

ROYAUME DE BELGIQUE

NUMERO DE PUBLICATION : 1016538A3

SPF ECONOMIE, P.M.E.,
CLASSES MOYENNES & ENERGIE

NUMERO DE DEPOT : 2005/0086

Classif. Internat. : C12M

Date de délivrance le : 09 Janvier 2007

Office de la Propriété intellectuelle

Le Ministre de l'Economie,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété intellectuelle;

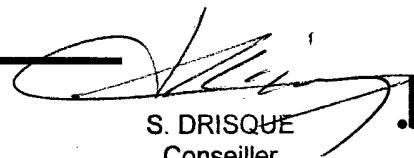
Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

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 17 Février 2005 à 14H50 à l'Office de la Propriété Intellectuelle

ARRETE :ARTICLE 1.- Il est délivré à : CESCO BIOENGINEERING CO., Ltd
Rm 537, Bldg. 53, N°. 195, Sec. 4, Chung-Hsing Rd., Chutung, HSINCHU, TAIWAN 310,
R.O.C.(PROVINCE DE TAIWAN)représenté(e)(s) par : GEVERS François, GEVERS & VANDER HAEGHEN, Holidaystraat 5, -
B 1831 DIEGEM.un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes
annuelles, pour : APPAREIL ET PROCEDE POUR LA PREPARATION ET LA MISE EN CULTURE DE
CELLULES.INVENTEUR(S) : Ho Lewis, Rm 537, Bldg. 53, No. 195, Sec.4, Chung-Hsing Rd., Chutung,
Hsinchu, Taiwan 310, R.O.C. (TW); Wang Yu-Chi, Rm 537, Bldg. 53, No. 195, Sec.4,
Chung-Hsing Rd., Chutung, Hsinchu, Taiwan 310, R.O.C. (TW); Chang King-Ming, Rm 537,
Bldg. 53, No.195, Sec.4, Chung-Hsing Rd., Chutung, Hsinchu, Taiwan 310, R.O.C. (TW)

PRIORITE(S) 20.02.04 US USA60546301

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).**Pour expédition certifiée conforme**Bruxelles, le 09 Janvier 2007
PAR DELEGATION SPECIALE :
DRISQUE S.
Conseiller
S. DRISQUE
Conseiller**.be**

**APPAREIL ET PROCEDE POUR LA PREPARATION ET LA MISE EN
CULTURE DE CELLULES**

Le mode de réalisation préféré de l'invention concerne un appareil et des procédés pour développer une culture de micro-organismes, de cellules et/ou de tissus *in vitro*. Le mode de réalisation préféré de l'invention concerne, plus particulièrement, un appareil de culture cellulaire contenant au moins un substrat de croissance de cellules qui permet un transfert rapide et uniforme de gaz entre l'environnement des cellules contenues dans l'appareil de culture cellulaire et l'atmosphère de l'incubateur dans lequel l'appareil de culture cellulaire est incubé. Le mode de réalisation préféré de l'invention est plus spécifiquement destiné au contrôle de manière efficace de l'oxygène et du pH pendant la période de culture et à l'optimisation dans la mise en culture de micro-organismes, de cellules et/ou de tissus de tous produits produits par le micro-organisme et/ou les produits cellulaires, tels qu'une protéine, et à la récolte de ceux-ci.

Des processus de culture cellulaire à grande échelle ont été développés de manière approfondie au cours des années pour faire croître des bactéries, de la levure et des moisissures, tous possédant généralement des parois cellulaires robustes et/ou des matières extracellulaires et sont donc plus résilientes. La résilience structurale de ces cellules microbiennes est un facteur-clé qui contribue à la rapidité du développement de processus de culture cellulaire à très haute efficacité pour ces types de cellules. On peut, par exemple, faire croître des cellules bactériennes dans de très grands volumes de milieu liquide en utilisant des techniques d'aspersion gazeuse, d'agitation de culture et d'agitation vigoureuse pour obtenir une bonne aération pendant la croissance, tout en maintenant des cultures viables. Selon une autre solution, on peut faire croître des bactéries comme un biofilm, mais une surface de croissance serait nécessaire.

A l'opposé, les techniques de culture de cellules telles que les cellules eucaryotes, les cellules animales, les cellules de mammifères

et/ou les tissus sont plus difficiles et complexes puisque ces cellules sont plus délicates que des cellules microbiennes et ont des exigences en oxygène et en milieu nutritif pendant la croissance qui sont plus complexes et difficiles à maintenir. Les cellules animales et/ou les

5 cellules de mammifères ne peuvent pas, en outre, résister à une turbulence et/ou à des forces de cisaillement excessives qui peuvent être créées par un apport de mélanges gazeux ou d'air, tels qu'un mélange contenant de l'oxygène, de l'azote et du dioxyde de carbone, qui sont tolérés plus facilement par des cellules microbiennes. De plus, aucune

10 cellule animale ne peut être directement exposée aux gaz. La plupart des cellules animales ne peuvent utiliser que l'oxygène dissous dans le milieu de culture. Les cellules animales et les cellules de mammifères sont plus susceptibles d'être endommagées par un apport gazeux et d'air que des cellules microbiennes, ce qui se traduit, donc, par une mortalité des

15 cellules accrue. Les bioréacteurs pour la mise en culture à plus grande échelle possèdent souvent des pièces internes en mouvement, telles que des agitateurs, qui soumettent les cellules à une force de cisaillement très élevée entraînant l'altération des cellules, parfois la mort cellulaire, ce qui conduit donc à une faible viabilité de cultures et, par suite, réduit le

20 production de protéine et/ou de sous-produits cellulaires. De même, les bioréacteurs qui utilisent d'autres types de pièces mécaniques, un mouvement d'air brusque ou un mouvement de fluide brutal comme mécanisme pour obtenir une suspension cellulaire et/ou une aération correcte, occasionneront vraisemblablement des altérations des cellules et empêcheront la

25 croissance tissulaire et cellulaire, ce qui entraînera ultérieurement une diminution de la production de sous-produits cellulaires, tels que protéine.

Une fonction principale d'un bioréacteur est destinée à la recherche dans laquelle un grand nombre de cellules se développent pour affiner les quantités infimes d'une matière active, incluant, mais

30 sans y être limité/e, une protéine ou un anticorps, qui sont sécrétées par des cellules dans le milieu de croissance. Une autre fonction d'un

bioréacteur est les processus de culture cellulaire en laboratoire à grande échelle pour des besoins commerciaux afin de produire en série les protéines actives fabriquées par des cellules et/ou des tissus. En raison du besoin de mise en culture de cellules eucaryotes et/ou de
5 cellules procaryotes et/ou de cellules animales et/ou de cellules de mammifères au laboratoire en grandes quantités, les bioréacteurs et l'appareil de mise en culture sont devenus un outil important dans la recherche et dans la production de cellules pour produire des protéines actives et/ou des anticorps ou des sous-produits cellulaires.

10 On connaît beaucoup de procédés dans l'art pour faire croître des cellules en culture, à la fois, à grande et petite échelles. Pour la mise en culture de cellules à plus petite échelle, beaucoup de récipients ont été développés au cours des années. Les boîtes de Pétri, par exemple, représentent un type de récipient de mise en culture. Les boîtes de Pétri
15 comprennent généralement un fond de boîte, qui contient le milieu de croissance, et un couvercle amovible. Bien que le couvercle amovible fournisse un accès commode à la culture, des micro-organismes, à la suite de la répétition de l'enlèvement du couvercle pendant le processus de mise en culture, contaminent souvent et facilement des cellules. En
20 fait, la contamination est l'un des principaux défis des techniques de mise en culture de tissus et de cellules satisfaisantes.

Pour pallier la contamination des boîtes de Pétri, des flacons de culture ont été développés. Les flacons de culture possèdent généralement une chambre de culture, une petite ouverture tubulaire
25 placée à une extrémité du flacon et une fermeture correspondante. Cette conception tente de réduire l'exposition des cellules à la poussière, aux bactéries, à la levure et à d'autres contaminants. Par exemple, des brevets enseignant des flacons de culture peuvent être trouvés dans les brevets américains Nos. 4.334.028 délivré à Carver et 4.851.351 délivré
30 à Akamine et 5.398.837 délivré à Degrassi. Bien que les flacons de culture aient constitué une amélioration sur les boîtes de Pétri, ils n'ont

pas entièrement remédié au problème de contamination. De plus, ni la boîte de Pétri ni le flacon de culture ne peuvent fournir une aération appropriée aux cellules. En outre, la surface de croissance disponible dans les flacons de culture n'est pas adéquate, comme dans les boîtes de Pétri ; ce qui met des limites au développement progressif du processus de mise en culture en utilisant cette technologie.

Une autre technologie développée pour être utilisée dans la mise en culture de tissus et de cellules a été les flacons rotatifs. Le flacon rotatif a été largement utilisé dans l'art pendant de nombreuses années. Bien qu'ils offrent certains avantages sur les boîtes et les flacons, tels qu'une plus grande surface pour la fixation et la croissance de cellules, ils sont toujours incapables de remédier à toutes les insuffisances et, en particulier, au développement progressif. Dans l'ensemble, ces faiblesses incluent, mais sans y être limitées, les grandes forces de cisaillement hydrodynamiques incontrôlables associées à une hauteur de remplissage gazeux et à l'abondance de tourbillons. En conséquence de l'environnement de forces de cisaillement élevées propres aux flacons rotatif, la mise en culture de tissus de structures tridimensionnelles plus grandes est pratiquement impossible. Seules les types de cellules qui ne sont pas endommagées par les forces de cisaillement et/ou qui sont capables de rester adhérentes à la paroi des flacons rotatifs peuvent être maintenues en culture pendant un laps de temps prolongé. Par conséquent, le maintien à long terme de lignées cellulaires établies peut se révéler difficile avec des flacons rotatifs, en raison du défi constant de l'environnement de forces de cisaillement élevées et de la contamination possible. Des exemples de brevets concernant les flacons rotatifs incluent les Brevets américains Nos. 5.527.705 délivré à Mussi et coll. et 4.962.033 délivré à Serkes.

De plus, bien que la surface de flacons rotatifs soit plus grande comparée aux boîtes de Pétri et aux flacons de culture, elle est souvent considérée comme non adéquate puisque la surface d'adhésion des

cellules n'est pas nécessairement plus favorable que les boîtes de Pétri et les flacons de culture, en particulier, pour le développement progressif de la croissance de cultures cellulaires. Des efforts ont été faits pour apporter des améliorations au flacon rotatif en fournissant une quantité
5 plus grande de surface par flacon rotatif. Le brevet américain No. 5.010.013 délivré à Serkes décrit, par exemple, un flacon rotatif avec une surface augmentée pour la fixation de cellules. Serkes expose l'utilisation d'une surface gaufrée ajoutée à la surface intérieure du flacon rotatif pour augmenter la capacité de fixation de cellules. Un flacon rotatif
10 typique ne fournit cependant qu'une surface d'environ 850 à 1700 cm² pour cultiver des cellules, et plusieurs flacons rotatifs sont toujours nécessaires pour la production à grande échelle. Bien que l'automatisation de la mise en culture avec une grande pluralité de flacons rotatifs puisse économiser un investissement en temps et
15 en main-d'œuvre, ces opérations sont généralement coûteuses et restrictives.

En plus des problèmes de forces de cisaillement hydrodynamiques et de limitation de surface, un problème central propre aux techniques de mise en culture de tissus et de cellules consiste à
20 atteindre et à maintenir une oxygénation suffisante dans la culture en phase de croissance. On sait bien dans l'art que les cellules procaryotes, les cellules eucaryotes, incluant les cellules animales, les cellules de mammifères, les cellules d'insectes, la levure et les moisissures, sont toutes caractérisées par un facteur limitant, le transfert en masse d'oxygène.

25 Le métabolisme de l'oxygène est essentiel pour la fonction métabolique de la plupart des cellules procaryotes et des cellules eucaryotes, à l'exception de certains métabolismes de type fermentatif de divers micro-organismes eucaryotes, tels que la levure. En particulier, avec des techniques de mise en culture de cellules animales et de
30 mammifères, le flux d'oxygène est spécialement important pendant les premières étapes de division cellulaire rapide. L'utilisation d'oxygène par

cellule est maximale lorsque les cellules sont en suspension ; les exigences en oxygène diminuent à mesure que les cellules s'agglomèrent et se différencient. Certaines cellules animales et de mammifères dépendent de l'ancrage, exigeant une surface plus grande, alors que d'autres cellules animales et de mammifères ne dépendent pas de l'ancrage et peuvent se développer dans des environnements liquides indépendamment des types de cellules. Ces cellules exigent toutes, cependant, de l'oxygène dissous dans le milieu. Néanmoins, pendant les dernières phases de culture cellulaire avec, à la fois, les cellules qui dépendent de l'ancrage et les cellules qui ne dépendent pas de l'ancrage, lorsque le nombre de cellules par unité de volume augmente, l'exigence de transfert en masse d'oxygène augmente de nouveau.

Traditionnellement, au moins avec les cellules qui ne dépendent pas de l'ancrage, l'augmentation des exigences en oxygène est adaptée par des procédés d'agitation mécanique et d'aspersion de gaz dans la culture. Cependant, tel que discuté, à la fois l'agitation et l'aspersion de gaz peuvent entraîner l'altération des cellules, diminuant de ce fait la viabilité de la culture et l'efficacité et la productivité générales de la culture cellulaire et/ou de tissus. L'aspersion directe de gaz sur les cultures cellulaires et de tissus peut, en outre, mener à la production de mousse, ce qui est également préjudiciable à la viabilité des cellules.

Certaines tentatives ont été faites dans l'art pour résoudre le problème d'oxygénation pendant la mise en culture de cellules. Le brevet américain No. 5.153.131, délivré à Wolf et coll. ("Wolf") concerne, par exemple, un récipient de bioréacteur sans pales de mélange. A la place, de l'air traverse un passage d'entrée d'air à travers un élément de plaque de support placé sur la largeur d'un tamis et à travers une membrane perméable à disque plat calée entre les deux côtés du logement du récipient. L'oxygène diffuse ensuite à travers la membrane dans la chambre de culture en raison du gradient de concentration entre les deux côtés du logement.

Le bioréacteur de Wolf présente, cependant, beaucoup d'inconvénients. La vitesse à laquelle l'oxygène peut diffuser à travers la membrane en forme de disque constitue, en particulier, une limitation importante qui restreint la taille de la chambre de culture. Un autre
5 inconvénient de la membrane à disque plat est qu'elle est conçue pour fléchir de manière à provoquer un mélange à l'intérieur de la chambre de culture, ce qui peut entraîner la mort cellulaire. L'effet de mélange est une caractéristique décrite comme étant déterminante pour la répartition
10 d'air dans les milieux de culture ; il aura cependant tendance à créer des forces de cisaillement à l'intérieur de la chambre, ce qui peut encore être préjudiciable aux cellules, en fournissant, en conséquence, un échange gazeux suffisant pour supporter la croissance de structures cellulaires plus importantes, qui constitue une restriction concrète et significative lors de la conception d'un récipient de culture ou de bioréacteur.

15 Un exemple montrant une tentative de pallier les insuffisances décrites jusqu'à présent est de réaliser des réacteurs à partir de matériaux perméables aux gaz. Le brevet américain No. 5.702.941, délivré à Schwarz et coll. ("Schwarz"), intitulé "Gas Permeable Bioreactor And Method Of Use" (Bioréacteur perméable aux Gaz et Procédé
20 d'Utilisation) concerne, par exemple, un récipient qui est tourné horizontalement et le récipient est au moins composé partiellement de matériaux perméables aux gaz. L'échange gazeux avec le milieu de culture est destiné à se produire directement à travers les matériaux perméables aux gaz dont les parois du récipient sont composées.

25 Schwarz décrit, cependant, que la gamme de tailles pour le récipient est toujours limitée, puisque l'échange gazeux dépend de la quantité de surface perméable aux gaz. Schwarz a insisté sur le fait que plus la surface du récipient augmente, plus le volume et la quantité de milieu de culture augmentent. En tant que telles, les dimensions
30 préférées du récipient décrites dans Schwarz sont limitées entre un et six pouces en diamètre tandis que la largeur est, suivant Schwarz,

limitée de préférence entre un quart de pouce et un pouce. De telles limitations de taille ne sont pas appropriées pour faire croître des agrégats cellulaires et des tissus tridimensionnels et/ou pour la production à grande échelle.

- 5 De manière similaire, le brevet américain No. 5.449.617, délivré à Falkenberg et coll. ("Falkenberg"), intitulé "Culture Vessel For Cell Culture" (Récipient de Culture pour Culture Cellulaire), concerne un récipient qui est tourné horizontalement. Le récipient est divisé par une membrane de dialyse en une chambre de mise en culture cellulaire et un
- 10 réservoir de milieu nutritif. Des matériaux perméables aux gaz sont utilisés dans les parois du récipient pour permettre un échange gazeux dans la chambre de mise en culture cellulaire. Le récipient n'est cependant pas rempli complètement du milieu nutritif et un grand volume d'air est maintenu au-dessus du milieu fluide dans les deux chambres.
- 15 Le récipient de Falkenberg n'est cependant pas conçu pour réduire la turbulence à l'intérieur de la chambre de culture cellulaire mais plutôt, le mélange est exposé pour être une étape essentielle pour maintenir la membrane de dialyse humide. En outre, Falkenberg n'envisage cependant pas d'utiliser le récipient pour faire croître des agrégats
- 20 cellulaires ou des tissus d'un type quelconque.

- Une autre solution a consisté à développer des récipients en plastique jetables, flexibles, qui n'exigent pas de nettoyage ou de stérilisation et qui n'exigent que des efforts de validation minima. Le Brevet américain No. 5.523.228 décrit, par exemple, une chambre de
- 25 culture cellulaire jetable, flexible, et perméable aux gaz qui est tournée horizontalement. La chambre de culture cellulaire est constituée de deux feuilles en plastique soudées ensemble. Les bords de la chambre, au-delà des soudures, servent de points d'attache à un moyen d'entraînement en rotation horizontale. La chambre de culture cellulaire
- 30 est constituée d'un matériau perméable aux gaz et est montée sur un entraînement à disque à rotation horizontale qui supportera la chambre

de culture cellulaire flexible sans bloquer le débit d'air sur les surfaces de la membrane. La chambre de culture cellulaire est donc placée dans un incubateur et le transfert d'oxygène est contrôlé en régulant la pression de gaz dans l'incubateur suivant le coefficient de perméabilité de la poche. La rotation de la poche permet le mélange du contenu de la poche et améliore le transfert de gaz dans la poche. La chambre de culture cellulaire est cependant limitée à une utilisation dans un environnement gazeux contrôlé. De plus, la chambre de culture cellulaire ne possède pas d'appareil de support et est par conséquent limitée à de petits volumes. La chambre de culture cellulaire décrite est en réalité un appareil de culture discontinue en ce qu'elle ne fournit pas d'entrée et de sortie à des milieux pour être pompés constamment à l'intérieur et à l'extérieur de la chambre pendant la rotation.

Wave Biotech (Bridgewater, N.J.) a également développé une gamme de bioréacteurs jetables, pré-stérilisés, qui n'exigent pas de nettoyage ou de stérilisation. Le bioréacteur Wave est constitué de feuilles en matériau imperméable aux gaz, flexible. La poche est partiellement remplie de milieux puis gonflée avec de l'air qui passe en continu dans la hauteur de remplissage de la poche. Les milieux sont mélangés et aérés en faisant osciller les poches jusqu'à 40 fois par minute pour augmenter l'interface air-liquide. Cependant, puisqu'un logement solide ne supporte pas les poches, les poches deviennent peu maniables et difficiles à manipuler lorsque leur taille augmente. De plus, l'action d'ondulation à l'intérieur de la poche en oscillation crée des forces de turbulence préjudiciables. Certaines cultures cellulaires, en particulier, les cultures cellulaires humaines, se développent mieux dans des conditions plus douces.

Il existe un besoin continu de développer des bioréacteurs jetables, pré-stérilisés, légers, avec des raccords simples à l'équipement existant, qui exigent peu de formation pour les utiliser, tout

en fournissant le transfert de gaz nécessaire et le mélange de milieu nutritif requis pour des cultures cellulaires réussies.

Etant donné l'importance de la technologie de culture cellulaire et de tissus dans la recherche biotechnologique, la recherche pharmaceutique, le soin des malades, la recherche universitaire et, compte tenu des insuffisances, des obstacles et des limitations qui existent dans l'art antérieur décrit, le mode de réalisation préféré de l'invention pallie l'obstacle et remédie aux insuffisances de l'art antérieur en enseignant et en décrivant un procédé et un appareil pour la mise en culture cellulaire et de tissus qui satisfont au besoin éprouvé depuis longtemps d'un procédé et d'un appareil nouveaux pour cultiver des cellules et des tissus qui sont plus fiables, moins complexes, plus efficaces, moins encombrants, moins coûteux, moins demandeurs de main-d'œuvre, capables d'augmenter l'échelle de culture sans limitation d'apport en oxygène, capables d'augmenter la vitalité cellulaire et de produire un rendement plus élevé de sous-produits cellulaires générés à partir des cellules.

Plusieurs obstacles ne sont pas surmontés dans la technologie de culture cellulaire. L'un des plus grands obstacles dans la mise en culture cellulaire et/ou de tissus est qu'il est difficile de trouver dans les appareils et/ou l'appareil et/ou le procédé employés un équilibre dans la fourniture d'oxygène suffisant tout en évitant d'altérer les cellules. Un autre obstacle dans la culture de cellules de mammifères est qu'une quantité relativement importante d'inoculum est exigée pour amorcer une culture. Ce qui rend, par conséquent, la question du développement progressif très difficile.

L'invention comprend à la fois l'appareil et le procédé pour l'utiliser. L'appareil pour la mise en culture cellulaire ayant des caractéristiques du mode de réalisation préféré de l'invention comprend une chambre qui contient une entrée et/ou une sortie, le placement d'un substrat de croissance cellulaire dans une chambre, la chambre qui est

fixée sur la plate-forme, un pivot sous la plate-forme ; un groupe moteur
raccordé au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de
va-et-vient ou un mouvement d'oscillation selon un degré ou deux degrés
de liberté ; un contrôleur de temps d'utilisation qui contrôle le
5 basculement de la plate-forme à une extrémité et la maintient pendant un
laps de temps et la maintient pendant un laps de temps de mise en
culture.

Le procédé de mise en culture cellulaire du mode de réalisation
préféré de l'invention comprend les étapes de préparation d'une
10 chambre stérile qui a un volume intérieur creux unique, de placement
d'un substrat de croissance cellulaire dans la chambre, d'introduction
d'air contenant de l'oxygène en utilisant l'entrée pour gonfler ladite
chambre, d'introduction d'un milieu de culture cellulaire en utilisant une
entrée, de placement de la suspension de cellules dans la chambre pour
15 répartir les cellules sur le substrat de croissance cellulaire, de fixation de
la chambre sur la plate-forme, de placement d'un pivot sous la plate-
forme, d'introduction d'air contenant de l'oxygène en utilisant une entrée,
et d'ouverture d'une sortie, de gonflage de la chambre avec l'air passant
en continu dans la chambre, de raccordement d'un pivot au groupe
20 moteur pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient
ou d'oscillation, de réglage d'un contrôle de temps d'utilisation de
manière à maintenir l'un des substrats de culture cellulaire immergé ou
exposé pendant un laps de temps de manière à permettre aux cellules
de s'ancrer sur le substrat de croissance cellulaire ou d'être incluses
25 dans le substrat de croissance cellulaire, de maintien du mouvement de
va-et-vient ou d'oscillation jusqu'à ce que les cellules soient ancrées sur
le substrat de croissance et/ou incluses dans le substrat de croissance
cellulaire, de réglage d'un contrôle de temps d'utilisation pour maintenir
l'un des substrats de culture cellulaire immergé ou exposé pendant un
30 laps de temps de manière à réaliser l'échange de milieu nutritif ou à
contrôler l'apport en milieu nutritif, à la fois, pendant la phase liquide et

gazeuse, pour maintenir le déplacement de la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation dans lequel le substrat de culture cellulaire est immergé d'un côté, de sorte que le dioxyde de carbone et la nutrition nécessaires sont transférés/mélangés et qu'un film

5 mince de milieu de culture est exposé sur le substrat de culture de l'autre côté, de sorte que l'oxygène est reçu par une interface milieu-film mince sans contact direct avec l'air pendant le mouvement de va-et-vient ou d'oscillation, en enlevant périodiquement le milieu de culture conditionné lequel contient des produits cellulaires sécrétés par des cellules, en

10 répétant périodiquement les étapes précédentes du réglage du contrôle de temps d'utilisation au processus final pour maintenir une condition de culture cellulaire continue appropriée pendant la période de mise en culture.

L'appareil et le procédé du mode de réalisation préféré de

15 l'invention fournissent un nouveau procédé de mise en culture de cellules en palliant les obstacles les plus importants relatifs au transfert d'oxygène/de milieu nutritif plus efficace, à une accumulation de déchets de métabolites minimale, aux bulles d'air et/ou aux forces de cisaillement provoquées par une injection de gaz, de mise en culture qui optimise

20 l'adhérence des cellules, d'augmentation de la surface de contact air-milieu et qui fonctionne comme un mélangeur statique lorsque le milieu se trouve dans l'appareil du mode de réalisation de l'invention.

Le mode de réalisation préféré de l'invention fournit un procédé

25 efficace, non coûteux, simple et fiable de mise en culture de cellules et/ou de tissus et de récolte de produits cellulaires produits par celles/ceux-ci, tels que les cellules procaryotes, les cellules eucaryotes, les cellules animales, les cellules de mammifères, de sorte qu'un apport continu, à la fois, d'oxygène et de milieux nutritifs aux cellules est assuré

30 sans exposer directement des cellules au gaz, réduisant de ce fait l'altération des cellules, voire, la mortalité des cellules. De plus, le

procédé du mode de réalisation préféré de l'invention réduit l'accumulation de déchets en fournissant suffisamment d'oxygène pendant la culture, facilite l'évacuation de dioxyde de carbone en excès pendant la culture, facilite la stabilisation de l'environnement de culture

5 par un moyen efficace, non coûteux, fiable et simple, facilite la prévention d'effets préjudiciables sur des cellules causés par des bulles d'air et des gaz. De plus, le procédé du mode de réalisation préféré de l'invention pourrait réduire la densité d'ensemencement initiale qui est habituellement exigée dans une culture de cellules animales, et éliminer

10 également la phase exponentielle de croissance pendant la période de croissance initiale due à l'origine à une faible densité d'inoculum. De plus, le procédé du mode de réalisation préféré de l'invention enseigne et décrit un moyen simple et nouveau de contrôle des milieux nutritifs similaire au processus à alimentation discontinue traditionnel ; de sorte

15 que le métabolisme pourrait être contrôlé correctement pendant les phases de croissance et de production. De plus, le mode de réalisation préféré de l'invention enseigne et décrit un procédé nouveau pour enlever de manière efficace le dioxyde de carbone et stabiliser le pH pendant la culture. En outre, le mode de réalisation préféré de l'invention

20 fournit un procédé pour une manière plus commode et plus facile de produire et de récolter des produits cellulaires sécrétés, tels que protéine, et/ou antibiotiques, et/ou des produits cellulaires et/ou tissulaires dans des cultures cellulaires ou de tissus.

Ces modes de réalisation et d'autres modes de réalisation sont

25 décrits ou apparaissent évidents à la lecture de la Description détaillée suivante, et sont englobés dans celle-ci.

Les figures suivantes sont données à titre d'illustration seulement et ne sont pas destinées à limiter le cadre du mode de réalisation préféré de l'invention.

30 La figure 1 représente un stéréogramme d'un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention, dans

lequel Les substrats de croissance sont disposés à la première extrémité et à la seconde extrémité de la chambre à poche. La chambre à poche est gonflée par un apport continu d'écoulement d'air. Le milieu de culture remplit partiellement la poche. La chambre à poche est montée sur un plateau raccordé par un moyen d'entraînement.

La figure 2 représente une vue de côté d'un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention, dans lequel Les substrats de croissance sont disposés à la première extrémité et à la seconde extrémité de la chambre à poche. La chambre à poche est gonflée par un apport continu d'écoulement d'air. Le milieu de culture remplit partiellement la poche. La chambre à poche est montée sur un plateau raccordé par un moyen d'entraînement.

La figure 3 représente le mécanisme d'un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention dans lequel la poche est inclinée d'un angle par le moyen d'entraînement de manière à abaisser une extrémité de la chambre à poche. Un groupe moteur est raccordé au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation et faire couler le milieu de culture vers l'autre extrémité de la chambre. le substrat de croissance dans l'extrémité la plus élevée de la chambre à poche émerge donc du milieu de culture et est exposé à l'environnement gazeux, tandis que le substrat de croissance dans l'extrémité la plus basse de la chambre à poche recouvre donc le milieu de culture.

La figure 4 représente le mécanisme d'un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention dans lequel le contrôleur commute la position du plateau et entraîne l'inclinaison de la chambre à poche vers l'autre côté d'un angle de manière à abaisser l'autre extrémité de la chambre à poche. Un groupe moteur est raccordé au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation et faire couler le milieu de culture vers l'autre extrémité de la chambre. le substrat de croissance

dans l'extrémité la plus élevée de la chambre émerge donc du milieu de culture et est exposé à l'environnement gazeux, tandis que le substrat de croissance dans l'extrémité la plus basse de la chambre à poche recouvre donc le milieu de culture.

5 La figure 5 représente un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention dans lequel le substrat de croissance est disposé à la première extrémité ou à la seconde extrémité de la chambre à poche. La chambre à poche est montée sur un plateau
10 raccordé par un moyen d'entraînement. L'air d'entrée gonfle la chambre à poche. Le milieu de culture remplit partiellement la poche. Lorsque la poche est inclinée d'un angle de manière à abaisser une extrémité de la chambre à poche, le milieu de culture s'écoule vers l'extrémité la plus
15 basse de la chambre à poche par le raccordement du groupe moteur au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation. Le substrat de croissance dans l'extrémité la plus basse de la chambre à poche recouvre donc le milieu de culture. Lorsque le contrôleur commute sa position et entraîne l'inclinaison de la chambre à
20 poche vers l'autre côté d'un angle de manière à abaisser l'autre extrémité de la chambre à poche, le milieu de culture s'écoule vers l'autre extrémité de la chambre à poche par le raccordement du groupe
25 moteur au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation. Le substrat de croissance dans l'extrémité la plus élevée de la chambre à poche émerge donc du milieu de culture et est exposé à l'environnement gazeux.

25 La figure 6 représente une vue de côté d'un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention dans lequel Les substrats de croissance sont disposés à la première extrémité de la chambre. Le milieu de culture remplit partiellement la poche. La
30 chambre à poche est montée sur un plateau raccordé par un moyen d'entraînement.

La figure 7 représente le mécanisme d'un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention dans lequel la chambre est inclinée d'un angle de manière à abaisser une extrémité de la chambre à poche, et faire couler le milieu de culture vers l'extrémité la plus basse de la chambre à poche par le raccordement d'un groupe moteur au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation. le substrat de croissance dans l'extrémité la plus élevée de la chambre à poche émerge donc du milieu de culture et est exposé à l'environnement gazeux, tandis que le substrat de croissance dans l'extrémité la plus basse de la chambre à poche recouvre donc le milieu de culture.

La figure 8 représente le mécanisme d'un appareil de mise en culture de cellules du mode de réalisation préféré de l'invention dans lequel le contrôleur commute la position du plateau et entraîne l'inclinaison de la chambre vers l'autre côté d'un angle de manière à abaisser l'autre extrémité de la chambre à poche, et à faire couler le milieu de culture vers l'autre extrémité de la chambre par le raccordement d'un groupe moteur au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation. Le substrat de croissance dans l'extrémité la plus élevée de la chambre émerge donc du milieu de culture et est exposé à l'environnement gazeux, tandis que le substrat de croissance dans l'extrémité la plus basse de la chambre recouvre donc le milieu de culture.

La figure 9 illustre la Répartition de cellules d'hybridomes (OKT3) de Souris ancrées sur un substrat de croissance cellulaire décrit dans l'Exemple 1.

La figure 10 illustre la Répartition de cellules d'hybridomes (OKT3) de Souris ancrées sur un substrat de croissance cellulaire décrit dans l'Exemple 1.

La figure 11 illustre la Comparaison du taux de capture de Glucose et du taux de capture de Glutamine (TCG) entre le mode de

réalisation référencé de l'invention et la BelloCell décrite dans l'Exemple 2.

La figure 12 illustre la Comparaison L/G et la valeur de pH entre la présente invention et la BelloCell décrite dans l'Exemple 3.

5 La figure 13 illustre la Photo du mode de réalisation préféré de l'invention décrite dans l'Exemple 4.

Suivant le mode de réalisation préféré de l'invention, il est fourni un appareil et un procédé de préparation et de mise en culture de cellules. Les modes de réalisation du mode de réalisation préféré de l'invention peuvent
10 être utilisés pour mettre en culture différentes variétés de cellules, telles que les cellules eucaryotes et procaryotes, en particulier, des cellules animales et/ou des cellules de mammifères.

L'appareil de préparation et de mise en culture de cellules est représenté sur la figure 1 (vue en perspective), la figure 2 (vue de côté)
15 et la figure 6 (vue en perspective). L'appareil inclut une chambre pré-stérilisée qui contient au moins une entrée et/ou une sortie, un substrat de croissance cellulaire placé dans la chambre, une plate-forme, la chambre étant fixée sur la plate-forme, un pivot sous la plate-forme, un groupe moteur qui est raccordé au pivot pour déplacer la plate-forme
20 dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation (figure 3, figure 4, figure 7 et figure 8) selon un degré ou deux degrés de liberté, un contrôleur de temps d'utilisation.

La chambre est une poche en plastique souple ou rigide, qui possède un espace intérieur creux unique pour placer le substrat de
25 croissance cellulaire, le milieu de culture et mettre les cellules en culture. La chambre peut contenir, par exemple, *inter alia*, des cellules désirées, un milieu de croissance et un moyen de substrat de croissance pour fournir une surface à l'adhérence et à la croissance des cellules. Dans un mode de réalisation préféré, la chambre est une poche en plastique,
30 flexible.

Référence est maintenant faite aux figures à titre d'exemples et elles ne limitent en aucune façon le cadre du mode de réalisation préféré de l'invention. En référence à la figure 1 et à la figure 2, un stéréogramme et une vue de côté de l'appareil de mise en culture

5 cellulaire d'un premier mode de réalisation du mode de réalisation préféré de l'invention sont présentés. Référence est faite aux figures. Une chambre 1006 contient un orifice d'entrée 1003, et un orifice de sortie 1009 pour l'écoulement d'air à l'intérieur et à l'extérieur, un orifice d'entrée 1004, un orifice de sortie 1008 pour l'introduction de milieu de

10 culture et l'extraction du milieu de culture conditionné, et un moyen de substrat de croissance cellulaire 1002 disposé dans deux côtés de la chambre à poche. Les orifices d'entrée 1003 et de sortie 1009 sont en outre munis d'au moins un filtre à air pour stériliser l'air passant dans l'appareil de mise en culture cellulaire ou sortant de celui-ci. Le tube de

15 sortie 1008 s'étend en outre dans la partie inférieure de la chambre 1006 de manière à faciliter l'évacuation du milieu de croissance. La chambre à poche 1006 est partiellement remplie de milieux 1005 par l'entrée 1004, puis gonflée avec l'air qui passe en continu dans la hauteur de remplissage de la chambre 1007 de l'entrée 1003 à la sortie 1009. La

20 chambre à poche 1006 est montée et supportée par un plateau 1001 raccordé à un moyen d'entraînement 1010 qui peut alternativement entraîner la chambre à poche 1006 en inclinaison, en va-et-vient ou en oscillation de manière à déplacer le liquide d'un côté de la chambre à poche vers l'autre côté de la chambre à poche.

25 le substrat de croissance cellulaire forme une matrice faiblement concentrée qui peut fonctionner comme un filtre de profondeur pour fixer les cellules pendant l'ensemencement des cellules de manière à optimiser l'ancrage et/ou l'inclusion de cellules. le substrat de croissance cellulaire optimise également le contact air-milieu en fournissant une

30 interface fine air-milieu de croissance lorsque le substrat de croissance émerge du milieu de croissance. le substrat de croissance peut

- également fonctionner comme mélangeur statique lorsque le milieu de croissance s'écoule dans le substrat de croissance. le substrat de croissance est de préférence un substrat poreux de taille et de forme quelconques et peut être construit dans une conformation quelconque.
- 5 Plus particulièrement, le substrat de croissance poreux suivant le mode de réalisation préféré de l'invention fournit une quantité maximale de surface pour l'adhérence, la croissance des cellules, l'agitation légère, le mélange léger et l'oxygénation sans jamais permettre aux cellules de venir en contact direct avec l'air. Le système de chambre suivant le
- 10 mode de réalisation préféré de l'invention optimise également la croissance cellulaire en soumettant les cellules à une exposition intermittente et périodique de milieux nutritifs et d'oxygène. Le système suivant le mode de réalisation préféré de l'invention fournit également une manière aisée de collecter des produits cellulaires contenant le
- 15 milieu de culture, ainsi que de réapprovisionner le milieu de culture. L'appareil de mise en culture cellulaire du mode de réalisation préféré de l'invention protège également les cellules de l'exposition directe à l'air, aux bulles d'air ou aux forces de cisaillement par un apport de gaz, évitant ainsi tous effets préjudiciables pour les cellules.
- 20 le substrat de croissance cellulaire placé dans le côté de la chambre est fourni pour les cellules ancrées et/ou incluses. le substrat de croissance cellulaire se compose de matériau poreux, de matériaux de haut poids moléculaire, de céramiques, de fibre, de feuilles tissées ou non tissées. Les matériaux sont des céramiques, des polymères, des
- 25 substrats tissés, des substrats non tissés, du polyamide, du polyester, du polyuréthane, des polymères fluorés, du polyéthylène, du polypropylène ou de l'alcool polyvinylique, du verre. le substrat de croissance poreux peut se présenter sous une forme ou une taille quelconque incluant, mais sans y être limités, un disque, une paillette, un bloc, une plaque,
- 30 une feuille, une lame, une pastille, un microporteur, une micropastille, une pastille macroscopique. L'utilisation de ces moyens de substrat de

croissance suivant le mode de réalisation préféré de l'invention optimise des surfaces pour l'adhérence des cellules et la surface air-milieu de croissance.

La plate-forme peut être inclinée dans un mouvement de va-et-
5 vient ou d'oscillation de 10 à 180 degrés. La fréquence de mouvement de va-et-vient ou d'oscillation peut réaliser un mouvement de manière intermittente et périodique en fonction de la densité de cellules et/ou des cellules de variétés différentes, mais indirectement exposées à un
10 environnement gazeux par une interface fine gaz-milieu de croissance de manière à recevoir de l'oxygène ou être immergées dans le milieu de culture de manière à faciliter la croissance des cellules et la production de produits cellulaires.

La chambre est fixée sur la plate-forme et un pivot sous la plate-
forme peut contrôler l'inclinaison de la plate-forme à un degré ou deux
15 degrés de liberté par un groupe moteur avec contrôleur de temps d'utilisation. De plus, le mode de réalisation préféré de l'invention est de préférence fourni avec un moyen d'entraînement pour contrôler le mouvement du milieu de culture d'une extrémité de la chambre à l'autre
20 extrémité de la chambre de manière à faciliter une immersion intermittente et périodique des cellules dans le milieu de culture de manière à fournir des milieux nutritifs nécessaires et une émergence du milieu de croissance de manière à exposer indirectement les cellules à un environnement gazeux par une interface fine gaz-milieu de croissance
25 pour fournir une oxygénation suffisante. L'exposition indirecte des cellules à l'environnement gazeux fournit une oxygénation efficace et suffisante sans endommager et/ou tuer les cellules.

Lorsque le milieu de culture en excès est retiré du substrat sur lequel les cellules sont immobilisées, la densité de cellules sur le substrat est fortement concentrée. Par exemple, s'il y a 500 ml de couverture de
30 milieu de culture sur 100 ml de substrat et avec 1×10^7 cellules au début. La densité de cellules est de 2×10^4 cellules/ml. Pour cette densité de

cellules, il y aura habituellement une phase exponentielle de croissance très longue et cela demandera beaucoup de temps pour obtenir une densité de cellules suffisante. Lorsque le milieu de culture en excès est évacué du moyen de substrat, environ 50 ml de milieu de culture
5 resteront sur le substrat en raison de son hydrophilicité. La densité de cellules augmentera ensuite à 2×10^5 cellules/ml. Ce qui rétablira donc la densité de cellules initiale normale et maintiendra la croissance cellulaire dans un temps de doublement normal. Cela est dû à une autocrine concentrée sécrétée par les cellules elles-mêmes et déclenche le cycle
10 cellulaire pour la propagation. Le substrat ne se dessèchera pas du fait que le substrat est un matériau hydrophile et que l'environnement de culture est saturé en humidité. Lorsque l'autocrine est suffisamment accumulée pour déclencher la propagation des cellules, un milieu de culture frais peut ensuite recouvrir de nouveau le substrat pour échanger
15 des déchets et le milieu nutritif à partir du milieu de culture conditionnée sur le moyen de substrat. La période entre l'émergence et le recouvrement dépend de la densité initiale de cellules. Une densité de cellules inférieure exigera une période d'émergence plus longue. Par exemple, si la densité d'ensemencement initiale après émergence est de
20 2×10^5 cellules/ml, cela exigerait une période d'exposition de plusieurs heures à une journée ; si la densité d'ensemencement initiale après émergence est de 1×10^6 cellules/ml, cela exigerait une période d'exposition d'une à plusieurs heures.

Plus particulièrement, le mode de réalisation préféré de l'invention
25 concerne un procédé efficace, stérile, jetable, non coûteux, simple et fiable pour mettre en culture des cellules et/ou des tissus et récolter des produits cellulaires produits par les cellules mises en culture de ceux-ci. De manière plus spécifique, le mode de réalisation préféré de l'invention fournit un procédé nouveau pour mettre en culture de manière efficace
30 des cellules quelconques qu'elles soient eucaryotes, procaryotes, de mammifères ou animales dans lesquelles, à la fois, de l'oxygène et des

milieux nutritifs nécessaires pour assurer la croissance cellulaire sont facilement disponibles sans entraîner l'altération des cellules. De plus, le procédé du mode de réalisation préféré de l'invention empêche ou réduit fortement l'accumulation de déchets de métabolites, évite l'introduction
5 de forces de cisaillement sur des cultures en phase de croissance, et protège les cellules de l'exposition directe au gaz, aux bulles d'air et aux gaz. En outre, le procédé de la présente invention peut soit être automatisé soit manuellement réalisé avec un niveau minimum d'utilisation de main-d'œuvre et/ou de supervision. La présente invention
10 fournit, en outre encore, un procédé pour un moyen plus commode et plus facile de produire et de récolter des produits cellulaires sécrétés tels que protéines, anticorps en provenance de cultures cellulaires ou de tissus.

Un autre mode de réalisation du mode de réalisation préféré de
15 l'invention enseigne un procédé de mise en culture cellulaire qui peut contrôler l'apport en milieux nutritifs et favoriser l'entrée des cellules dans la phase de production secondaire. Le procédé comprend l'étape de : fourniture d'un substrat de croissance pour recevoir des cellules et permettre l'adhérence des cellules ; fourniture d'un milieu de culture pour
20 recouvrir le substrat pour fournir un milieu nutritif suffisant ; évacuation du milieu de culture en excès du moyen de substrat et laisser seulement un film mince de milieu de culture recouvrant le substrat et remplacer l'espace occupé à l'origine par le milieu de culture par une phase gazeuse ; possibilité pour le substrat de rester dans la phase gazeuse
25 pendant un laps de temps ; recouvrement de nouveau du moyen de substrat par le milieu de culture pour fournir un milieu nutritif suffisant et évacuer les déchets du moyen de substrat ; répéter la phase de recouvrement et d'émergence jusqu'à atteindre l'objectif de la culture cellulaire.

30 Lorsque le milieu de culture en excès est évacué du moyen de substrat avec lequel les cellules sont immobilisées, le milieu nutritif sur le

substrat est par conséquent limité, à moins que le milieu de culture ne recouvre de nouveau le moyen de substrat. Par conséquent, si nous contrôlons la période d'exposition, nous pouvons contrôler la disponibilité du milieu nutritif sur le moyen de substrat. Beaucoup de produits biologiques importants, tels qu'anticorps monoclonal, angiostatine, interféron, ..., sont produits par CHO et l'hybridome passera en phase de production uniquement si la croissance cellulaire atteint un plateau ou dans des conditions de croissance lente. En contrôlant le milieu nutritif, on peut enseigner à la cellule d'entrer en production plutôt qu'en phase de croissance illimitée. Cela économisera donc beaucoup de temps et du milieu de culture.

Le dioxyde de carbone est un sous-produit métabolique, qui est la source principale pour réduire le pH dans le milieu de culture pendant la culture. Puisque le substrat créera une grande surface lorsque le milieu de culture en excès est évacué et exposé audit moyen de substrat dans la phase gazeuse, cela facilitera la libération de dioxyde de carbone de la phase liquide à la phase gazeuse. Par exemple, pendant la phase de recouvrement, le rapport surface-volume pour le contact de la phase liquide-gaz est 1, puis après la phase d'émergence, le rapport surface-volume pour le contact liquide-gaz augmentera à environ 200. Par conséquent, le taux de libération de dioxyde de carbone augmentera plusieurs fois. La phase d'exposition peut s'échelonner de plusieurs minutes à plusieurs heures, à moins que le milieu nutritif sur le substrat ne soit pas suffisant pour supporter la croissance ou l'activité cellulaire.

Le mode de réalisation préféré de l'invention concerne, plus particulièrement, un procédé et un appareil efficaces, stériles, jetables, non coûteux, simples et fiables pour mettre en culture des cellules et/ou des tissus et récolter des produits cellulaires produits par les cellules mises en culture de ceux-ci. De manière plus spécifique, le mode de réalisation préféré de l'invention fournit un procédé et un appareil nouveaux pour mettre en culture de manière efficace des cellules

quelconques qu'elles soient eucaryotes, procaryotes, de mammifères ou animales dans lesquelles, à la fois, de l'oxygène et des milieux nutritifs nécessaires pour assurer la croissance cellulaire sont facilement disponibles sans entraîner l'altération des cellules. De plus, le procédé et
5 l'appareil du mode de réalisation préféré de l'invention empêchent ou réduisent fortement le risque de tout type de contamination, évitent l'introduction de forces de cisaillement sur des cultures en phase de croissance, et protège les cellules de l'exposition directe au gaz, aux bulles d'air et aux gaz. En outre, le procédé et l'appareil de la présente
10 invention peut soit être automatisé soit manuellement réalisé avec un niveau minimum d'utilisation de main-d'œuvre et/ou de supervision. La présente invention fournit, en outre encore, un procédé et un appareil pour un moyen plus commode et plus facile de produire et de récolter des produits cellulaires sécrétés tels que protéines, anticorps en provenance de cultures cellulaires ou
15 de tissus.

La description détaillée suivante, donnée à titre d'exemple, n'est pas destinée à limiter l'invention à des modes de réalisation spécifiques décrits quelconques. Sans vouloir limiter inutilement ce qui précède, ce qui suit exposera l'invention pour certains modes de réalisation préférés.
20 Les cellules du mode de réalisation préféré de l'invention peuvent être soit des cellules eucaryotes et/soit des cellules procaryotes. Dans un mode de réalisation préféré, les cellules sont des cellules animales, et des cellules de mammifères. Les cellules peuvent être un type quelconque de cellule eucaryote ou de cellule procaryote recombinante
25 ou non recombinante, incluant, par exemple, des cellules d'insectes, par exemple, Sf-9, des cellules de primates, par exemple, Vero, souris, par exemple, BHK ou C-127, hamster, par exemple, CHO, fongiques, par exemple, Saccharomyces ou Scizosaccharomyces ou humaines, par exemple, tumeur, ostéoblaste, fibroblaste, et des cellules souches
30 mésenchymateuses. Toutes les cellules peuvent se développer dans l'appareil de mise en culture cellulaire suivant le mode de réalisation

préféré de l'invention. En particulier, des cellules de choix pour le mode de réalisation préféré de l'invention peuvent dépendre de l'ancrage ou ne pas dépendre de l'ancrage. Les cellules qui dépendent de l'ancrage exigent une surface sur laquelle croître, tandis que les cellules qui ne
5 dépendent pas de l'ancrage peuvent croître dans une suspension liquide. Tous les types de cellules exigent de l'oxygène, des milieux nutritifs, et des facteurs de croissance appropriés pour croître.

Un autre mode de réalisation du mode de réalisation préféré de l'invention du procédé de mise en culture cellulaire, qui peut faciliter la
10 libération de dioxyde de carbone pendant la culture et aider à stabiliser le pH pendant la culture, est représenté sur la figure 13. Le procédé comprend les étapes de : fourniture d'un substrat de croissance pour recevoir des cellules et permettre l'adhérence des cellules ; fourniture d'un milieu de culture pour recouvrir le substrat pour fournir un milieu
15 nutritif suffisant ; évacuation du milieu de culture en excès du moyen de substrat et laisser seulement un film mince de milieu de culture recouvrant le substrat et remplacer l'espace occupé à l'origine par le milieu de culture par une phase gazeuse ; possibilité pour le substrat de rester dans la phase gazeuse pendant un laps de temps ; possibilité
20 d'écoulement d'air dans le substrat de manière à évacuer le dioxyde de carbone en excès ; recouvrement de nouveau du moyen de substrat par le milieu de culture pour fournir un milieu nutritif suffisant et évacuer les déchets du moyen de substrat ; répéter l'étape de recouvrement et d'émergence jusqu'à atteindre l'objectif de la culture cellulaire.

25 EXEMPLES

L'exemple suivant est exposé pour illustrer un mode de réalisation suivant le mode de réalisation préféré de l'invention ; il n'est en aucun cas limitatif non plus que cet exemple n'impose de limitation sur le mode de réalisation préféré de l'invention.

30 Exemple 1 Répartition de cellules d'hybridomes (OKT3) de Souris ancrées sur un substrat de croissance cellulaire

Mettre en culture des cellules d'hybridomes OKT3 avec un milieu (IMDM complété de 10 % de FCS / NaHCO_3 /1 % de PSA /pH = 7,4). Le milieu et les cellules de culture sont introduits dans le mode de réalisation préféré de l'invention (Tide Bag). Tide Bag a été placé dans un incubateur à 37 °C et celui-ci mis en marche tel que suggéré par le protocole de la section Description détaillée. Après une mise en culture de 97,7 heures, on a utilisé de l'hématoxyline pour colorer les cellules OKT3 afin d'observer la répartition des Cellules OKT3 ancrées sur un substrat de croissance cellulaire.

Le résultat de l'examen au microscope a été représenté sur la figure 9 et sur la figure 10.

Exemple 2 Comparaison du taux de capture de Glucose et du taux de capture de Glutamine (TCG) entre le mode de réalisation référencé de l'invention et la BelloCell

Le mode de réalisation préféré de l'invention (Tide Bag) demande un laps de temps relativement plus court pour atteindre 97,7 h TCG:63,8 ; le résultat est donc similaire au Lot de BelloCell, 189,5 h TCG:68,33. Il montre que Tide Bag est plus efficace dans la préparation des cellules que BelloCell (un bioréacteur du commerce a été fabriqué par CESCO BIOENGINEERING CO., LTD.)

Le résultat de la comparaison entre le mode de réalisation référencé de l'invention et BelloCell, en termes de TCG, a été indiqué sur la figure 11.

Exemple 3 Comparaison L/G et la valeur de pH entre la présente invention et la BelloCell

Le mode de réalisation préféré de l'invention (Tide Bag) est dans un système de culture fermé au début, et plus la culture continue, plus du dioxyde de carbone est libéré des cellules, et, par suite, la valeur de pH du milieu de culture diminue légèrement. Le mode de réalisation référencé de l'invention avec une culture continue sera plus stable en termes de valeur de pH.

Le résultat de la comparaison du rapport de la production de Lactate à la consommation de Glucose (L/G) et de la valeur de pH a été indiqué sur la figure 12. (L/G est une indication de l'efficacité du métabolisme du glucose. La plage normale doit être d'environ 1,5 à 1,8.)

5 Exemple 4 Photo du mode de réalisation préféré de l'invention

La photo indique une position relative du mode de réalisation préféré de l'invention, qui contient un substrat de croissance cellulaire, une bouteille de milieu de culture frais raccordée à une entrée et à deux sorties pour l'air et le transfert du milieu conditionné. Une chambre

10 repose sur une plate-forme équipée d'un contrôle de temps d'utilisation.

La photo du mode de réalisation préféré de l'invention a été présentée sur la figure 13.

REVENDEICATIONS

1. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules comprenant :
 - 5
 - au moins une chambre, qui contient au moins une entrée et/ou une sortie ;
 - un ou plusieurs substrat(s) de croissance cellulaire placé(s) dans le(s) côté(s) de la chambre ;
 - une plate-forme, ladite chambre étant fixée sur ladite plate-forme ;
 - 10
 - un ou plusieurs pivot(s) sous ladite plate-forme ;
 - un groupe moteur, raccordé au pivot pour déplacer ladite plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou un mouvement d'oscillation selon un degré ou deux degrés de liberté ;
 - 15
 - un contrôleur de temps d'utilisation qui peut contrôler le temps de basculement de la plate-forme à une extrémité, de maintien de la position d'inclinaison pendant un laps de temps, puis de rebasculement vers l'autre extrémité et de maintien de la position d'inclinaison pendant un laps de
 - 20
 - temps.
2. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel la chambre est une poche en plastique souple ou rigide ; la poche possède un espace intérieur creux unique.
- 25 3. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 2, dans lequel la chambre est une poche en plastique rigide.
4. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 2, dans lequel la chambre est une poche en
- 30
 - plastique souple.

5. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel la chambre contient au moins une entrée et/ou une sortie sur la surface de la chambre.
- 5 6. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 5, dans lequel la chambre contient deux entrées et/ou deux sorties sur la surface de la chambre.
- 10 7. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 6, dans lequel une des entrées est destinée à recevoir l'écoulement d'air, et l'autre entrée est destinée à introduire le milieu de culture.
- 15 8. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 7, dans lequel l'entrée destinée à recevoir l'écoulement d'air possède au moins un filtre fixé pour stériliser l'air passant dans la chambre.
9. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 8, dans lequel le filtre est simple, double ou multiple.
- 20 10. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 6, dans lequel une sortie est destinée à expulser l'écoulement d'air, et l'autre sortie est destinée à évacuer le milieu de culture conditionné.
- 25 11. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 10, dans lequel la sortie destinée à évacuer l'écoulement d'air possède au moins un filtre fixé pour stériliser l'air sortant de la chambre.
- 30 12. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 10, dans lequel la sortie destinée à évacuer le milieu de culture conditionné est en outre conçue pour prolonger son tube dans la partie inférieure de la chambre.

13. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 11, dans lequel le filtre est simple, double ou multiple.
- 5 14. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 5, dans lequel la chambre contient un orifice qui peut être fermé par un bouchon.
- 15 15. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 14, dans lequel un orifice est destiné au passage d'air et à l'échange d'air.
- 10 16. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 14, dans lequel un orifice est destiné à l'introduction de cellules, de milieux de culture et à l'évacuation de milieux de culture conditionnés.
- 15 17. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel le substrat de croissance comprend un polymère qui peut se plier en une structure tridimensionnelle.
- 20 18. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 17, dans lequel le polymère est constitué d'un matériau poreux et/ou non poreux, d'un matériau de haut poids moléculaire, de céramiques, de fibres, et de feuilles tissées ou de feuilles non tissées.
- 25 19. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 18, dans lequel le polymère est constitué d'un matériau poreux, d'un matériau de haut poids moléculaire, de céramiques, de fibres et de feuilles tissées.
- 20 20. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel la plate-forme peut être basculée dans un mouvement de va-et-vient de 0 à 180 degrés.
- 30 21. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel les pivots peuvent être

- un ou plusieurs de manière à contrôler le basculement de la plate-forme selon un ou deux degré/s de liberté.
22. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel le groupe moteur est un moteur.
- 5 23. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel le groupe moteur est un vérin hydraulique.
24. Appareil pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 1, dans lequel le groupe moteur est un vérin pneumatique.
- 10 25. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules, comprenant les étapes de : (a) préparation d'une chambre stérile qui possède un volume intérieur creux unique, et qui possède un (des) substrat(s) de croissance cellulaire monté(s) sur un ou plusieurs côté(s) terminal(aux) dans la chambre ; (b) d'introduction d'air contenant de l'oxygène en utilisant l'entrée pour gonfler partiellement ladite chambre ; (c) d'introduction d'un milieu de culture cellulaire en utilisant l'(les) entrée(s) ; (d) de placement de la suspension de cellules dans la chambre pour répartir les
- 15 cellules sur le substrat de croissance cellulaire ; (e) de fixation de la chambre sur la plate-forme ; (f) de placement d'un pivot sous la plate-forme ; (g) d'introduction d'air contenant de l'oxygène en utilisant l'(les) entrée(s), et d'ouverture de la (des) sortie(s), pour gonfler la chambre avec l'air passant en continu dans la chambre ;
- 20 (h) de raccordement d'une alimentation, raccordée au pivot pour déplacer la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation ; (i) de réglage d'un contrôle de temps d'utilisation de manière à maintenir l'un des substrats de culture cellulaire immergé ou exposé pendant un laps de temps de manière à
- 25 permettre aux cellules de s'ancrer sur le substrat de croissance cellulaire ou d'être incluses dans le substrat de croissance
- 30

- cellulaire, et à maintenir le mouvement de va-et-vient ou d'oscillation jusqu'à ce que les cellules soient ancrées sur le substrat de croissance et/ou incluses dans le substrat de croissance poreux ; (j) de réglage d'un contrôle de temps d'utilisation de manière à maintenir l'un des substrats de culture cellulaire immergé ou exposé pendant un laps de temps de manière à réaliser l'échange de milieu nutritif ou à contrôler l'apport en milieu nutritif, à la fois, pendant la phase liquide et gazeuse ; (k) de maintien du déplacement de la plate-forme dans un mouvement de va-et-vient ou d'oscillation, dans lequel le substrat de croissance cellulaire est immergé d'un côté, de sorte que le dioxyde de carbone et la nutrition nécessaires sont transférés/mélangés ; et qu'un film mince de milieu de culture est exposé sur le substrat de croissance cellulaire de l'autre côté, de sorte que l'oxygène est reçu par une interface milieu-film mince sans contact direct avec l'air pendant le mouvement de va-et-vient ou d'oscillation ; (l) d'évacuation périodique du milieu de culture conditionné, lequel contient des produits cellulaires sécrétés par des cellules ; (m) de répétition périodique des étapes (j) à (l) pour maintenir une condition de culture cellulaire continue appropriée pendant la période de mise en culture.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
26. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel les cellules à mettre en culture sont des cellules qui dépendent de l'ancrage fixées sur le substrat de croissance.
27. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel les cellules à mettre en culture sont des cellules qui ne dépendent pas de l'ancrage incluses dans le substrat de croissance poreux.
28. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel les cellules sont sélectionnées

- dans le groupe consistant en les cellules eucaryotes, procaryotes, de mammifères, animales, humaines, bactériennes, et fongiques.
29. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel la mise à disposition de la chambre se situe dans la plage de 0 s à 24 h pour les cellules à ancrer ou à inclure sur/dans le substrat de croissance, en fonction de la différente variété et/ou de la densité de cellules.
30. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel la mise à disposition de la chambre se situe dans la plage de 0 s à 4 h pour les cellules à ancrer ou à inclure sur/dans le substrat de croissance, en fonction de la différente variété et/ou de la densité de cellules.
31. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel la mise en place du substrat de croissance cellulaire se fait dans la chambre.
32. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel le contrôle du temps d'exposition et/ou de recouvrement du substrat de croissance cellulaire se situe dans la plage de 0 à 24 h, en fonction de la différente variété et/ou de la densité de cellules.
33. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel le contrôle du temps d'exposition du substrat de croissance cellulaire se situe dans la plage de 0,5 à 12 h, en fonction de la différente variété et/ou de la densité de cellules.
34. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel le contrôle du temps d'exposition du substrat de croissance cellulaire se situe dans la plage de 0,5 à 2 h, en fonction de la différente variété et/ou de la densité de cellules.

- 5 35. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel le contrôle du temps d'exposition du substrat de croissance cellulaire se situe dans la plage de 0 à 1 h, en fonction de la différente variété et/ou de la densité de cellules.
36. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 25, dans lequel le substrat de croissance comprend un polymère qui peut se plier en une structure tridimensionnelle.
- 10 37. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 36, dans lequel le polymère est constitué d'un matériau poreux et/ou non poreux, d'un matériau de haut poids moléculaire, de céramiques, de fibres, et de feuilles tissées ou de feuilles non tissées.
- 15 38. Procédé pour la mise en culture et la préparation de cellules selon la revendication 37, dans lequel le polymère est constitué d'un matériau poreux, d'un matériau de haut poids moléculaire, de céramiques, de fibres et de feuilles tissées.

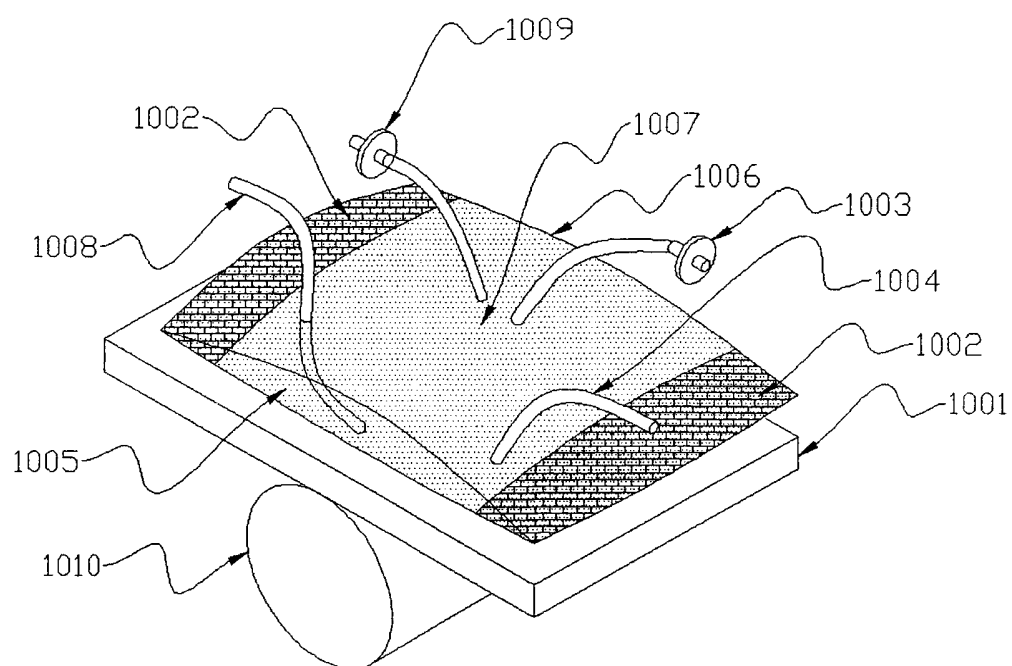


FIG. 1

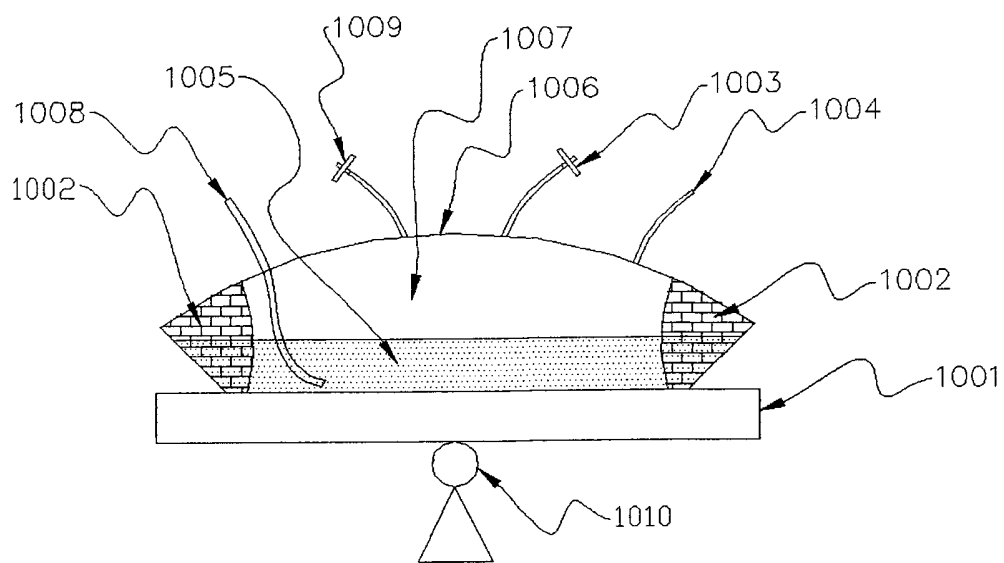


FIG. 2

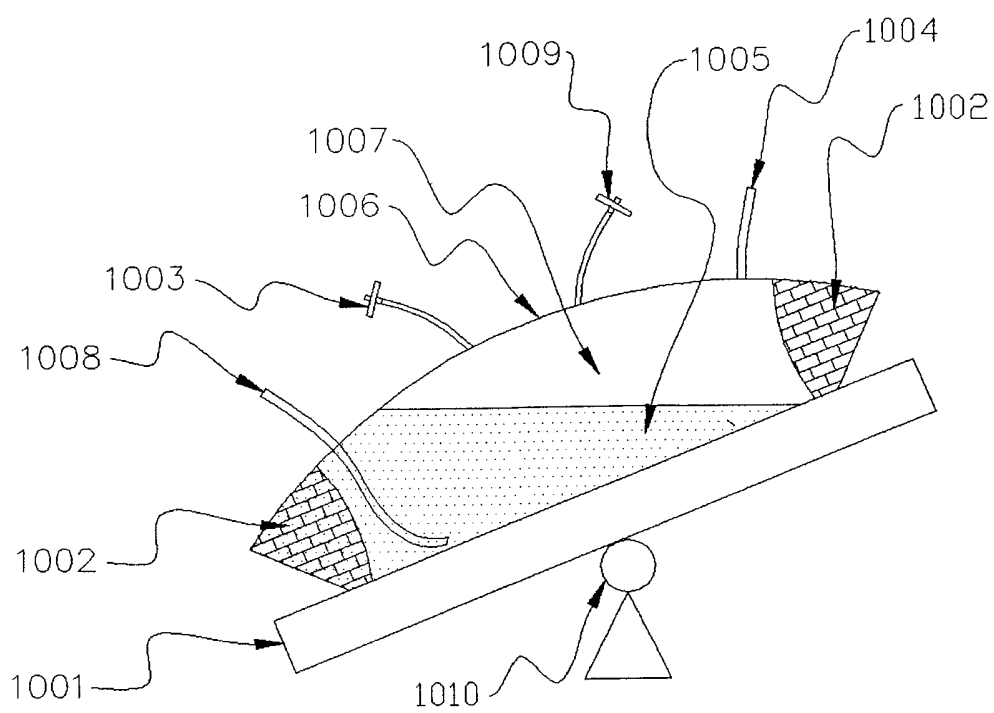


FIG. 3

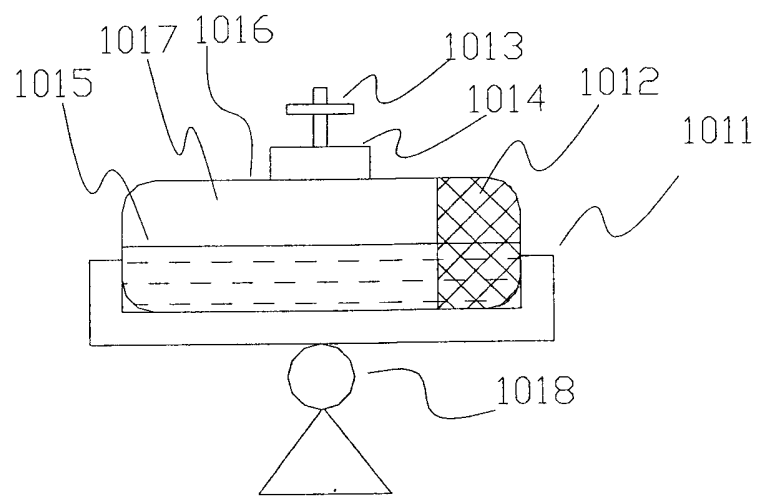


FIG. 6

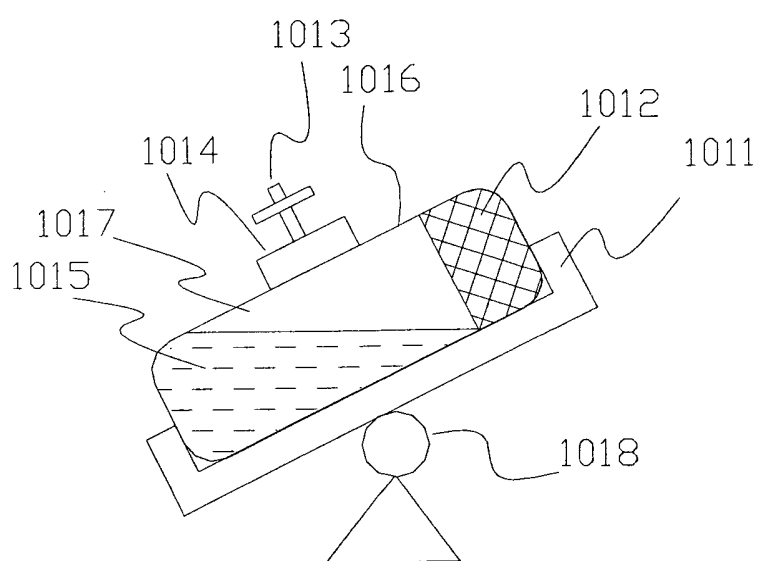


FIG. 7

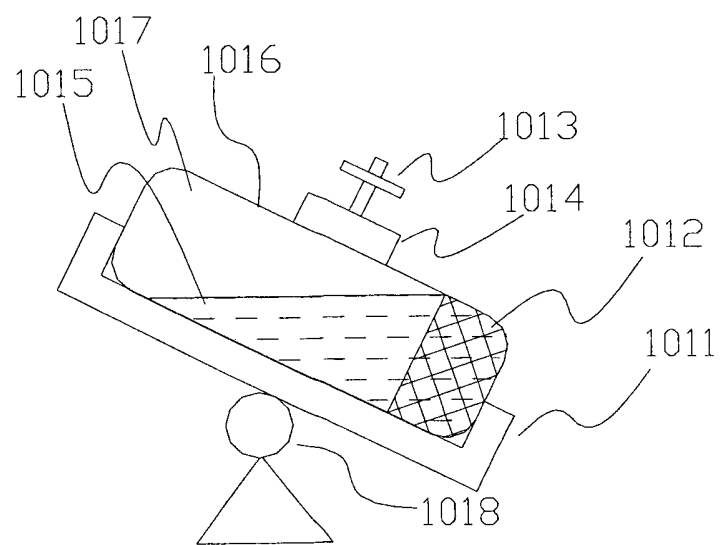


FIG. 8

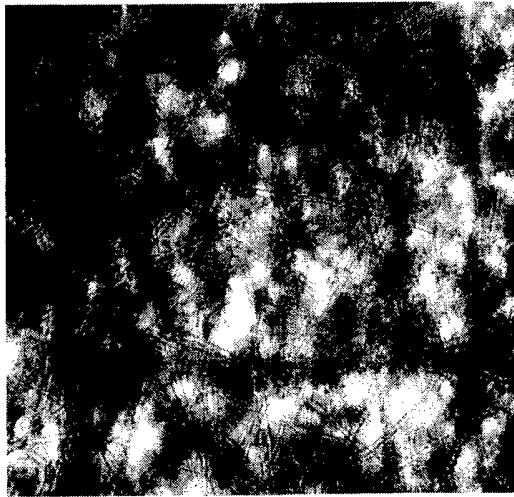


FIG. 9

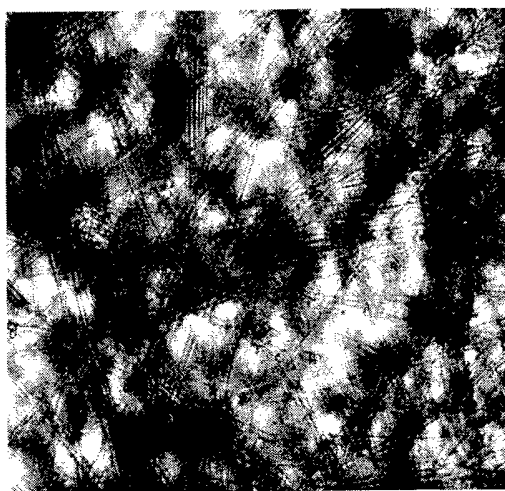


FIG.10

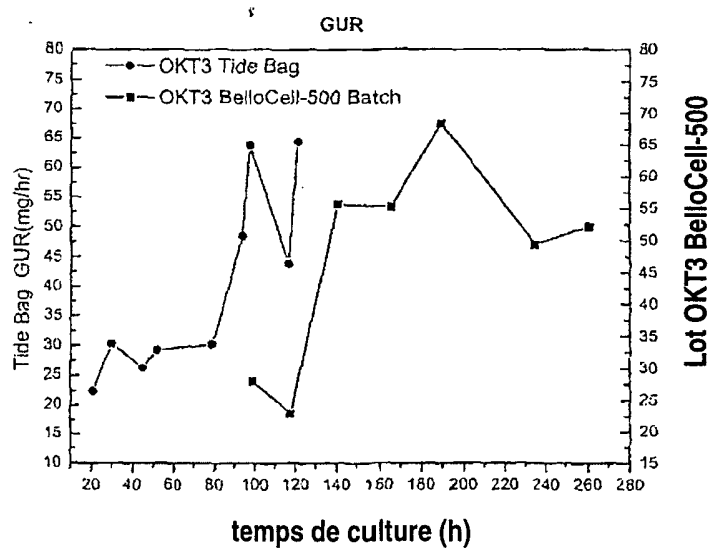


FIG. 11

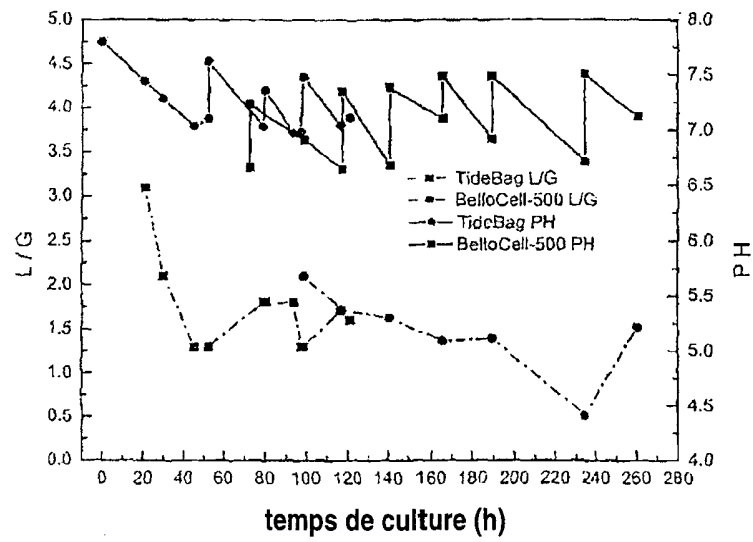


FIG.12

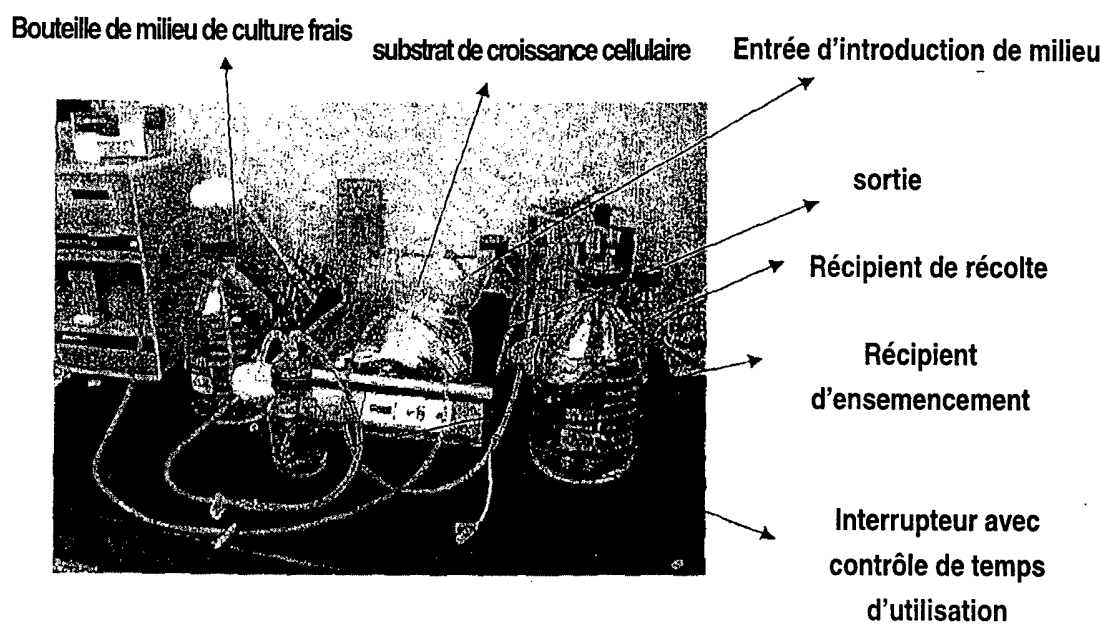


FIG. 13

ABREGE**APPAREIL ET PROCEDE POUR LA PREPARATION ET LA MISE EN
CULTURE DE CELLULES**

5

Un appareil et un procédé de préparation et de mise en culture de cellules incluent une chambre ayant une entrée et une sortie pour introduire un milieu de culture et de l'air. Un substrat de croissance cellulaire est placé dans la chambre pour les cellules ancrées ou incluses. Le mode de réalisation préféré de l'invention revendique un nouveau processus pour contrôler le basculement de la forme de la plate-forme à une extrémité, pour maintenir le mouvement de va-et-vient et d'oscillation pour le processus de mise en culture. Le mouvement de va-et-vient ou le mouvement d'oscillation assure de manière efficace le transfert d'oxygène, de dioxyde de carbone et de milieu nutritif pendant le processus de mise en culture pour la production de produits de protéines cellulaires ou la récolte des cellules.

20 (figure 1)

25



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 9036
BE 200500086

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
A	US 6 190 913 B1 (SINGH VIJAY) 20 février 2001 (2001-02-20) * colonne 3, ligne 44 - colonne 5, ligne 20 * -----	1,25	INV. C12M1/02 C12M3/00
A	US 2003/036192 A1 (SINGH VIJAY) 20 février 2003 (2003-02-20) * revendications 1-15 * -----	1,25	
A	WO 00/66706 A (ROELL, MARCEL) 9 novembre 2000 (2000-11-09) * revendication 1 * -----	1,25	
A	FR 2 519 020 A (SPOFA SPOJENE PODNIKY PRO ZDRAVO) 1 juillet 1983 (1983-07-01) * revendication 1 * -----	1,25	
A	US 5 432 087 A (SPIELMANN ET AL) 11 juillet 1995 (1995-07-11) * colonne 3, ligne 64 - colonne 4, ligne 68 * -----	1,25	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
			C12M
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 juin 2006		Clement, J-P	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

B0 9036
BE 200500086

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

14-06-2006

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6190913	B1	20-02-2001	AUCUN	
US 2003036192	A1	20-02-2003	AUCUN	
WO 0066706	A	09-11-2000	AT 293682 T	15-05-2005
			AU 3954000 A	17-11-2000
			DE 50010111 D1	25-05-2005
			EP 1173542 A1	23-01-2002
FR 2519020	A	01-07-1983	CH 658071 A5	15-10-1986
			CS 231615 B1	14-12-1984
			DE 3248543 A1	14-07-1983
			HU 193483 B	28-10-1987
			YU 273282 A1	31-10-1985
US 5432087	A	11-07-1995	AU 8918691 A	25-06-1992
			BE 1004610 A5	22-12-1992
			WO 9209681 A1	11-06-1992
			DE 69106726 D1	23-02-1995
			DE 69106726 T2	17-08-1995
			DK 559678 T3	08-05-1995
			EP 0559678 A1	15-09-1993