

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IB05/001691

International filing date: 16 June 2005 (16.06.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: PI2004A00046
Filing date: 18 June 2004 (18.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 23 August 2005 (23.08.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

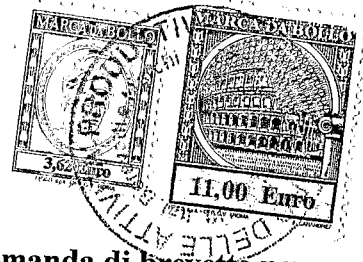


Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. PI 2004 A 000046.**

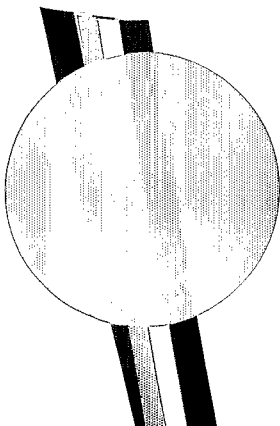
Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

ROMA li..... **22 LUG. 2005**

IL FUNZIONARIO

..... *Giampietro Carlotta*

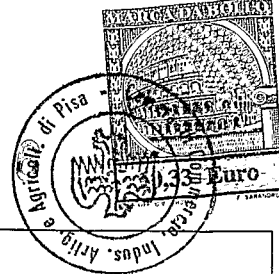
Giampietro Carlotta



MODULO A (1/2)

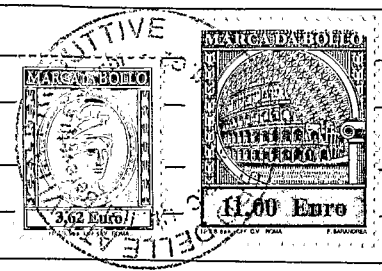
AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° PI2004 A 0 0 0 0 4



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITA' DI PISA		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 80003670504
INDIRIZZO COMPLETO DI RESIDENZA	A4	Lungarno Pacinotti 43/44 I-56126 PISA		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	= = = = =		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO DI RESIDENZA	A4			
A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	BIOREATTORE PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI SULLE ATTIVITA' CELLULARI DI STIMOLI IMPOSTI.		



D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	AHLUWALIA ARTI
NAZIONALITÀ	D2	Britannica
COGNOME E NOME	D1	VOZZI GIOVANNI
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	PREVITI ANTONIO
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	SCARPA CRISTIANO
NAZIONALITÀ	D2	Italiana

E. CLASSE PROPOSTA	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
	E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITA' DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	G1	
-----------------------------	----	--

[Handwritten signature]

Dott. Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
iscritto all'albo n. 544

FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° ~~PI2004 A 0 0 0 0 4 6~~

FOGLIO AGGIUNTIVO N.	1
DI TOTALI:	1

A. RICHIEDENTE/I


COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO DI RESIDENZA	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO DI RESIDENZA	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO DI RESIDENZA	A4			

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	ROSSI VALERIO
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	FORGIONE NICOLA
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	VOZZI FEDERICO
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I			Dott. Ing. Marco Celestino ABM Agenzia Brevetti & Marchi iscritto all'albo n. 544		


MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).



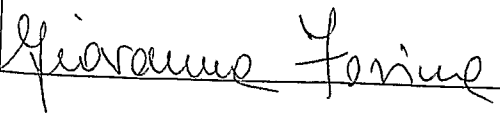
NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	ING. MARCO CELESTINO
	I2	ABM, AGENZIA BREVETTI & MARCHI
DENOMINAZIONE STUDIO	I3	VIALE GIOVANNI PISANO, 31
INDIRIZZO	I4	56123 PISA
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	L1	Nessuna
L. ANNOTAZIONI SPECIALI		

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	1		27
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)	1		5
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	SI		
PROCURA GENERALE			
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE			
	(LIRE/EURO)		
ATTESTATI DI VERSAMENTO	Euro	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE	
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI	DUECENTONOVANTUNO, 80 (291, 80)	
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO	D	X
DATA DI COMPILAZIONE	16 giugno 2004	F	
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I			

Dott. Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
iscritto all'albo n. 544

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	PI2004 A 0 0 0 0 4 6		
C.C.I.A.A. DI	Pisa		COD. 50
IN DATA	18.06.2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME	
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.	1	FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE	-		
IL DEPOSITANTE			L'UFFICIALE ROGANTE 
			

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

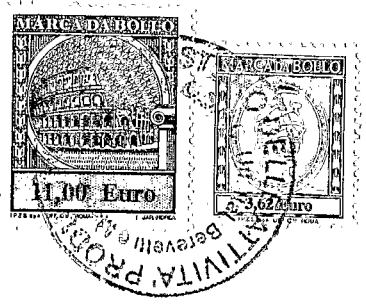
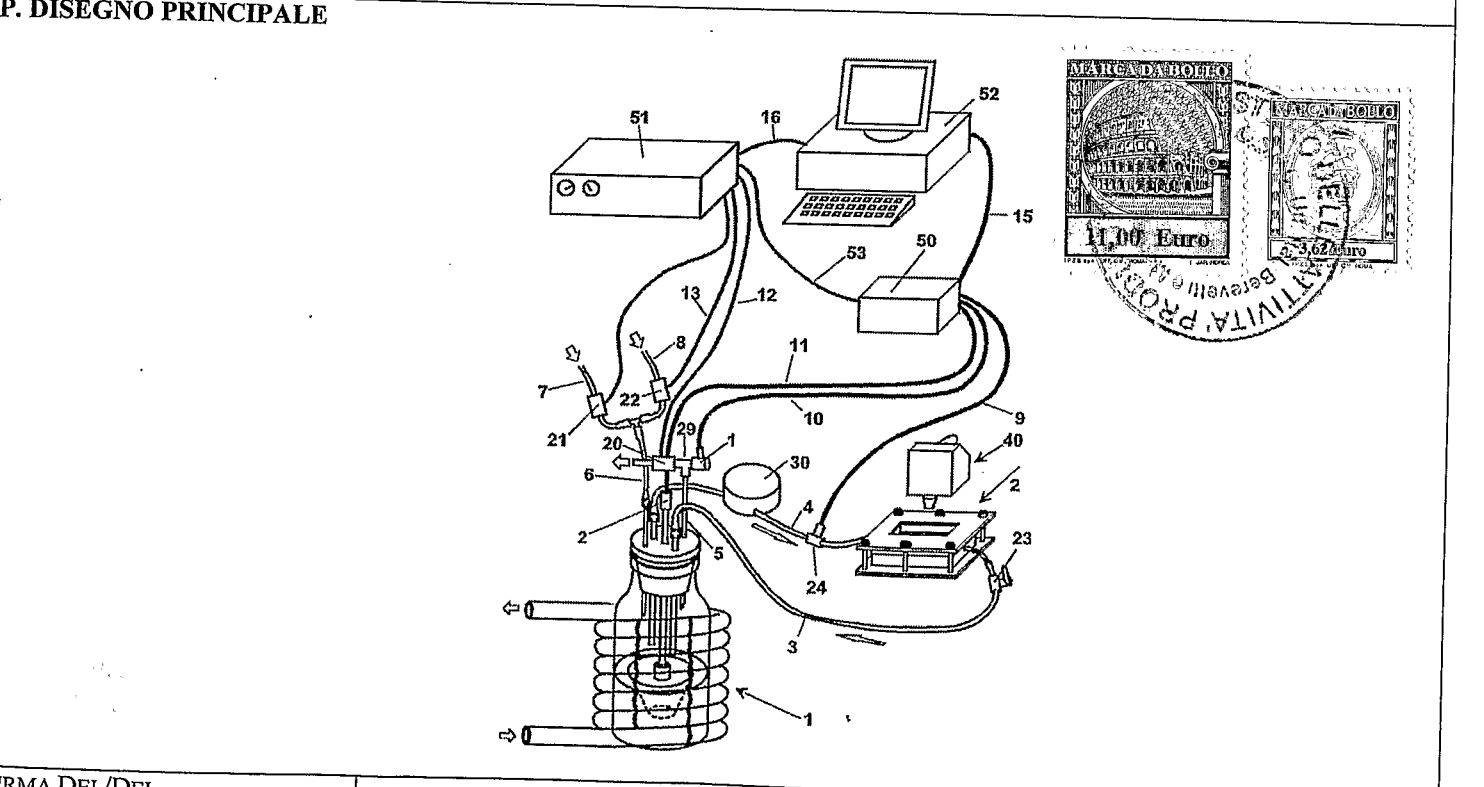
NUMERO DI DOMANDA P/2004 A 0 0 0 0 4 6	DATA DI DEPOSITO: 18.06.2004
A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO	
UNIVERSITA' DI PISA	
C. TITOLO	
BIOREATTORE PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI SULLE ATTIVITA' CELLULARI DI STIMOLI IMPOSTI.	



E. CLASSE PROPOSTA	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO

O. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda un dispositivo bioreattore per lo studio degli effetti di stimoli fisici, chimici, meccanici ed elettromagnetici sulle attività cellulari. In particolare, il dispositivo utilizza una camera di premiscelamento (1) sensorizzata, una cella di coltura (2) che permette di osservare lo sviluppo delle cellule tramite un microscopio (40). I segnali in uscita vengono trasmessi ad una centralina di amplificazione e filtraggio dei segnali (50), che trasmette i segnali modificati ad un calcolatore (52). Esso è collegato ad una centralina (51) di azionamento di elettrovalvole (20), (21) e (22) che regolano l'immissione di gas nella camera di premiscelamento. Il terreno di coltura viene prelevato dalla camera di premiscelamento (1) tramite il condotto (4) e il suo flusso è regolato (2) e continua il suo percorso nel condotto (3), tornando nella cella di premiscelamento (1). In uscita dalla cella di coltura (2) il condotto presenta un punto di prelievo (23) che permette di prelevare una quantità di terreno di coltura per effettuare l'analisi. Subito prima, lungo il condotto, è presente un sensore di temperatura (24) che trasmette un segnale alla centralina (50) tramite il cavo elettrico (9).



FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

[Handwritten signature]

Dott. Ing. Marco Celestino
 ABM Agenzia Brevetti & Marchi
 iscritto all'albo n. 544



Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"BIOREATTORE PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI SULLE ATTIVITA'
CELLULARI DI STIMOLI IMPOSTI", a nome UNIVERSITÀ DI PISA
5 con sede a PISA.

DESCRIZIONE

Ambito dell'invenzione.

La presente invenzione riguarda un dispositivo
bioreattore per lo studio degli effetti di stimoli fisici
10 chimici, meccanici ed elettromagnetici sulle attività
cellulari per applicazioni in vari settori tra cui:
l'ingegneria tissutale per lo sviluppo di costrutti
biologici; in campo industriale per il "testing"
farmacologico, e nel campo della cosmesi per lo studio
15 delle reazioni allergologiche ai prodotti sviluppati.

Descrizione della tecnica nota.

È noto che ogni tessuto biologico durante la sua
evoluzione e la sua normale attività è sottoposto a
stimoli fisici e chimici che sia ne determinano il suo
20 stato patologico e fisiologico sia influenzano la sua
normale funzione. A tal fine si è cercato di riprodurre
sistemi in grado di riprodurre uno stimolo o fisico o
chimico in modo da studiare la sua influenza sulle normali
attività cellulari.

25 Allo stato attuale sono noti sistemi che riproducono

Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto al Registro N. 544



lo stimolo pressorio, per lo studio della sulla influenza
sulle cellule gangliari o endoteliali. Altri sistemi
riproducono il flusso laminare, o turbolento, per simulare
la permeazione dei nutrienti attraverso la membrana
cellulare come avviene in ogni tessuto biologico. in
seguito al passaggio del flusso sanguigno.

Per quanto riguarda i sistemi di coltura cellulare
isobari si conoscono due sistemi:

- uno primo sistema studia i legami tra l'incremento
della pressione e l'apoptosi nelle cellule gangliari.
Esso è costituito da una speciale camera di coltura
portata a pressioni elevate e monitorata da un
sfigmomanometro a colonna di mercurio. L'atmosfera
all'interno della camera è costituita da una miscela al
5% di CO₂ e la temperatura è mantenuta costantemente a
37°C.
- un altro sistema studia i legami tra la variazione di
pressione ed il rilascio di endotelina 1. Esso è
costituito da una piastra di coltura cellulare a 24
pozzetti, ricoperta da un foglio adesivo con cui si
sigilla il lato superiore della piastra ed in
corrispondenza di ogni pozzetto viene praticato un foro
dove viene applicata e monitorata la pressione
desiderata, tramite una valvola pressoria connessa ad
uno sfigmomanometro.



Esistono anche i cosiddetti bioreattori a flusso, che sono composti da una camera di coltura cellulare in serie con un sistema di flusso dei nutrienti. Le applicazioni di tali bioreattori sono svariate tra cui, lo studio di patologie, la rigenerazione di tessuti cardio-muscolari, lo sviluppo di sostituti funzionali epatici, la rigenerazione ed il testing della cartilagine.

I bioreattori a flusso sono stati studiati per effettuare delle colture ad alta densità. Infatti il flusso di nutrienti che passa nel bioreattore permette una più facile perfusione degli stessi ed una più efficace rimozione dei cataboliti cellulari. Questi sistemi incrementano la velocità di crescita di mono-layer cellulari fino a confluenza da un 100% fino al 200% e ottimizzano la funzione, la morfologia e la differenziazione delle cellule.

In commercio, i vari bioreattori si differenziano fondamentalmente per le diverse tipologie delle celle di coltura:

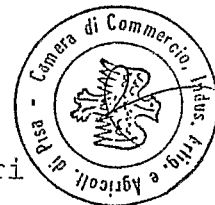
- 20 - "Rocking Culture System", costituito da una base fissa con un ripiano oscillante e una sacca di coltura in cui fluisce una miscela gassosa attraverso appositi connettori sulla parte superiore della sacca. Il trasferimento di massa, e dei gas, nonché la miscelazione del terreno di coltura vengono raggiunti



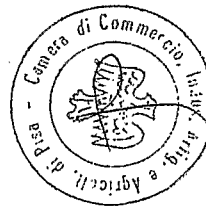
attraverso l'oscillazione del dispositivo di supporto.
L'effetto del moto ondoso genera sulla superficie delle
turbolenze, con il risultato di un notevole aumento del
coefficiente di trasferimento volumetrico dei nutrienti
rispetto ad una coltura statica.



- "Spinner Bioreactor System" avente fiasche con palette
girevoli che permettono la perfusione di ossigeno e la
distribuzione dei nutrienti. Per controllare il pH e la
temperatura è necessario inserire il sistema in un
incubatore.
- "Spinner-Air Lifted Bioreactor" che adotta un sistema
per immobilizzare le cellule costituito da dischetti
porosi tenuti tra loro da una parte rigida in acciaio.
- "Rotary Cell Culture System" o a parete rotante, avente
una camera cilindrica rotante che contiene una membrana
cilindrica, per lo scambio dei gas, co-rotante e che
svolge le funzioni di ossigenazione.
- "Airlift Bioreactor", costituito da una camera molto
allungata disposta in posizione verticale, nella cui
parte bassa viene introdotta la miscela di gas. Il gas
introdotta dal basso provoca la riduzione della densità
del liquido contenuto all'interno del tubo. Questo
determina una circolazione del terreno di coltura
attraverso il tubo interno verso la zona più esterna
del tubo.



- 5 - "Hollow-Fiber Bioreactor", avente una rete di capillari artificiali semipermeabili che, bagnati dal terreno di coltura per fenomeni diffusivi, forniscono ossigeno alle cellule, prelevando nutrienti e asportando i rifiuti delle vie metaboliche cellulari ed altri inibitori della crescita cellulare.
- 10 - "Flat Bed Perfusion System", consistente in una camera piatta contenente co-culture di stroma, ovvero una maglia di fibre connettivali generalmente di natura reticolare. La cella è perfusa dal terreno di coltura.
- 15 - "Stirred Tank". Questo dispositivo presenta un motore elettrico che mette in rotazione alcune palette di varia geometria e disposizione. Essendo molto simili agli "Spinners", valgono le stesse considerazioni fatte per essi, infatti consentono coltivazioni con "microcarriers" o in sospensione. Le palette sono tenute ferme da una parte in acciaio durante la decantazione o l'utilizzo da parte dell'operatore, per evitare di danneggiare le cellule o i "microcarriers".
- 20 - "Micro-Cell Culture Analog", costituito da una cella di coltura microfabbricata tramite tecniche standard di litografia ed "etching" e permette di avere più microcamere in serie con colture cellulari diverse in modo da poter testare l'effetto di uno stesso farmaco
- 25 su diverse cellule per studiare la sua farmacocinetica.



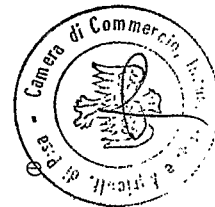
Il principale limite della maggior parte di questi sistemi è rappresentato dal fatto che essi non sono autonomi, dal momento che necessitano di un incubatore per poter garantire all'interno della camera i valori di pH e temperature richieste. La presenza dell'incubatore non consente, in particolare, l'utilizzo di un calcolatore che consentirebbe di seguire in tempo reale l'evolversi dei parametri per poter intervenire mediante regolazioni nel corso dell'esperimento.

Esistono anche bioreattori dove non è necessaria la presenza dell'incubatore, tuttavia, la struttura della cella di coltura cellulare non permette di osservare l'esperimento in tempo reale, mediante microscopio ottico e/o a fluorescenza, e quindi di valutare l'evolversi dei processi cellulari.

In conclusione, attualmente non esistono bioreattori autonomi che siano contemporaneamente capaci di mantenere e cambiare in maniera rapida e controllata la pressione, il pH e la temperatura all'interno di una camera di coltura, e capaci di produrre nelle celle un flusso costante di terreno di coltura, con possibilità di visione in tempo reale di ciò che avviene all'interno.

Sintesi dell'invenzione

Scopo della presente invenzione è fornire un dispositivo con la funzione di bioreattore che utilizzi



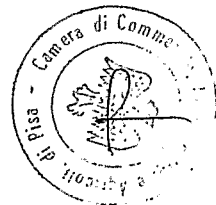
celle di coltura facilmente modellabili e conformabili e
che permetta l'utilizzo di trasduttori e regolatori per
monitorare in tempo reale cosa accade all'interno della
cella di coltura e per regolare i parametri e gli stimoli
5 fisico-chimici simulando condizioni fisiologiche e/o
patologiche.

Altro scopo è fornire un dispositivo con la funzione
di bioreattore in cui è presente un flusso di terreno di
coltura che permette una riduzione dei volumi di terreno
10 di coltura utilizzati per ogni esperimento da 10 a 30
volte rispetto agli altri dispositivi presenti in
commercio, con notevole risparmio economico, sia in
termini di terreni di coltura utilizzati che nell'analisi
delle sostanze in esse contenute.

15 Ulteriore scopo della presente invenzione è fornire un
bioreattore i cui mezzi per produrre un flusso di terreno
nelle celle di coltura non danneggiano le cellule e gli
aggregati cellulari, non avendo agitatori, gorgogliamenti
di gas o altre parti meccaniche in movimento nella cella
20 di coltura.

Questi ed altri scopi sono ottenuti da un bioreattore
per il monitoraggio di attività cellulari in presenza di
stimoli fisici, chimici e meccanici, la cui
caratteristica è di prevedere:

25 - almeno una cella di coltura avente un ingresso e



un'uscita;

- una camera di premiscelazione, separata da detta almeno una cella di coltura, per la preparazione del terreno di coltura;
- 5 - un circuito connesso a detto ingresso e detta uscita e comprendente detta camera di premiscelazione;
- mezzi per produrre un flusso controllato di terreno di coltura attraverso detto circuito;
- mezzi per produrre almeno uno stimolo fisico-chimico
- 10 che si desidera applicare alle cellule sotto esame, scelto tra temperatura, pH, pressione o combinazione di essi;
- mezzi di controllo di detti mezzi per produrre almeno uno stimolo fisico-chimico, affinché detto o ciascuno
- 15 stimolo assuma valori predeterminati.



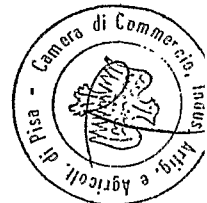
Vantaggiosamente, detti mezzi di controllo comprendono un software appositamente sviluppato, che tramite un'interfaccia grafica facile da gestire da ogni utente permetta di settare sia i parametri dell'esperimento che

20 di visionare in tempo reale ciò che accade alle cellule.

In tal modo è permessa un'analisi in tempo reale di ciò che avviene all'interno di una cella di coltura senza aver bisogno di utilizzare un incubatore in cui allocare

la cella di coltura.

25 In particolare, detta cella di coltura è realizzata in



materiale siliconico con forme che producono un flusso laminare del terreno di coltura a seconda degli scopi previsti e può essere di volta in volta ridisegnata tramite l'utilizzo di software per la progettazione
5 meccanica.

Preferibilmente detta cella è realizzata in almeno due parti sovrapponibili delle quali almeno una presenta una concavità in modo tale che una volta sovrapposte fornisca un passaggio per il terreno di coltura.

10 Vantaggiosamente, lungo detto passaggio per il terreno di coltura almeno una di dette parti sovrapponibili comprende un vetrino da laboratorio disposto in una zona che operativamente permette l'osservazione mediante microscopio delle cellule impiantate su di esso. Dette due
15 parti sovrapponibili possono essere premute reciprocamente per l'azione di due piastre rigide tenute insieme da mezzi di accoppiamento rimovibile.

Preferibilmente, detti mezzi per produrre un flusso controllato di terreno di coltura attraverso detta cella
20 di coltura comprendono:

- un condotto in ingresso e in uscita da detta cella di coltura, a formare un circuito chiuso con la camera di premiscelazione separata;
- una pompa peristaltica installata lungo tale condotto;
- 25 - un punto di immissione di eventuali farmaci o altre



- sostanze che potenzino o inibiscano le attività cellulari a monte della cella di coltura;
- un punto di prelievo a valle della cella di coltura per effettuarne analisi;
 - 5 - un sensore di temperatura a monte della cella.

In particolare detta camera di premiscelazione comprende:

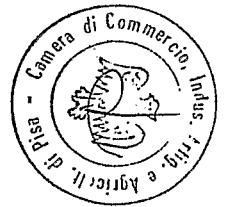
- un contenitore in materiale inerte;
- un tappo in materiale inerte;
- 10 - mezzi per misurare operativamente i parametri fisiologici del terreno di coltura.

Preferibilmente, detto contenitore in materiale inerte è realizzato a forma di beuta in vetro.

Vantaggiosamente i mezzi per misurare operativamente i
15 parametri fisiologici del terreno di coltura possono comprendere:

- un sensore di pH immerso nel terreno di coltura presente in detta camera di premiscelazione;
- un sensore di pressione per la misurazione all'interno
20 di detta camera di premiscelazione;
- sensori per la misura di specie chimiche come O₂, CO₂, NO, etc.

Vantaggiosamente, all'interno e sul fondo della camera di premiscelazione, è presente una struttura concava
25 tronco-conica in cui viene disposto detto sensore di pH,



in modo da preservarlo dal contatto diretto con eventuali bolle di gas immesse all'interno di detta camera di premiscelazione per equilibrare il terreno di coltura e mantenerlo a pH desiderato.

5 Preferibilmente, sono previsti mezzi per variare operativamente i parametri fisiologici del terreno di coltura comprendenti:

- condotti di immissione/fuoriuscita di gas, ad esempio aria e CO₂, in/da detta camera di premiscelazione per
10 variarne il pH e la pressione;
- flusso di fluido termostato in un condotto che avvolge detta camera di premiscelazione, per variarne
la temperatura.

15 Preferibilmente, i mezzi per monitorare e controllare gli stimoli fisico-chimici applicati alle cellule nella camera di coltura sono scelti tra:

- un sensore ottico per la rilevazione di bolle all'interno della camera di coltura cellulare;
- un sensore per la rilevazione di deformazione e sforzi
20 meccanici.

Vantaggiosamente, più celle di coltura possono essere collegate tramite condotti di lunghezza predeterminata per simulare il comportamento di organi biologici anche complessi, in modo che le cellule contenute nelle celle a
25 monte producano metaboliti che, trasportati dal terreno di



coltura, fungono da alimento per le cellule contenute nelle celle a valle.

Vantaggiosamente più celle collegate tra loro vengono integrate su un unico supporto miniaturizzato, in particolare in materiale rigido, formando un circuito il flusso di terreno di coltura che alimenta, in modo e in sequenza predeterminati, tutte le celle di coltura.

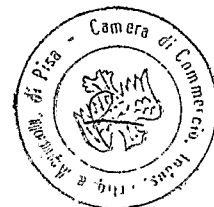
Vantaggiosamente, detto supporto in materiale rigido è ottenuto tramite un processo di microformatura, in particolare per fotolitografia e/o elettroerosione.

Vantaggiosamente detto supporto chiude le celle e i condotti con almeno un vetrino in materiale trasparente, permettendo l'osservazione, tramite microscopio, dello sviluppo delle cellule contenute nelle celle.

Vantaggiosamente, detti condotti di immissione e fuoriuscita di gas in/da detta camera di premiscelazione, possono essere azionati da elettrovalvole comandate da una centralina elettrica di comando.

Preferibilmente, il bioreattore utilizza una centralina elettronica di amplificazione e filtraggio dei segnali elettrici provenienti dai sensori per misurare detti parametri fisiologici del terreno di coltura, e collocata separatamente da detta centralina elettrica di comando delle elettrovalvole, al fine di evitare interferenze elettromagnetiche.





Breve descrizione dei disegni.

L'invenzione verrà di seguito illustrata con la descrizione di alcune sue forme realizzative, fatte a titolo esemplificativo e non limitativo, con riferimento
5 ai disegni annessi in cui:

- la figura 1 mostra il bioreattore completo dei dispositivi ad esso collegati per misurare e variare dall'esterno tutti i parametri biologici e fisici di interesse;
- 10 - la figura 2 mostra un disegno esploso della camera di premiscelamento del terreno di coltura;
- le figure 3 e 4 mostrano rispettivamente un disegno esploso in vista prospettica e una sezione di un esempio di cella di coltura;
- 15 - la figura 4 mostra una sezione della cella di coltura;
- le figure 5 e 6 mostrano rispettivamente un disegno esploso del montaggio e una sezione di un altro esempio di cella di coltura;
- la figura 7 mostra una sequenza di due celle di
20 coltura in serie;
- la figura 8 mostra un'applicazione di un insieme di celle di coltura collegate in serie e in parallelo che simulano il funzionamento di un apparato biologico.

Descrizione delle forme realizzative preferite.

25 Nella figura 1 è mostrato il complessivo di un

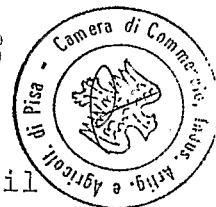


dispositivo bioreattore per lo studio degli effetti di stimoli fisici, chimici, meccanici ed elettromagnetici sulle attività cellulari.

In particolare, il dispositivo utilizza una camera di premiscelamento 1 sensorizzata che ha il compito di preparare il terreno di coltura che serve per alimentare le cellule in fase di studio, le quali si trovano in una cella di coltura 2 che permette di osservare lo sviluppo delle cellule contenute tramite un microscopio 40. I segnali in uscita dai sensori vengono trasmessi ad una centralina di amplificazione e filtraggio dei segnali 50, che trasmette i segnali modificati ad un calcolatore 52 che li acquisisce tramite una scheda di acquisizione I/O.

Detto calcolatore è collegato ad una centralina 51 di azionamento di elettrovalvole 20, 21 e 22 che regolano l'immissione di aria e anidride carbonica nella camera di premiscelamento. Detta centralina 51 alimenta la centralina 50, tramite il cavo elettrico 53, in modo da eliminare l'interferenza della rete elettrica con il sistema di amplificazione e di filtraggio dei segnali.

Il terreno di coltura viene prelevato dalla camera di premiscelamento 1 tramite il condotto 4 e il suo flusso è regolato tramite una pompa peristaltica 30. Il terreno attraversa poi la cella di coltura 2 e continua il suo percorso nel condotto 3, tornando nella cella di

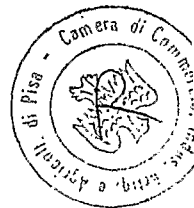


premiscelamento 1. In uscita dalla cella di coltura 2 il
condotto presenta un punto di prelievo 23 che permette di
prelevare una quantità di terreno di coltura per
effettuarne l'analisi. Subito prima, lungo il condotto, è
5 presente un sensore di temperatura 24 che trasmette un
segnale alla centralina 50 tramite il cavo elettrico 9.

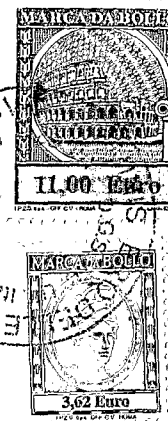
La camera di premiscelamento 1 comprende un sensore di
pH 2, che trasmette un segnale alla centralina 50 tramite
il cavo elettrico 10. Altro parametro misurato nella
10 camera di premiscelamento è la pressione, misurata con un
sensore di pressione 1 che trasmette un segnale alla
centralina 50 tramite il cavo elettrico 10.

La camera di premiscelamento contiene un'atmosfera
controllata tramite l'immissione controllata di aria
15 attraverso il condotto 7 e di CO₂ attraverso il condotto
8, che confluiscono poi nel condotto 6. Tali immissioni
sono controllate rispettivamente dalle elettrovalvole 21 e
22, comandate dalla centralina 51. La camera di
premiscelamento 1 presenta anche un condotto 5 di uscita
20 del gas, anch'esso controllato da un servomeccanismo 20
comandato dalla stessa centralina 51, che permette di
mantenere la pressione all'interno del bioreattore
costante e pari a quello impostato via software.

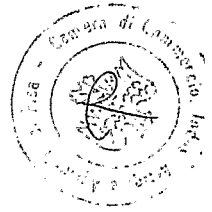
Il controllo dei parametri fisico-chimici e
25 fisiologici in modo da rispettare le specifiche imposte



tramite software è effettuato tramite un algoritmo di tipo PID, in modo da rendere il sistema stabile cosa che non accadrebbe con un controllo di tipo ON/OFF e di apportare le debite correzioni solo nel momento in cui il sistema da solo non riesce a riportarsi verso la situazione di equilibrio iniziale, in modo da ridurre gli effetti provenienti dall'ambiente esterno e cercando di simulare il più possibile l'omeostasi del sistema cellulare.



La camera di premiscelamento è descritta più approfonditamente nella figura 2. In particolare comprende un contenitore in vetro 60 o altro materiale inerte ad esempio a forma di beuta, chiuso ermeticamente con un tappo in silicone 63 che permette l'alloggiamento dei sensori e il passaggio di una serie di condotti rigidi in ingresso e uscita, ai quali si collegano condotti flessibili. In particolare il tappo 63 è attraversato dal condotto 68 per l'immissione di gas (aria o CO₂), che si collega al condotto flessibile 6; dal condotto 5 che presenta all'estremità un manicotto a "T" che da un lato sorregge il sensore di pressione 1 e dall'altro il servomeccanismo 20 per la fuoriuscita dei gas; dai condotti di ingresso 65 e uscita 66 del terreno di coltura, che si collegano rispettivamente ai condotti flessibili 4 e 3. Inoltre il tappo 63 permette il passaggio dello stelo del sensore di pH 64, che si collega



al cavo elettrico 10.

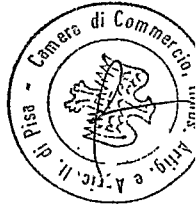
Sul fondo del contenitore 60, è realizzata una base in silicone che presenta una cavità a forma tronco conica per ridurre lo spazio attorno al sensore di pH 64, allo scopo di ottenere una misurazione più accurata, evitando che il gorgogliamento del gas immesso alteri il pH.

La temperatura del terreno di coltura 59 presente nel contenitore 60, è regolata da un flusso di liquido in temperatura passante in un condotto 61 avvolto attorno al contenitore 60.

Nelle figure dalla 3 alla 6 sono mostrati alcuni esempi di realizzazione di una cella di coltura.

In particolare in figura 3 e 4 sono mostrati rispettivamente un disegno esplosivo e una sezione di un particolare tipo di cella in cui si è studiata la forma del condotto per garantire un flusso laminare di terreno di coltura. La cella comprende due parti in silicone, una inferiore 71 e una superiore 70 simmetriche. Esse comprendono rispettivamente un vetrino 74 e 75 che permettono l'osservazione tramite microscopio dello sviluppo delle cellule precedentemente depositate sul vetrino 74. Le due parti in silicone vengono tenute insieme forzatamente da due piastre rigide 72 e 73, ad esempio in metallo, tenute insieme da viti 76.

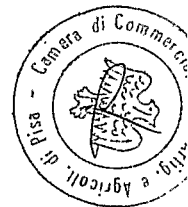
Le figure 5 e 6 mostrano rispettivamente una vista



esplosa e una sezione di un altro esempio di cella di coltura, al cui interno il flusso del terreno di coltura è permesso dai condotti 79 e 80. Anche nel presente esempio la cella comprende due parti in silicone 70 e 71, comprendenti rispettivamente un vetrino 74 e 75 per permettere l'osservazione delle cellule. Le due parti in silicone sono poi tenute insieme tramite le piastre rigide 73 e 72 collegate tramite le viti 76.

Come è mostrato in figura 7, più celle di coltura possono essere collegate insieme in serie o in parallelo in modo che i prodotti delle cellule coltivate nelle celle a monte fungano da alimento per le cellule nelle celle a valle, in modo da simulare i sistemi fisiologici, quali ad esempio il sistema respiratorio, il sistema cardiovascolare, il sistema metabolico, il sistema alimentare, etc. Nell'esempio trattato sono poste in serie la cella 160 a monte e la cella 161 a valle rispetto al flusso 149 di terreno di coltura; sul vetrino 150 sono depositate ad esempio "cellule a" 156, che producono i "metaboliti a" 154 e sul vetrino 151 sono depositate ad esempio "cellule b" 157 che producono i "metaboliti b" 155 e si nutrono dei "metaboliti a" 154.

A valle di ogni cella si può disporre di un punto di prelievo 152 e 153 per permettere il prelievo di una quantità di terreno per effettuarne le analisi.



Nella figura 8 è descritto un esempio di combinazione di più celle di coltura collegate in serie e in parallelo tramite percorsi più o meno lunghi (102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110) e integrate su un unico supporto 100, realizzate per litografia nel corpo stesso del supporto. I canali così ottenuti nel supporto possono essere poi chiusi superiormente con un vetrino 101 che copre l'intero supporto 100 o più vetrini che chiudono le singole celle. In particolare sono utilizzate quattro 5
10 celle che contengono rispettivamente cellule epatiche umane o di ratto 220, cellule endoteliali umane o di ratto 222, cellule adipociti 223 e cellule pancreatiche 221, che complessivamente simulano il metabolismo di un organismo. Il funzionamento delle celle è monitorato individualmente 15
tramite la misurazione dei metaboliti e delle proteine in condizioni standard, in prelievi effettuati in prossimità di ogni cella. Le sostanze che possono essere misurate sono svariate, quali ad esempio albumina, colesterolo, glucosio, potassio, lattato, sodio, proteine totali, 20
trigliceridi, urea ed altre.

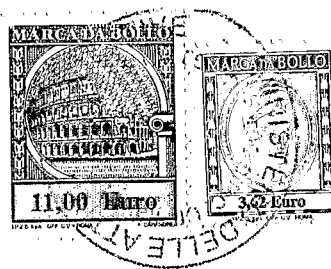
Nell'esempio descritto si utilizza un canale di ingresso 102 del terreno di coltura che giunge alla cella epatica 220, dalla quale, attraverso i condotti 109 e 110 il terreno di coltura giunge rispettivamente alle cellule 25
adipociti 223 e alle cellule endoteliali 222, collegate in



parallelo. Da tali celle, attraverso i condotti 107, 108 e 105, il terreno di coltura arriva alla cella epatica 220 attraverso 106 e attraverso il condotto 104 passando attraverso la cella pancreatica 221.

5 La descrizione di cui sopra di una forma esecutiva specifica è in grado di mostrare l'invenzione dal punto di vista concettuale in modo che altri, utilizzando la tecnica nota, potranno modificare e/o adattare in varie applicazioni tale forma esecutiva specifica senza
10 ulteriori ricerche e senza allontanarsi dal concetto inventivo, e, quindi, si intende che tali adattamenti e modifiche saranno considerabili come equivalenti della forma esecutiva esemplificata. I mezzi e i materiali per realizzare le varie funzioni descritte potranno essere di
15 varia natura senza per questo uscire dall'ambito dell'invenzione. Si intende che le espressioni o la terminologia utilizzate hanno scopo puramente descrittivo e per questo non limitativo.

20



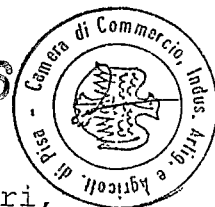
RIVENDICAZIONI

1. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari in presenza di stimoli fisici, chimici e meccanici, la cui caratteristica è di prevedere:

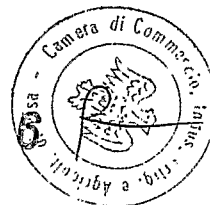
- 5 - almeno una cella di coltura avente un ingresso e un'uscita;
- una camera di premiscelazione, separata da detta almeno una cella di coltura, per la preparazione del terreno di coltura;
- 10 - un circuito connesso a detto ingresso e detta uscita e comprendente detta camera di premiscelazione;
- mezzi per produrre un flusso controllato di terreno di coltura attraverso detto circuito;
- mezzi per produrre almeno uno stimolo fisico-chimico
- 15 che si desidera applicare alle cellule sotto esame, scelto tra temperatura, pH, pressione o combinazione di essi;
- mezzi di controllo di detti mezzi per produrre almeno uno stimolo fisico-chimico, affinché detto o ciascuno
- 20 stimolo assuma valori predeterminati.

2. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 1, in cui detta cella di coltura è realizzata in materiale siliconico con forme delle sezioni che producono un flusso laminare del

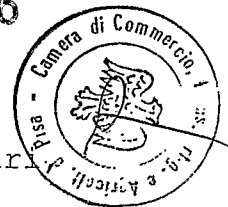
25 terreno di coltura.



3. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 1, in cui detta cella è realizzata in almeno due parti sovrapponibili delle quali almeno una presenta una concavità in modo tale che una volta sovrapposte fornisca un passaggio per il terreno di coltura.
4. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 3, in cui, lungo detto passaggio per il terreno di coltura almeno una di dette parti sovrapponibili comprende un vetrino da laboratorio disposto in una zona che operativamente permette l'osservazione mediante microscopio delle cellule impiantate su di esso.
5. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 4, in cui dette due parti sovrapponibili possono essere premute reciprocamente per l'azione di due piastre rigide tenute insieme da mezzi di accoppiamento rimovibile.
6. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 1, in cui detti mezzi per produrre un flusso controllato di terreno di coltura attraverso detta cella di coltura comprendono:
- un condotto in ingresso e in uscita da detta cella di coltura, a formare un circuito chiuso con la camera di premiscelazione separata;



- una pompa peristaltica installata lungo tale condotto;
 - un punto di immissione di eventuali farmaci o altre sostanze che potenzino o inibiscano le attività cellulari a monte della cella di coltura;
 - un punto di prelievo a valle della cella di coltura per effettuarne analisi;
 - un sensore di temperatura a monte della cella.
7. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 1, in cui detta camera di premiscelazione comprende:
- un contenitore in materiale inerte;
 - un tappo in materiale inerte;
 - mezzi per misurare operativamente i parametri fisiologici del terreno di coltura.
8. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 7, in cui i mezzi per misurare operativamente i parametri fisiologici del terreno di coltura comprendono:
- un sensore di pH immerso nel terreno di coltura presente in detta camera di premiscelazione;
 - un sensore di pressione per la misurazione all'interno di detta camera di premiscelazione;
 - sensori per la misura di specie chimiche, scelte tra O₂, CO₂, NO, etc.



9. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 7, in cui, all'interno e sul fondo della camera di premiscelazione, è presente una struttura concava tronco-conica in cui viene disposto detto sensore di pH, in modo da preservarlo dal contatto diretto con eventuali bolle di gas immesse all'interno di detta camera di premiscelazione per equilibrare il terreno di coltura e mantenerlo a pH desiderato.

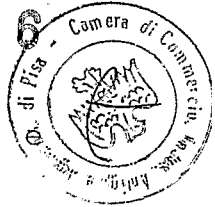
10. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 7, in cui sono previsti mezzi per variare operativamente i parametri fisiologici del terreno di coltura comprendenti:

- condotti di immissione/fuoriuscita di gas, quali in particolare aria e CO₂, in/da detta camera di premiscelazione per variarne il pH e la pressione;
- flusso di fluido termostato in un condotto che avvolge detta camera di premiscelazione, per variarne la temperatura.

11. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 7, in cui i mezzi per monitorare e controllare gli stimoli fisico-chimici applicati alle cellule nella camera di coltura sono scelti tra:

- un sensore ottico per la rilevazione di bolle all'interno della camera di coltura cellulare;





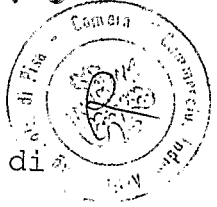
- un sensore per la rilevazione di deformazione sforzi meccanici.

12. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 1, in cui più celle di coltura vengono collegate tramite condotti di lunghezza predeterminata per simulare il comportamento di organi biologici anche complessi, in modo che le cellule contenute nelle celle a monte producano metaboliti che, trasportati dal terreno di coltura, fungono da alimento per le cellule contenute nelle celle a valle.

13. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 12, in cui più celle collegate tra loro vengono integrate su un unico supporto miniaturizzato, in particolare in materiale rigido, formando un circuito per il flusso di terreno di coltura che alimenta, in modo e in sequenza predeterminati, tutte le celle di coltura.

14. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 13, in cui detto supporto chiude le celle e i condotti con almeno un vetrino in materiale trasparente, permettendo l'osservazione, tramite microscopio, dello sviluppo delle cellule contenute nelle celle.

15. Bioreattore per il monitoraggio di attività cellulari, secondo la rivendicazione 10, in cui detti condotti di

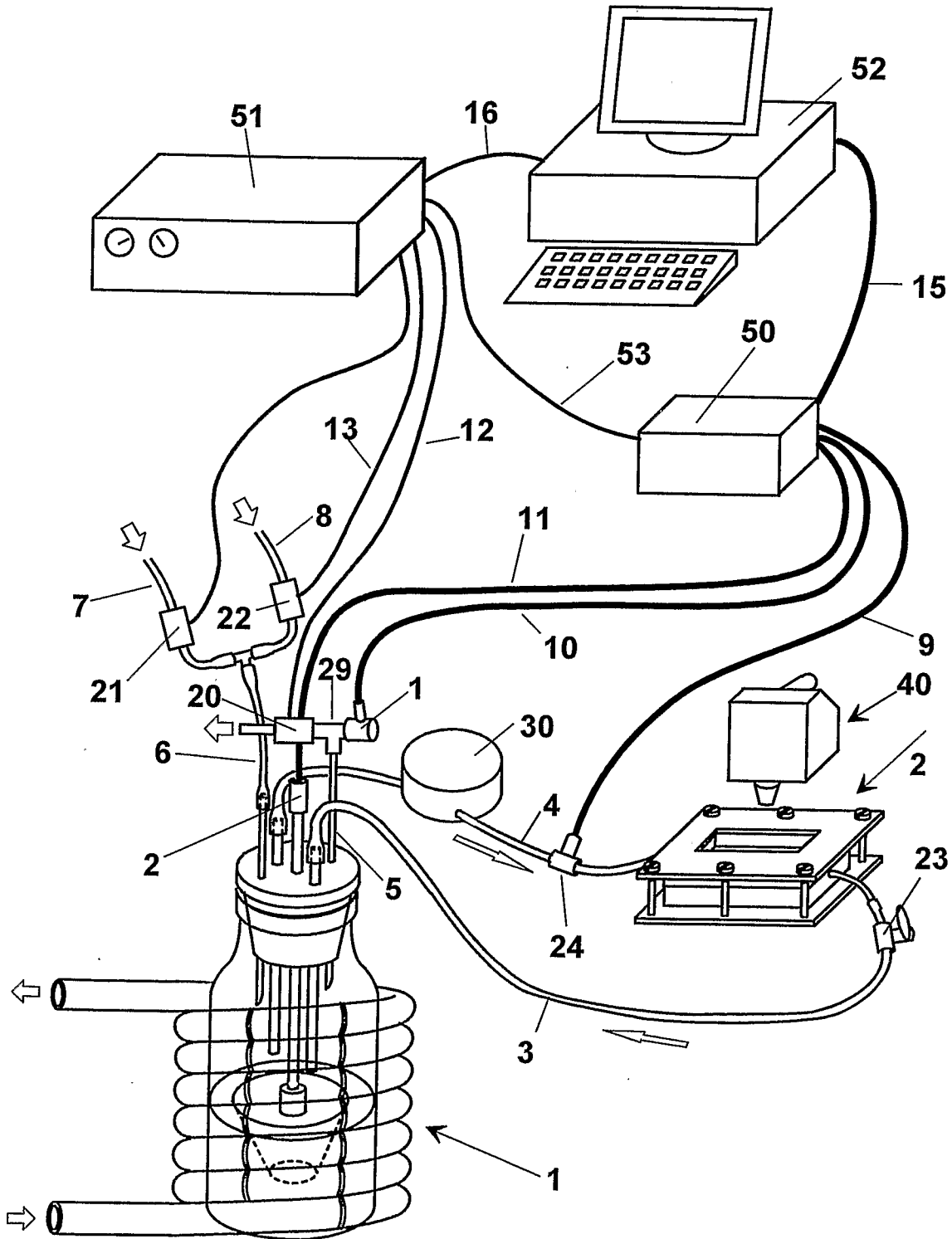


immissione e fuoriuscita di gas in/da detta camera di
premiscelazione, sono associati a elettrovalvole
comandate da una centralina elettrica di comando.

5



Fig.1



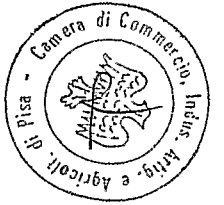
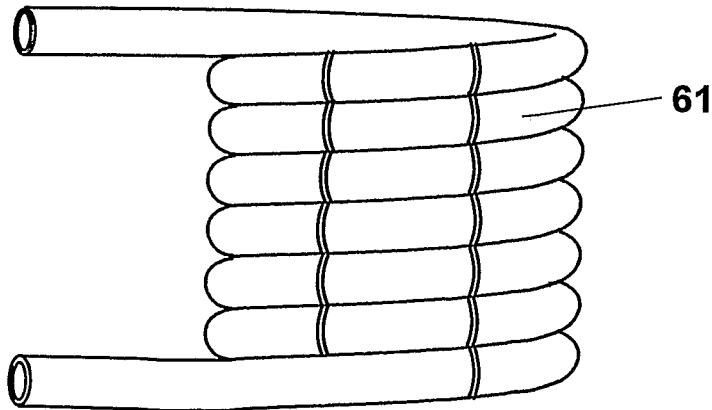
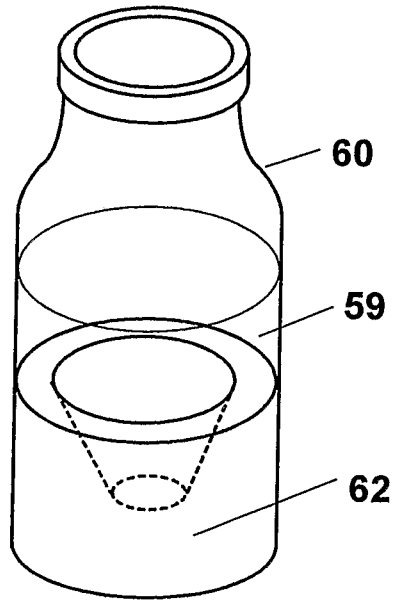
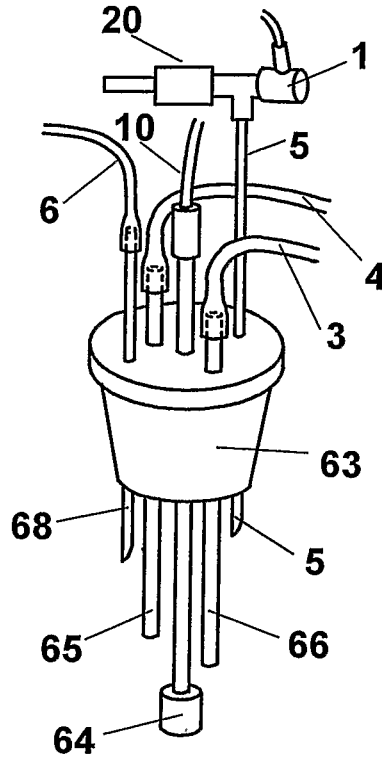


Fig.2



Ing. Marco Celestino
 ABM Agenzia Brevetti & Marchi
 Iscritto all'albo N. 544

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marco Celestino".



Fig.3

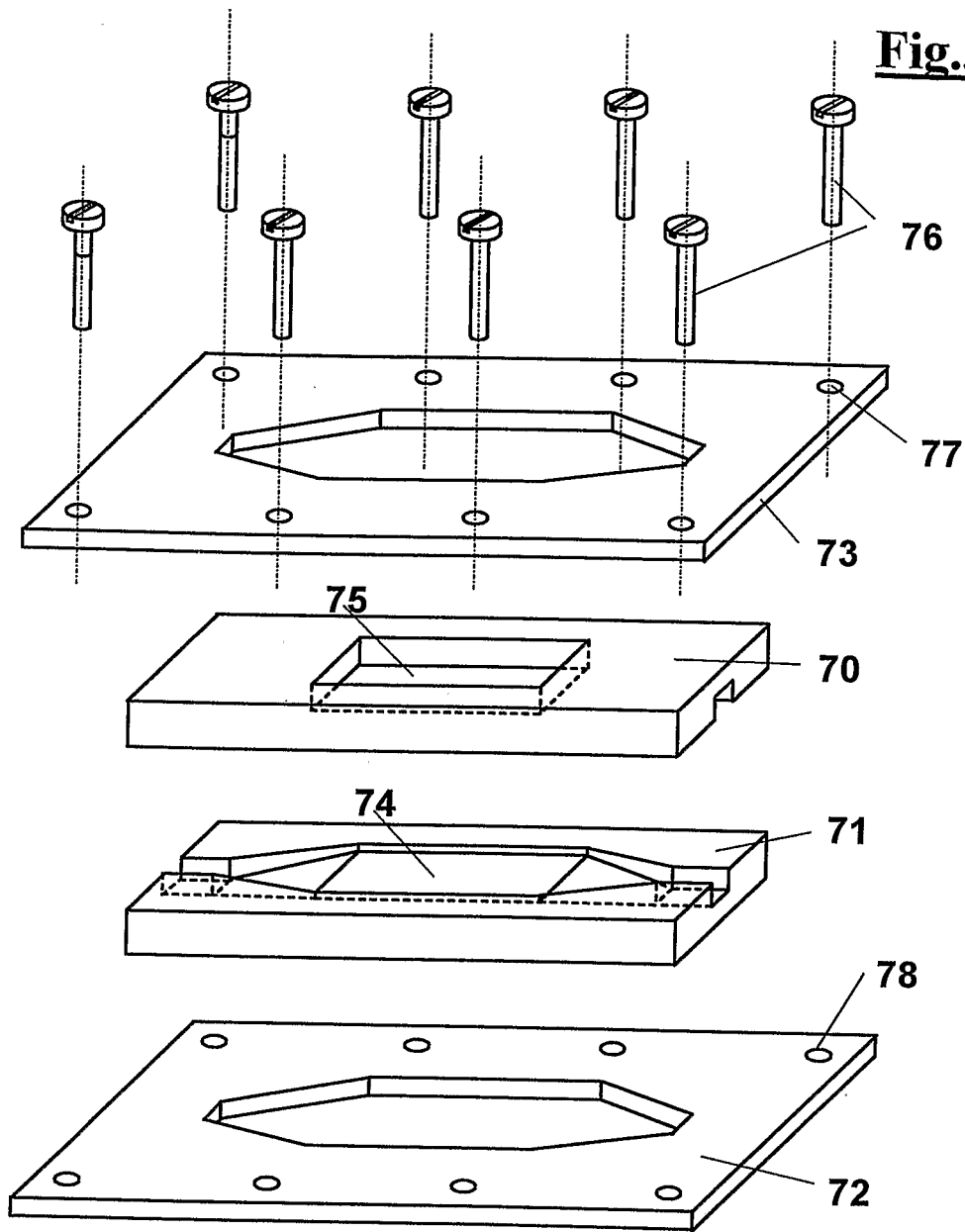
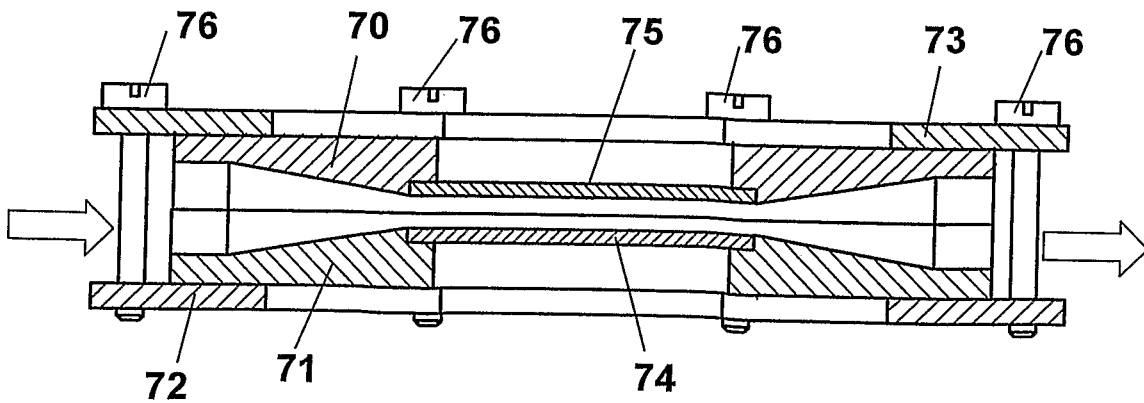


Fig.4



Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'Albo N. 544



Fig.5

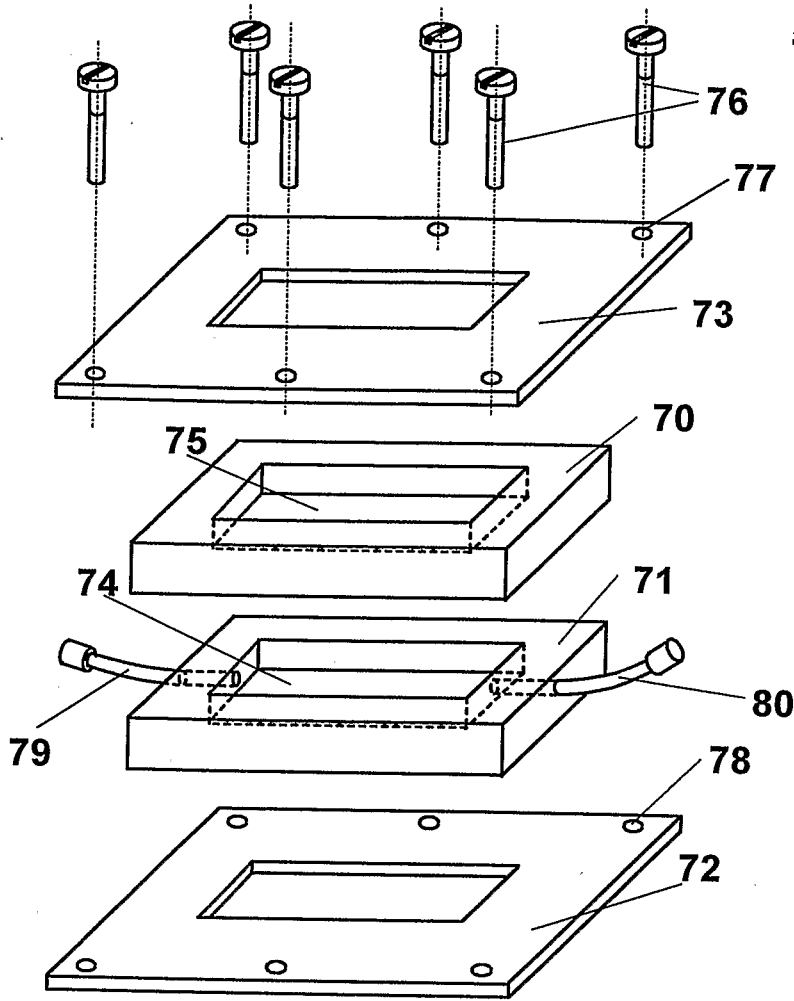
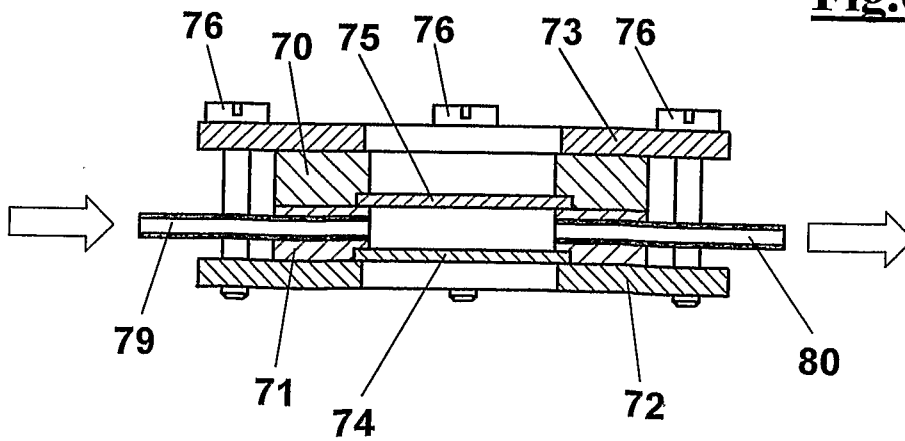


Fig.6



Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo N. 544



Fig.7

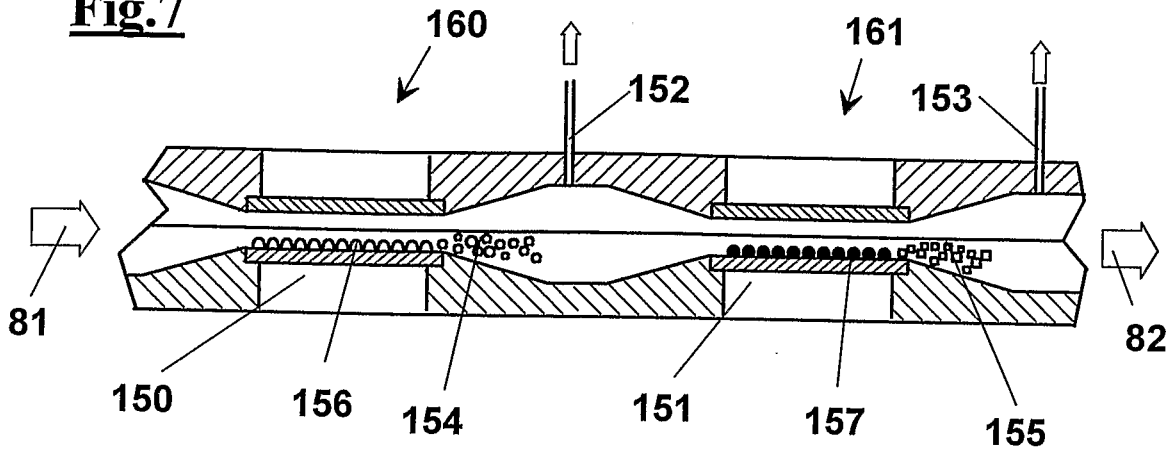
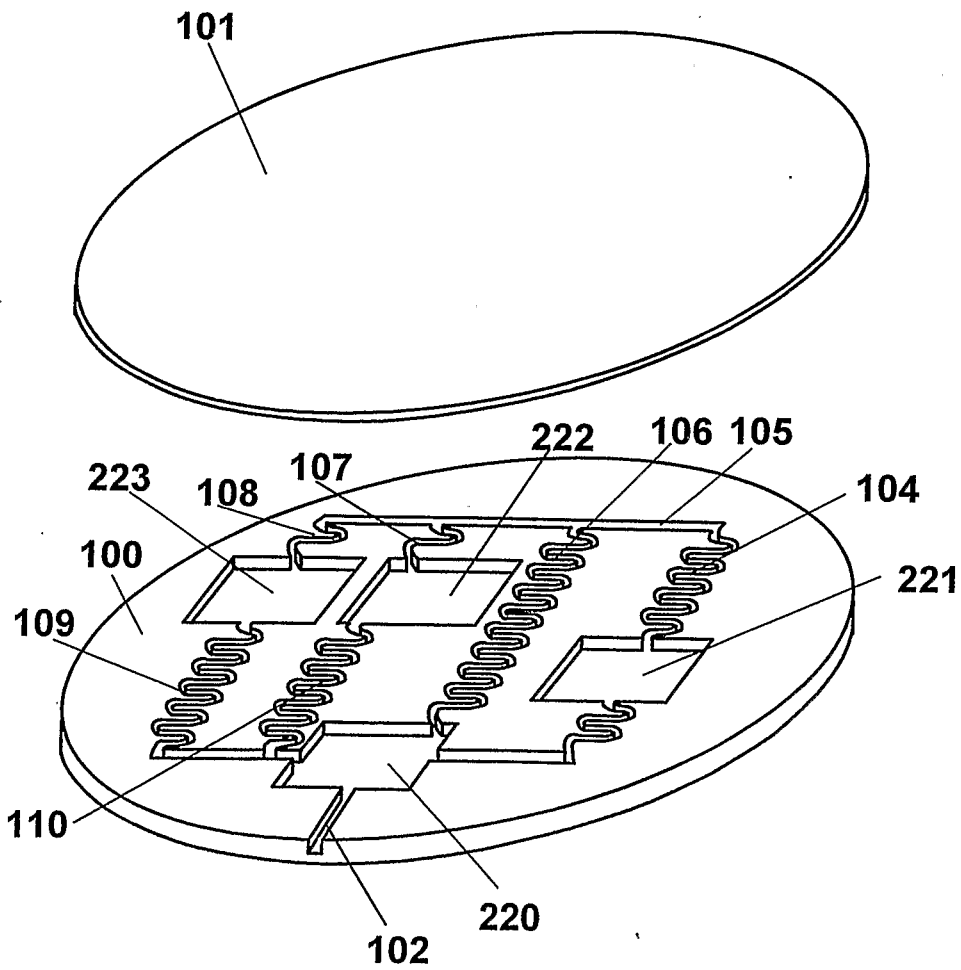


Fig.8



Ing. Marco Celestino
ABM Agenzia Brevetti & Marchi
Iscritto all'albo n. 544