus behandelt werden. Eine derartige Behandlung der Zellen kann entweder vor oder nach dem Festanbringen der Zellen auf der Matrix erfolgen. Die Behandlung kann auch vorteilhaft unter Verwendung eines Films durchgeführt werden, der sich von einem zusammengefallenen Schaum ableitet.

Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Anwendung des beschriebenen Verfahrens, die im Patentanspruch 2 definiert ist.

Das Interferon kann in solche Zellen durch Inkubieren mit induzierenden Substanzen, wie Viren, Teilen von Viren, doppelsträngiger Ribonucleinsäure aus Viren und synthetischen doppelsträngigen Ribonucleinsäuren, induziert werden. Doppelsträngige Ribonucleinsäuren mit dieser Fähigkeit können aus bestimmten virusinfizierten Fungi, wie *Penicillia* und *Aspergilli*, isoliert werden, wie es beispielsweise in den GB-PS 1 170 929 und 1 300 259 sowie von Banks und Mitarbeitern in der Zeitschrift «Nature» 218 (1968), S. 542, beschrieben ist.

Der beim erfindungsgemässen Verfahren eingesetzte am besten geeignete Interferon-Induktor ist eine doppelsträngige Ribonucleinsäure aus Viren, wie sie in mit Virenteilen infizierten *Penicillia*, beispielsweise *Penicillium chrysogenum* (GB-PS 1 170 929), *Penicillium stoloniferum* (Banks und Mitarbeiter in «Nature» 218 (1968), S. 542) und *Penicillium cyaneofulvum* (Banks und Mitarbeiter in «Nature» 213 (1968), S. 155), und in mit Virusteilen infizierten *Aspergilli* gefunden worden sind, z. B. *Aspergillus niger* und *Aspergillus foetidus* (GB-PS 1 300 259). Vorzugsweise stammt die doppelsträngige Ribonucleinsäure aus mit Virenteilen infizierten *Penicillium chrysogenum* (GB-PS 1 170 929).

Für eine Virusinfektion hängt die jeweilige Spezies, aus der die Zelle erhalten wird, vom Typ des herzustellenden Vaccins ab. Virusantigene zum Einbringen in pharmazeutische Vaccine

werden aus Zellen höherer Primaten, wie Affen oder Menschen, erzeugt, doch werden sie vorzugsweise aus menschlichen Zellen erhalten. Virusantigene zum Einarbeiten in veterinärmedizinische Vaccine werden aus den entsprechenden Tierarten hergestellt.

Die Zellen werden durch Inkubieren der Zellen mit ansteckenden Viren infiziert. Beispiele von Viren, die nach diesem Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Impfstoffen erzeugt werden können, umfassen Tollwut, Masern-, Mumps-, Röteln-, Poliomyelitis-, Adeno-, Gelbfieber-, Herpes-, Zytomegalie-, Influenza-, Parainfluenza-, Hepatitis-, infektiöse Mononucleosis- und «Respiratory-syncytial»-Viren (RS-Viren).

Beispiele von Viren, die zur Herstellung von veterinärmedizinischen Impfstoffen erzeugt werden können, umfassen Marek-Hühnerlähmungs-, Parainfluenza-, Adeno-, Staupe-, Katzenleukämie-, infektiöse Rinder-Nasen-Luftröhrenkatarrh, infektiöse Bronchitis, Maul- und Klauenseuche-, Kälberdiarrhöe-, Pferde-Rhinopneumonitis-, Pseudotollwut-, infektiöse Laryngotracheitis-, Schweineseuchen- und übertragbare Gastroenteritis-Viren.

Die Typen von Zellen, die zur Verwendung bei diesem Verfahren geeignet sind, sind in Schichten wachsende Zellen von Lebewesen, z. B. Fibroblasten und Epithelzellen, wie dies zuvor ausgeführt worden ist. Der Einfachheit halber werden Haut- und Muskelfibroblasten bevorzugt.

Vor der Induktions- oder Infektionsbehandlung werden die Zellen zumindest an einen Teil der Matrix gebunden und entwickeln sich nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren zu einer zusammengewachsenen Schicht. Hierfür sind beliebige der vorstehend besprochenen Medien geeignet. Bei Fibroblasten wird als besonderes Medium das Medium nach Eagle verwendet, das mit Rinderfötus-Serum, Rinderbrägenextrakt, nicht-essentiellen Aminosäuren, Earleschen Salzen, Ascorbinsäure und einem Antibiotikum ergänzt und mit Natriumbicarbonat abgepuffert worden ist.

Für eine Interferon-Induktion induziert man das Interferon in den Zellschichten entweder durch Untertauchen der Matrix in ein Induktionsmedium oder durch Einbringen des Induktionsmediums als dünne Schicht, die sich von einem zusammengefallenen Schaum ableitet, welcher in einem mit einer grenzflächenaktiven Verbindung ergänzten Induktionsmedium erzeugt worden ist. In zweckmässiger Weise wird die Induktionsinkubation bei einer Temperatur in einem Bereich durchgeführt, der gewöhnlich für ein Zellenwachstum geeignet ist, d. h. 35 bis 38 °C, vorzugsweise etwa 37 °C. Diese Induktionsinkubation kann 1 bis 3 Stunden lang durchgeführt werden. Es wurde gefunden, dass 2 Stunden eine angemessene Dauer ist. Das Induktionsmedium ist eine Lösung, die aus doppelsträngiger Ribonucleinsäure in einem üblichen Züchtungsmedium besteht, das gegebenenfalls mit einer der zuvor beschriebenen grenzflächenaktiven Verbindungen ergänzt worden ist. Gewöhnlich ist es besonders zweckmässig, die doppelsträngige Ribonucleinsäure in dem gleichen Medium zu lösen, wie es für die Zellzüchtung angewendet wird. Bei einer Verwendung von Fibroblasten ist bei dem bevorzugten Induktionsmedium die doppelsträngige Ribonucleinsäure in einer möglichst geringen Menge des wesentlichen (Eagleschen) Mediums gelöst, das mit einem Antibiotikum und einem wasserlöslichen Hydrochlorid eines Poly-diäthylaminoäthyläthers von Dextran («DEAE-Dextran») ergänzt und mittels Natriumbicarbonat auf einen physiologischen pH-Wert gepuffert ist.

Für eine Infektion mit Viren infiziert man dann die Zellen entweder durch Untertauchen der Matrix in ein Infektionsmedium oder durch Einbringen des Infektionsmediums als dünne Schicht, die sich von einem zusammengefallenen Schaum ableitet, welcher in einem mit einer grenzflächenaktiven Verbindung ergänzten Infektionsmedium erzeugt worden ist. Dieses Infektionsmedium ist eine Lösung, die den Virus in einem übli-

chen Züchtungsmedium enthält, das gegebenenfalls mit einer der vorgenannten grenzflächenaktiven Verbindungen ergänzt worden ist. Gewöhnlich ist es besonders zweckmässig, den Virus in dem gleichen Medium zu suspendieren, wie es für die Zellzüchtung angewendet wird. Bei Verwendung von Fibroblasten wird bei einem bevorzugten Infektionsmedium der Virus in einer möglichst geringen Menge des wesentlichen (Eagleschen) Mediums suspendiert, das mit einem Antibiotikum und einem wasserlöslichen Hydrochlorid eines Poly-diäthylamino-äthyläthers von Dextran ergänzt und mittels Natriumbicarbonat auf einen physiologischen pH-Wert gepuffert worden ist. Zweckmässigerweise wird die Infektionsinkubation bei einer Temperatur innerhalb eines Bereiches durchgeführt, der im allgemeinen für ein Zellwachstum üblich ist, d. h. 35 bis 38 °C, vorzugsweise etwa 37 °C. Die Infektionsinkubation kann in 1 bis 3 Stunden durchgeführt werden. Es ist gefunden worden, dass 2 Stunden eine angemessene Dauer sind.

Nach der Induktions- oder Infektionsperiode werden die Zellen mittels phosphatgepufferter Salzlösung frei vom Infektionsmedium gewaschen, indem man sie in die Salzlösung eintaucht oder indem man die Salzlösung als dünne Schicht aufbringt. Dann wird ein Sammelmedium auf die Zellschicht als dünne Schicht für eine Dauer zwischen 6 und 25 Stunden, vorzugsweise 16 bis 20 Stunden, für das Sammeln von Interferon und für eine Dauer von 3 bis 7 Tagen für das Sammeln des Virus aufgebracht. Das Sammelmedium kann ein beliebiges typisches Züchtungsmedium darstellen, wie es zuvor beschrieben worden ist. Gewöhnlich ist es am zweckmässigsten, das gleiche Medium wie für die Zellzüchtung zu verwenden, wobei im Falle von Fibroblasten ein besonderes geeignetes Sammelmedium eine geringstmögliche Menge des wesentlichen (Eagleschen) Mediums ist, das mit Rinderfötus-Serum und einem Antibiotikum ergänzt und mit Natriumbicarbonat auf einen physiologischen pH-Wert gepuffert worden ist. Das Sammeln wird bei einer Temperatur in einem Bereich durchgeführt, der gewöhnlich für die Züchtung von Zellen angewandt wird, d. h. 35 bis 38 °C, vorzugsweise 37 °C. Nach der Sammelperiode wird der Kreislauf des Sammelmediums unterbrochen, die Matrix abgezogen und das Interferon oder Virus enthaltende Medium dann gesammelt. Der Interferon- oder Virusgehalt der Lösung kann dann geprüft werden, und das Interferon oder der Virus nach beliebigen Standardmethoden isoliert werden.

Des weiteren bildet einen Gegenstand vorliegender Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens. Diese Vorrichtung besteht aus einem die zur Anhaftung der Zellen feste poröse Matrix enthaltenden Reaktionsgefäss mit einem Einlass für das flüssige Medium und einem Auslass für das abgezogene flüssige Medium und weist das kennzeichnende Merkmal auf, dass dem Reaktionsgefäss ein Schaumerzeuger und Mittel zum Aufbringen des erzeugten Schaums auf zumindest einen Teil der Oberfläche der festen porösen Matrix zugeordnet sind.

Das zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens geeignete Reaktionsgefäss kann ein Turm oder Trog mit rundem oder rechteckigem Querschnitt sein, oder in Form eines Hohlkegels, hängenden Kegels oder einer Kugel vorliegen. Das Reaktionsgefäss weist einen Einlass auf, durch den die Matrix eingebracht werden kann, sowie einen Auslass aus dem Schaumerzeuger, durch den der Schaum auf die Matrix aufgebracht wird. Das Reaktionsgefäss kann auch mit einem weiteren Einlass zum Einbringen der Zellsuspension ausgerüstet sein. Dieser Einlass kann in Form einer selbstdichtenden Gummimembran oder einer normalen dampfsterilisierbaren Einlassöffnung bestehen. Um sicherzustellen, dass die Eigenschaften des Mediums in dem erwünschten Bereich bleiben, kann das Reaktionsgefäss mit empfindlichen Elektroden für den pH-Wert und/oder den partiellen Sauerstoffdruck ausgerüstet sein.

Das Gefäss kann auch mit einem Gasauslass gegebenenfalls durch ein steriles Filter versehen sein, um Gas aus dem Schaum austreten zu lassen. Das Gefäss kann ferner mit einem zusätzlichen Gaseinlass ausgestattet sein, der zweckmässigerweise auf der gegenüberliegenden Seite angeordnet ist, auf der der Schaum auf der Matrix zusammenbricht, so dass das einströmende Gas nicht den Schaum auftreibt. Das Medium wird dem Schaumerzeuger aus einem Flüssigkeitsvorratsbehälter zugeführt, wobei die Zufuhr mittels Fallstrom oder gegebenenfalls durch Pumpen erfolgt.

Der Ausfluss des Mediums aus dem Reaktionsgefäss kann abgeleitet und verworfen oder aber durch Pumpen zurückgeführt werden, erforderlichenfalls in den Flüssigkeitsvorratsbehälter.

Die Vorrichtung nach vorliegender Erfindung wird nachstehend an einem Beispiel unter Bezugnahme auf die Fig. 1 der Zeichnung beschrieben, die in schematischer Weise die Vorrichtung der Erfindung beschreibt.

In der Fig. 1 ist eine Zellzüchtungsvorrichtung nach der Erfindung gezeigt, die aus einem Schaumerzeuger 1, einem Reaktionsgefäss in Form eines zylindrischen Turmes 2, der die feste poröse Matrix 3 enthält, und einem Auslass 4 aus dem Gefäss als Mittel zum Abziehen der Flüssigkeit besteht.

Bei einer besonderen Ausführungsform besteht der Schaumerzeuger 1 aus einem zylindrischen Gehäuse 5, einem Gaszuleitungsrohr 6, das an einem Ende mit dem Strömungsmesser 6a verbunden ist und dessen anderes Ende in das Gehäuse 5 durch dessen Seitenwand reicht und in einer Platte 7 aus gesintertem Glas endet. Der Schaumerzeuger 1 weist auch an dem einen Ende des Gehäuses 5 einen Flüssigkeitseinlass 8 und am anderen Ende des Gehäuses 5 einen Schaumauslass 9 auf. Der Flüssigkeitseinlass 8 steht in Verbindung mit dem Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 über eine Einspeisleitung 8a, in der ein Rückschlagventil 11 eingebaut ist. Bei dieser Ausführungsform kann die Flüssigkeitseinspeisleitung durch das Ventil 12 entleert werden, das zwischen dem Rückschlagventil 11 und dem Schaumerzeuger 1 angeordnet ist. Der Schaumauslass 9 steht in Verbindung mit dem einen Ende der Schaumspeisleitung 9a, die in das Reaktionsgefäss 2 oberhalb der Deckfläche 13 der festen porösen Matrix 3 endet.

Bei dieser Ausführungsform enthält das Reaktionsgefäss 2 die Matrix 3 in Form kleiner Kunststoffzylinder. Das Reaktionsgefäss ist am oberen Ende mit einem dicht sitzenden durchbohrten Stopfen 14 verschlossen, durch den die Schaumspeisleitung 9a läuft. Das Reaktionsgefäss 2 läuft an seinem unteren Ende unter Bildung des Auslasses 4 spitz zu. Ferner weist das Reaktionsgefäss 2 einen Einlass für die Zellsuspensionen in Form einer selbstdichtenden Gummimembran 15 und ein Gasauslassrohr 16 auf, das in dem Bakterienfilter 17 endet. Der Auslass 4 steht mit dem einen Ende des Ableitungsrohres 18 in Verbindung, das sich teilt, und zwar in einen Teil 18a, der über das Ventil 19 zum Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 führt, und einen zweiten Teil 18b, der den Abflussablauf durch das Ventil 20 bildet. Der Flüssigkeitsvorratsbehälter 10, zu dem das Medium zurückkehrt, weist eine Gasabzugsleitung 22 und einen Flüssigkeitseinlass in Form einer selbstdichtenden Gummimembran 23 auf. Die Gasabzugsleitung 22 ist bei dieser Ausführungsform mit dem Gasauslassrohr 16 aus dem Reaktionsgefäss 2 unter dem Bakterienfilter 17 verbunden.

Um die Vorrichtung in Betrieb zu nehmen, wird das Reaktionsgefäss 2 mit einer geeigneten Menge von kleinen Zylindern eines Polycarbonats gefüllt. Dann wird der durchbohrte Stopfen 14 in das Reaktionsgefäss 2 eingesetzt und die Vorrichtung zusammengebaut. Danach wird die gesamte Vorrichtung sterilisiert, indem sie in einer Umgebung mit konstanter Temperatur von etwa 37 °C angeordnet und dann auf Raumtemperatur abkühlen gelassen wird. Dann werden über die selbstdichtende Gummimembran 15 in das Reaktionsgefäss 2 die in einer



ausreichenden Menge des Mediums suspendierten Zellen eingespeist, um die Matrix unterzutauchen. Die Vorrichtung lässt man 2 bis 20 Stunden stehen, damit sich die Zellen auf der Matrix festsetzen können. Dann speist man das Nährmedium über die selbstdichtende Gummimembran 23 in das Flüssigkeitsvorratsgefäß 10 ein und lässt es über die Einspeisleitung 8a in den Schaumerzeuger 1 fließen. Dann wird ein steriles Gas bei einer Geschwindigkeit, die mit dem Strömungsmesser 6a bemessen wird, in den Schaumerzeuger 1 eingeleitet, wodurch das Medium aufgeschäumt wird. Der Schaum gleitet mittels des Gasstromes durch den Schaumauslass 9 zum oberen Ende der Matrix 3. Wenn der Schaum auf der Matrix auftrifft, bricht er zusammen, und das Flüssigkeitsmedium fließt über die Matrixoberfläche. Gleichzeitig wird das Ventil 20 geöffnet, um das Suspensionsmedium mit einer Geschwindigkeit ausfließen zu lassen, die ausreichend ist, um das Suspensionsmedium durch das sich vom Schaum ableitende Nährmedium ersetzen zu lassen und ein Trockenwerden der Zellschicht zu verhindern. Wenn das Suspensionsmedium durch das sich vom Schaum ableitende Nährmedium ersetzt worden ist, wird das Ventil 20 geschlossen und das Ventil 19 geöffnet, so dass das Medium in den Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 zurückkehrt. Das Nährmedium wird im Kreislauf geführt, bis sich eine Zellenkolonie in der gewünschten Grösse festgesetzt hat. Dann wird die Gaszufuhr abgestellt und das Ventil 19 geschlossen. Der Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 und der Schaumerzeuger 1 werden vom Nährmedium befreit und mit einem Waschmedium gefüllt. Dann wird die Gaszufuhr wieder in Betrieb genommen. Die Zellen werden mit einem dünnen Film des Waschmediums so lange gewaschen, bis sie frei von dem Kulturmedium sind. Das abfließende Waschwasser wird entweder durch das Ventil 20 abgezogen und verworfen oder durch das Ventil 19 zum Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 zurückgeleitet. Dann wird die Schaumzufuhr unterbrochen, und die Zellen werden von der Matrix in geeigneter Weise durch Füllen des Reaktionsgefäßes 2 mit einer die Zellen freisetzenen Lösung, wie Trypsin, entfernt. Die Matrix kann dabei gegebenenfalls durch langsames Gasdurchleiten durch die Matrix durch das Rohr 18 bei geschlossenen Ventilen 19 und 20 schwach bewegt werden, um ein Freisetzen der Zellen zu unterstützen.

Die Zellsuspension wird dann durch das Ventil 20 abgezogen, während das Ventil 19 geschlossen bleibt und das Ventil 20 geöffnet ist.

Die Vorrichtung kann gegebenenfalls unterhalb des Bakterienfilters 17 mit einem Dampfabfangkühler und einer zusätzlichen Gaszufuhr ausgerüstet sein, die so angeordnet ist, dass das Gas bei einem Punkt eingespeist wird, unter dem sich das Ableitungsrohr 18 in die beiden Teile 18a und 18b teilt.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

Die vorstehend beschriebene Vorrichtung mit einem Reaktionsgefäß 2, das einen Durchmesser von 3,5 cm aufweist, wird bis zu einer Höhe von 25 cm mit aus gepresstem Polycarbonat bestehenden Zylindern von 4 mm Durchmesser und 4 mm Länge gefüllt. Die Gesamtvorrichtung wird 30 Minuten unter Druck bei 1,05 kg/cm<sup>2</sup> sterilisiert.

Dann lässt man die Vorrichtung auf Raumtemperatur abkühlen und speist über die selbstdichtende Gummimembran 15 unter Verwendung einer Pravazspritze bei geschlossenen Ventilen 19 und 20 einen Impfstoff von  $3,6 \times 10^7$  L929-Mäuse-Fibroblastenzellen ein, die in 100 cm<sup>3</sup> Wachstumsmedium suspendiert sind. Das verwendete Wachstumsmedium ist ein Medium nach Eagle, das mit earleschen Salzen, 10prozentigem Rinderfötus-Serum, nicht-essentiellen Aminosäuren, Ascorbinsäure und einem Gemisch aus Penicillin und Streptomycin ergänzt worden ist. Das Medium ist mit 2,2 g Natriumbicarbonat/Liter gepuffert und enthält als pH-Indikator Phenolrot.

Dann lässt man die Impfvorrichtung 20 Stunden bei 37 °C stehen, um die Zellen an der Füllung sich ansiedeln und festsetzen zu lassen.

Wenn sich die Zellen auf der porösen Matrix angesiedelt haben, wird das Ventil 19 etwas geöffnet, um die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß ablaufen und gleichzeitig ein Gasgemisch aus 10% Sauerstoff und 85% Stickstoff und 5% Kohlendioxid einströmen zu lassen. Das Gasgemisch wird dem Schaumerzeuger in einer Geschwindigkeit von 25 cm<sup>3</sup>/Minute zugeführt, so dass der Schaum an der Deckfläche der porösen Matrix dann eintrifft, wenn die vorhandene Flüssigkeit wieder abgezogen wird. Die Fließgeschwindigkeit des Mediums durch das Ventil 19 wird so eingestellt, dass das Medium, in dem die Zellen suspendiert sind, durch das sich von dem Schaum ableitende Medium ersetzt wird, so dass die Zellen auf der Matrix nicht trocken werden. Wenn das Medium, in dem die Zellen suspendiert worden sind, vollständig aus dem Reaktionsgefäß abgezogen ist, wird das Ventil 19 vollständig geöffnet, und die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit durch die Säule wird durch die Geschwindigkeit des Zusammenfallens des Schaums an der Oberfläche der Matrix kontrolliert.

Man lässt den Schaum etwa 72 Stunden zirkulieren.

Dann wird die Gaszufuhr zu dem Schaumerzeuger 1 unterbrochen und das Ventil 19 geschlossen. Der Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 und der Schaumerzeuger 1 werden durch das Ventil 12 geleert. Bei geschlossenem Ventil 12 wird der Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 mit einem Waschmedium gefüllt, das aus einer 0,15-m Kochsalzlösung besteht, die mittels Phosphat auf einen pH 7,3 abgepuffert und mit 0,1% Methylcellulose ergänzt worden ist. Man lässt das Waschmedium schäumen und durch das Reaktionsgefäß laufen und durch das Ableitungsrohr 18b durch das Ventil 20 ablaufen, bis die Zellen von den letzten Spuren des roten Nährmediums frei sind. Dann schliesst man das Ventil 20 und speist bei 37 °C eine Lösung von Trypsin und dem Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure in das Reaktionsgefäß 2 über die selbstdichtende Gummimembran 15 ein, um die poröse Matrix unterzutauchen. Nach 10 Minuten bewegt man die Füllung und die Lösung schwach während 5 Minuten, indem man über das Ventil 20 einen schwachen Strom steriler Luft einleitet. Die Zellen, die als Ergebnis dieser Bewegung in der Pufferlösung suspendiert sind, werden aus dem Reaktionsgefäß 2 durch das Ventil 20 abgezogen. Dann wird ein weiterer Teil der vorgenannten Pufferlösung aus Trypsin und dem Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure zugegeben, um die restlichen Zellen zu entfernen.

Die Anzahl der geernteten Zellen wird durch Auszählen unter Verwendung einer Zählkammer bestimmt.

50 Gesamtzahl der überimpften Zellen	$3,6 \times 10^7$
geerntete Zellen (i) in dem abgezogenen Wachstumsmedium und in der gepufferten Kochsalzwachslösung	$0,8 \times 10^7$
(ii) in der Lösung mit Trypsin und dem Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure	$5,25 \times 10^7$
55 insgesamt	$6,05 \times 10^7$

#### Beispiel 2

Unter Anwendung des Verfahrens nach Beispiel 1 werden menschliche Fibroblasten gezüchtet und das Interferon wie folgt erzeugt:

Eine Matrix von 5×15 cm von mit Silikon behandelten Polycarbonatperlen mit 4 mm Durchmesser, die in ein zylindrisches Reaktionsgefäß aus Glas eingefüllt worden sind, wird mit  $2,5 \times 10^7$  Fibroblasten aus menschlicher Haut bzw. menschlichen Muskeln beimpft. Die Zellen werden als Suspension in ein Wachstumsmedium gegeben, das ein Minimum an dem wesentlichen (Eagleschen) Medium mit Earleschen Salzen besteht, die mit 10% Rinderfötus-Serum, nicht-essentiellen Aminosäuren,

Ascorbinsäure, einem Fibroblasten-Wachstumsfaktor, einem Gemisch aus Penicillin aus Streptomycin und mit 0,88 g/Liter Natriumbicarbonat ergänzt worden ist.

Die beimpfte Matrix wird bebrütet und bei 37 °C über Nacht stehengelassen. Dann lässt man das Suspensionsmedium langsam ablaufen und beginnt die Bebrütung des Nährmediums, indem ein Gemisch von 5% Kohlendioxid in steriler Luft zu der Flüssigkeit in dem Schaumerzeuger zugeführt wird. Dieses Gemisch wird so eingestellt, dass es in dem Medium den zutreffenden pH-Wert von 7,0 bis 7,2 ergibt. Der Umlauf des Mediums wird 48 Stunden fortgesetzt.

Dann lässt man das Medium sich in der Matrix ansammeln, die dann durch Überschichten der Perlen und des Mediums gewaschen wird. Anschliessend lässt man die Flüssigkeit von der Basis der Matrix langsam ablaufen. In der gleichen Weise wird Induktionsmedium zugegeben, das aus der Mindestmenge des wesentlichen (Eagle) Mediums besteht, dem Earlesche Salze, Natriumbicarbonat, ein Gemisch aus Penicillin und Streptomycin, 5 µg/ml doppelstrangige Ribonucleinsäure und 100 µg/ml eines wasserlöslichen Hydrochlorids eines Poly-diäthylaminoäthyläthers von Dextran («DEAE-Dextran») zugegeben sind. Man lässt das Medium 2 Stunden bei 37 °C mit den Zellen in Berührung und wäscht dann die Zellen wie vorstehend beschrieben mit der mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung. Das Waschwasser wird durch das Sammelmedium ersetzt, das aus dem eagleschen Medium besteht, das mit Earleschen Salzen, Natriumbicarbonat, einem Gemisch aus Penicillin und Streptomycin und 1% Rinderfötus-Serum ergänzt worden ist. Das Reaktionsgefäss lässt man unter diesen Bedingungen über Nacht bei 37 °C stehen. Dann wird das Medium abgezogen und festgestellt, dass es 3300 internationale Einheiten menschliches Interferon enthält.

#### Beispiel 3

Das Verfahren des Beispiels 1 wird wiederholt unter Verwendung von menschlichen Fibroblasten.

Eine Matrix von 3,5×25 cm von Polycarbonatperlen mit 4 mm Durchmesser, die mit einem Polytetrafluoräthylen-Aerosol-Spray besprüht und in das zylindrische Reaktionsgefäss aus Glas eingefüllt worden sind, wird mit  $8 \times 10^6$  Fibroblasten aus menschlicher Haut bzw. menschlichen Muskeln beimpft. Die Zellen werden als Suspension in ein Wachstumsmedium zugegeben, das eine Mindestmenge an wesentlichem (Eagleschen) Medium mit Earleschen Salzen enthält, das mit 10% Rinderfötus-Serum, nicht-essentiellen Aminosäuren, einem Gemisch aus Penicillin und Streptomycin und 0,88 g/Liter Natriumbicarbonat ergänzt worden ist.

Die beimpfte Matrix wird über Nacht bei 37 °C bebrütet. Dann zieht man das Suspensionsmedium langsam ab und beginnt mit dem Kreislauf des Nährmediums, indem man ein Gemisch aus Luft und Kohlendioxid zu der Flüssigkeit in dem Schaumerzeuger zugibt. Dieses Gemisch wird so eingestellt, dass es in dem Medium den richtigen pH-Wert von 7,0 bis 7,2 ergibt. Der Kreislauf des Mediums wird 75 Stunden fortgesetzt.

Dann wird die Gaszufuhr zum Schaumerzeuger 1 unterbrochen und das Ventil 19 geschlossen. Der Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 und der Schaumerzeuger 1 werden durch das Ventil 12 entleert. Bei geschlossenem Ventil 12 wird der Flüssigkeitsvorratsbehälter 10 mit einer 0,15-m Kochsalzlösung als Waschmedium gefüllt, die mittels Phosphat auf pH 7,3 gepuffert und mit 0,1% Methylcellulose ergänzt worden ist. Das Waschmedium wird zum Schäumen veranlasst und dann durch das Reaktionsgefäss 2 geleitet und schliesslich durch die Leitung 18b durch das Ventil 20 abgezogen und verworfen, bis die Zellen

frei von letzten Spuren des roten Nährmediums sind. Dann schliesst man das Ventil 20 und leitet in das Gefäss durch die selbstdichtende Gummimembran 15 bis 37 °C eine Lösung von Trypsin und dem Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure, um die poröse Matrix unterzutauchen. Nach 10 Minuten wird die Füllung und die Lösung 5 Minuten lang schwach bewegt, indem durch das Ventil 20 ein langsamer schwacher Strom von steriler Luft eingeleitet wird. Die Zellen, die als Ergebnis der Bewegung in der Pufferlösung suspendiert worden sind, werden durch das Ventil 20 aus dem Reaktionsgefäss 2 abgezogen. Das Bewegen wird unter Verwendung einer 0,15-m Kochsalzlösung, die mittels Phosphat auf pH 7,3 gepuffert worden ist, wiederholt. Dann wird ein weiterer Anteil der Pufferlösung aus Trypsin und dem Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure zugegeben, der ein weiterer Anteil von Kochsalzlösung folgt, die beide bewegt werden, um verbliebene Zellen zu entfernen.

Überimpfte Zellen insgesamt	$8 \times 10^6$
geerntete Zellen	
(i) in dem abgezogenen Wachstumsmedium und in dem gepufferten Kochsalzwaschwasser	$0,5 \times 10^6$
(ii) nach der ersten Behandlung mit Trypsin und dem Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure	$10,7 \times 10^6$
(iii) in dem ersten bewegten Kochsalzwaschwasser	$1,95 \times 10^6$
(iv) nach der zweiten Behandlung mit Trypsin und Natriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure	$2,48 \times 10^6$
(v) in dem zweiten bewegten Kochsalzwaschwasser	$4,13 \times 10^6$
insgesamt	$19,8 \times 10^6$

In der nachstehenden Tabelle sind Beispiele nach dem Verfahren vorliegender Erfindung angegeben, wobei zahlreiche menschliche Fibroblasten unter Verwendung unterschiedlicher Matrices gezüchtet worden sind.

Die in der Tabelle verwendeten Abkürzungen haben die folgenden Bedeutungen:

1000: Strom von 1000 menschlichen Haut- und Muskelfibroblasten
7000: Strom von 7000 menschlichen Vorhautfibroblasten
12000: Strom von 12000 menschlichen Nasenschleimhaut-Epithelzellen
meth: Methylcellulose
F.G.F.: Fibroblasten-Wachstumsfaktor
P.C.: Polycarbonat
VIT.C.: Ascorbinsäure
N 6: Polyamid («Nylon 6»)
N 11: («Nylon 11»)
N 12: («Nylon 12»)
PET: Polyäthylen-terephthalat
PET(O): oxidiertes Polyäthylen-terephthalat
PPO: Polyphenylenoxid
PP: Polypropylen
PE: Polyäthylen
PF: Polyoxymethylen
FEP: fluoriertes Äthylen-Propylen-Mischpolymerisat
P.T.F.E.: Polytetrafluoräthylen
S: Silikon
Sil: Silikon
D.C.Sil: Silikon
Stearic: Stearinsäure
A: Luft
N: Stickstoff
O/N: über Nacht



Bei- spiel	Zellen	Serum	Zusätze	Substrat- füllung	Gas	Impfung	Ertrag	Wachstums- dauer in Tagen	Ver- hält- nis	Festle- gungs- dauer
4	1000(P25)	10%	-	PC	A/N/CO <sub>2</sub>	≤2,5	1,78	4	-	O/N
5	1000(P25)	10%	0,1% meth	PC	A/N/CO <sub>2</sub>	2,5	2,07	4	-	O/N
6	1000(P26)	10%	-	PC	A/N/CO <sub>2</sub>	1,35	1,15	4	-	O/N
7	1000(P26)	10%	-	PC	A/N/CO <sub>2</sub>	1,35	1,26	4	-	O/N
8	1000(P28)	10%	-	PC	A/N/CO <sub>2</sub>	1,7	1,35	8	-	O/N
9	1000(P28)	10%	-	PC	A/N/CO <sub>2</sub>	1,7	1,71	11	1	O/N
10	1000(P29)	10%	-	N 11	A/N/CO <sub>2</sub>	1,9	1,46	8	-	O/N
11	1000(P29)	10%	-	PET(O)	A/N/CO <sub>2</sub>	1,6	1,61	8	1	O/N
12	1000(P29)	10%	-	PC/S	A/N/CO <sub>2</sub>	1,6	1,72	8	1,08	O/N
13	1000(P29)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,6	3,05	8	1,9	O/N
14	7000(P24)	10%	-	GLAS	A/N/CO <sub>2</sub>	1,5	0,72	9	-	O/N
15	7000(P24)	10%	-	GLAS/S	A/N/CO <sub>2</sub>		0,74	9	-	O/N
16	7000(P24)	10%	-	GLAS/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,5	0,59	9	-	O/N
17	7000(P25)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,4	2,09	8	1,49	O/N
18	7000(P25)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,4	2,9	8	2,07	O/N
19	7000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,8	1,92	4	1,07	O/N
20	7000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,8	2,51	6	1,4	O/N
21	7000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,8	2,80	5	1,56	O/N
22	7000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,8	5,18	11	2,88	O/N
23	7000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/N/CO <sub>2</sub>	1,8	3,64	7	2,02	O/N
24	7000(P27)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,05	2,94	4	2,8	O/N
25	7000(P27)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,25	2,95	4	2,36	O/N
26	1000(P37)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,9	0,99	1	1,10	O/N
27	1000(P37)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,9	1,18	2	1,31	O/N
28	1000(P37)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,9	2,27	5	2,52	O/N
29	1000(P37)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,9	2,11	8	2,34	O/N
30	1000(P37)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,9	2,47	9	2,75	O/N
31	1000(P39)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	1,98	4	2,47	O/N
32	1000(P39)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	2,13	4	2,66	O/N
33	1000(P40)	10%	-	N6/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,6	0,75	4	1,25	O/N
34	1000(P40)	10%	-	N11/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,6	nicht ab- schätzbar	4	-	O/N
35	1000(P40)	10%	-	N12/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,6	dito	4	-	O/N
36	1000(P40)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,6	0,94	4	1,57	O/N
37	7000(P32)	10%	-	PF	A/CO <sub>2</sub>	1,0	1,3	4	1,3	O/N
38	7000(P32)	10%	-	PF/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,0	0,335	4	-	O/N
39	7000(P32)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,0	1,07	7	1,07	O/N
40	7000(P31)	10%	-	PET/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	0,96	4	1,20	O/N
41	7000(P31)	10%	-	PET(O)/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	0,88	4	1,10	O/N
42	7000(P31)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	vergiftet	-	-	O/N
43	1000(P23)	10%	-	PET/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,25	0,89	4	-	O/N
44	1000(P23)	10%	-	PET(O)/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,25	1,27	4	1,02	O/N
45	1000(P23)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,25	1,26	4	1,01	O/N
46	1000(P24)	10%	-	PET/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,375	induziert	7	-	O/N
47	1000(P24)	10%	-	PET(O)/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,375	dito	8	-	O/N
48	1000(P24)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,375	dito	9	-	O/N
49	1000(P26)	10%	-	FEP	A/CO <sub>2</sub>	1,0	0,25	4	-	O/N
50	1000(P26)	10%	-	PPO	A/CO <sub>2</sub>	1,0	0,685	4	-	O/N
51	1000(P26)	10%	-	PPO/PTFE	A/C <sub>2</sub>	1,0	0,91	4	-	O/N
52	1000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,725	induziert	9	-	O/N
53	1000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,725	dito	8	-	O/N
54	1000(P26)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,725	dito	10	-	O/N
55	12000(P23)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,2	1,24	4	1,03	O/N
56	12000(P23)	10%	-	FEP	A/CO <sub>2</sub>	1,2	0,41	4	-	O/N
57	12000(P23)	0	0,1% Meth	FEP	A/CO <sub>2</sub>	0,8	0,59	4	-	O/N
58	12000(P24)	5%	5% FGF	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,95	0,77	3	-	O/N
59	12000(P24)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,05	0,79	3	-	O/N
60	12000(P24)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,05	1,18	3	1,12	O/N
61	12000(P25)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	0,675	4	-	2½ Std.
62	12000(P25)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	0,503	4	-	16 Std.
63	12000(P25)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,8	0,734	4	-	16 Std.
64	1000(P30)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,0	2,03	4	2,03	2¼ Std.
65	1000(P30)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,0	1,45	4	1,45	2¼ Std.

Bei- spiel	Zellen	Serum	Zusätze	Substrat- füllung	Gas	Impfung	Ertrag	Wachstums- dauer in Tagen	Ver- hält- nis	Festle- gungs- dauer
66	1000(P24)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,375	1,23	4	-	O/N
67	1000(P24)	10%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	1,375	1,175	4	-	O/N
68	1000(P25)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,925	0,57	4	-	3 Std.
69	1000(P25)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,925	0,42	4	-	5 Std.
70	1000(P25)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,925	0,13	4	-	7 Std.
71	1000(P25)	5%	-	PC/PTFE	A/CO <sub>2</sub>	0,925	0,21	4	-	9 Std.
72	1000(P27)	10%	-	PP	A/CO <sub>2</sub>	0,72	0,34	4	-	3 Std.
73	1000(P27)	10%	-	PP	A/CO <sub>2</sub>	0,72	0,39	4	-	5 Std.
74	1000(P28)	5%	FGF	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,04	0,41	4	-	3 Std.
75	1000(P28)	5%	FGF	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,04	0,53	4	-	3 Std.
76	1000(P28)	5%	FGF	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,3	0,86	4	-	3 Std.
77	1000(P29)	5%	FGF	PC	A/CO <sub>2</sub>	1,2	0,91	4	-	3 Std.
78	1000(P29)	5%	VITC	PC	A/CO <sub>2</sub>	1,2	0,53	4	-	3 Std.
79	12000(P25)	5%	-	PC	A/CO <sub>2</sub>	1,7	induziert	3	-	3 Std.
80	12000(P26)	5%	VITC	PC/Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,9	1,40	4	-	3 Std.
81	12000(P26)	5%	VITC	PC/Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,9	1,46	4	-	3 Std.
82	1000(P26)	5%	FGF/VITC	PC/Sil	A/CO <sub>2</sub>	2,5	induziert	2	-	3 Std.
83	1000(P29)	10%	-	PC/DC.Sil	A/CO <sub>2</sub>	2,1	1,32	4	-	-
84	1000(P29)	10%	-	PC/Sil	A/CO <sub>2</sub>	2,1	1,29	4	-	-
85	1000(P29)	10%	-	PC/PTFE/Sil	A/CO <sub>2</sub>	2,1	1,62	4	-	-
86	1000(P31)	5%	-	PC/Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,7	0,7	4	-	3 Std.
87	1000(P31)	5%	-	GLAS/Stearic	A/CO <sub>2</sub>	1,7	0,6	4	-	3 Std.
88	1000(P33)	5%	FGF	PC/Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,7	1,13	4	-	3 Std.
89	1000(P33)	5%	FGF	PC/Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,7	0,9	4	-	3 Std.
90	1000(P33)	5%	FGF	PC/DC.Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,7	2,2	4	1,3	3 Std.
91	12000(P33)	5%	VITC	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,7	2,06	4	1,21	3 Std.
92	12000(P33)	5%	VITC	PE	A/CO <sub>2</sub>	1,7	1,67	4	1,0	3 Std.
93	12000(P33)	5%	VITC	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,7	1,79	4	1,05	3 Std.
94	1000(P35)	5%	FGF/VITC	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,36	1,16	4	-	3 Std.
95	1000(P35)	5%	FGF/VITC	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,36	0,58	4	-	3 Std.
96	1000(P35)	5%	FGF/VITC	PE	A/CO <sub>2</sub>	1,36	0,76	4	-	3 Std.
97	1000(P23)	5%	FGF/VITC	PP	A/CO <sub>2</sub>	1,78	0,896	4	0,54	3 Std.
98	1000(P23)	5%	FGF/VITC	PP	A/CO <sub>2</sub>	induziert	2	-	3 Std.	
99	1000(P23)	5%	FGF/VITC/ HEPES	PE	A/N <sub>2</sub>	2,56	1,20	4	0,47	3 Std.
100	1000(P24)	5%	FGF/VITC	PC/DC.Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,45	2,45	4	1,69	3 Std.
101	1000(P24)	5%/10%	FGF/VITC/ Meth	PC/DC.Sil	A/CO <sub>2</sub>	1,45	1,92 (2,38)	4	1,32 (1,64)	3 Std.

