



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1004599A5

NUMERO DE DEPOT : 09000954

Classif. Internat. : B01D

Date de délivrance le : 22 Décembre 1992

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 10 Octobre 1990 à 15H15 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : MILLER Alain; DUBOIS Dominique
Parc de la Sablonnière 681/6, B-7000 MONS (BELGIQUE); Vieille rue du Moulin 301, B-1180
BRUXELLES (BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : VOSSWINKEL Philippe, BUREAU GEVERS S.A., Rue de Livourne 7 -
B 1050 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE ET DISPOSITIF DE SEPARATION DE PARTICULES A PARTIR D'UN MILIEU FLUIDE.

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 22 Décembre 1992
PAR DELEGATION SPECIALE :


MUYTS L
Directeur.

"Procédé et dispositif de séparation de particules à partir d'un milieu fluide"

La présente invention est relative à un procédé de séparation de cellules à partir d'un milieu de culture fluide, comprenant une immersion dans le milieu fluide d'un filtre présentant une enveloppe tubulaire capable de filtrer au moins une fraction desdites cellules, un entraînement de ce filtre dans un sens de rotation autour de son axe longitudinal, une séparation par filtration d'un filtrat à l'intérieur de l'enveloppe du filtre et d'un rétentat à l'extérieur de celle-ci, un soutirage du filtrat hors du filtre, et une agitation du milieu fluide, simultanément à la filtration. Elle concerne également un dispositif de séparation de cellules à partir d'un milieu de culture fluide, comprenant une cuve dans laquelle est contenue le milieu fluide, un moyen de filtration du milieu fluide sous la forme d'un filtre immergé dans ce dernier et présentant une enveloppe tubulaire filtrante, capable de filtrer au moins une fraction desdites cellules, des moyens pour entraîner en rotation ce filtre autour de son axe longitudinal, des moyens pour soutirer hors du filtre un filtrat parvenu à l'intérieur de l'enveloppe tubulaire filtrante, et un moyen d'agitation du milieu fluide, capable de fonctionner simultanément au moyen de filtration.

L'invention concerne en particulier l'agitation des fluides utilisés dans les procédés fermentatifs en bioréacteur, et la rétention d'une biomasse à l'intérieur du bioréacteur. Elle permet notamment de concentrer la biomasse à l'intérieur du bioréacteur tout en maintenant un mélange continu et efficace du fluide.

Par cellules, on entend les cellules elles-mêmes (micro-organismes, cellules animales ou végétales, isolées ou associées), ou une matrice servant de support aux cellules (notamment supports macroscopiques, microsupports pleins ou creux, billes de carraghénane ou d'alginate, matrices d'encapsulation, particules servant de substrat

nutritif auxquelles les cellules sont associées).

Par séparation de cellules, on entend, au départ d'un fluide contenant des cellules au sens de l'invention en suspension ou mises en suspension par une agitation, l'obtention de deux fluides
5 qui puissent être récoltés séparément, l'un contenant des cellules et l'autre pas ou encore l'un différant de l'autre par la taille et/ou la concentration des cellules qu'il contient en suspension.

L'invention concerne plus particulièrement les étapes de culture et de concentration de cellules animales en bio-
10 réacteur, pour la production de différents types de matériaux biologiques. Comme exemples de tels matériaux issus de la culture de cellules, on peut citer les cellules elles-mêmes, les composants cellulaires, les virus ou protéines virales, les vaccins viraux ou bactériens, les anticorps monoclonaux, les protéines résultant de la manipulation
15 du génome des cellules. Vu la demande importante et croissante pour de tels produits en médecine humaine ou vétérinaire et en biologie moléculaire, l'invention sera décrite ci-après en référence à la culture de cellules animales.

Un bioréacteur est une enceinte dans laquelle les
20 cellules sont soumises à un environnement qui puisse être contrôlé, et qui correspond aux exigences physiologiques des cellules : les paramètres contrôlés sont par exemple la température, l'apport d'agents nutritifs, le retrait de produits du métabolisme, l'oxygénation du milieu de culture, l'équilibre acido-basique, l'équilibre d'oxydo-
25 réduction, la turbulence et les forces de cisaillement, la concentration cellulaire.

Chacun de ces paramètres dépend du système d'agi-

tation du milieu, ainsi que du système d'introduction de milieu de culture dans la cuve, ou de retrait de milieu usagé hors de la cuve. Il en résulte que l'agitation du fluide et le renouvellement du fluide sont deux opérations majeures pour le succès de la culture des cellules.

5 Vu la grande sensibilité des cellules aux variations de leur environnement, il est souhaitable, dans un processus de production de matériaux biologiques, que les cellules soient maintenues un maximum de temps à l'intérieur du bioréacteur.

10 On connaît des dispositifs de culture de cellules animales en cuve agitée dans lesquels des cellules isolées ou des supports d'ancrage pour les cellules sont mis en suspension. Selon les méthodes classiques en usage dans ces dispositifs, l'agitation est réalisée par un mobile d'agitation immergé dans le fluide, et le mobile est mis en mouvement par un moteur, ou contient un barreau
15 magnétique mis en mouvement par un agitateur magnétique (cuves de petit volume) (A. PROKOP et cons., Bioreactor for Mammalian Cell Culture, dans FIECHTER A., Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 39, p. 29-71, Springer-Verlag, Berlin, 1989). L'ensemble des pièces en contact avec la culture est stérilisé avant
20 inoculation, et doit demeurer stérile pendant la culture.

Les performances attendues du système d'agitation sont notamment le maintien en suspension de la biomasse, l'homogénéisation des concentrations dans le fluide, le contact entre phases (gaz-liquide-biomasse), l'aération du milieu de culture.

25 De tels dispositifs ne permettent toutefois pas une séparation entre la biomasse et le liquide usé, dans la cuve elle-même. Ces étapes de séparation sont toutefois indispensables, aussi bien dans les procédés qui visent à la production des cellules que dans les procédés qui visent à la production, par les cellules, de
30 substances solubles. Dans un procédé de culture d'un lot de cellules dans un bioréacteur, après la phase de culture cellulaire, les volumes liquides à traiter sont très importants par rapport au poids récolté de biomasse concentrée. Typiquement, il faut centrifuger 10 litres d'un milieu de culture contenant 1,6 millions de cellules animales
35 par millilitre de milieu, pour récolter seulement 50 grammes de

cellules (poids du culot mouillé). Ces étapes de centrifugation (ou microfiltration) rendues nécessaires pour la séparation des particules, demandent des investissements, de la main-d'oeuvre et le respect de consignes de sécurité.

5 Dans les cas où la production de biomasse constitue le but visé par le procédé, ces étapes, pratiquées en dehors du bioréacteur, altèrent la qualité des cellules récoltées, et sont susceptibles d'augmenter la variation de qualité d'un lot à l'autre. Or, le maintien de la qualité des cellules récoltées est au contraire particulièrement
10 important dans la production en masse de cellules animales destinées à l'étude structurelle ou à l'étude de l'activité fonctionnelle de constituants cellulaires.

 Dans les cas de culture cellulaire pour la culture d'organismes pathogènes (par exemple production de vaccins viraux),
15 les risques infectieux encourus par le personnel sont liés au nombre d'étapes nécessaires en aval des bioréacteurs. Par ailleurs, la concentration des cellules à l'intérieur du bioréacteur est appréciée dans la production de virus, à l'étape d'inoculation des cellules par le virus, car l'inoculum viral n'est pas dilué dans un grand volume de
20 milieu liquide.

 Dans les deux cas, le maintien de la stérilité de la ligne de production est rendu difficile par le volume des effluents de bioréacteur à traiter.

25 La concentration substantielle des cellules à l'intérieur même du bioréacteur constitue pour ces raisons une diminution appréciable des coûts d'investissements et opératoires des premières étapes en aval du bioréacteur, une amélioration de la sécurité de la séparation des particules, une amélioration de la qualité des cellules récoltées, et une réduction de la durée totale du processus.

30 On a alors mis au point, pour la culture en continu de cellules, des cuves contenant un filtre en rotation autour d'un axe. Ce filtre sert usuellement à isoler au sein du bioréacteur un compartiment essentiellement dépourvu de cellules et dans lequel un ou plusieurs tubes fixes sont introduits, pour pomper le milieu
35 liquide hors du bioréacteur (v. entre autres S. REUVENY et cons.,

Comparison of cell propagation methods....., Journal of Immunological Methods, 86, 1986, p. 61-69; P.S. THAYER, Spin Filter Device for Suspension Cultures, dans KRUSE P.F. et cons., Tissue Culture Methods and Applications, Academic Press, 1973, p. 345-351). Dans ces dispositifs toutefois l'agitation du milieu de culture résulte uniquement de la turbulence provoquée par la rotation du filtre, ce qui est insuffisant ou inapproprié dans beaucoup de circonstances.

On a aussi réalisé des dispositifs dans lesquels la croissance et l'agitation du milieu de culture ont lieu dans une cuve principale et la filtration du milieu de culture dans une cuve auxiliaire (v. W.R. TOLBERT et cons., Perfusion culture systems for production of mammalian cell biomolecules, dans J. FEDER et cons., Large-scale mammalian cell culture, Academic Press, 1985, p. 97-119). Un tel agencement s'avère particulièrement coûteux, et présente les inconvénients précités qui sont inhérents à tous les dispositifs où la séparation doit avoir lieu en aval de la cuve de culture.

On a aussi développé un procédé et un dispositif tels que décrits au début (v. entre autres brevet US-A-4.166.768; P. HIMMELFARB et cons., Spin Filter Culture..., Science, vol. 164, p. 555-557; G.C. AVGERINOS et cons., Spin Filter Perfusion..., Bio/Technology, vol. 8, 1990, p. 54-58). Ces dispositifs sont utilisés dans la culture continue en perfusion, pour maintenir les cellules dans le bioréacteur et augmenter la concentration cellulaire en cours de culture continue. Ils ne sont cependant pas utilisés pour concentrer les cellules dans le bioréacteur à la fin d'une culture par lot. En réalité les filtres rotatifs sont placés au-dessus du mobile d'agitation, constitué d'un barreau magnétique dans les petites cuves ou d'un mobile de pompage dans les grandes cuves. Or, il n'est pas possible d'abaisser le niveau liquide dans le bioréacteur en dessous du niveau inférieur du filtre rotatif, et celui-ci est relativement élevé dans la cuve étant donné la présence de l'agitateur sous-jacent. La présence du filtre, reportant le mobile d'agitation vers le bas, nuit à l'efficacité de pompage de celui-ci. L'agitation du milieu de culture dans toute la cuve depuis une zone localisée au fond de celle-ci se heurte à

la sensibilité des cellules aux forces de cisaillement.

La présente invention a pour but de mettre au point un procédé et un dispositif de séparation de cellules qui ne présentent pas les inconvénients des procédés et dispositifs selon l'état de la technique. Elle doit tout particulièrement permettre de procéder à la séparation de cellules en remédiant aux difficultés d'agitation rencontrées avec les moyens actuels. Avantageusement, ce procédé doit pouvoir s'appliquer aux divers modes de culture existants, traditionnellement classés selon l'évolution des apports et retraits de milieu au bioréacteur. Dans le but de montrer l'étendue des applications du procédé et du dispositif selon l'invention on peut décrire ci-après ces divers modes de culture.

1. - Dans la culture par lot, les agents nutritifs sont apportés par le milieu de culture présent lors de l'inoculation, la culture évoluant ensuite sans apport ni retrait substantiel de milieu de culture, et ce jusqu'à la fin de la culture du lot. Le volume de la culture est constant.

2. - Dans la culture par lot alimenté, il y a un apport continu ou discontinu de milieu de culture au bioréacteur, sans retrait substantiel de liquide du bioréacteur. Le volume de la culture est croissant.

3. - Dans la culture continue, il y a un apport de milieu de culture conjointement à un retrait de liquide de la culture. Le volume de la culture est généralement maintenu constant. Lorsqu'on réalise, en particulier, un retrait de milieu de culture du bioréacteur en y associant un procédé de séparation des cellules, lequel retient les cellules dans le bioréacteur ou renvoie les cellules au bioréacteur, la culture continue est dite en perfusion. Il en résulte un accroissement de la concentration cellulaire dans le bioréacteur.

Pour résoudre ces problèmes, on prévoit un procédé de séparation tel que décrit au début, ce procédé comprenant une agitation du milieu fluide depuis une zone de celui-ci qui est située à la périphérie de l'enveloppe tubulaire filtrante. Avantageusement, on prévoit une immersion du filtre jusqu'au bas du milieu fluide agité de manière à obtenir une filtration sur toute la hauteur du milieu fluide. Suivant un mode particulier du procédé suivant l'invention,

ladite zone, depuis laquelle s'effectue l'agitation du milieu fluide, est située le long de la totalité de la hauteur de l'enveloppe tubulaire filtrante immergée. Suivant un mode préféré de réalisation de l'invention, l'agitation produit une circulation tangentielle du milieu fluide sur la hauteur de l'enveloppe tubulaire filtrante immergée. Suivant l'invention l'agitation peut produire un transfert simultané d'au moins un gaz, présent au-dessus du milieu fluide, à l'intérieur de ce dernier et une distribution de ce ou ces gaz dans le milieu fluide.

On prévoit également, suivant l'invention, un dispositif de séparation tel que décrit au début, ce dispositif comprenant un moyen d'agitation du milieu fluide, agencé autour de l'enveloppe tubulaire filtrante du filtre. Suivant une forme de réalisation avantageuse de l'invention, le moyen d'agitation est un ruban hélicoïdal disposé autour de l'enveloppe tubulaire filtrante, éventuellement sur toute la hauteur de celle-ci. Suivant une forme de réalisation préférée de l'invention, le ruban hélicoïdal est fixé par endroits sur l'enveloppe tubulaire filtrante, avec un bord interne du ruban situé à une faible distance de ladite enveloppe, notamment de l'ordre de 0,5 à 5 mm. Suivant l'invention, le ruban hélicoïdal peut en particulier être disposé de manière à pouvoir émerger partiellement au-dessus du milieu fluide. Suivant une autre forme de réalisation de l'invention, le moyen d'agitation est formé de pales entraînées en rotation autour de l'enveloppe tubulaire filtrante susdite. Très avantageusement, le filtre est immergé jusqu'à une faible distance du fond de la cuve, notamment de l'ordre de 1 cm.

D'autres détails et particularités de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après, à titre non limitatif et avec référence aux dessins annexés.

La figure 1 représente, d'une manière schématique, une vue en coupe d'un dispositif suivant l'invention.

La figure 2 représente une vue en coupe d'un mécanisme d'entraînement du filtre rotatif et du moyen d'agitation, dans une variante de réalisation d'un dispositif suivant l'invention.

La figure 3 représente, d'une manière schématique, une vue en coupe d'encore une autre forme de réalisation de dispo-

sitif suivant l'invention.

La figure 4 représente une vue de détail d'un support de filtre dans un dispositif suivant l'invention.

La figure 5 représente une vue en section suivant la ligne V-V de la figure 1.

Dans les différentes figures, les éléments identiques portent les mêmes références.

Ainsi qu'il ressort de la figure 1, le dispositif illustré comprend une cuve 1 dans laquelle est contenue un milieu de culture fluide 2. Cette cuve 1 est fermée à son extrémité supérieure par une plaque de fermeture 3. Celle-ci supporte un moteur 4 qui, en service, entraîne en rotation un arbre de sortie 5 dans le sens de rotation désigné par la flèche F1. Sur cet arbre est montée un filtre rotatif 6. Celui-ci comprend une bride de support supérieure 7 et une bride de support inférieure 8 qui sont montées sur l'arbre 5 de manière à être entraînées en rotation par ce dernier. Entre les deux brides 7 et 8 est tendue une enveloppe filtrante 9 sous la forme d'un treillis cylindrique. Le filtre peut être constitué d'un treillis d'acier inoxydable de finesse nominale et absolue connues. Alternativement, le treillis peut être constitué de céramique poreuse ou d'un polymère synthétique de bonne compatibilité biologique et résistant à la stérilisation, notamment du Nylon, de l'éthylène-tétrafluoroéthylène (ETFE).

Le treillis est refermé sur lui-même pour adopter la forme d'un cylindre à axe vertical, et il est donc solidaire de l'arbre de rotation 5 du moteur 4 disposé en haut de la cuve.

Les performances de séparation particulière du treillis sont exprimées par la taille des cellules retenues dans un test fonctionnel (diamètre nominal de séparation), plutôt que par le diamètre des espaces ménagés entre les mailles du treillis. En effet, les espaces ménagés par le treillis n'ont pas nécessairement une forme circulaire.

Le choix de la finesse de la maille du filtre rotatif est un compromis entre le diamètre des cellules à retenir et les conditions opératoires dans lesquelles la séparation aura lieu.

En effet, le diamètre des cellules retenues par

le filtre rotatif en rotation dépend du diamètre nominal de séparation du treillis, de sa vitesse tangentielle, du débit éventuel de fluide au travers du treillis, de la configuration du système d'agitation (forme du treillis, relations géométriques entre le moyen d'agitation et le treillis), de l'apparition d'un salissement (tendance des milieux biologiques à former des dépôts sur les surfaces et à obturer les orifices de faible diamètre), et des interactions existant entre les cellules en suspension et le treillis ou les substances y déposées (notamment interactions hydrophobes, électrostatiques, électrocinétiques).

En conséquence, le filtre rotatif pourra éventuellement être équipé d'un treillis présentant un diamètre nominal de séparation supérieur à la taille des cellules à séparer, car le diamètre de coupure effectif du treillis en rotation est supérieur au diamètre de coupure déterminé par un test fonctionnel sur treillis statique.

Suivant l'invention, le moyen d'agitation est disposé autour de l'enveloppe filtrante, c'est-à-dire à la même hauteur que l'enveloppe filtrante, ce qui permet d'améliorer les fonctions d'agitation et de filtration, comme décrit ci-après. La taille des deux éléments peut être telle qu'ils s'étendent sur la majeure partie de la hauteur de la phase contenant les cellules, et ils peuvent exercer une fonction d'agitation et de filtration sur la plus grande partie de cette phase.

Dans l'exemple de réalisation illustré sur la figure 1, le moyen d'agitation est constitué d'un ruban hélicoïdal 10, disposé autour de l'enveloppe filtrante 9 en forme de treillis cylindrique.

Dans cet exemple, le ruban hélicoïdal est fixé d'une manière appropriée quelconque à l'une de ses extrémités 12 à la bride de support supérieure 7 du filtre et à l'autre extrémité 13 à la bride de support inférieure 8 du filtre.

Par sa mise en rotation au moyen d'un moteur disposé au-dessus, ou éventuellement aussi en dessous de la cuve, cet agitateur assure un pompage du fluide particulièrement efficace, avec génération d'un champ de turbulence minimal dans le fluide.

Lorsqu'il s'agit d'agiter des cellules sensibles aux forces de cisaillement, les différentes fonctions d'agitation décrites plus haut (maintien en suspension, homogénéisation, contact entre phases, aération) sont le mieux rencontrées par un type d'agitateur qui réalise
5 un pompage maximal pour une turbulence minimale. Dans les cuves agitées de la sorte, les filets de courant liquide 11 (Fig. 1) décrivent une trajectoire globalement verticale sur toute la hauteur de la cuve; plus particulièrement, le liquide est pompé vers le bas par le moyen d'agitation 10 et il remonte le long des parois de la cuve,
10 pour être pompé de nouveau dans le moyen d'agitation. Une telle circulation dans l'axe vertical de la cuve définit un agitateur de type axial.

Parmi les agitateurs de type axial, le ruban hélicoïdal et la vis d'Archimède exercent un pompage plus important
15 qu'une hélice marine ou une turbine à pales inclinées. Dans le cas d'un fonctionnement en régime turbulent, ce type de mobile procure également une plus grande homogénéité du champ de turbulence, qu'un agitateur de type radial. Typiquement, le ruban hélicoïdal 10, disposé verticalement de manière à entourer le treillis cylindrique
20 9, est immergé jusqu'au fond de la cuve, et il assure le pompage du fluide vers le bas.

Le matériau choisi pour la réalisation du moyen d'agitation devra répondre aux exigences du processus, et présentera en particulier une bonne résistance mécanique, une bonne compatibilité
25 biologique, une résistance aux conditions de stérilisation (stérilisation thermique en autoclave ou in situ). On peut citer notamment les polymères de synthèse, l'acier inoxydable, les matériaux composites formés de résines époxy renforcées de fibres de carbone, d'aramide ou de verre.

Lorsque le transfert de gaz de la surface vers le liquide est un paramètre important, il est préférable que la partie supérieure 12 du ruban hélicoïdal 10 soit émergée du milieu fluide 2, de façon que le pompage vers le bas augmente le coefficient de transfert des gaz vers la phase liquide. C'est en particulier le
35 cas dans la culture de cellules animales en bioréacteur, où l'oxygène

est apporté aux cellules au départ de la surface du liquide, ou au départ de fins tubes immergés perméables aux gaz. Dans ces deux modes d'aération, il est préférable que le système d'agitation assure un débit de pompage important, sans toutefois créer un régime turbulent. L'apport d'oxygène aux cellules est un facteur critique, vu la très faible solubilité de l'oxygène dans les milieux aqueux, la sensibilité des cellules aux variations d'oxygène dissous, et la sensibilité des cellules aux effets de cisaillement créés par les bulles de gaz.

Le dispositif illustré comprend en outre un tube fixe d'aspiration 25 qui débouche à l'intérieur du filtre 6, à un niveau proche du fond de la cuve, et qui est donc capable de soutirer du filtrat parvenu à l'intérieur du filtre. Le dispositif comprend également un tube fixe d'aspiration 26 qui débouche au fond de la cuve 1 et à l'extérieur du filtre 6, et qui est capable de soutirer du rétentat. Un tube d'introduction de milieu fluide frais 28 peut aussi être prévu pour alimenter le rétentat retenu dans la cuve 1 à l'extérieur du filtre 6.

Suivant l'exemple de réalisation illustré sur la figure 2, le filtre 6 représenté partiellement et de manière schématique et le moyen d'agitation non représenté ne sont pas solidaires l'un de l'autre. L'arbre de sortie 5 porte un mécanisme d'accouplement 14 du type présentant des planétaires 17 et 18, qui pivotent autour de l'axe longitudinal de l'arbre 5, et des satellites 15 et 16 qui pivotent autour de l'axe de bouts d'arbre 20, supportés d'une manière quelconque par exemple par la plaque de fermeture de la cuve. Le planétaire 17 est entraîné en rotation dans le sens F1 par l'arbre de sortie 5 et, par l'intermédiaire des satellites 15 et 16, il entraîne en rotation dans le sens opposé F2 le planétaire 18 et l'arbre 19. L'arbre 19 est, dans l'exemple illustré, coaxial à l'arbre 5 et ils tournent chacun en sens opposés. Le filtre 6 est supporté par le planétaire 18 et tourne dans le sens F2. Par contre, le moyen d'agitation, par exemple un ruban hélicoïdal, peut être fixé à l'arbre 5 par une bride de support non représentée, du type de la bride 8 sur la figure 1. Il tourne alors dans le sens F1.

Il est évident qu'on peut aussi prévoir un mécanisme d'accouplement réducteur ou multiplicateur permettant d'entraîner le filtre et le moyen d'agitation à des vitesses différentes.

On peut d'ailleurs aussi dans toutes les formes de réalisation suivant l'invention prévoir de modifier la vitesse de rotation du filtre en fonction de conditions préétablies.

Suivant l'exemple de réalisation illustré sur la figure 3, le dispositif suivant l'invention comprend un agitateur de type radial, constitué par exemple d'un ou de plusieurs disques 21 portant à leur périphérie des pales droites 22. Ces disques sont montés de manière à être entraînés en rotation par l'arbre de sortie 5 du moteur 4. Dans l'exemple de réalisation illustré, le disque 21 est supporté sur la bride de support inférieure 8 par des tiges de soutien 23 agencées verticalement autour du filtre 6. Il est évident que d'autres modes de fixation des disques peuvent être envisagés, par exemple à travers l'enveloppe filtrante 9.

On utilise en particulier un tel dispositif, lorsqu'on souhaite obtenir une plus grande turbulence dans le fluide. Dans ce type de dispositif, les filets de courant liquide 24 quittent l'agitateur de manière radiale vers la paroi de la cuve 1, et ils se divisent en deux parties : l'une, supérieure remonte le long de la paroi, puis est pompée dans l'agitateur, l'autre, inférieure, descend le long de la paroi vers le fond de la cuve, puis est pompée dans l'agitateur. Lorsque l'on souhaite faire fonctionner le dispositif dans des cuves à niveau liquide de hauteur variable, il est utile que le disque 21 situé le plus bas soit proche du fond de cuve.

Les dispositifs qui viennent d'être décrits peuvent être mis en oeuvre en particulier, bien que non exclusivement, dans une culture de cellules animales dans un milieu de culture approprié.

Tout en maintenant la turbulence à une valeur minimale, le dispositif suivant l'invention permet une agitation efficace du milieu de culture dans les divers modes de culture décrits précédemment.

Le procédé permet de concentrer les cellules en

fin d'une culture de lot, tout en les maintenant dans l'environnement physiologique adéquat et contrôlé présent dans le bioréacteur. Les volumes liquides à traiter pour récolter les cellules sont fortement réduits. Ce procédé de concentration est rendu possible par l'utilisation d'un dispositif de séparation dont l'élément filtrant peut descendre jusqu'en bas de cuve.

Par un retrait continu ou intermittent de milieu usagé essentiellement dépourvu de cellules, le dispositif suivant l'invention permet une culture continue à haute concentration cellulaire.

Les diverses fonctions que sont l'agitation, le retrait de fluide usagé, et la concentration des cellules in situ, peuvent être exercées dans des cuves partiellement remplies, ou dans des cuves pour lesquelles la hauteur du niveau du liquide peut varier en cours de culture.

Un exemple de réalisation tout particulier de dispositif suivant l'invention, du type illustré sur la figure 1, va à présent être décrit.

L'enveloppe filtrante 9 est constituée d'un treillis de fils d'acier inoxydable tressés, de type Twilled Dutch Weave (Haver & Boecker, R.F. Allemagne). Le treillis choisi a une finesse nominale de 10 micromètres, et une finesse absolue de 15 à 18 micromètres. Selon le type de cellules à séparer, la finesse du filtre à choisir pourra être très différente, par exemple comprise entre 0,5 micromètres et 1 centimètre, mais en général elle est comprise entre 5 micromètres et 200 micromètres.

Dans le cas des cellules animales en suspension, le diamètre moyen de celles-ci est typiquement de 13 micromètres. On peut choisir un treillis présentant un diamètre nominal de séparation supérieur à la taille des cellules à séparer, car le diamètre de coupure effectif du filtre rotatif est supérieur au diamètre de coupure déterminé sur le treillis dans des conditions statiques.

Le treillis est refermé sur lui-même pour adopter la forme d'un cylindre à axe vertical (diamètre variable de 3 centimètres à plusieurs mètres, selon les dimensions de la cuve, typiquement de 4 à 8 cm pour une cuve de 15 litres avec une hauteur de 44 cm

et un diamètre intérieur de 22 cm), et il est fixé à un support d'acier inoxydable par soudure au laser.

Un type de support est représenté plus particulièrement sur la figure 4, dans laquelle le treillis n'a pas été dessiné,
5 pour des raisons de clarté du dessin.

Le treillis est soigneusement soudé à sa base inférieure sur la bride 8 de manière à ne pas ménager d'espace entre support et treillis. La bride 8 possède une tige centrale 27 qui, par un alésage axial taraudé, assure la fixation à l'extrémité filetée
10 de l'arbre de rotation 5, et qui prolonge cet arbre de manière à positionner le moyen d'agitation 10 en bas de cuve. Sur la bride 8 est soudé un tube de support 31 en acier inoxydable de même diamètre, très largement ajouré. Le treillis épouse la forme cylindrique du tube ajouré 31, et le bord supérieur du treillis est soudé à l'extrémité
15 supérieure du tube. Alternativement, le bord supérieur du treillis peut être soudé à une bride supérieure, comme illustré sur la figure 1.

Le filtre rotatif ainsi décrit est fermé à sa base, il comporte un treillis sur toute sa hauteur, et il est ouvert à son
20 sommet. La bride 8 qui forme la base du filtre peut être également ajourée et supporter un treillis horizontal. Dans ce cas, le filtre comporte un treillis plan à sa base et un treillis cylindrique sur toute sa hauteur.

Un ou plusieurs tubes fixes 25 (par exemple de
25 6 millimètres de diamètre extérieur) sont disposés verticalement dans l'espace intérieur du filtre, et leur extrémité est proche du bas de celui-ci. Ces tubes permettent de soutirer le fluide ayant franchi l'élément filtrant, ou d'introduire divers fluides, ou encore d'appliquer des conditions particulières de traitement du filtrat.
30 Il sont fixés à la plaque de fermeture 3 (figure 1). Alternativement des tubes peuvent être maintenus solidaires d'une plaque intermédiaire horizontale en acier inoxydable 32, qui prend appui sur des parties non représentées du bioréacteur, et les tubes sont connectés à la plaque de fermeture 3.

35 La section horizontale du treillis décrit ici est

un cercle simple, mais elle peut être modifiée notamment en cercle festonné, dans le but d'augmenter localement la turbulence.

Dans une cuve de 15 litres de volume total (hauteur 44 cm, diamètre intérieur 22 cm), utilisée à 9 litres, l'élément filtrant présente typiquement les dimensions suivantes :

hauteur du cylindre filtrant : 250 mm

diamètre du cylindre filtrant : 60 mm

hauteur de la partie immergée du cylindre
filtrant : 220 mm

surface immergée du treillis : 415 cm^2

élévation du filtre par rapport au fond de la cuve :
1 cm. Cette distance (désignée par la référence
D sur la figure 1) permet par exemple le passage
d'un tube de vidange de la cuve.

Le moyen d'agitation est constitué d'un ruban hélicoïdal 10 disposé autour du treillis cylindrique, et parcourant toute sa hauteur. Le ruban hélicoïdal est composé de résine époxy modifiée (Fibredux 914, Ciba-Geigy, Suisse) préimprégnée de fibres unidirectionnelles de carbone (High tensile Carbon T300). Pour sa réalisation, on peut envisager par exemple que des rubans de Fibredux 914 soient coupés et disposés sur un moule de Duralumin taillé au tour, et chauffés sous pression de manière à former un matériau composite renforcé présentant les caractéristiques suivantes :

- haute résistance mécanique (résistance au cisaillement interlaminaire ILSS = 80-90 MN/m² à 37°C; résistance à la rupture par flexion, longitudinale (0°) UFS = 1700 MN/m²; module de flexion FM = 125 GN/m²; résistance à la rupture par flexion, transversale (90°) TFS = 95 MN/m²; module de flexion transversal TFM = 7,5 GN/m²)
- résistance à la stérilisation thermique (121 °C, 1,5 bar, vapeur

d'eau, 30 minutes)

- compatibilité biologique avec les cellules animales et présentant les dimensions suivantes :

hauteur du ruban hélicoïdal : 250 mm

pas du ruban hélicoïdal : 140 mm

largeur du ruban hélicoïdal : 42 mm

diamètre interne : 61 mm, diamètre externe : 145 mm

épaisseur du ruban hélicoïdal : $\pm 0,9$ mm

Le bord supérieur et/ou inférieur du ruban hélicoïdal est rendu solidaire du filtre rotatif par une ou deux pièces métalliques amovibles 29 et/ou 30, fixées à la partie supérieure et/ou inférieure du filtre rotatif.

Il est utile de maintenir cette unité d'agitation et de filtration en constante rotation, de manière à diminuer l'apparition d'éventuels dépôts et le salissement du treillis. Ceci est particulièrement le cas dans les fluides biologiques qui sont fortement chargés en substances dissoutes (protéines, lipides, molécules d'ADN) et en particules susceptibles de colmater le treillis.

L'unité d'agitation et de filtration empêche ou retarde l'apparition éventuelle d'un salissement dans les fluides très chargés, en tirant parti des facteurs suivants :

1. La disposition du moyen d'agitation autour du treillis augmente la turbulence locale à l'endroit du treillis. Au contraire, la turbulence régnant au niveau des filtres rotatifs usuels est faible, car le moyen d'agitation est disposé au-dessous du filtre rotatif, et la circulation dans la cuve est essentiellement de type laminaire.
2. La distance de 0,5 à 5 mm, existant, suivant l'invention entre le filtre rotatif et le ruban hélicoïdal et désignée sur la figure 5 par la référence d, autorise une circulation tangentielle de liquide sur la hauteur du filtre rotatif. Cette disposition augmente la turbulence au niveau du filtre, et évite l'apparition de zones de faible circulation entre le filtre et le ruban hélicoïdal.
3. La configuration du treillis s'étendant du fond de la cuve jusqu'à la surface du liquide, donne une grande surface de filtration. Les filtres rotatifs usuels ont au contraire une hauteur réduite par rapport aux dimensions de la cuve.

Le choix d'un ruban hélicoïdal comme moyen d'agitation procure un pompage maximal : l'agitation réalisée peut être quantifiée par le coefficient de transfert volumique d'oxygène (paramètre $kL.a$). Dans une cuve de 15 litres remplie de 8 litres de liquide et aérée par la surface, la valeur de $kL.a$ obtenue avec

le dispositif suivant l'invention décrit, mis en rotation à 100 tours par min., est de 4,0/heure, contre une valeur de $\pm 0,5$ /heure obtenue avec une hélice marine classique prévue pour ce type de cuve.

5 L'efficacité de pompage peut encore être accrue par l'ajout d'un segment de tube fixe concentrique immergé, plus large que le moyen d'agitation et de moindre hauteur. Ce tube de guidage, connu en soi et non représenté, autorise l'entrée du fluide par son bord supérieur et la sortie du fluide de la zone de pompage, par son bord inférieur. Un tel tube de guidage autorise l'utilisation
10 du dispositif suivant l'invention pour l'agitation du milieu dans la culture en lots et dans les cultures continues. Un tel tube de guidage peut typiquement avoir un diamètre de 18 cm et une hauteur de 12 cm, pour une cuve dont la hauteur du niveau liquide est de 23 cm.

15 A titre d'exemple, on a mis en oeuvre le dispositif suivant l'invention qui vient d'être décrit pour la concentration de cellules cultivées en lot, en fin de culture. Il permet en une heure de ramener de 10 litres à 1 litre le volume d'une culture à 3 millions de cellules animales par millilitre, en soutirant le milieu filtré à
20 un débit de 150 millilitres par minute (filtrat). Utilisant une unité d'agitation et de filtration en rotation à 150 tours par minute, un diamètre nominal de coupure de 10 micromètres et des cellules ayant un mode de distribution des tailles de 13 micromètres, la concentration des cellules dans le filtrat est de trois ordres de grandeur
25 inférieure à la concentration dans le rétentat. Dans l'exemple cité, l'effluent contenant les cellules concentrées (rétentat) comporte un litre de cellules à 29,7 millions de cellules par millilitre.

Il doit être entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes et modes de réalisation décrits
30 ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir de son cadre.

On peut par exemple prévoir la mise en oeuvre du procédé suivant l'invention dans un milieu de culture de cellules accrochées sur un support mis en suspension, par exemple des micro-
35 billes, et une filtration des cellules détachées de leur support.

REVENDECATIONS

1. Procédé de séparation de cellules à partir d'un milieu de culture fluide, comprenant
- 5 une immersion dans le milieu fluide d'un filtre présentant une enveloppe tubulaire capable de filtrer au moins une fraction desdites cellules,
- un entraînement de ce filtre dans un sens de rotation autour de son axe longitudinal,
- 10 une séparation par filtration d'un filtrat à l'intérieur de l'enveloppe du filtre et d'un rétentat à l'extérieur de celle-ci, un soutirage du filtrat hors du filtre, et une agitation du milieu fluide, simultanément à la filtration,
- 15 caractérisé en ce qu'il comprend une agitation du milieu fluide depuis une zone de celui-ci qui est située à la périphérie de l'enveloppe tubulaire filtrante.
2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une immersion du filtre jusqu'au bas du milieu fluide agité de manière à obtenir une filtration sur toute la hauteur
- 20 du milieu fluide.
3. Procédé suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que ladite zone, depuis laquelle s'effectue l'agitation du milieu fluide, est située le long de la totalité de la hauteur de l'enveloppe tubulaire filtrante immergée.
- 25 4. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'agitation produit une circulation tangentielle du milieu fluide sur la hauteur de l'enveloppe tubulaire filtrante immergée.
5. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé
- 30 en ce que l'agitation produit un transfert simultané d'au moins un gaz, présent au-dessus du milieu fluide, à l'intérieur de ce dernier et une distribution de ce ou ces gaz dans le milieu fluide.
6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que, pour produire l'agitation, il comprend

un entraînement en rotation d'un moyen d'agitation agencé autour du filtre, dans un sens de rotation différent de celui du filtre.

5 7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que, pour produire l'agitation, il comprend un entraînement en rotation d'un moyen d'agitation agencé autour du filtre, dans le même sens de rotation que celui du filtre.

8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend une modification du niveau du milieu fluide pendant le procédé.

10 9. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend un apport de milieu fluide frais au milieu fluide en cours d'agitation et/ou de séparation.

15 10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend un entraînement du filtre en rotation à une vitesse variable.

20 11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend une culture d'un lot de cellules et, en fin ou en cours de culture du lot, la filtration du milieu agité, avec concentration des cellules dans le milieu de culture lui-même.

12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend une culture continue à une haute concentration cellulaire dans le rétentat.

25 13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend une culture de cellules accrochées sur un support mis en suspension, et une filtration des cellules détachées de leur support.

30 14. Dispositif de séparation de cellules à partir d'un milieu de culture fluide (2), comprenant une cuve (1) dans laquelle est contenue le milieu fluide,

35 un moyen de filtration (6) du milieu fluide sous la forme d'un filtre immergé dans ce dernier et présentant une enveloppe tubulaire filtrante (9), capable de filtrer au moins une fraction desdites cellules,

des moyens pour entraîner (4, 5, 15-18) ce filtre dans un sens de rotation (F1, F2) autour de son axe longitudinal, et

des moyens pour soutirer (25) hors du filtre un
5 filtrat parvenu à l'intérieur de l'enveloppe tubulaire filtrante (9), et

un moyen d'agitation (10, 21, 22) du milieu fluide, capable de fonctionner simultanément au moyen de filtration,

caractérisé en ce que le moyen d'agitation (10,
10 21, 22) du milieu fluide (2) est agencé autour de l'enveloppe tubulaire filtrante (9).

15 15. Dispositif suivant la revendication 14, caractérisé en ce que le moyen d'agitation est un ruban hélicoïdal (10) disposé autour de l'enveloppe tubulaire filtrante (9), éventuellement sur toute la hauteur de celle-ci.

16. Dispositif suivant la revendication 15, caractérisé en ce que le ruban hélicoïdal (10) est fixé par endroits sur l'enveloppe tubulaire filtrante (9), avec un bord interne du ruban situé à une faible distance (d) de ladite enveloppe, notamment de l'ordre
20 de 0,5 à 5 mm.

17. Dispositif suivant l'une des revendications 15 et 16, caractérisé en ce que le ruban hélicoïdal (10) est disposé de manière à pouvoir émerger partiellement au-dessus du milieu fluide (2).

18. Dispositif suivant la revendication 14, caractérisé en ce que le moyen d'agitation est formé de pales (21) entraînées en rotation autour de l'enveloppe tubulaire filtrante (9) susdite.

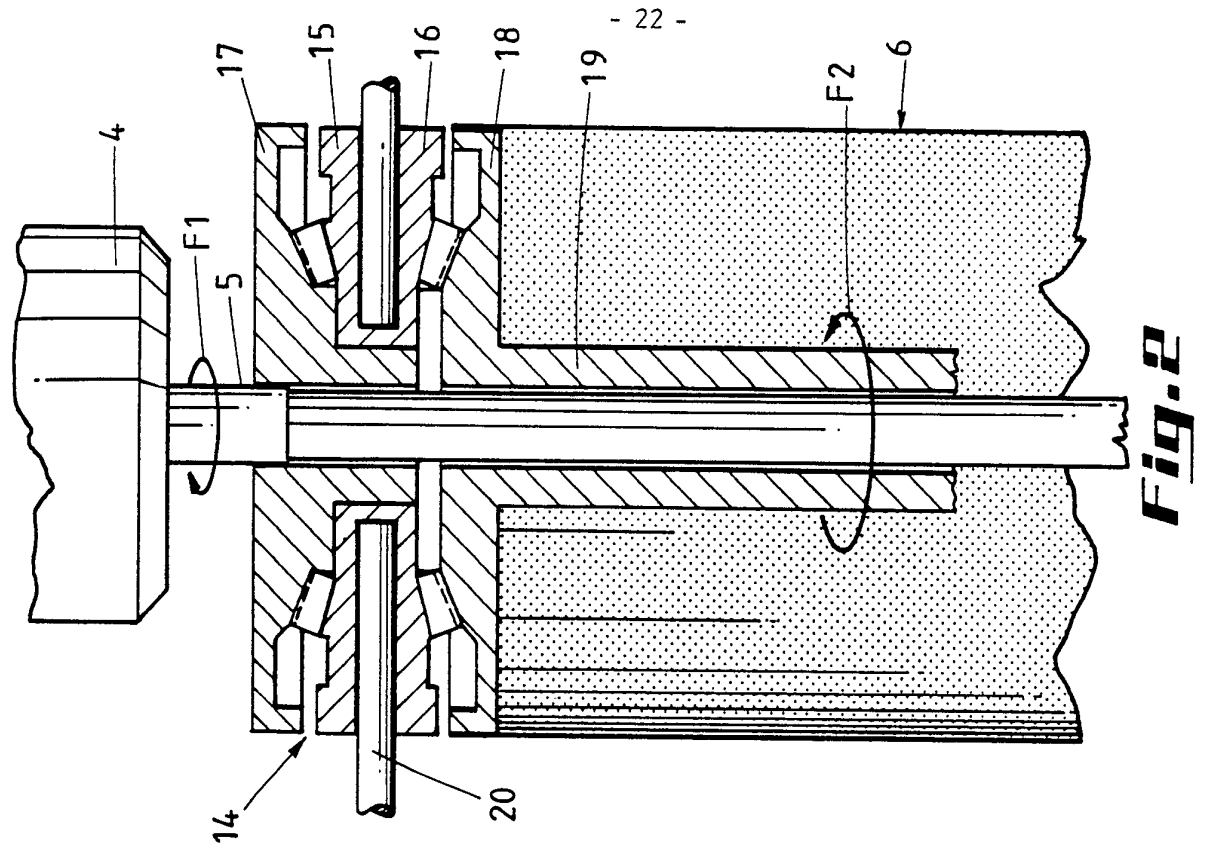
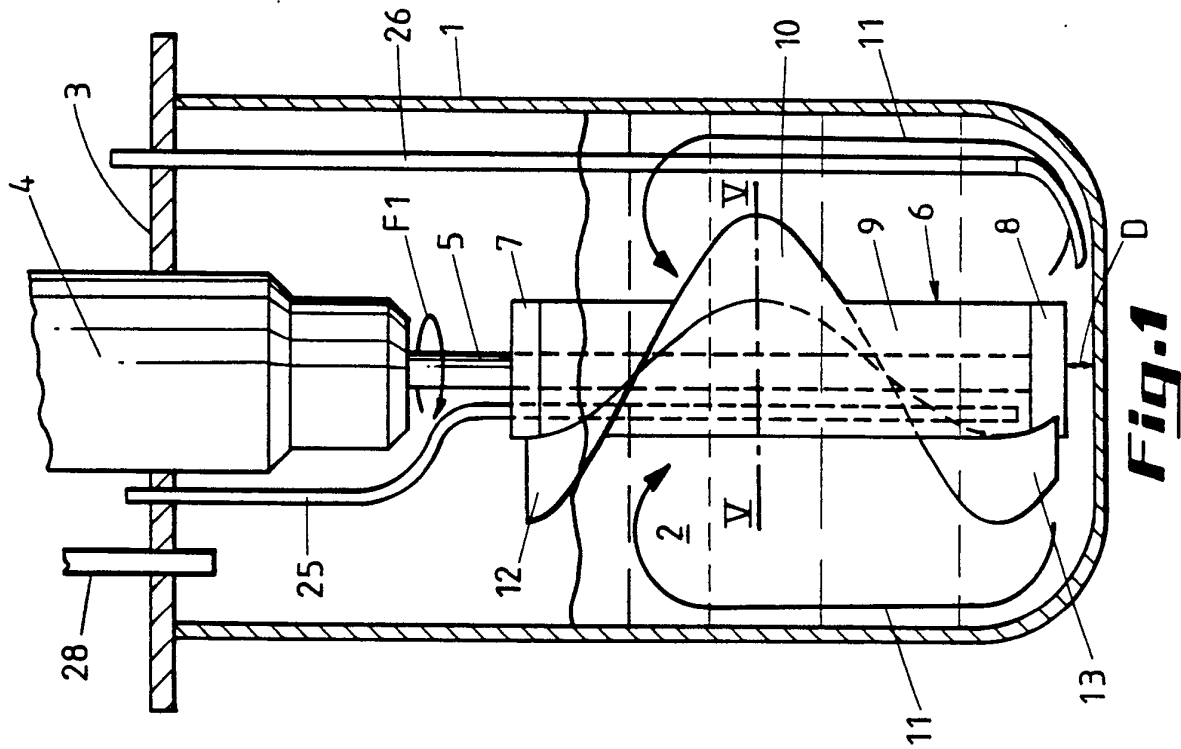
19. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que le filtre est immergé jusqu'à
30 une faible distance (D) du fond de la cuve (1), notamment de l'ordre de 1 cm.

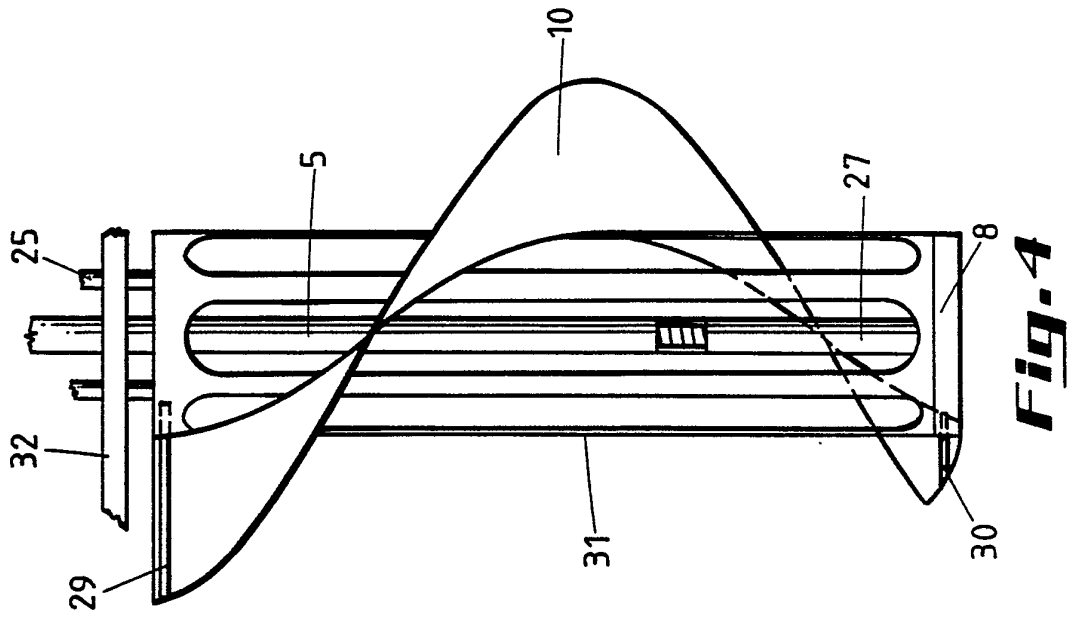
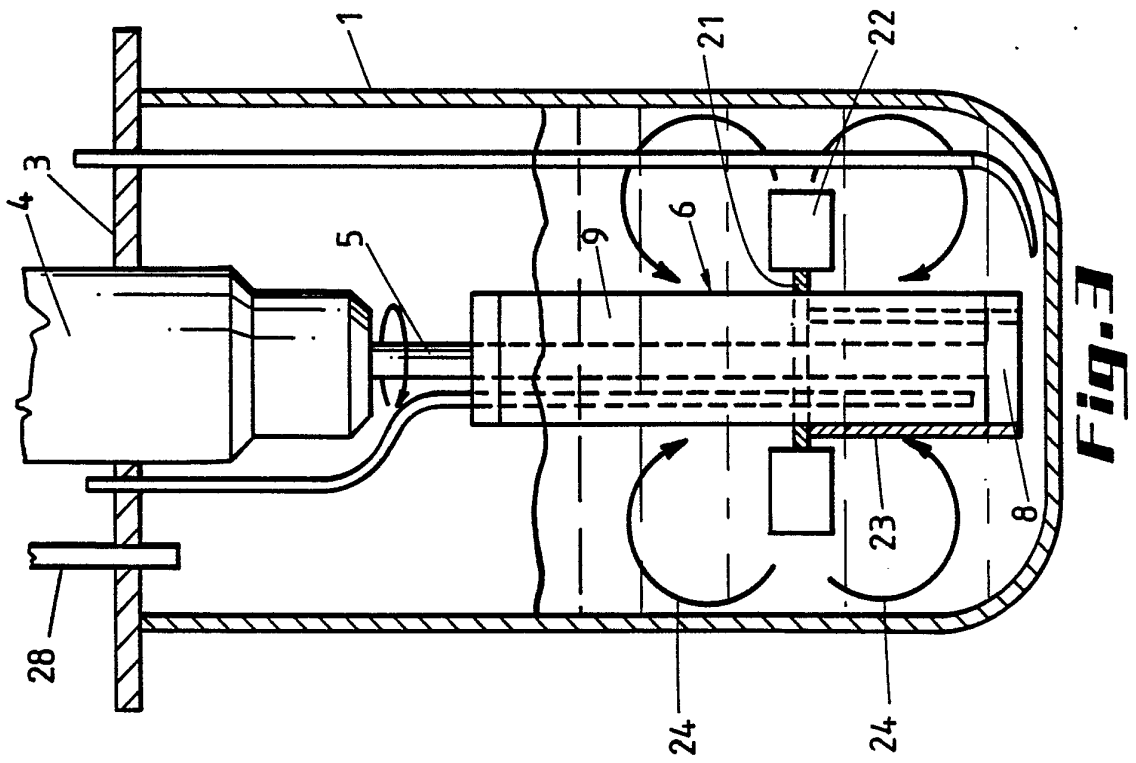
20. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens pour entraîner en rotation (4, 5, 15-20) le moyen d'agitation dans un sens
35 (F1) différent du sens de rotation (F2) du filtre.

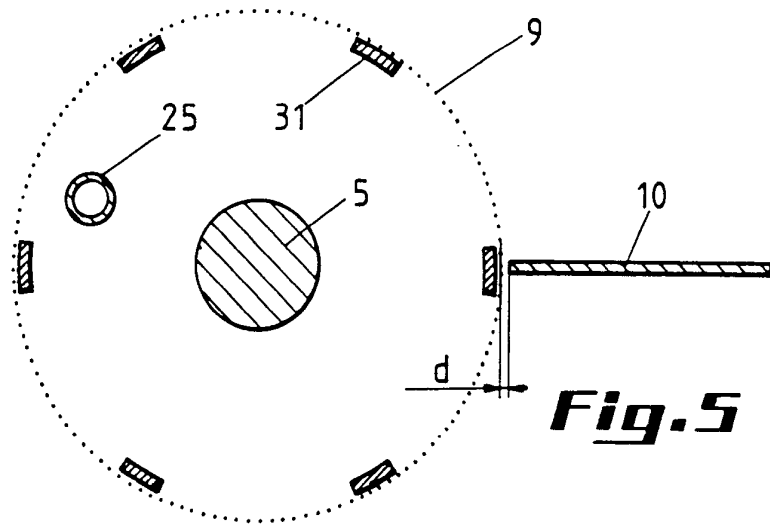
21. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens pour entraîner en rotation (4, 5) le moyen d'agitation dans le même sens que le sens de rotation (F1) du filtre.

5

22. Dispositif suivant l'une quelconque des revendications 14 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens pour entraîner en rotation (4, 5) le moyen d'agitation à une vitesse variable.



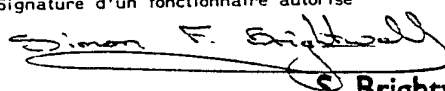




TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Rapport de recherche de type international
 établi en vertu de l'article 21 § 9
 de la loi belge sur les brevets d'invention
 du 28 mars 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		RÉFÉRENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE 4 OPRI/45/558	
Demande nationale belge n° 9000954		Date du dépôt 10 octobre 1990	
		Date de priorité revendiquée	
Déposant (nom) MILLER CLAIN			
Date de requête de la recherche de type international 12 décembre 1990		Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale. SN 17067 BE	
I, CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE(en cas de plusieurs symboles de la classification , les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Int.Cl. ⁵ : B 01 D 33/07, B 01 D 33/68			
II, DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification		Symboles de la classification	
Int.Cl. ⁵		B 01 D	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III, ☐ IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV, ☐ ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			

V. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Citation du document, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
X	US, A, 3262573 (A.H. SCHOTTE) 26 juillet 1966 voir colonne 2, lignes 43-72; colonnes 3-8 --	1-4,7,15, 19,22
X	GB, A, 1057015 (J. KASPAR) 1 février 1967 voir page 3, lignes 14,126; pages 4-6 --	1-4,7,15, 19,22
A	CH, A, 372284 (DEUTSCHE GOLD- UND SILBER-SCHEIDEANSTALT) 30 novembre 1963 voir figure 3 --	6,21
A	EP, A, 0164004 (KLASS G) 11 décembre 1985 voir figure 2 --	16-18
A	WO, A, 90/07968 (THE COCA-COLA CO.) 26 juillet 1990 voir page 3, lignes 5-18 -----	11-14
* Catégories spéciales de documents cités : A: document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent E: document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date L: document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) O: document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens P: document publié avant la date de dépôt international, mais postérieur à la date de priorité revendiquée T : document ultérieur cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention X: document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive Y: document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de la même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier &: document qui fait partie de la même famille de brevets		
VI. CERTIFICATION		
Date d'achèvement effectif de la recherche de type international 9 avril 1969		Date d'expédition du rapport de recherche de type international
Administration chargée de la recherche internationale		Signature d'un fonctionnaire autorisé  S. Brightwell

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL
RELATIF A LA DEMANDE NO.**

BE 9000954

SN 17067

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche de type internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 24/04/91
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A- 3262573		Aucun	
GB-A- 1057015		Aucun	
CH-A- 372284		Aucun	
EP-A- 0164004	11-12-85	DE-A- 3418701	21-11-85
		DE-A- 3433571	20-03-86
WO-A- 9007968	26-07-90	AU-A- 5046290	13-08-90

EPO FORM P0475

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82