



CH 680985 A5



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 680985 A5

⑤① Int. Cl.⁵: B 01 D 15/08

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

②① Numéro de la demande: 3382/89

②② Date de dépôt: 18.09.1989

③① Priorité(s): 21.09.1988 GB 8822180

②④ Brevet délivré le: 31.12.1992

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 31.12.1992

⑦③ Titulaire(s):
Glaverbel, Bruxelles (BE)

⑦② Inventeur(s):
Dubois, Dominique, Bruxelles (BE)
Delzant, Marcel, Charleroi (BE)
Toussaint, François, Montignies-le-Tilleul (BE)
Kemp, Thierry, Bruxelles (BE)

⑦④ Mandataire:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

⑤④ Procédé biochimique, microbilles de verre et bioréacteur pour séparer une matière d'un milieu fluide.

⑤⑦ L'invention se rapporte à un procédé biochimique pour séparer une matière d'un milieu fluide. On introduit dans le milieu fluide des microbilles de verre sur la surface desquelles est fixé un agent de liaison de la dite matière, on laisse séjourner les microbilles dans le milieu fluide pendant un temps suffisant à la fixation d'une certaine quantité de la dite matière sur les microbilles. On retire les microbilles chargées de matière du milieu, on enlève des microbilles une partie au moins de la matière fixée tout en laissant l'agent de liaison sur les microbilles et on recycle les microbilles avec l'agent de liaison vers le milieu fluide.

Les microbilles utilisées dans ce procédé peuvent porter une couche monomoléculaire de silane comme agent de fixation à l'agent de liaison qui est choisi pour son affinité biologique vis-à-vis de la matière à séparer.



CH 680985 A5

Description

La présente invention concerne un procédé biochimique pour séparer une matière d'un milieu fluide. L'invention s'étend à un milieu porteur pour enlever la matière du milieu fluide et à un bioréacteur et une colonne d'affinité contenant un tel milieu porteur.

L'invention concerne particulièrement la production de différentes variétés de matières biologiques qui sont produites par des cellules animales ou végétales. On peut citer à titre d'exemple de telles matières des protéines virales, des cytokines, des hormones, des enzymes, des anticorps monoclonaux, des vaccins viraux et bactériens, des produits pharmaceutiques, et des composants cellulaires tels que des chromosomes et des organites cellulaires. A titre d'autres exemples, on peut citer des cellules entières, par exemple destinées à des transplantations cutanées ou des greffes de foie, des cellules pancréatiques, rénales ou de rate.

L'invention concerne également des matières biologiques qui ont été obtenues autrement que par un processus biologique, par exemple par broyage mécanique de tissus biologiques, ainsi que des matières, telles que des alcools ou des dérivés ammoniacaux, produites par un processus biologique et qui doivent être séparées du milieu biologique de production. Par exemple, certaines levures produisent de l'alcool qui, s'il n'est pas séparé, augmente jusqu'à une concentration toxique pour la levure. De plus, l'invention concerne des processus biochimiques de dépollution et de purification d'un milieu fluide.

En raison de l'importance et de la demande croissante en médecine humaine et vétérinaire de matières biologiques qui sont produites par des cellules animales, l'invention sera décrite ci-dessous en se référant particulièrement à la production de telles matières.

Selon les méthodes classiques, des matières biologiques sont produites au départ de cellules animales par un procédé de fermentation dans une enceinte de culture, duquel on doit séparer le produit souhaité et le purifier. Le produit souhaité est souvent fortement dilué et présent seulement en de faibles proportions dans le milieu de culture qui contient également de nombreux contaminants. En raison de la dilution, des quantités très importantes de milieu de culture doivent être traitées et concentrées avant de procéder à la purification. En raison de la contamination, le produit est très difficile à séparer et, dans les méthodes classiques, cette séparation nécessite de très nombreuses étapes. Ces opérations sont très lentes et, dès lors, coûteuses. En outre, de tels procédés doivent être effectués en masse. Des cellules se développent pendant un laps de temps dans une enceinte de culture (bioréacteur) contenant un milieu nutritif et le milieu de culture est ensuite traité pour enlever le produit souhaité et le purifier. Les procédés de purification comprennent souvent la séparation des cellules et le traitement du milieu de culture démuné de cellules par différentes étapes de purification basées sur des caractéristiques biochimiques ou biophysiques du produit souhaité, afin de le séparer progressive-

ment de la matière contaminatrice. Une étape de séparation peut par exemple être mise en œuvre en faisant passer le milieu de culture à travers une colonne contenant une matrice poreuse constituée d'un lit de particules telles que des billes d'agarose ou de polyacrylamide qui ont été traitées pour présenter de l'affinité vis-à-vis du produit souhaité, et en séparant le produit des particules porteuses, par exemple en exposant les particules porteuses à un milieu qui possède un pH différent de celui du milieu de culture. A titre d'exemple, on peut séparer un antigène d'un milieu de culture en revêtant les particules porteuses au moyen d'un anticorps de cet antigène. Un tel procédé à étapes multiples et en masse est par sa nature inefficace et coûteux, parce qu'il requiert l'entreposage du milieu biologique à purifier, ce qui l'expose à un risque de dégradation, et implique l'adaptation des réactifs individuels à chaque étape successive.

Un des objets de la présente invention est de fournir un procédé biochimique pour séparer une matière d'un milieu fluide, dans lequel au moins certains de ces désagréments sont réduits.

La présente invention concerne un procédé biochimique pour séparer une matière d'un milieu fluide, caractérisé en ce qu'on introduit, dans le milieu fluide, des microbilles de verre sur la surface desquelles est fixé un agent de liaison de la dite matière, on laisse séjourner les microbilles dans le milieu fluide pendant un temps suffisant à la fixation d'une certaine quantité de la dite matière sur les microbilles, on retire les microbilles chargées de matière du milieu, on enlève des microbilles une partie au moins de la matière fixée tout en laissant l'agent de liaison sur les microbilles et on recycle les microbilles avec l'agent de liaison vers le milieu fluide.

L'invention comprend des procédés dans lesquels le produit collecté enlevé des microbilles n'est pas identique à la matière qui est séparée du milieu fluide. Par exemple, les molécules de cette matière séparée peuvent être altérées au cours de leur fixation sur les microbilles ou pendant son enlèvement des microbilles.

La présente invention fournit un procédé biochimique dans lequel un milieu porteur comprenant des microbilles de verre portant un agent de liaison est véhiculé au travers du milieu fluide de manière à enlever la matière du milieu en une seule étape ou de manière continue, ce qui est en soi plus efficace et, dès lors, moins coûteux que des techniques d'enlèvement en masse et à étapes multiples, telles que celles utilisées jusqu'à ce jour. De plus, parce que les microbilles portant l'agent de liaison sont recyclées vers le milieu fluide, l'agent de liaison est lui-même réutilisable pour une séparation ultérieure de matière. La quantité d'agent de liaison nécessaire à l'enlèvement d'une quantité donnée de matière est donc très fortement réduite, et de ce fait, le coût d'approvisionnement en agent de liaison est également moindre.

L'invention inclut des microbilles de verre qui peuvent être utilisées dans un tel procédé.

L'invention concerne dès lors également des microbilles de verre portant un revêtement, caractérisées en ce que le dit revêtement comprend au moins

un agent de liaison fixé aux microbilles, capable de fixer de manière réversible une matière contenue dans un milieu fluide par réaction d'affinité biologique, de sorte que la dite matière puisse être retirée du milieu fluide, fixée aux microbilles et ensuite enlevée des microbilles tout en laissant l'agent de liaison fixé sur celles-ci. Par l'emploi simultané de plus d'un agent de liaison, que ce soit sur un même porteur ou sur un porteur traité de manière différente, il est possible d'enlever simultanément différentes matières du milieu fluide.

De telles microbilles sont utiles dans des procédés pour séparer des matières biologiques, et elles sont économiques parce que réutilisables. On notera que le coût principal de telles microbilles ne se situe pas dans le coût du verre, mais plutôt dans le coût de l'agent de liaison lui-même et dans le coût du procédé utilisé pour fixer l'agent de liaison sur les microbilles. Parce qu'elles sont réutilisables, de tels coûts peuvent être amortis sur une plus longue durée.

L'emploi de microbilles de verre procure des avantages importants. Des microbilles de verre peuvent être fabriquées facilement et économiquement, et il est très facile d'appliquer une technique appropriée pour fixer l'agent de liaison sur la surface de telles microbilles. Des microbilles en verre peuvent être stérilisées et manipulées facilement, et elles peuvent présenter des propriétés données qui les rend particulièrement aptes à être utilisées en tant que porteur. Par opposition à d'autres types de microbilles, des microbilles en verre ne tendent pas à gonfler par une exposition prolongée à un milieu fluide ou lorsque la concentration ionique dans le milieu varie et, de ce fait, elles garantissent des qualités hydrodynamiques plus sûres et plus régulières pendant la séparation, que ce soit pendant la collecte de la matière, par exemple provenant d'un bioréacteur, ou pendant l'enlèvement de la matière de l'agent de liaison, par exemple dans une colonne d'affinité.

Avantageusement, les dites microbilles sont constituées au moins principalement de microbilles en verre à surface non poreuse. Ceci est une propriété particulièrement souhaitable, parce que des microbilles à surface non poreuse ne sont pas pourvues de pores qui pourraient adsorber et emprisonner des contaminants ou d'autres matières nuisibles, provenant par exemple du milieu fluide ou d'un milieu utilisé pour enlever la matière. En fait, le milieu fluide de croissance de cellules contient non seulement des cellules et le produit souhaité, mais aussi de nombreux contaminants solubles et des débris cellulaires, tels que des morceaux de membranes cellulaires, et des agrégats et des organites d'origine cellulaire. De tels contaminants peuvent être adsorbés ou emprisonnés dans des pores et nuire à la pureté du produit souhaité et pourraient empoisonner les cellules ou avoir sur elles d'autres effets délétères si des microbilles poreuses étaient recyclées vers le milieu fluide. Il peut être extrêmement difficile d'enlever de la matière emprisonnée dans des pores de microbilles de verre, ou en fait, dans des pores de microbilles de toute autre matière. Cependant, des microbilles non poreuses

peuvent être réutilisées facilement sans traitement spécial: on peut simplement les laver énergiquement avant et après avoir enlevé le produit purifié sans qu'il n'y ait d'effet nuisible sur l'agent de liaison ou le produit souhaité.

Les microbilles en verre ont de préférence une densité en accord avec la densité du milieu et avec les procédures pour leur adjonction au milieu, leur contact avec lui et leur enlèvement du milieu. En général, elles ont de préférence une densité moyenne comprise entre 0,5 et 1,5. Elles peuvent être des microbilles pleines, qui auront une densité plus élevée que celle du milieu fluide, et qui pourront être introduites dans la partie supérieure de l'enceinte contenant le milieu fluide et en être retirées près de sa base. En variante et de préférence, elles sont constituées au moins principalement de microbilles en verre creuses. Elles peuvent avoir une densité nettement inférieure à celle du milieu fluide et, dans ce cas il conviendrait de les introduire à la base de l'enceinte et de les enlever par écumage de la surface du milieu fluide. Des microbilles d'une telle faible densité conviennent particulièrement à une utilisation dans un milieu qui doit être agité. Dans de nombreuses formes préférées de réalisation de l'invention, les dites microbilles ont une densité moyenne comprise entre 0,9 et 1,1. De telles microbilles sont facilement mises en suspension dans de nombreux milieux fluides concernés, ont une flottabilité substantiellement neutre ou légèrement positive dans le milieu et peuvent facilement être véhiculées avec le milieu dans un réseau de canalisations. Ceci est avantageux pour obtenir un bon mélange des microbilles dans un tel milieu et pour permettre un temps de séjour convenable pour collecter efficacement le produit.

La dimension des microbilles a aussi un effet sur leur efficacité en tant que milieu porteur pour l'agent de liaison. Le traitement des microbilles est facilité si, ainsi qu'on le préfère, elles ont un diamètre médian inférieur à 125 μm , par exemple $75 \pm 151 \mu\text{m}$. En d'autres termes, on préfère que la majorité (en nombre) des microbilles ait un diamètre inférieur à 125 μm . Il est également souhaitable que les microbilles aient une distribution de dimension assez étroite. Par exemple, on préfère que le diamètre de leur décile supérieur (les 10% en nombre de diamètre plus grand) ne soit pas supérieur à deux fois le diamètre de leur décile inférieur (les 10% en nombre de diamètre plus petit). En variante, ou en complément, il est parfois souhaitable que les diamètres de leurs déciles supérieur et inférieur diffèrent de moins de 20 μm . On a trouvé en particulier qu'une telle distribution étroite de dimension des microbilles, que l'on peut obtenir plus facilement avec du verre qu'avec d'autres substances formant des microbilles, facilite la filtration des microbilles et l'élution de matière d'avec elles. On préfère particulièrement que les microbilles aient un diamètre médian compris entre 20 μm et 30 μm . Ceci procure aux microbilles une surface spécifique élevée qui convient particulièrement à la fixation de l'agent de liaison et à la fixation de la matière à séparer sur l'agent de liaison.

De préférence, le dit agent de liaison est fixé à la

surface des microbilles de verre au moyen d'un agent de fixation. Ceci facilite une fixation forte de l'agent de liaison sur les microbilles pour résister à l'enlèvement de cet agent de liaison pendant le traitement des microbilles pour enlever la matière fixée, et, avantageusement, le dit agent de liaison est fixé à la surface des microbilles de verre par liaison covalente.

L'agent de fixation est typiquement une molécule à chaîne assez longue qui se fixe lui-même solidement au verre à une extrémité de la chaîne et à l'agent de liaison à l'autre extrémité de la chaîne. La fixation à l'agent de liaison doit être telle qu'elle ne perturbe pas la capacité de l'agent de liaison à s'accrocher lui-même à la matière à séparer du milieu fluide.

Différents agents de fixation qui sont capables de se fixer au verre et à des matières organiques sont connus en soi et peuvent être utilisés dans la présente invention. De préférence, le dit agent de fixation comprend un silane, de préférence un silane contenant 6 à 18 atomes de carbone dans sa molécule. Une gamme étendue de silanes est disponible commercialement, et on peut choisir un silane approprié qui se solidarise bien au verre et à l'agent de liaison particulier concerné. Un silane particulièrement approprié est un amino-silane ou un époxy silane, par exemple du gamma-glycidoxypropyltriméthoxysilane. L'agent de fixation peut être formé in situ, par exemple au départ d'amino-alkyl-silane et de glutaraldéhyde. Les fonctions méthoxy du gamma glycidoxypropyltriméthoxysilane se fixent solidement au verre, tandis que la fonction époxyde est particulièrement appropriée pour former des liaisons covalentes, principalement avec des groupes amines de protéines, et les agents de liaison les plus intéressants tombent dans cette catégorie. Dans une variante de forme de réalisation, le silane peut être fixé à un sucre faisant partie d'une glycoprotéine, d'un glycolipide ou d'un polysaccharide servant d'agent de liaison. Une telle réaction avec du sucre est normalement effectuée après que le sucre ait été traité avec un agent oxydant qui réagit avec le sucre pour créer des sites actifs sur lesquels les fixations peuvent avoir lieu.

Dans certaines formes préférées de réalisation de l'invention, le dit agent de fixation forme sur les dites microbilles une couche substantiellement monomoléculaire. Ceci favorise la formation d'une liaison forte entre le verre et l'agent de liaison. Une telle couche s'étend de préférence substantiellement sur la totalité de la surface des microbilles, de manière à fixer le maximum d'agent de liaison. De cette manière, une molécule d'agent de liaison se lie directement à une molécule d'agent de fixation qui, à son tour, se lie directement au verre. Une couche monomoléculaire est moins susceptible d'endommagement, par exemple par abrasion, et ceci réduit fortement le risque que de l'agent de fixation et de l'agent de liaison fixé sur ce dernier soient enlevés et contaminent la matière qu'on désire séparer. De plus, l'adoption de cette caractéristique laisse subsister, sur les microbilles revêtues, un plus petit nombre de sites capables de fixer des matières autres que la matière souhaitée. L'adoption de cette caractéristique est également économique en agent

de fixation et en agent de liaison. En outre, l'utilisation d'une couche monomoléculaire d'agent de fixation est avantageuse, car elle évite que des molécules d'agent de liaison se fixent au porteur en plus d'un endroit, et ceci respecte le mouvement moléculaire des macromolécules biologiques et favorise la disponibilité maximum de sites de fixation de matière à séparer du milieu fluide.

L'invention convient particulièrement pour séparer des matières biologiques produites par des cellules animales, par exemple des protéines virales, des cytokines, des hormones, des enzymes, des anticorps monoclonaux, des vaccins viraux et bactériens, des produits pharmaceutiques, des cellules entières, et des composants cellulaires tels que des chromosomes et des organites cellulaires.

L'invention procure des avantages notables de simplicité de mise en œuvre et d'économie lorsque le dit milieu fluide est un milieu de culture et la dite matière est produite dans ce milieu de culture.

L'invention est particulièrement utile pour séparer un antigène d'un milieu de culture, et à cette fin, on préfère spécialement que le dit agent de liaison et la dite matière interagissent selon le principe d'une paire antigène-anticorps, l'agent de liaison attaché aux microbilles agissant en tant qu'anticorps. L'adoption de cette caractéristique préférée de l'invention facilite la séparation et la purification de la matière souhaitée, en raison de l'affinité très sélective entre une telle matière et un tel agent de liaison. On peut utiliser par exemple une immunoglobuline du type IgG ou IgM (pentamère). On peut utiliser d'autres agents de liaison, par exemple une protéine A ou une protéine G, qui présentent également de l'affinité vis-à-vis de plusieurs antigènes animaux. En variante, pour séparer un anticorps du milieu fluide, son antigène correspondant ou son haptène, ou une molécule présentant le site antigène, peut être utilisé en tant qu'agent de liaison fixé sur les microbilles. L'antigène peut faire partie d'une particule telle qu'une cellule entière ou un fragment de cellule.

De plus, l'invention est utile dans la transformation de molécules de matière biologique ou organique à séparer du milieu fluide. Une telle transformation moléculaire est particulièrement intéressante lorsque la matière, dans sa forme originelle dans le milieu fluide, est nuisible à l'environnement, lorsque la matière transformée est une forme plus utile de la matière originelle dans le milieu fluide, ou lorsque la réaction entre la matière et l'agent de liaison est un indicateur utile de la présence de cette matière dans le milieu fluide.

Les microbilles peuvent être véhiculées de différentes manières dans le milieu fluide. Par exemple, on peut laisser séjourner dans le milieu (qui est de préférence agité) des microbilles qui flottent pendant un laps de temps voulu et ensuite les écumer de la surface. En variante, en utilisant une enceinte de grande dimension pour contenir un tel milieu, de telles microbilles peuvent être introduites à sa base et collectées à la surface du milieu.

Dans des formes de réalisation de l'invention dans lesquelles les microbilles sont véhiculées dans une enceinte de culture, des avantages importants

sont procurés par l'emploi de filtres rotatifs qui confinent les microbilles, à l'intérieur du milieu de culture, dans un espace délimité par les filtres et permettent le passage de la dite matière vers cet espace tout en excluant substantiellement celui des cellules cultivées dans le milieu.

Des microbilles transportant la dite matière passent de préférence par une colonne de chromatographie d'affinité où la matière leur est enlevée. Ceci constitue une manière simple et appropriée pour traiter des charges de microbilles portant de la matière. Si on le souhaite, plusieurs de ces colonnes peuvent être associées à une enceinte de culture unique pour permettre un délai suffisant pour enlever de la matière dans toute colonne donnée, tout en maintenant une réserve de microbilles suffisante pour leur recyclage vers l'enceinte de culture. La matière peut par exemple être enlevée des microbilles par élution dans un milieu acide. Un avantage particulier de l'invention réside dans le fait que l'enlèvement de matière peut être effectué de manière continue.

La contamination du système peut être évitée en préparant des microbilles stériles au moyen d'un équipement stérile et de techniques de manipulation stérile, et si on le désire, la contamination peut être contrôlée par l'emploi d'une préparation antibiotique convenable. On peut utiliser par exemple une fluoroquinolone.

L'invention s'étend à un bioréacteur dans lequel des microbilles selon l'invention sont utilisées.

La présente invention s'étend à un bioréacteur comprenant une enceinte contenant un milieu fluide et des microbilles telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est pourvu de moyens pour retirer des microbilles du milieu de manière continue et pour y introduire des microbilles de manière continue. De manière spécifique, l'invention concerne un bioréacteur destiné à contenir un milieu fluide, caractérisé en ce qu'il comprend une première zone destinée au contact entre le milieu fluide et des microbilles de verre portant un agent de liaison d'un composant du milieu fluide, et une seconde zone destinée à la séparation ultérieure du dit composant d'avec les microbilles.

Il existe plusieurs manières pour réaliser deux zones dans le réacteur: les zones peuvent être dans des enceintes séparées mais interconnectées, ou elles peuvent être dans différents compartiments d'une enceinte unique. Un moyen convenable pour obtenir des zones différentes à l'intérieur d'une même enceinte est d'employer entre elles des feuilles perforées ou des tamis, par exemple un réseau maillé en acier inoxydable. Un réseau maillé de forme cylindrique convient spécialement à cette fin. Le cylindre est de préférence également pourvu de moyens pour le mettre en rotation, de manière à éviter le passage de certains composants du milieu fluide au travers du réseau et à réduire le risque de colmatage. De tels réseaux maillés cylindriques rotatifs sont dénommés filtres rotatifs dans la présente description. Ils peuvent être aussi d'un type qui peut être abaissé dans le milieu fluide et extrait du milieu par relevage, ce qui permet aux microbilles de prélever du milieu fluide le composant sou-

haité, de les séparer du milieu fluide avec le cylindre, et de les séparer du composant souhaité tout en les laissant à l'intérieur du cylindre.

Une version particulièrement préférée de bioréacteur avec filtre rotatif comprend une enceinte destinée à contenir un milieu fluide et des filtres interne et externe qui délimitent entre eux un espace annulaire au sein de la dite enceinte, des moyens pour animer les dits filtres d'un mouvement de rotation de manière à empêcher substantiellement que de la matière, en suspension, du dit milieu pénètre dans le dit espace annulaire, tout en permettant la pénétration d'un produit soluble d'un procédé biologique, dissous dans un tel milieu, et des moyens pour véhiculer des microbilles de verre dans le dit espace annulaire.

L'utilisation d'un bioréacteur d'une telle simplicité de construction procure un procédé biochimique efficace et économique pour séparer une matière d'un milieu de culture. L'emploi d'un tel ensemble de deux filtres rotatifs (dénommé ci-après filtre rotatif double) procure des avantages importants. Les microbilles peuvent être confinées dans une surface bien délimitée de l'enceinte de culture, de manière à simplifier le déplacement des microbilles dans cet espace en leur permettant d'y séjourner pendant un laps de temps voulu. Ceci favorise l'efficacité du procédé de séparation. Parce que les cellules cultivées du milieu peuvent être hors de la zone où se trouvent les microbilles, la liaison de la matière à l'agent de liaison peut s'effectuer sans entrave. Un autre avantage de l'utilisation d'un filtre rotatif double est que la dimension maximum des particules qu'un filtre donné peut laisser passer, peut être modifiée, quelle que soit la dimension des mailles du filtre, en augmentant la vitesse de rotation du filtre. De ce fait, on peut utiliser un filtre rotatif double unique, à différents moments, dans le traitement de différentes matières qui nécessiterait, en d'autres circonstances, deux filtres rotatifs doubles dimensionnés différemment. Un autre avantage réside également dans le fait que les mailles, dans des filtres rotatifs tournant rapidement, ont beaucoup moins tendance à se colmater que celles de filtres stationnaires. Le procédé peut par exemple être mis en œuvre par filtration depuis un compartiment d'entrée vers un compartiment de sortie séparés ou délimités par de tels filtres rotatifs.

Des moyens peuvent exister pour extraire du fluide d'un espace situé à l'intérieur du dit filtre interne et pour acheminer ce fluide pour le mettre en contact avec des microbilles à l'extérieur de l'enceinte, et ensuite revéhiculer ce fluide vers l'enceinte. Ceci est une manière très simple d'assurer que du fluide transporte ou rince, par exemple, des microbilles, tout en utilisant efficacement le milieu fluide et en maintenant une quantité suffisante dans l'enceinte de culture.

Dans des formes préférées de réalisation de l'invention, au moins une colonne d'affinité est associée à des moyens pour amener des microbilles vers la colonne et pour renvoyer des microbilles vers l'enceinte.

L'invention s'étend à une colonne d'affinité contenant des microbilles revêtues, telles que décrites ci-

dessus. Une telle colonne présente de bonnes propriétés hydrodynamiques lorsqu'elle est chargée, et on peut facilement la vider par rinçage au moyen d'un milieu fluide, par exemple un milieu de culture, qui permet le maintien de la colonne et des microbilles dans un circuit stérile.

Certaines formes préférées de réalisation de l'invention seront maintenant décrites à titre d'exemple en se référant aux figures annexées, dans lesquelles:

La fig. 1 est une vue schématique en perspective d'un bioréacteur, dans laquelle une partie du recouvrement a été enlevée pour révéler les détails internes;

La fig. 2 est un schéma synoptique d'une deuxième version de bioréacteur;

La fig. 3 est un schéma synoptique d'une troisième version de bioréacteur;

Les fig. 4a et 4b sont des schémas synoptiques d'une quatrième version de bioréacteur; et

La fig. 5 est un schéma synoptique d'une cinquième version de bioréacteur.

Le dessin du bioréacteur de la fig. 1 représente une enceinte de culture 1 qui contient deux filtres cylindriques coaxiaux 2, 3 montés sur une base commune et formant ensemble un filtre rotatif double. Les filtres 2, 3 sont en treillis d'acier inoxydable dont les mailles sont comprises entre 5 μ m et 10 μ m. Ils sont animés d'un mouvement de rotation au moyen d'un moteur 4, par exemple à une vitesse de 100 tours/min. Le système d'agitation du milieu de culture n'est pas représenté. L'agitation du milieu de culture peut être indépendante de la rotation du filtre rotatif double utilisé. Des conduits 6 et 7 véhiculent des microbilles de verre portant l'agent de liaison au travers de l'espace annulaire 8 entre les deux éléments 2, 3 du filtre rotatif double. Un conduit 9 alimente l'enceinte de culture en milieu de culture à l'extérieur du filtre rotatif double, et un conduit 10 extrait du fluide de l'espace central du filtre rotatif double. Le réacteur est également pourvu de moyens (non représentés) pour contrôler et régler la pression à l'intérieur de l'enceinte de culture 1, le niveau du liquide, la teneur en dioxyde de carbone et en oxygène dissous, la température et le pH du milieu de culture, la vitesse de rotation du filtre rotatif double et la circulation des microbilles.

Dans un exemple caractéristique faisant usage du bioréacteur de la fig. 1, des microbilles creuses en verre ayant une densité moyenne juste inférieure à 1 sont calibrées de manière à donner une charge dont les diamètres sont compris entre 20 μ m et 30 μ m. Les microbilles sont d'abord lavées à l'acide chlorhydrique et, si on le désire, avec un détergent. Spécifiquement une charge de 20 g de microbilles est lavée à l'acide chlorhydrique pendant une heure à une température comprise entre 20°C et 80°C. Ce traitement a un effet important sur l'équilibre ionique du verre et sur sa stabilité lorsqu'il est exposé à un environnement biologiquement actif. Le traitement de lavage à l'acide peut détruire des microbilles dont les parois sont trop minces ou non complètement formées. Les microbilles sont décan-

tées pour séparer celles qui sont bien conformées d'avec les débris de celles qui sont mal conformées, qui ont tendance à couler, et elles sont rincées à l'eau déminéralisée jusqu'au moment où le pH de l'éluant revient à des valeurs comprises entre 6 et 7, et les microbilles sont ensuite séchées à poids constant à une température de 130°C.

En variante, les microbilles sont choisies de manière à avoir une densité moyenne de 0,51 et des diamètres compris entre 53 μ m et 90 μ m.

Un agent de fixation est ensuite fixé aux surfaces des microbilles traitées. L'agent de fixation choisi dans cet exemple est du gamma-glycidioxypropyltriméthoxysilane. Dans une première méthode, 2 ml de silane sont dissous dans 75 ml de toluène pour traiter 15 g de microbilles. Les microbilles sont immergées dans la solution pendant 18 heures à 110°C, puis elles sont enlevées et lavées successivement au moyen de 200 ml de toluène, de 10 ml de méthanol et ensuite d'eau déminéralisée. En variante, l'agent de fixation utilisé est du N-triméthoxysilyléthylène-diamine.

Dans une seconde méthode, 1,2 ml de silane sont dissous dans 60 ml d'une solution aqueuse de 0,1 mole d'acétate de sodium tamponnée à un pH de 5,5, et 15 g de microbilles sont traités dans cette solution pendant 4 heures à 90°C et ensuite lavées à l'eau déminéralisée. Dans ce traitement, certains des groupes fonctionnels époxy sont hydrolysés en diols. Afin de terminer l'hydrolyse, les microbilles sont traitées au moyen d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à un pH de 3 pendant 2 heures, à raison de 40 ml de solution par gramme de microbilles. Les microbilles sont ensuite lavées à l'eau distillée.

Afin de favoriser l'aptitude du silane à fixer de la matière protéinique sur les microbilles, on fait réagir à leur tour les groupes diol avec des ions periodate pour former des groupes aldéhyde. 5 g de ces microbilles sont mises en suspension dans 50 ml de méthanol refroidi par de la glace, et une solution de 380 mg de NaBH₄ et de 30 mg de NaOH dans 10 ml d'eau est ajoutée par portions de 2 ml. On laisse revenir la température à la valeur ambiante, et la suspension est ensuite chauffée à 40°C pendant 15 minutes. Les microbilles sont ensuite lavées successivement dans de l'eau, de l'acétone et de l'éther et ensuite séchées sous vide à 70°C pendant deux heures. Ceci convertit les groupes diol en groupes alcool primaire. Dans ces conditions, le test à la 2,4-dinitrophénylhydrazine est négatif, ce qui indique l'absence de groupes fonctionnels carbonyle résiduels, les microbilles restant blanches.

3 g de microbilles ainsi traitées sont ensuite traitées par une solution de 70 mg de 1,1'-carbodiimide (un excès d'environ 100 fois) dans 25 ml de dioxane anhydre. Après un séjour de 2 heures à la température ambiante, les microbilles sont filtrées, lavées à l'éther et séchées sous vide dans un dessiccateur. Ce traitement donne des microbilles revêtues d'un silane ayant un groupe fonctionnel imidazole carbamate qui s'adapte bien à la fixation de toute NH₂-protéine.

Des microbilles portant l'agent de fixation fixé de la manière décrite sont essayées quant à leur capa-

cité de fixer des protéines en utilisant de l'albumine de sérum bovin (BSA). 250 mg de microbilles sont utilisées dans chaque essai. Les microbilles sont agitées par rotation horizontale à une vitesse de 60 tours/min dans 1,5 ml de solution, tamponnée par 100 mM de borate et 150 mM de NaCl à un pH de 9, contenant 5 mg de BSA par ml à une température de 20°C. Les microbilles dont l'agent de fixation comprenait des groupes fonctionnels époxy fixent en moyenne 80 µg de BSA après 2 heures de traitement. Les microbilles dont l'agent de fixation comprenait des groupes fonctionnels imidazolyl carbamate fixent en moyenne 424 µg de BSA après 2 heures de traitement, et 480 µg de BSA après 4 heures de traitement.

Le choix de l'agent de liaison dépend évidemment du produit qu'on désire collecter et purifier. Dans l'exemple suivant, on collecte et on purifie un anticorps monoclonal de souris IgG1 produit par des hybridomes de souris cultivés dans le bioréacteur.

On utilise en tant qu'agent de liaison pour fixer l'agent de fixation du sérum total de lapin immunisé contre l'immunoglobuline de souris IgG1 (sérum RAM [rabbit-anti-mouse]). Le IgG1 est reconnu comme étant un antigène étranger par le sérum de lapin et provoque la formation in vivo de l'immunoglobuline de lapin en tant qu'anticorps spécifiquement dirigé contre cet antigène.

Des microbilles portant l'agent de fixation sont traitées à raison de 250 mg par ml de solution de traitement. La solution de traitement est tamponnée au borate et contient 20 mg/ml de sérum RAM. Les microbilles sont mises en suspension dans la solution de traitement pendant 2 heures à 20°C et maintenues en agitation horizontale à raison de 60 tours/min, et elles subissent ensuite une incubation de post-réaction pendant 16 heures à 7°C. On a trouvé que les microbilles fixent de manière covalente 660 µg de sérum RAM par gramme de microbilles séchées, lorsqu'on effectue des mesures par une méthode Folin-Lowry modifiée pour des protéines fixées. Après fixation de l'agent de liaison, il est souhaitable de désactiver tous les sites restants de l'agent de fixation non utilisé afin de favoriser la spécificité des microbilles à fixer la matière souhaitée. On effectue cette opération en lavant les microbilles portant l'agent de liaison dans une solution tampon contenant 150 mM de glycine-NaOH à un pH de 9, et on les lave ensuite dans un tampon neutre.

Un tel agent de liaison de sérum polyclonal peut, si on le désire, être remplacé par un anticorps monoclonal. Un tel anticorps monoclonal peut être obtenu à partir d'une culture d'hybridomes ou de lymphocytes transformés, par exemple des hybridomes de rat produisant des anticorps monoclonaux de rat (IgR), afin de reconnaître une caractéristique antigénique unique d'une immunoglobuline de souris, et peut être fixé de la même manière.

L'immunoglobuline de souris IgG1 à purifier peut être produite par des hybridomes de souris dans un milieu approprié contenu dans l'enceinte de culture. Un milieu de culture approprié est le «Dulbecco Modified Eagle's Medium» contenant du sérum, ou un

substitut de sérum. Le pH est ajusté à 7,2. Le milieu de culture contient également un inhibiteur (par exemple de la pepstatine A ou du fluorure de phényl méthyl sulfonyl) pour éviter la production d'enzymes qui, en d'autres circonstances, digéreraient les protéines présentes. Le milieu de culture est introduit dans l'enceinte de culture de manière à entourer le filtre rotatif double. Le filtre est contrôlé pour permettre le passage du liquide de culture et de toute matière dissoute, mais pour retenir les cellules cultivées dans cette zone périphérique de l'enceinte de culture.

Au moyen du dispositif représenté dans la fig. 1, les microbilles portant l'agent de liaison sont introduites dans l'espace 8 entre les filtres, de sorte qu'elles sont immergées dans le liquide de culture qui contient du IgG1 dissous. Les microbilles portant le produit fixé sont enlevées du milieu de culture de manière continue par le conduit 7, dans du liquide de culture servant de porteur, et traversent une colonne chromatographique (non représentée), dans laquelle elles constituent la matrice chromatographique. Le liquide de culture porteur peut être recyclé vers l'enceinte de culture par le conduit 9. Le produit IgG1 est enlevé des microbilles par élution en utilisant, par exemple, un milieu acide et une pression faible à modérée; les microbilles, portant toujours l'agent de liaison, sont recyclées vers l'enceinte de culture en utilisant en tant que fluide porteur du liquide de culture extrait du centre du filtre rotatif double via le conduit 10. Le produit voulu IgG1 est immédiatement tamponné pour éviter sa dénaturation, son identité est vérifiée par dosage immuno-enzymatique, et sa pureté est vérifiée par électrophorèse.

En variante, le conduit 7 constitue lui-même une colonne chromatographique au travers de laquelle le fluide de culture est véhiculé de manière continue, de sorte que la fixation du produit IgG1 s'effectue en continu. La colonne est retirée après un temps de séjour convenable et est remise en place après élution du produit. Dans une telle colonne contenant 20 g de microbilles et ayant une capacité de 2 mg de IgG1 de souris, un facteur de purification de 750 fois est obtenu en une seule étape avec une électrophorèse protéinique montrant un produit pur.

Des précautions très strictes sont prises pour maintenir des conditions stériles et pour exclure des contaminants de l'enceinte de culture, et le liquide de culture et les microbilles portant l'agent de liaison y sont recyclés pour maintenir les niveaux souhaités. On peut utiliser un antibiotique à large spectre qui n'empoisonne pas ou ne contamine pas les cellules, par exemple un fluoroquinolone.

En variante, des microbilles sont traitées avec un amino-silane et du glutaraldéhyde en tant qu'agent de fixation, et on obtient des résultats similaires.

Dans une autre variante, les microbilles sont revêtues avec un aminosilane en tant qu'agent de fixation. Les chaînes oligosaccharide d'une immunoglobuline telle que celle dénommée IgR dans cet exemple, qui est destinée à servir d'agent de liaison

d'anticorps, sont oxydées. A cette fin, on utilise 1 mg de IgR par gramme de microbilles. 20 µl d'une solution (0,5M) de NaIO₄ sont ajoutés par ml d'une solution contenant le IgR dans un milieu d'acétate à un pH de 5,5. On laisse l'oxydation se dérouler pendant 20 minutes à la température ambiante, sous agitation intermittente. Le IgR oxydé est ensuite séparé du milieu d'oxydation par une technique chromatographique classique. Le IgR oxydé en solution est ensuite ajouté au microbilles silanisées en une quantité de 2 ml de solution par gramme de microbilles dans une enceinte de réaction tournant à une vitesse de 30 à 60 tours/min. Après 24 heures, les microbilles sont traitées pendant 2 heures, à la température ambiante et sous faible rotation, avec une solution de glycine pour désactiver tous les sites libres restant sur le verre. Les microbilles sont ensuite lavées dans un filtre de Buchner, et mises en contact d'une solution tampon de phosphate (2 ml par gramme de microbilles). 20 µl de solution réductrice de BaBH₃CN (0,5M) sont ajoutés par ml de solution tampon, et laissés pendant 4 heures en rotation lente à la température ambiante, avant qu'elles soient de nouveau lavées dans un filtre de Buchner. Les microbilles sont récoltées et entreposées à froid dans une solution tampon (0,01M, pH 7,4) d'acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique (MOPS) contenant si nécessaire du NaCl et du NaN₃.

Le système bioréacteur illustré dans la fig. 2 comprend une enceinte de culture 11 dans laquelle des microbilles de verre revêtues sont acheminées par le conduit 13, au départ d'une trémie 15. L'enceinte 11 contient également le milieu de culture fluide biologique dont on désire séparer la matière souhaitée. Un agitateur 17 est destiné à favoriser le mélange des microbilles dans le milieu fluide. Une conduite de sortie 19 pourvue d'une vanne connecte l'enceinte 11 à une colonne chromatographique 21. Une canalisation d'alimentation 23, alimentée par cinq conduits différents d'amenée de liquide, 25, 26, 27, 28 et 29, chacun pourvu d'une vanne de contrôle, est connectée à la base de la colonne 21. Les fluides à fournir à tour de rôle, par les conduits 25, 26, 27, 28 et 29 sont respectivement du fluide de rinçage de colonne (solution tampon de MOPS), du fluide de premier nettoyage de colonne (solution fortement ionique), du fluide de second nettoyage de colonne (solution d'acétate d'ammonium), du fluide d'élution de matière (solution tampon glycine-HCl) et, en tant que fluide de lavage des microbilles, une solution tampon d'acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-3-propane sulfonique (HEPPS) contenant du NaOH. Un collecteur 31 mène d'un réservoir de fluide 32 au côté de la colonne 21 et sert à introduire du fluide à différents niveaux de la colonne 21 pour favoriser la séparation des microbilles de la colonne en vue de leur retour dans l'enceinte 11. La sortie principale de la colonne 21 est un conduit 33 menant à une vanne 35 qui peut diriger du fluide provenant de la colonne 21, via un conduit 41 traversant un spectrophotomètre 43, vers un conduit de rebut 45 ou vers un conduit de produit 47, ces deux conduits étant pourvus de vannes. La vanne 35 peut, en variante, diriger du fluide et/ou des microbilles dans une con-

duite 37 pourvue d'une pompe 39 retournant à l'enceinte 11.

Le système de la fig. 2 nécessite que les microbilles soient de densité relativement faible, par exemple 0,5 à 0,9, de manière qu'elles puissent flotter vers le haut au travers de l'enceinte et de la colonne 21.

Au cours du fonctionnement du système bioréacteur de la fig. 2, les microbilles revêtues de liant sont amenées dans l'enceinte 11 par le conduit 13 et elles y sont intimement mélangées au fluide biologique sous l'action de l'agitateur 17. Après un temps de séjour suffisant, on arrête l'agitation, la vanne 19 est ouverte et les microbilles, portant maintenant la matière séparée du milieu de l'enceinte 11, flottent vers le haut de la colonne 21. Après rinçage et nettoyage des microbilles par les conduits 25, 26 et 27, le produit souhaité est séparé des microbilles par un fluide d'élution venant du conduit 28. L'éluat est acheminé par le conduit 33 et la vanne 35 où le spectrophotomètre 43 décèle la présence de protéines dans l'éluat et ouvre la vanne 47 pour collecter le produit, les produits de rinçage et de nettoyage ayant été mis au rebut par la vanne 45. Lorsque tout le produit souhaité a été enlevé, les microbilles dans la colonne 21 sont soumises à un cycle de lavage et de rinçage (conduits 29 et 25). La matrice est démantelée par injection sous pression modérée de milieu de culture provenant du réservoir 32 et les microbilles sont alors recyclées au travers de la vanne 19 vers l'enceinte 11, prêtes à séparer de la nouvelle matière biologique à séparer, celle-ci étant produite en continu dans le bioréacteur.

Le système bioréacteur représenté à la fig. 3 présente de nombreux points similaires à ceux du système de la fig. 2 et ceux-ci sont représentés par des numéros de repère équivalents. Cependant, dans le système de la fig. 3, l'enceinte 11 comprend un filtre rotatif double constitué de filtres 2, 3 similaires à ceux de la fig. 1. Pour l'introduction stérile de microbilles dans le système de purification, le conduit 13 d'alimentation en microbilles dans le système de la fig. 3 mène au bioréacteur via la vanne de commutation 53. Un conduit 51 mène de l'espace annulaire 8 à la vanne 53 pour acheminer des microbilles chargées de matière à séparer de l'enceinte 11 vers la colonne 21, en recyclant le fluide débarrassé de microbilles vers le réacteur via la vanne 35 et la pompe 39. Un conduit 10, pourvu d'une pompe 16, relie la chambre intérieure formée par le filtre 2 du filtre rotatif 2, 3, à un conduit pourvu d'une vanne 20 menant au collecteur 31.

Au cours du fonctionnement du système bioréacteur de la fig. 3, les microbilles revêtues de liant et portant la matière séparée sont dirigées vers la colonne 21 au travers du conduit 51 et de la vanne 53. Dans ce système, les microbilles doivent avoir une densité d'environ 1,0. La matière souhaitée est séparée des microbilles par un fluide d'élution venant du conduit 28. Le collecteur rinçage/nettoyage/élution/lavage 25, 26, 27, 28 et 29 et son fonctionnement sont similaires à celui de la fig. 2. De manière similaire, l'éluat est acheminé par le conduit 33 où le spectrophotomètre décèle la présence de protéines et ouvre la vanne 47 si nécessaire. Après lavage

et rinçage, la matrice est démantelée par injection de milieu de culture prélevé à l'intérieur du filtre rotatif sous l'influence de la pompe 16 et de la vanne 20. Les microbilles sont recyclées depuis la colonne 21 vers l'espace annulaire 8 via la vanne 53 et le conduit 51.

Le système bioréacteur représenté aux fig. 4a et 4b diffère des autres systèmes illustrés, en ce qu'il possède un filtre rotatif simple et est dépourvu de colonne chromatographique. Dans ce système, le filtre rotatif est ajustable en hauteur entre une position supérieure (représentée à la fig. 4a) et une position inférieure (représentée à la fig. 4b). Une plaque déflectrice annulaire 63 délimite la limite supérieure du mouvement du filtre rotatif 61. Une bride 67 à la base du filtre rotatif 61 porte un joint annulaire 65 qui vient buter contre la plaque 63 à la limite supérieure du déplacement du filtre rotatif 61. Le conduit 23 issu du collecteur rinçage/nettoyage/élution/lavage 25, 26, 27, 28 et 29 aboutit via une vanne de commutation 54 à un conduit d'alimentation en fourche 23a/23b et, de là, à l'intérieur du filtre rotatif 61. Les conduits 56 mènent également de la vanne 54 à l'espace annulaire 62 formé, lorsque le filtre rotatif 61 est en position haute, entre le filtre rotatif 61 et les parois de l'enceinte 11. Un conduit 42 d'extraction de produit conduit de l'espace annulaire 62 vers l'unité de séparation de produit 43, 45, 47.

Au cours du fonctionnement du système bioréacteur de la fig. 4a/b, le filtre rotatif 61 contenant des microbilles revêtues de liant et ayant une densité d'environ 1 est abaissé dans le fluide 14 (fig. 4b) et y séjourne pendant un temps suffisant pour fixer le produit souhaité sur les microbilles. Le filtre rotatif 61 est ensuite relevé en position haute (fig. 4a) et la matière est séparée des microbilles suivant un cycle rinçage/nettoyage/élution/lavage similaire à celui de la fig. 2.

Le système bioréacteur représenté à la fig. 5 comprend deux enceintes 11 et 71, chacune d'entre elles étant pourvue de filtres rotatifs (respectivement 72a et 72b). Dans cette version, le milieu de culture 14 est filtré en 72a dans l'enceinte 11 et ensuite acheminé via le conduit 73 vers le filtre à membrane 74, pour retenir tous débris de cellules qui auraient pu traverser le filtre rotatif 72a, et ensuite, via le conduit 75, vers l'enceinte 71 où les microbilles revêtues de liant sont débarassées du produit souhaité. Les microbilles, qui ont une densité d'environ 1, restent dans l'enceinte 71. Des conduits 76 et 77 permettent le recyclage du fluide résiduel vers l'enceinte 11, le conduit 76 étant activé par un dispositif de contrôle 78 qui règle le niveau du fluide dans l'enceinte 71 et active une pompe 79 lorsque le niveau dans l'enceinte dépasse une limite supérieure. Après une période suffisante, le recyclage du fluide est arrêté et les fluides de rinçage/nettoyage/élution/lavage sont amenés dans l'enceinte 71 par un conduit d'alimentation 23c et le produit séparé est enlevé par le conduit 41 d'une manière similaire à celle des autres versions.

Revendications

1. Procédé biochimique pour séparer une matière

d'un milieu fluide, caractérisé en ce qu'on introduit, dans le milieu fluide, des microbilles de verre sur la surface desquelles est fixé un agent de liaison de la dite matière, on laisse séjourner les microbilles dans le milieu fluide pendant un temps suffisant à la fixation d'une certaine quantité de la dite matière sur les microbilles, on retire les microbilles chargées de matière du milieu, on enlève des microbilles une partie au moins de la matière fixée tout en laissant l'agent de liaison sur les microbilles et on recycle les microbilles avec l'agent de liaison vers le milieu fluide.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les dites microbilles sont constituées au moins principalement de microbilles en verre à surface non poreuse.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les dites microbilles sont constituées au moins principalement de microbilles en verre creuses.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les dites microbilles ont une densité moyenne comprise entre 0,5 et 1,5, et de préférence comprise entre 0,9 et 1,1.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les dites microbilles ont un diamètre médian inférieur à 125 μm , et de préférence compris entre 20 μm et 30 μm .

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le dit agent de liaison est fixé à la surface des microbilles de verre au moyen d'un agent de fixation.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le dit agent de liaison est fixé à la surface des microbilles de verre par liaison covalente.

8. Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que le dit agent de fixation comprend un silane.

9. Procédé selon l'une des revendications 6 à 8, caractérisé en ce que le dit agent de fixation forme sur les dites microbilles une couche substantiellement monomoléculaire.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le dit milieu fluide est un milieu de culture cellulaire et la dite matière est produite dans ce milieu de culture.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le dit agent de liaison et la dite matière interagissent selon le principe d'une paire antigène-anticorps.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les dites microbilles passent par un espace annulaire situé au sein d'une enceinte de culture et cet espace est délimité par deux filtres rotatifs qui confinent les microbilles, à l'intérieur de l'enceinte de culture, dans cet espace annulaire et permettent le passage de la dite matière vers l'espace annulaire tout en excluant celui des cellules cultivées dans le milieu.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que des microbilles transportant la dite matière passent par une colonne de chromatographie où de la matière leur est enlevée.

14. Microbilles de verre portant un revêtement, caractérisées en ce que le dit revêtement comprend au moins un agent de liaison fixé aux microbilles, ca-

pable de fixer de manière réversible une matière contenue dans un milieu fluide par réaction d'affinité biologique, de sorte que la dite matière puisse être retirée du milieu fluide, fixée aux microbilles et ensuite enlevée des microbilles tout en laissant l'agent de liaison fixé sur celles-ci.

5

15. Microbilles selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont constituées au moins principalement de microbilles en verre à surface non poreuse.

10

16. Microbilles selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisées en ce qu'elles sont constituées au moins principalement de microbilles en verre creuses.

17. Microbilles selon la revendication 16, caractérisées en ce qu'elles ont une densité moyenne comprise entre 0,5 et 1,5.

15

18. Microbilles selon la revendication 17, caractérisées en ce qu'elles ont une densité moyenne comprise entre 0,9 et 1,1.

20

19. Microbilles selon l'une des revendications 14 à 18, caractérisées en ce qu'elles ont un diamètre médian inférieur à 125 μm .

20. Microbilles selon la revendication 19, caractérisées en ce qu'au moins 90% d'entre elles ont un diamètre compris entre 20 μm et 30 μm .

25

21. Microbilles selon l'une des revendications 14 à 20, caractérisées en ce que le dit agent de liaison est fixé à la surface des microbilles de verre au moyen d'un agent de fixation.

30

22. Microbilles selon la revendication 21, caractérisées en ce que le dit agent de liaison est fixé à la surfaces des microbilles de verre par liaison covalente.

23. Microbilles selon l'une des revendications 21 ou 22, caractérisées en ce que le dit agent de fixation comprend un silane.

35

24. Microbilles selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisées en ce que le dit agent de fixation forme sur les dites microbilles une couche substantiellement monomoléculaire.

40

25. Microbilles selon l'une des revendications 14 à 24, caractérisées en ce que le dit agent de liaison est un antigène/anticorps.

26. Bioréacteur comprenant une enceinte contenant un milieu fluide et des microbilles conformes à l'une des revendications 14 à 25, caractérisé en ce qu'il est pourvu de moyens pour retirer des microbilles du milieu de manière continue et pour y introduire des microbilles de manière continue.

45

50

27. Bioréacteur selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il est pourvu d'au moins une colonne d'affinité associée à des moyens pour amener des microbilles vers la colonne et pour renvoyer des microbilles vers l'enceinte.

55

28. Colonne d'affinité contenant des microbilles selon l'une des revendications 14 à 25.

60

65

10

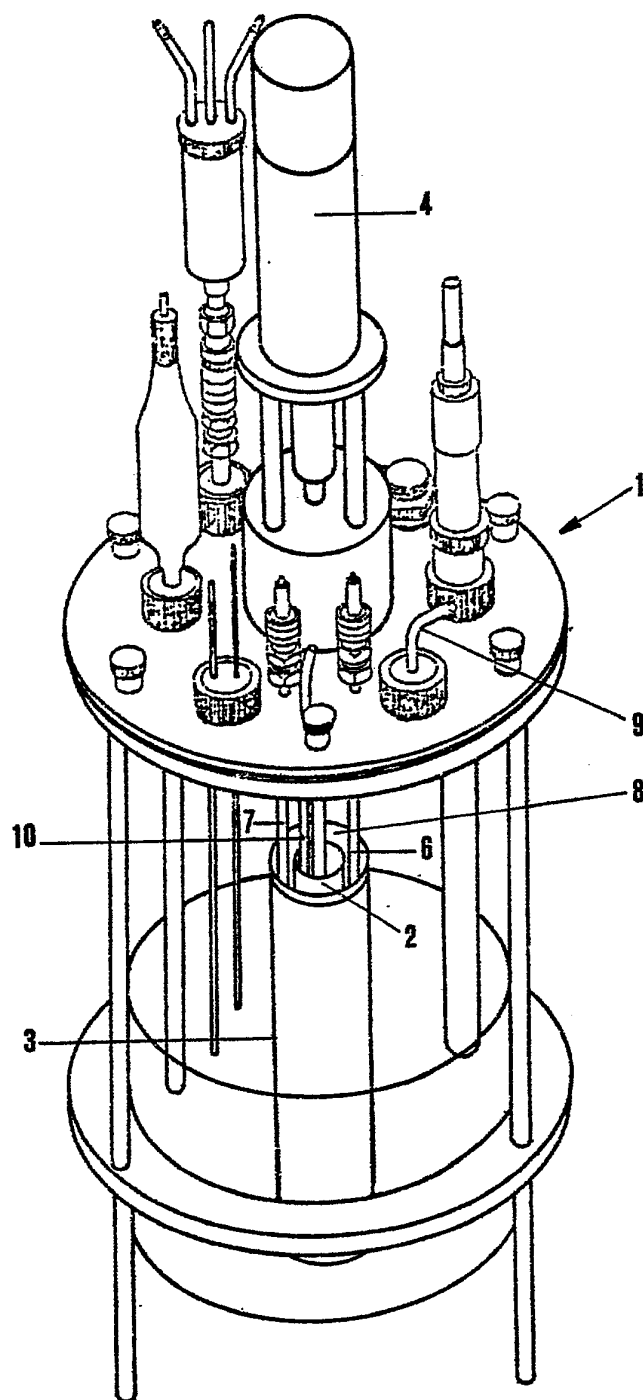


Fig.1

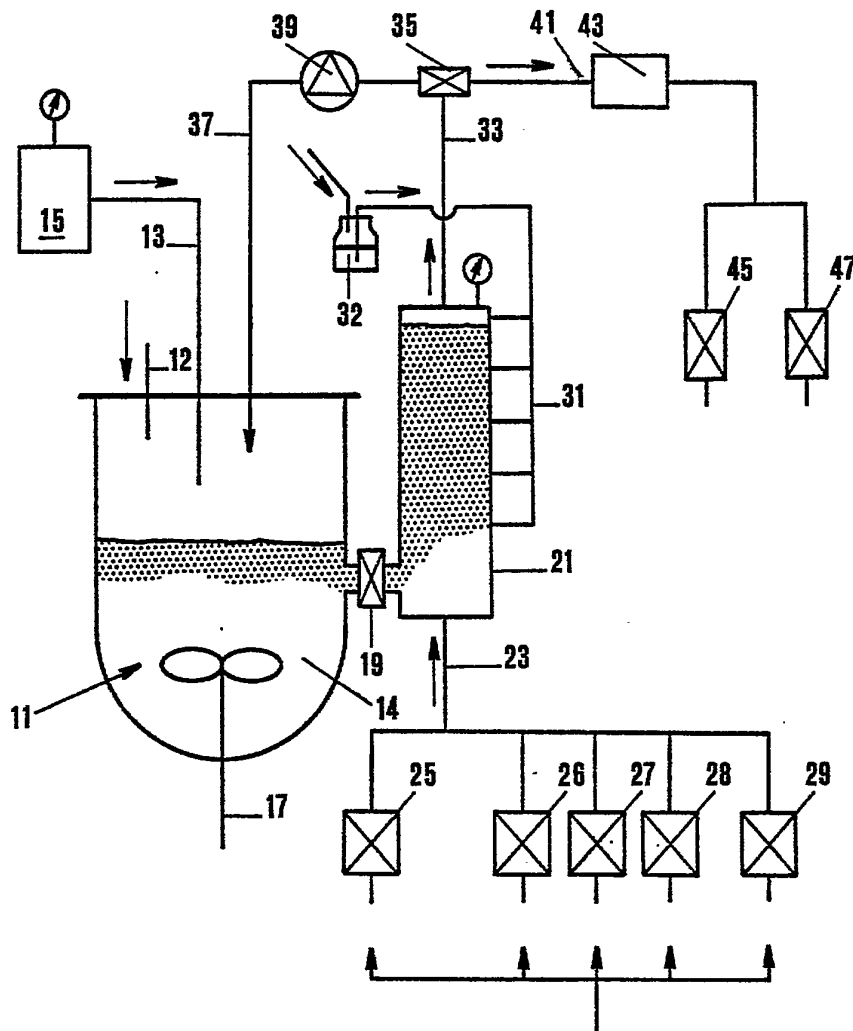


Fig. 2

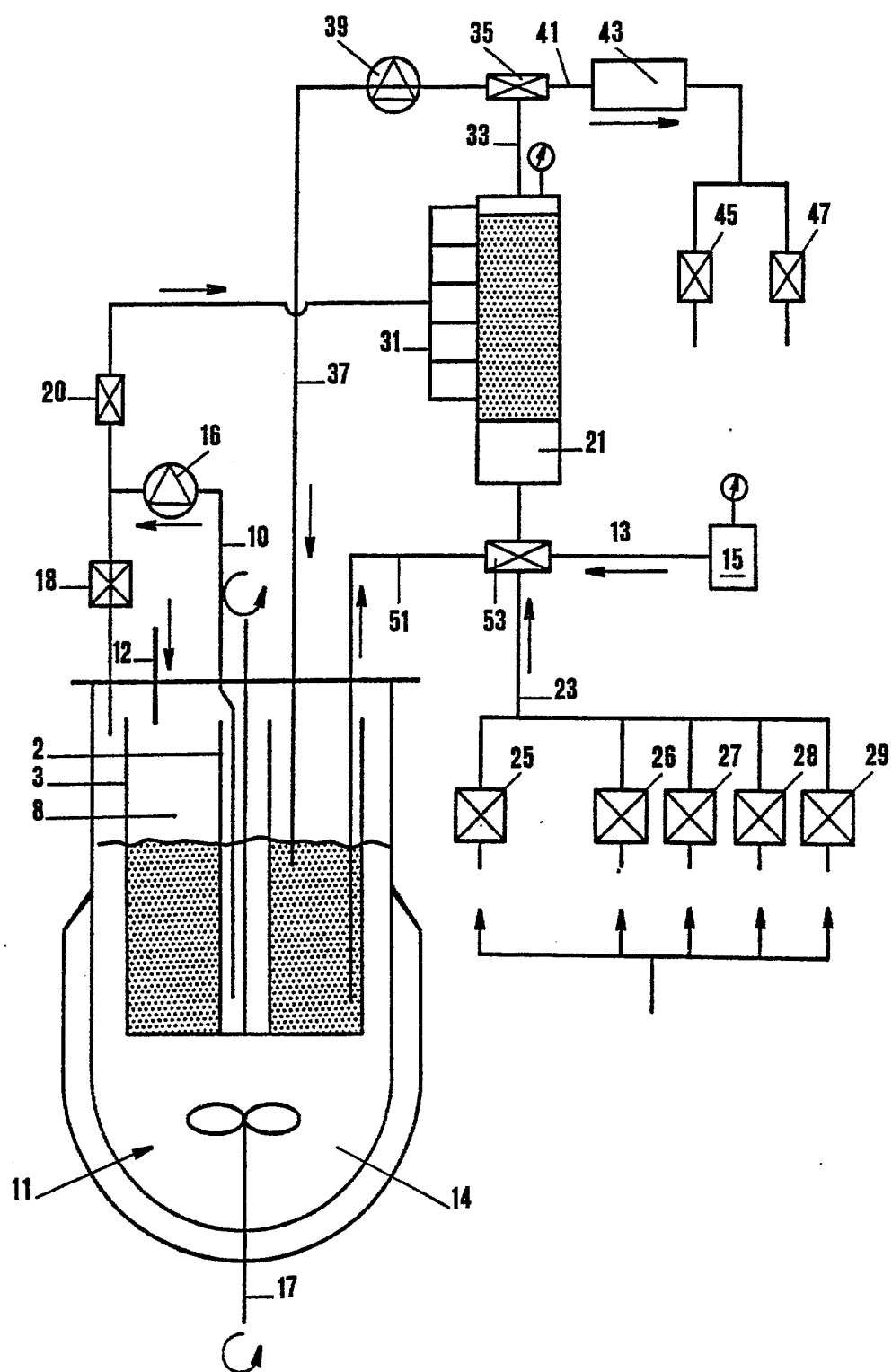


Fig. 3

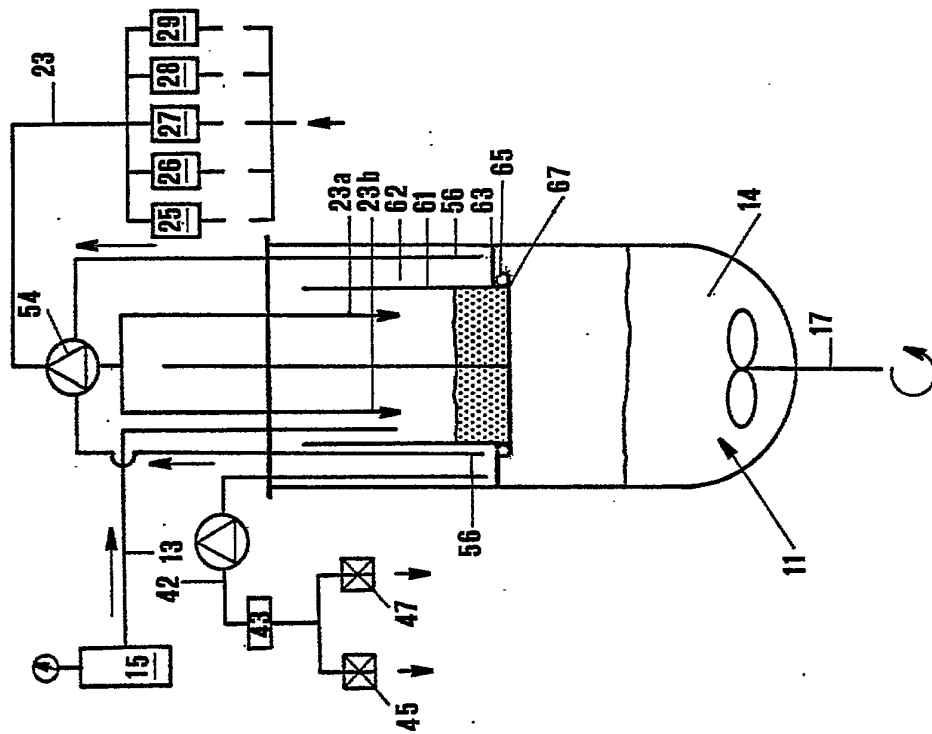


Fig. 4a

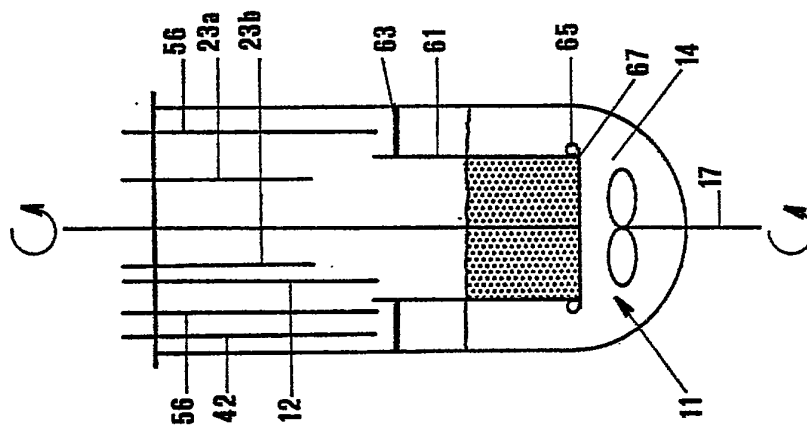


Fig. 4b

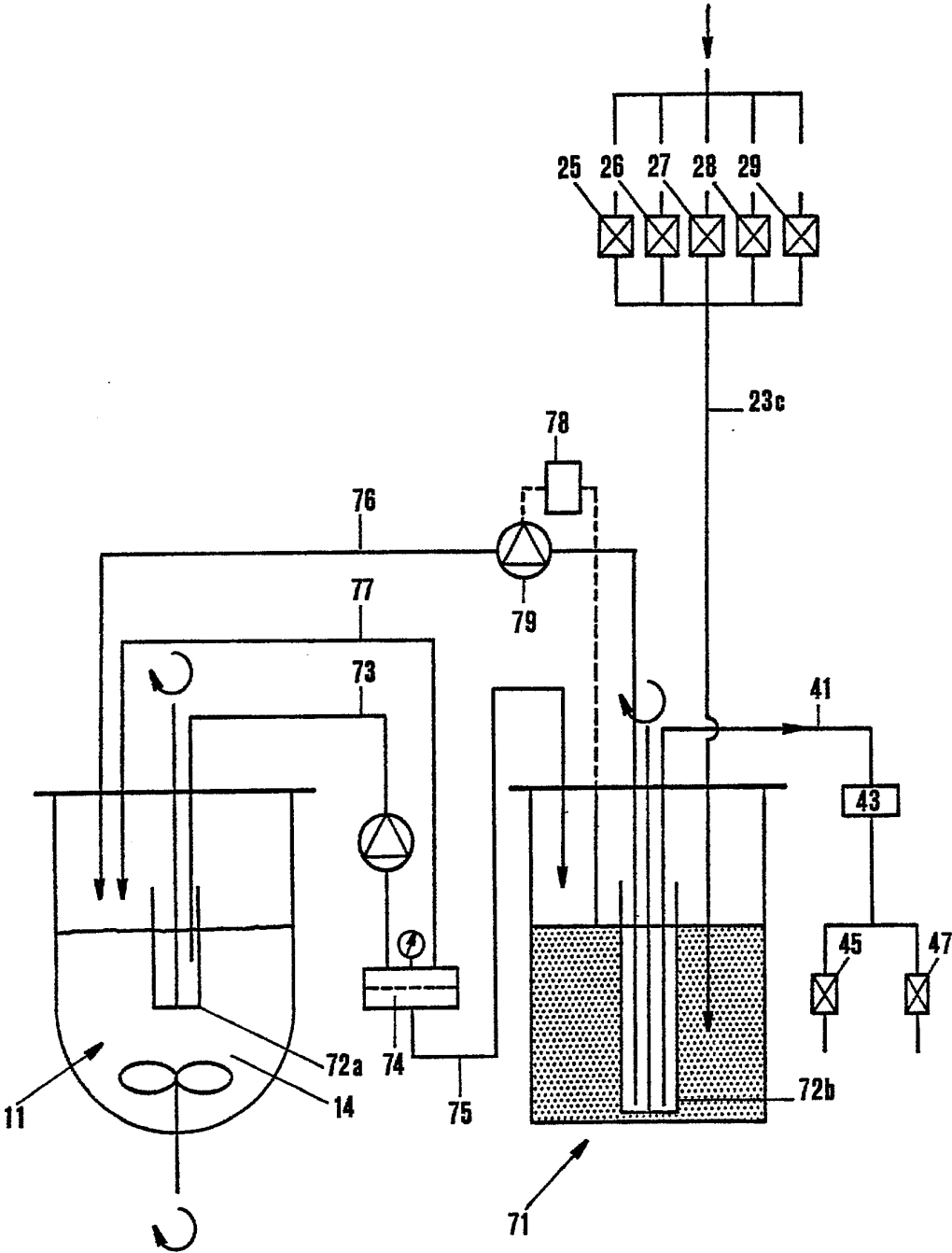


Fig. 5