

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 20019

(54) Procédé de culture de cellules, unité de culture de cellules animales flottantes, et dispositif pour culture de cellules.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 M 3/02.

(22) Date de dépôt..... 17 septembre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 18 septembre 1979, n° 118833/1979.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 34 du 21-8-1981.

(71) Déposant : Société dite : ASAHI KASEI KOGYO KK, résidant au Japon.

(72) Invention de : Koichi Yoshida et Fusakazu Hayano.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein,
20, av. de Friedland, 75008 Paris.

La présente invention se rapporte à un procédé pour la culture de cellules animales flottantes dans une unité de culture de cellules composée de fibres creuses. Plus particulièrement, elle concerne un procédé pour la culture
5 de cellules animales flottantes dans une unité de culture de cellules composée d'une enveloppe et de fibres creuses à extrémités ouvertes enfermées dans l'enveloppe, qui consiste à introduire un milieu de culture dans les fibres creuses et à mettre en culture les cellules animales
10 flottantes dans l'espace entre l'enveloppe et les fibres creuses. La présente invention se rapporte également à une unité de culture de cellules animales flottantes utilisée pour le procédé.

Divers procédés pour la mise en culture de cellules
15 animales sont connus. Les cellules animales comprennent celles qui croissent et prolifèrent en étant attachées à une surface de croissance (cellules attachées) et celles qui croissent et prolifèrent à l'état flottant (cellules flottantes). Des progrès importants ont été effectués
20 dans l'étude de la culture des cellules attachées.

De telles cellules attachées peuvent généralement croître et proliférer uniquement dans une seule couche sur la surface d'attache. Cependant, Richard A. Knazek, et autres, ont réussi à faire croître et proliférer
25 tridimensionnellement des cellules attachées en employant un procédé où l'on fait croître les cellules attachées sur la surface externe de fibres creuses semi-perméables ou capillaires et où un milieu de culture traverse les fibres creuses ou capillaires (voir Journal Of Medicine,
30 Vol. 296, n°3, pages 154-159 (1977)). De plus, dans le brevet U.S. n° 3.997.396 est révélé un procédé pour la croissance et la prolifération tridimensionnelles de cellules attachées, où les cellules attachées croissent sur une surface d'une membrane de fibre creuse et de l'oxygène
35 est fourni à l'autre surface.

Les cellules flottantes sont généralement faibles en comparaison avec les cellules attachées (voir Shoichi

Oboshi et autres, Jingansaibo no Baiyo, Asakura Shoten, Tokyo, page 44 (1975)). On a considéré par conséquent qu'il était difficile de faire croître et proliférer les cellules flottantes aux fortes densités souhaitées.

5 De telles considérations ont conduit à la conclusion que tous les procédés ci-dessus décrits utilisant des fibres creuses étaient limités à la culture des cellules attachées.

Les procédés qui sont généralement utilisés dans la culture des cellules flottantes comprennent un procédé
10 de culture flottante stationnaire et un procédé de culture en suspension utilisant l'agitation, une agitation en rotation ou analogue. Cependant, ces procédés présentent des inconvénients parce que (1) il faut un équipement de grande échelle car il est difficile de faire croître et
15 proliférer les cellules à de fortes densités ; (2) on rencontre des difficultés pour séparer les cellules des milieux nutritifs, des produits métaboliques, des déchets et autres ; (3) il est difficile d'échanger continuellement le milieu de culture ; et (4) il y a une forte possibilité
20 de contamination par d'autres micro-organismes. Il est par conséquent tout à fait souhaitable de supprimer ces inconvénients, en particulier en tenant compte du fait que les cellules flottantes donnent des produits métabo-
liques importants du point de vue médical et vétérinaire,
25 comme le diagnostic et le traitement médical de diverses maladies.

Comme on l'a décrit ci-dessus, les progrès dans les procédés de croissance et de prolifération de cellules animales attachées sont remarquables, et il est maintenant
30 devenu possible de faire croître et proliférer tridimensionnellement les cellules animales attachées, c'est-à-dire comme un tissu, en utilisant des fibres creuses. Par ailleurs, la culture des cellules flottantes a été effectuée par les procédés traditionnels ci-dessus décrits.
35 Selon ces procédés, il est difficile de faire croître et proliférer des cellules flottantes à de fortes densités. Par conséquent, divers problèmes sont posés par l'intro-

duction de produits métaboliques utiles à partir des cellules flottantes par leur culture en grandes quantités

La présente invention a pour objet un procédé de culture permettant la croissance et la prolifération de
5 cellules animales flottantes à la fois à une forte densité et continuellement.

La présente invention a pour autre objet une unité de culture de cellules efficace pour la culture de cellules animales flottantes.

10 On a maintenant découvert que quand des cellules animales flottantes sont mises en culture dans une unité de culture de cellules comprenant une enveloppe et des fibres creuses à extrémités ouvertes enfermées dans l'enveloppe, dans l'espace entre l'enveloppe et les fibres
15 creuses, en faisant s'écouler un milieu de culture à l'intérieur des fibres creuses, les cellules flottantes croissent et prolifèrent à de fortes densités. On a également trouvé que tandis qu'il est généralement souhaitable que le diamètre des pores des fibres creuses soit
20 compris entre environ $20 \text{ \AA}$ et $10^5 \text{ \AA}$, quand les fibres creuses ont des diamètres des pores se trouvant entre $10^2 \text{ \AA}$ et $5 \times 10^4 \text{ \AA}$, les cellules flottantes croissent et prolifèrent à des densités encore supérieures.

On pense que cela a pour raison le fait que, dans
25 les conditions décrites, l'échange des agents nutritifs dans le milieu de culture et des produits métaboliques et déchets dans les cellules se passe très doucement, produisant un environnement favorable à la croissance et la prolifération des cellules.

30 On a également trouvé que le procédé selon l'invention pouvait généralement s'appliquer à des cellules animales flottantes, et que le procédé donnait de bons résultats à la prolifération des cellules flottantes obtenues par fusion des cellules avec d'autres cellules.

35 L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, caractéristiques, détails et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description explicative

qui va suivre faite en référence aux dessins schématiques annexés donnés uniquement à titre d'exemple illustrant plusieurs modes de réalisation de l'invention, et dans lesquels :

- 5 - la figure 1 est une vue en perspective d'une unité de culture de cellules utile dans la mise en pratique de la présente invention ;
- la figure 2 est une coupe transversale faite suivant la ligne A-A de la figure 1 ;
- 10 - la figure 3 est une coupe transversale faite suivant la ligne B-B de la figure 1 ;
- la figure 4 est une coupe transversale faite suivant la ligne C-C de la figure 1 ;
- la figure 5 est une vue en perspective d'un autre
- 15 mode de réalisation d'une unité de culture de cellules utile dans la mise en pratique de l'invention ;
- la figure 6 est une coupe transversale faite suivant la ligne D-D de la figure 5 ;
- la figure 7 est un schéma illustrant un dispositif
- 20 de culture de cellules utilisant des unités de culture de cellules selon l'invention ; et
- la figure 8 est un graphique montrant la différence de densité des cellules entre le procédé selon l'invention et un procédé selon l'art antérieur, le nombre de jours
- 25 de mise en culture étant indiqué en abscisse et la densité des cellules/densité des cellules implantées sur l'axe des ordonnées.

La présente invention concerne un procédé de culture de cellules animales flottantes utilisant une unité de

30 culture de cellules comprenant une enveloppe et des fibres creuses à extrémités ouvertes, ayant des diamètres des pores de $20 \text{ \AA}$ à $10^5 \text{ \AA}$, enfermées dans l'enveloppe, les deux extrémités d'une fibre creuse étant ouvertes à l'extérieur de l'enveloppe, en faisant s'écouler un

35 milieu de culture à l'intérieur des fibres creuses, les cellules animales flottantes croissant dans l'espace entre l'enveloppe et les fibres creuses.

D'abord, on décrira les unités de culture de cellules et le dispositif utiles dans la mise en pratique du procédé selon l'invention.

La structure de l'unité de culture de cellules n'est
5 pas particulièrement limitée à condition que les fibres creuses aient des diamètres des pores compris entre $20 \text{ \AA}$ et $10^5 \text{ \AA}$, soient enfermées dans l'enveloppe et que les deux extrémités des fibres creuses soient ouvertes vers l'extérieur de l'enveloppe.

10 On expliquera les exemples appropriés en se référant aux dessins joints.

Les figures 1 à 4 montrent un mode de réalisation d'une unité de culture de cellules selon l'invention, où un certain nombre de fibres creuses 1 sont enfermées dans
15 une enveloppe 2 obtenue en collant ensemble deux feuilles en forme de sac. Les fibres 1 sont maintenues en place de chaque côté par des couches de fixation 3 et 3' et les intérieurs des fibres creuses 1 ouvrent vers l'extérieur. Des tubes 4 et 4' communiquant avec l'intérieur des fibres
20 creuses 1 débouchent vers l'extérieur de l'enveloppe. Un milieu de culture peut être introduit et retiré au moyen des tubes 4 et 4'. De plus, des tubes 5 et 5' sont prévus, qui communiquent avec l'espace défini entre les fibres creuses 1 et l'enveloppe 2, et ils débouchent vers l'extérieur
25 de l'enveloppe. Les cellules flottantes peuvent être introduites et retirées par ces tubes 5 et 5'. Des parois latérales 6 et 6' obturent les deux extrémités de l'enveloppe 2 et maintiennent simultanément en place les tubes 4 et 4'. Des parois 7 et 7' maintiennent en place
30 les tubes 5 et 5' et obturent la limite des tubes 5 et 5'.

Les figures 5 et 6 illustrent un autre mode de réalisation où une enveloppe est formée en prévoyant des organes de connexion 2-b et 2-b' ayant des tubes 4 et 4' aux deux extrémités d'un tube 2-a recevant un certain
35 nombre de fibres creuses 1. Ces fibres creuses 1 sont maintenues en place à chaque extrémité par des couches de fixation 3 et 3' de la même façon qu'on l'a décrit ci-dessus,

et des tubes 5 et 5' par où les cellules flottantes sont introduites et retirées, sont prévus sur les parois latérales du tube 2-a. Un tube large peut être utilisé par le tube 2-a. Le diamètre interne du tube n'est pas limité mais il est généralement compris entre environ 5mm et environ 10cm.

Dans les modes de réalisation ci-dessus, si l'enveloppe est faite en un matériau mou, les tubes 5 et 5' ne doivent pas être nécessairement prévus parce que les cellules flottantes peuvent être introduites et retirées en utilisant une seringue.

Les unités de culture de cellules ci-dessus décrites peuvent être incorporées dans un dispositif tel que celui illustré sur la figure 7, où les extrémités ouvertes des fibres creuses par exemple, dans une unité de culture de cellules 8, sont reliées par une pompe 10 à un réservoir 11 d'un milieu de culture en utilisant un tube 9 fait en un matériau ayant une excellente perméabilité aux gaz. Tout le dispositif, ou le dispositif à l'exception de la pompe 10, est placé dans un incubateur 12 au gaz carbonique gazeux, et la culture est effectuée à une température constante.

Ci après, on expliquera en plus de détails les pièces à utiliser dans l'unité et le dispositif de culture de cellules.

Les fibres creuses peuvent être faites en toute substance semi-perméable n'exerçant pas d'influence néfaste sur les cellules flottantes. On peut citer, comme exemples appropriés de ces substances, la polysulfone, la polyéther sulfone, le polyacrylonitrile, l'acétate de cellulose, un polycarbonate, du polyméthylméthacrylate, de la cuprammonium cellulose et analogues. Parmi ces substances, on préfère la polysulfone et la polyéther sulfone parce que, comme on le décrira ci-après et comme cela est indiqué dans les exemples, elles permettent la croissance et la prolifération des cellules flottantes à de fortes densités et elles peuvent être

stérilisées à la vapeur.

Afin d'augmenter le taux de prolifération des cellules flottantes, il est nécessaire de fournir continuellement et rapidement de grandes quantités d'agents nutritifs d'oxygéné de retirer les déchets cellulaires. Pour obtenir l'alimentation rapide et continue et l'enlèvement, les diamètres des pores présents dans les parois des fibres creuses doivent être d'au moins 20 Å. On pense que la raison en est que les molécules géantes nécessaires pour la prolifération des cellules flottantes, comme les protéines et les acides nucléiques, doivent être amené du côté du réservoir du milieu de culture. Cependant, quand les diamètres des pores présents dans les parois des fibres creuses dépassent 10^5 Å, les cellules flottantes traversent les pores et la présente invention ne peut être mise en œuvre. Des recherches détaillées ont révélé que si les diamètres des pores présents dans les parois des fibres creuses sont plus importants et que le taux de perméation des substances est plus important, l'allure de prolifération des cellules flottantes n'est pas toujours nécessairement plus important, et que le diamètre des pores approprié pour rendre maximale la prolifération et pour son maintien varie selon le type des cellules flottantes. En général, le diamètre optimal des pores est compris entre 10^2 Å et 5×10^4 Å. Bien entendu, dans ce cas, des pores ayant des diamètres de moins de 10^2 Å et des pores ayant des diamètres de plus de 5×10^4 Å peuvent coexister avec eux, à condition que les diamètres soient inférieurs à 10^5 Å.

Les fibres creuses utilisées dans la présente invention peuvent facilement être produites selon les brevets U.S. n° 3.871.950, n° 3.888.771 et n° 3.896.061 et les brevets britanniques n° 1.506.785 et n° 1.565.113.

La couche de fixation peut être faite en tout matériau n'endommageant pas les cellules flottantes, et ne se détériorant pas pendant une étape de stérilisation. En particulier, on préfère un polymère de silicone adhésif.

Divers matériaux peuvent être utilisés pour former l'enveloppe, et tous n'exerçant pas de mauvaises influences sur les cellules flottantes peuvent être utilisés. On peut citer, comme exemples de ces matériaux, le verre, un polycarbonate, du polystyrène, un polymère de silicone, une polysulfone, du polyéthylène, du polyuréthane et autres. Pour amener des quantités suffisantes d'oxygène aux cellules en prolifération, cependant, on préfère des matériaux ayant une excellente perméabilité aux gaz comme une pellicule ou un tube mince en polymère de silicone, une pellicule mince en polymère de silicone renforcée d'une maille de polyester, une pellicule ou un tube mince de polybutadiène, une pellicule ou un tube mince d'un copolymère silicone-polycarbonate, une pellicule poreuse en téflon, une pellicule poreuse de polypropylène, et autres. L'épaisseur de la pellicule ou du tube est de préférence de 0,05 à 3mm.

Comme matériau pour former les tubes pour l'introduction et le retrait du milieu de culture et des cellules flottantes, on peut employer les mêmes que ceux utilisés pour l'enveloppe.

Le tube à utiliser pour relier l'unité de culture de cellules au réservoir du milieu de culture est également avantageusement fait en un matériau ayant une excellente perméabilité aux gaz. On peut citer comme exemples de tels matériaux, un polymère de silicone, du polybutadiène, un copolymère silicone-polycarbonate, et autres. Tandis que le milieu de culture traverse le tube, de l'oxygène est amené à travers le tube.

Les cellules pouvant être mises en culture par le procédé selon l'invention ne sont pas limitées à condition que ce soit des cellules flottantes. Des exemples de telles cellules flottantes sont décrits en détails dans Soshiki Baiyo, de Junnosuke Nakai et autres, Asakura Shoten, Tokyo, pages 265-275 (1970) et Jingansaibo no Baiyo, de Shoichi Oboshi et autres, Asakura Shoten, Tokyo (1975). On peut citer comme exemples typiques de cellules

flottantes, les cellules lymphocytaires, les cellules de tumeur médullaire, les cellules de lymphome, les cellules leucémiques, les cellules de mastocarcinome, les cellules de cancer du foie, les cellules leucocytaires, et autres.

- 5 Le procédé selon l'invention est très efficace pour la prolifération des cellules de tumeurs médullaires, des cellules leucémiques et des cellules lymphocytaires, et il est également très efficace pour la prolifération des cellules flottantes obtenues par fusion de cellules de
10 tumeurs médullaires et d'autres cellules comme les cellules de la rate, les cellules lymphocytaires et analogues.

L'opération de culture selon l'invention peut être effectuée selon la séquence qui suit, sans limitation.

- D'abord, l'unité de culture de cellules, les tubes
15 et le réservoir du milieu de culture sont stérilisés, séparément ou à l'état où ils sont tous reliés ensemble. Pour cette stérilisation, on peut employer une stérilisation à la vapeur, une stérilisation au gaz, une stérilisation par rayonnement, une stérilisation dans la formaline et
20 autres. En particulier, on préfère la stérilisation à la vapeur parce que l'opération est simple et qu'un traitement ultérieur n'est pas nécessaire après la stérilisation. Comme la polysulfone et la polyéther/sulfone peuvent être stérilisées à la vapeur, on peut avantageusement les
25 utiliser comme matériaux pour les fibres creuses. Dans le cas d'une stérilisation au gaz, d'une stérilisation à la formaline et autres, il est nécessaire de laver totalement le gaz résiduel, la formaline et autres, du dispositif, après stérilisation en faisant s'écouler de façon répétée le
30 milieu de culture dans le dispositif de culture.

- Après stérilisation, les cellules flottantes peuvent être implantées dans l'espace entre les fibres creuses et l'enveloppe en utilisant une seringue. Comme cellules flottantes on utilise habituellement celles en suspension
35 dans un milieu de culture. La densité des cellules dans la suspension pour l'implantation est de préférence de 10^5 à 5×10^6 cellules/ml, bien qu'elle puisse varier selon

le type de la cellule.

Quand l'implantation est terminée, tout le dispositif de culture, ou ce dispositif à l'exception de la pompe, est placé dans l'incubateur au gaz carbonique où sont
5 amenés des gaz mélangés d'air-CO₂ ou O₂-CO₂. La concentration en CO₂ est de préférence de 5 à 10% en poids. La température dans l'incubateur est ajustée à environ 35 à 38°C et l'intérieur de l'incubateur est toujours maintenu à un état suffisamment humide pour empêcher l'eau d'être
10 excessivement retirée du perfusat.

Le procédé selon l'invention présente un certain nombre d'avantages par rapport au procédé selon l'art antérieur.

Selon le procédé de l'invention, l'allure de
15 prolifération des cellules flottantes est élevée, et on peut les faire croître à de plus fortes densités que dans le procédé en suspension. En général, les cellules flottantes sont si faibles, par rapport aux cellules attachées, qu'il est difficile de les cultiver à une forte
20 densité. On pense qu'avec l'augmentation de la densité des cellules, l'action mutuelle entre elles devient trop importante, ce qui rend plus difficile leur maintien en vie. Ainsi, on suppose que le procédé de culture selon l'invention permet l'alimentation continue et rapide d'agents nutritifs
25 et d'oxygène, et l'enlèvement rapide et continu des déchets cellulaires par les fibres creuses, par suite de quoi peuvent être créées des circonstances suffisamment appropriées aux cellules pour surmonter les effets néfastes de l'action mutuelle entre elles.

30 Par conséquent, le procédé de culture selon l'invention permet la diminution de la dimension du dispositif pour la culture de grandes quantités de cellules flottantes. Par ailleurs, du fait de la semi-perméabilité des fibres creuses, le milieu de culture contenant un
35 produit métabolique, obtenu par les cellules flottantes à une pureté relativement élevée, peut facilement être séparé des cellules, par exemple, un milieu de culture

contenant des anticorps ou de l' α -Fétoprotéine peut facilement être séparé des cellules de tumeur médullaire ou des cellules du cancer du foie respectivement, en utilisant l'unité de culture de cellules animales flottantes
5 selon l'invention. Le produit métabolique peut être séparé du milieu de culture ainsi obtenu d'une façon traditionnelle. Par exemple, l' α -Fétoprotéine peut être purifiée en dessalant le milieu de culture séparé des
10 cellules du cancer du foie par fractionnement avec du sulfate d'ammonium, en dialysant avec une solution tampon et en développant par une chromatographie d'échange d'ions. En particulier, la technique de production d'anticorps spécifiques par fusion des cellules de tumeurs médullaires et de diverses cellules produisant des anticorps a
15 récemment progressé (voir European Journal of Immunology Volume 6, pages 511-519 (1976)). Le procédé selon l'invention est avantageux pour la culture de cellules hybrides produisant des anticorps spécifiques que l'on obtient par une telle fusion des cellules, et il permet
20 la production de divers anticorps très purs à de grandes quantités. Ainsi, la valeur médicale et vétérinaire de la présente invention est importante.

Par ailleurs, dans les procédés selon l'art antérieur, il est nécessaire de séparer les cellules du
25 milieu de culture afin d'échanger périodiquement ce milieu de culture. Par ailleurs, dans le procédé selon l'invention, une telle séparation n'est pas nécessaire et le milieu de culture peut être amené continuellement. C'est un grand avantage pour obtenir une culture pratique
30 en masse.

De plus, dans le procédé de culture en suspension, la possibilité d'une contamination par des micro-organismes tels que des bactéries et de la moisissure est considérablement importante, et il faut porter une attention
35 considérable à la culture sur de longues périodes de temps. Par ailleurs, dans le procédé selon l'invention, quand les cellules flottantes sont implantées aseptiquement, les

micro-organismes ne peuvent traverser les parois des fibres creuses et ne peuvent se mélanger avec des cellules flottantes. Par conséquent, des conditions aseptiques peuvent facilement être maintenues sur de longues périodes de temps. De même, si le milieu de culture est contaminé par des micro-organismes, les cellules flottantes ne peuvent être contaminées par les micro-organismes.

Les exemples qui suivent sont donnés pour illustrer en plus de détails la présente invention.

Exemple 1.

Six sortes de fibres creuses de polysulfone d'un diamètre interne de 250 μ , d'un diamètre externe de 350 μ et ayant des diamètres des pores de 18 Å, 30 Å, 50 Å, 10² Å, 2 x 10² Å et 5 x 10² Å, respectivement, ont été produites en dissolvant une polysulfone aromatique dans une solution mélangée de N-méthylpyrrolidone (solvant) de diméthyl sulfoxyde (non solvant), d'eau et de nitrate de sodium et en extrudant dans l'eau (liquide coagulant) à travers une tubulure de forme creuse. Alors, on inséra 100 de chacune des fibres creuses de polysulfone dans un tube en polymère de silicone ayant un diamètre interne de 1cm, un diamètre externe de 1,3cm et une longueur de 8cm, et les deux extrémités du tube en silicone furent obturées ainsi que le faisceau des fibres creuses en utilisant un adhésif en polymère de silicone. Après durcissement de l'adhésif en polymère de silicone, les tubes en silicone furent découpés à leurs extrémités, pour produire ainsi des unités de culture de cellules avec une couche de fixation en silicone et des fibres creuses à extrémités ouvertes. Alors, des tubes en polymère de silicone de 50cm de long (diamètre interne 3mm, diamètre externe 5mm), furent reliés aux deux extrémités des unités de culture des cellules ci-dessus produites en utilisant des organes de connexion. Ces tubes en polymère de silicone étaient reliés par une pompe à un réservoir de milieu de culture de 200 ml, fait en polymère de silicone pour produire ainsi un dispositif de culture de cellules.

Après stérilisation à la vapeur du dispositif de culture de cellules ci-dessus produit, on introduisit 100 ml d'un milieu de culture (consistant en 80% d'un milieu de culture Eagle modifié de Dulbecco et 20% de sérum de cheval), dans le réservoir du milieu de culture et on fit circuler dans l'intérieur des fibres creuses par la pompe. La quantité totale d'une solution préparée en mettant en suspension $1,08 \times 10^6$ cellules de tumeurs médullaires de souris (MPC-11) dans 1 ml du même milieu de culture que celui utilisé ci-dessus, fut implantée en utilisant une seringue, dans l'espace entre les fibres creuses et l'enveloppe.

Le dispositif, à l'exclusion de la pompe, fut placé dans une chambre isothermique maintenue à 38°C , et on amena, dans la chambre isothermique, environ 200 à 300 ml/mn (pour $0,03 \text{ m}^2$ de la chambre) d'un gaz mélangé consistant en 95% d'air et 5% de CO_2 . Des échantillons furent pris sur une certaine période de temps et le nombre de cellules ayant proliféré fut déterminé. Les résultats sont indiqués au tableau 1. Dans ce cas, aux septième et quinzième jours, le milieu de culture fut changé.

Tableau 1.

25	Diamètre des pores des fibres creuses (Å)	Nombre de cellules implantées	9ème jour		18ème jour	
	18 (com- paraison)	$1,08 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$
30	30	"		$1,35 \times 10^7$		$0,81 \times 10^8$
	50	"		$3,00 \times 10^7$		$1,23 \times 10^8$
	102	"		$4,20 \times 10^7$		$1,75 \times 10^8$
	2×10^2	"		$5,00 \times 10^7$		$1,90 \times 10^8$
	5×10^2	"		$5,70 \times 10^7$		$2,10 \times 10^8$

Exemple 2.

Dans cet exemple, on utilisa trois sortes de fibres creuses d'acétate de cellulose ayant un diamètre interne de 250 μ , un diamètre externe de 350 μ et un diamètre des pores de 10^2 Å, 2×10^3 Å, 5×10^4 Å, respectivement. On inséra 30 de chacune des fibres creuses ci-dessus dans trois tubes en polymère de silicone, respectivement, chacun d'un diamètre interne de 1 cm, d'un diamètre externe de 1,3 cm et d'une longueur de 8 cm, et on produisit un dispositif de culture de cellules de la même façon qu'à l'exemple 1.

Seule l'unité de culture de cellules fut stérilisée au moyen d'oxyde d'éthylène gazeux pendant 5 heures, les autres pièces étant stérilisées à la vapeur. Après stérilisation, on mit en circulation 100 ml du même milieu de culture que celui utilisé à l'exemple 1, dans le dispositif, et on échangea pour un lot frais de milieu de culture une fois par jour. On répéta ce processus pendant trois jours pour retirer l'oxyde d'éthylène résiduel.

Ensuite, des cellules de tumeurs médullaires de souris (MPC-11) furent inoculées et on les fit croître de la même façon qu'à l'exemple 1. Des échantillons furent pris sur une certaine période de temps, et on compta, au moyen d'un microscope, le nombre de cellules ayant proliféré. Les résultats sont indiqués au tableau 2.

Tableau 2

	Diamètre des pores des fibres creuses (Å)	Nombre de cellules implantées	9ème Jour	18 ème Jour
30	10^2	$1,00 \times 10^6$	$3,50 \times 10^7$	$1,50 \times 10^8$
	2×10^3	"	$4,75 \times 10^7$	$2,00 \times 10^8$
35	5×10^4	"	$3,00 \times 10^7$	$1,40 \times 10^8$

[Aux 7^{ème} et 15^{ème} jours, le milieu de culture fut changé].

Pour une comparaison, on fit croître les mêmes cellules que celles utilisées ci-dessus, en employant le même milieu de culture que ci-dessus, par un procédé en suspension. Comme procédé en suspension, on utilisa le procédé de ponction en bassin de 100ml. Les résultats sont indiqués sur la figure 8, où A indique des résultats de culture utilisant l'unité composée des fibres creuses ayant un diamètre des pores de $2 \times 10^3 \text{ Å}$, et B indique les résultats en utilisant le procédé en suspension. La flèche ↑ sur la figure 8, indique l'échange du milieu de culture.

Exemple 3.

En utilisant 30 fibres creuses en acétate de cellulose d'un diamètre interne de 250 μ , d'un diamètre externe de 350 μ et d'un diamètre des pores de $2 \times 10^3 \text{ Å}$, on produisit un dispositif de culture de cellules de la même façon qu'à l'exemple 1.

Selon le procédé révélé par Millstein et autres (European Journal of Immunology, volume 6, pages 511-519 (1976)), on obtint des anticorps d'érythrocytes par la fusion des cellules de tumeurs médullaires de souris (MPC-11) et des cellules de rate de souris immunisées par l'érythrocyte du mouton.

On mit 10^6 de ces cellules en suspension dans 1 ml du milieu de culture, on implanta dans l'unité de culture de cellules ci-dessus et on les fit croître dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1.

Pour la comparaison, les cellules furent mises en culture par le même procédé en suspension qu'à l'exemple 2.

Les changements du nombre des cellules sur une certaine période de temps furent examinés, et les résultats obtenus sont indiqués au tableau 3.

Tableau 3.

	Procédé de culture	Nombre de cellules implantées	9ème jour	18ème jour
5	Unité de culture de cellules composée de fibres creuses	10^6	$4,50 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$
10	procédé en suspen- sion (10ml) (procédé de ponction en bassin)	10^6 /ml	$2,10 \times 10^7$ /ml	$8,0 \times 10^7$ /ml

Exemple 4.

15 En utilisant diverses fibres creuses, on produisit
un dispositif de culture de cellules de la même façon qu'à
l'exemple 1. Des cellules de lymphome de Burkitt de
cellules leucémiques humaines et de cellules de tumeur
médullaire de souris furent implantées dans le dispositif
de culture de cellules et on les fit croître de la même
20 façon qu'à l'exemple 1. Les résultats sont indiqués au
tableau 4.

Tableau 4.

Type de cellules	Matériau des fibres creuses	Diamètre interne/ diamètre externe μ	Diamètre des pores ($\text{\AA}$)	Nombre de cellules	
				Implantées	18ème jour
Cellules de lymphome de cellules leucémiques d'être humain	Polycarbonate	200/250	25	$2,00 \times 10^6$	$5,00 \times 10^6$
	Acétate de Cellulose	200/250	10^3	"	$1,20 \times 10^8$
	Polyacrylonitrile	250/350	50	"	$7,00 \times 10^7$
Cellules de tumeur médullaire de souris	Polyméthyl-méthacrylate	250/350	40	"	$2,50 \times 10^7$
	Polycarbonate	200/250	25	"	$7,00 \times 10^6$
	Polyéther sulfone	250/350	40	"	$1,10 \times 10^8$

Exemple 5.

Des lymphocytes périphériques pris d'êtres humains (voir Leslie Hudson et Frank C. Hay, Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications pages 17-18) furent mis en suspension dans un milieu de culture RPMI 1640 (contenant 20% de sérum d'embryon de vache) afin que la densité des cellules soit de 10/ml et de 5×10^6 /ml. De la même façon qu'à l'exemple 1, on les implanta dans le même dispositif de culture de cellules qu'à l'exemple 2. Au bout d'une semaine, les cellules furent sorties du dispositif et on mesura l'activité des lymphocytes par l'essai d'exclusion des pigments (idem pages 30-32) en utilisant du bleu Trypan, et on compara avec celle avant l'implantation. En même temps on répéta le processus par le procédé de culture flottante stationnaire, et les résultats sont indiqués au tableau 5.

Tableau 5

Méthode	Activité résiduelle au 7ème jour (%)	
	Nombre de cellules implantées (10^6 /ml)	Nombre de cellules implantées (5×10^6 /ml)
Culture utilisant des fibres creuses	80	75
Culture flottante stationnaire	60	0
Activité résiduelle au 7ème jour	$\frac{\text{capacité d'exclusion du pigment au 7ème jour}}{\text{capacité d'exclusion du pigment avant implantation}} \times 100$	

Bien entendu, l'invention n'est nullement limitée aux modes de réalisation décrits et représentés qui n'ont été donnés qu'à titre d'exemple. En particulier, elle comprend tous les moyens constituant des équivalents

techniques des moyens décrits, ainsi que leurs combinaisons, si celles-ci sont exécutées suivant son esprit et mises en œuvre dans le cadre de la protection comme revendiquée.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Procédé de culture de cellules animales flottantes caractérisé en ce qu'il consiste à introduire un milieu de culture dans une unité de culture de cellules comprenant une enveloppe et un certain nombre de fibres creuses enfermées dans ladite enveloppe, lesdites fibres creuses étant ouvertes à chaque extrémité vers l'extérieur de ladite enveloppe et ayant un diamètre des pores compris entre $20 \text{ \AA}$ et $10^5 \text{ \AA}$, ledit milieu de culture passant par l'intérieur desdites fibres creuses et lesdites cellules animales flottantes étant mises en culture dans l'espace entre ladite enveloppe et lesdites fibres creuses.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le diamètre des pores des fibres creuses est compris entre $10^2 \text{ \AA}$ et $5 \times 10^4 \text{ \AA}$.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les fibres creuses précitées sont faites en polysulfone ou polyéther sulfone.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que les cellules animales flottantes précitées sont des cellules de tumeur médullaire, des cellules leucémiques, des cellules lymphocytaires ou des cellules de tumeur médullaire obtenues par fusion des cellules avec des cellules de la rate ou des cellules lymphocytaires.
5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules animales flottantes précitées sont des cellules de tumeur médullaire obtenues par fusion des cellules avec des cellules de la rate ou des cellules lymphocytaires.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'enveloppe précitée est faite en un polymère de silicone, un polybutadiène ou un copolymère silicone-polycarbonate.
7. Procédé selon l'une queconque des revendications

1 ou 2, caractérisé en ce que l'unité de culture de cellules précitée est reliée à un réservoir de milieu de culture par un tube fait en un polymère de silicone, du polybutadiène ou un copolymère silicone-polycarbonate.

5 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on utilise un adhésif de polymère de silicone comme couche de fixation maintenant en place les deux extrémités de la fibre creuse précitée.

10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les cellules animales flottantes précitées sont implantées dans l'unité de culture de cellules précitée, à une concentration initiale de 10^5 à 5×10^6 cellules/ml.

15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'unité de culture de cellules précitée est placée dans un incubateur à gaz carbonique où la concentration en CO_2 est de 5 à 10%.

20 11. Unité de culture de cellules animales flottantes caractérisée en ce qu'elle comprend un enveloppe (2) et un certain nombre de fibres creuses (1) enfermées dans ladite enveloppe, ladite fibre creuse étant ouverte à chaque extrémité vers l'extérieur de ladite enveloppe et ayant un diamètre des pores compris entre environ $20 \text{ \AA}$ et $10^5 \text{ \AA}$, permettant le passage d'un milieu de culture à travers l'intérieur desdites fibres creuses et la culture de cellules animales flottantes dans l'espace entre ladite enveloppe et lesdites fibres creuses.

25 12. Unité selon la revendication 11, caractérisée en ce que le diamètre des pores des fibres creuses précitées est compris entre $10^2 \text{ \AA}$ et $5 \times 10^4 \text{ \AA}$.

30 13. Unité selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que l'enveloppe précitée est faite en un polymère de silicone, du polybutadiène ou un copolymère silicone-polycarbonate.

35 14. Unité selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que ladite unité (8) est reliée à un réservoir de milieu de culture (11) par un

tube (9) fait en un polymère de silicone, du polybutadiène ou un copolymère silicone-polycarbonate.

5 15. Unité selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce qu'un adhésif d'un polymère de silicone est utilisé comme couche de fixation (3, 3') maintenant en place les deux extrémités de la fibre creuse précitée.

10 16. Dispositif de culture de cellules caractérisé en ce qu'il comprend au moins une unité de culture de cellules animales flottantes selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

FIG. 1

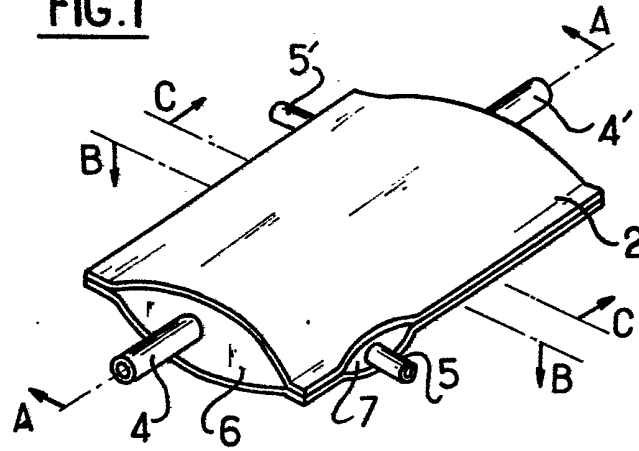


FIG. 2

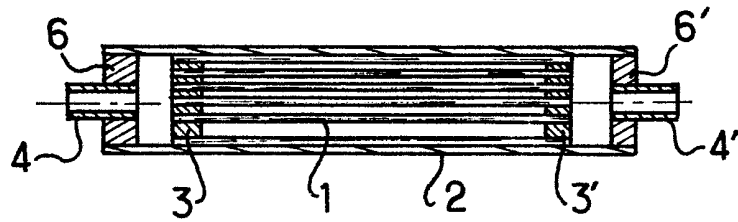


FIG. 3

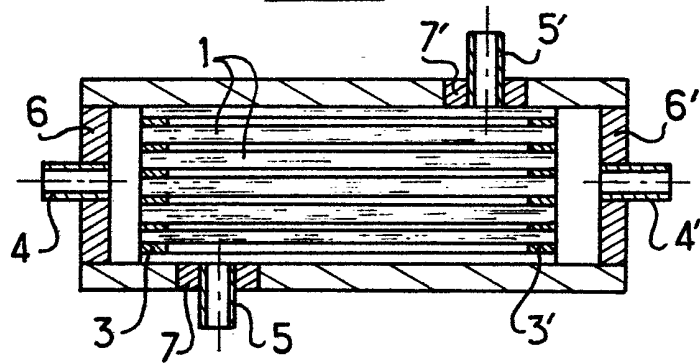
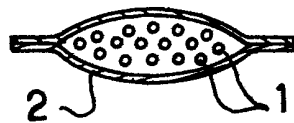


FIG. 4



2476124

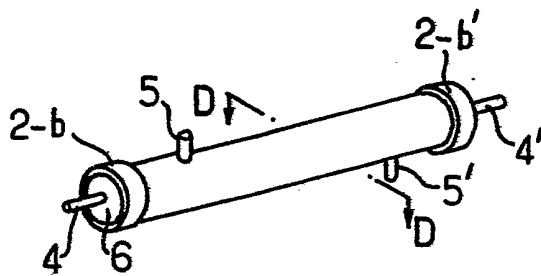


FIG. 5

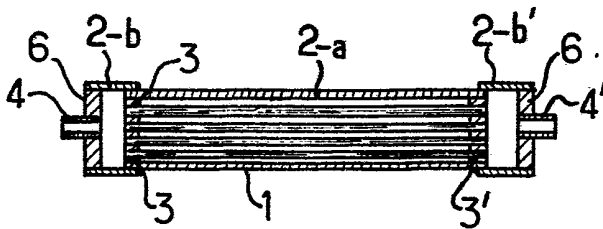


FIG. 6

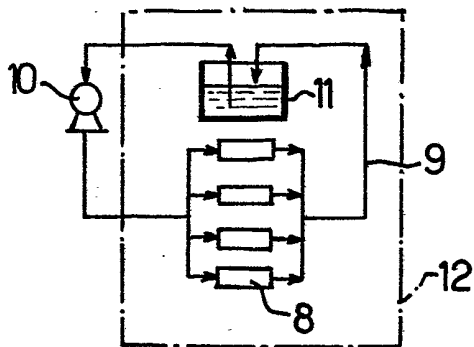


FIG. 7

2476124

FIG.8