

(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00948

(22) Data de depozit: 26/11/2018

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2020 BOPI nr. 6/2020

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA TEHNICĂ - IFT IAȘI,  
BD. MANGERON NR. 47, OP IS 3, CP 833,  
IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:  
• DUMITRU DANIEL HEREA, ȘOS.REDIU,  
NR.6A, BL.482E, SC.B, ET.4, AP.17, IAȘI,  
IS, RO;

• CHIRIAC HORIA,  
STR.ALEXANDRU VLAHUȚĂ NR.7 B,  
BL. ACADEMIE, SC.A, ET.2, AP.9, IAȘI, IS,  
RO;  
• LUPU NICOLETA, ȘOS.NAȚIONALĂ  
NR.42B, BL.A1, SC.D, ET.4, AP.3, IAȘI, IS,  
RO;  
• LĂBUȘCĂ LUMINIȚA, STR.HAN TĂȚAR,  
NR.2, BL.360, SC.C, ET.8, AP.23, IAȘI, IS,  
RO;  
• RĂILEANU ECATERINA,  
STR.PICTOR AUREL BĂEȘU, NR.15 BIS,  
FĂLTICENI, SV, RO

### (54) DISPOZITIV PENTRU INCUBAREA ȘI MONITORIZAREA ÎN TIMP REAL A CULTURILOR CELULARE

#### (57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv de incubare și monitorizare în timp real a culturilor celulare de mamifere sau bacterii, utilizat pentru înregistrarea cu ajutorul unui microscop inversat a acestor culturi. Dispozitivul conform invenției este realizat parțial sau total din materiale plastice și este constituit dintr-o cameră (A) interioară și o cameră (B) exterioară, care nu comunică una cu cealaltă, prima cameră (A), în care se cultivă specimenul, este înconjurată de camera (B) exterioară care este parcursă în mod continuu de apa încălzită și circulată de o baie de apă la o temperatură constantă, de exemplu la 37°C, apa încălzită pătrunde în camera (B) exterioară prin intrarea (1) și părăsește incinta prin ieșirea (2), iar dacă specimenul necesită utilizare de gaz, camera (A) interioară se conectează la o sursă de gaz prin intermediul tubului (3 sau 5) de admisie a gazului care, ulterior, părăsește incinta prin ieșirea (4 sau 6), tubul (3) de admisie și ieșirea (4) trecând prin capacul dispozitivului, iar tubul (5) de admisie și ieșirea (6) trec prin camera (B) exterioară.

Revendicări: 6  
Figuri: 14

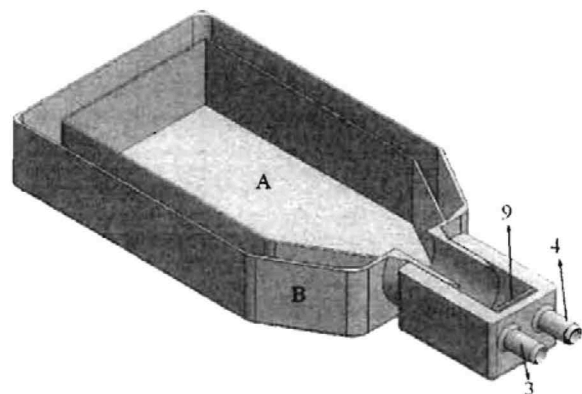


Fig. 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## Dispozitiv pentru incubarea și monitorizarea în timp real a culturilor celulare

Autori: Dumitru-Daniel Herea, Horia Chiriac, Nicoleta Lupu, Luminița Lăbușcă, Ecaterina  
Răileanu

### DESCRIEREA INVENȚIEI

[01]. Prezenta invenție se referă la un incubator care folosește o atmosferă normală (aer) sau modificată (de ex., îmbogățită cu 5 % CO<sub>2</sub>) pentru incubarea culturilor de celule de mamifere sau bacterii. Invenția se referă la un dispozitiv pentru monitorizarea și înregistrarea cu ajutorul unui microscop inversat a culturilor celulare menționate mai sus într-un interval de la câteva ore până la câteva zile.

### Nivelul curent al domeniului

[02]. În domeniul incubatoarelor de celule dedicate imagisticii de microscopie optică în timp real, sunt utilizate două categorii principale de incubatoare: (a) incubatoare de tip cușcă care închid microscopul în interiorul lor; și (b) incubatoare de dimensiuni mai mici (numite mai departe mini-incubatoare) care sunt așezate pe măsura microscopului. Prezenta invenție se referă la un mini-incubator pentru monitorizarea culturilor celulare în timp real.

[03]. Pentru observații pe termen lung, specimenul (de ex., cultură celulară) este plasat mai întâi într-un recipient (vas de cultură) și cultivat un timp variabil (cateva ore sau zile) într-un incubator convențional pentru a-i permite să sedimenteze și să adere la suprafața de plastic a recipientului. În final, acesta este transferat în interiorul unui mini-incubator sau a unui incubator de tip cușcă pentru monitorizarea acestuia în timp real. Cu toate acestea, incubarea specimenului în incubatorul convențional poate fi omisă, iar recipientul cu specimenul de incubat poate fi plasat direct în interiorul mini-incubatorului sau a celui de tip cușcă. În general, este preferată o etapă de incubare preliminară efectuată în interiorul unui incubator convențional, deoarece în acest fel microscopul optic nu este ocupat pentru o perioadă lungă de timp, iar consumul de CO<sub>2</sub> poate fi redus foarte mult.




[04]. În comerț sunt disponibile câteva tipuri de mini-incubatoare pentru monitorizarea în timp real a culturilor celulare, caracteristicile lor structurale și principiile de funcționare fiind amplu descrise în brevetul US 2005 / 0248836A1 și pe site-urile producătorilor:

<http://www.oko-lab.com/live-cell-imaging/stage-top-digital-gas;>

<http://www.tokaihit.com/en/stage-top-incubator;>

[www.pathologydevices.com;](http://www.pathologydevices.com;)

<http://www.biosciencetools.com/catalog/Closed.htm;>

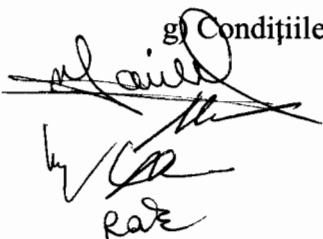
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AMC1000?SID=srch-srp-AMC1000>

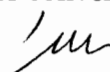
[05]. Sistemele de incubare pentru monitorizarea în timp real a culturilor celulare cuprind în esență: (a) un mini-incubator plasat pe măsura microscopului, (b) un modul de amestecare a gazelor sau, alternativ, un cilindru cu gaze preamestecate, (c) modul de umiditate, (d) adaptor pentru măsura microscopului și (e) modul de încălzire al obiectivului (opțional). Un astfel de sistem de incubare permite recipientului cu celule să fie găzduit în interiorul acestuia, fiind însă distinct de acesta.

### ***Problema pe care o rezolvă invenția***

[06]. Mini-incubatoarele pentru monitorizarea în timp real a culturilor celulare, inclusiv cel menționat în brevetul US 2005 / 0248836A1, prezintă următoarele dezavantaje:

- a) Trebuie adaptate la măsura fiecărui model de microscop.
- b) Permit doar o reîmprospătare pasivă a atmosferei gazoase din interiorul recipientelor de cultură celulară.
- c) Cantitatea de gaz pe care o consumă este crescută.
- d) Este permisă incubarea în interiorul lor doar a recipientelor cu volum mic.
- e) Au un potențial redus de producție în masă. Deoarece sunt complexe și scumpe, ele nu sunt susceptibile pentru producție pe scară largă.
- f) Din cauza costurilor foarte ridicate, acestea nu pot funcționa ca mini-incubatoare de unică folosință.
- g) Condițiile de sterilitate pe care le oferă sunt inferioare unui incubator convențional.

  
Rade



[07]. Prezenta invenție oferă soluții noi pentru a rezolva deficiențele menționate mai sus prin furnizarea unui nou dispozitiv (denumit în continuare NewInc) dedicat atât incubării, cât și observării în timp real a specimenului cultivat. Conform invenției, NewInc este așezat pe măsura microscopului, operațiile de observare și înregistrare în timp real a specimenului efectuându-se în condiții de temperatură constantă și fără modificarea parametrilor setați ai gazului.

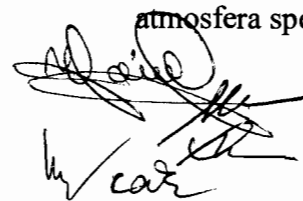
### Descrierea detaliată a invenției

[08]. Dispozitivul de incubare din prezenta invenție este prezentat în Figurile 1-8. Conform invenției, NewInc se utilizează ca mini-incubator pentru observarea microscopică a specimenului pe termen lung (de regulă, zile). Dispozitivul de incubare este realizat parțial sau total din materiale plastice și cuprinde o cameră interioară (A) și o cameră (B) care nu comunică una cu cealaltă. Prima cameră, în care se cultivă specimenul, este înconjurată de cea de-a doua care este parcursă în mod continuu de apa încălzită și circulată de o baie de apă la o temperatură constantă (de exemplu, 37 °C). Apa încălzită pătrunde în cea de-a doua cameră prin intrarea (1) și părăsește incinta prin ieșirea (2).

[09]. Dacă specimenul necesită utilizare de gaz, prima cameră (A) este conectată prin intermediul tubului de admisie a gazului (3 sau 5) la o sursă de gaz. Gazul părăsește incinta prin ieșirea (4 sau 6). Tubul de admisie (3) și cel de evacuare (4) a gazului trec prin capacul dispozitivului NewInc, iar cel de admisie (4) și evacuare (5) trec prin camera (B).

[10]. Pentru a bloca accesul bacteriilor în interiorul primei camere (A), tuburile de admisie și cele de evacuare ale gazului pot fi echipate cu filtre de aer având dimensiuni diferite ale porilor (de exemplu, pori de 220 nm) pentru a preveni contaminarea. Dacă circulația gazului este făcută prin capacul dispozitivului, capacul însuși poate fi prevăzut cu filtre de aer (9). În acest caz, filtrele din interiorul orificiilor de intrare nu mai sunt necesare.

[11]. Pentru observații microscopice efectuate în timp real, NewInc este plasat pe măsura unui microscop optic și conectat prin intermediul conectorilor pentru gaze la o sursă de gaz. Ulterior, gazele, aflate sub o ușoară presiune, sunt transportate în camera interioară a NewInc unde este cultivat specimenul. Gazele pot fi transportate (a) prin intermediul unei pompe de aer, dintr-un incubator de celule convențional pe bază de gaz (de ex., CO<sub>2</sub>) către specimenul aflat în NewInc, (b) dintr-un recipient cu gaze automatizat sau (c) dintr-un cilindru cu gaze preamestecate în concentrația dorită. În final, gazul părăsește NewInc prin tuburile de evacuare. În acest mod, atmosfera specimenului este permanent reînnoită.



[12]. Dacă fluxul de gaze din interiorul NewInc este controlat de un incubator convențional a cărui atmosferă este umidificată, NewInc nu va necesita un modul de umidificare. În plus, nivelurile de temperatură, umiditate și gaz sunt menținute constante de către incubatorul convențional. De obicei, gazul cel mai utilizat pentru creșterea celulelor este CO<sub>2</sub> a cărui concentrație în incubator este în mod comun menținută la o valoare fixă de 5%.

[13]. Dacă NewInc este conectat la un recipient automatizat de gaze sau la un cilindru cu gaze preamestecate, este necesar ca un modul de umiditate să fie introdus în circuit înainte de pătrunderea gazului în camera interioară a NewInc.

[14]. În cazul în care procesul de creștere a culturilor celulare se desfășoară în condițiile unei atmosfere normale, conectorii de gaz nu mai sunt necesari (Figurile 9-12). O astfel de configurație a NewInc este proiectată pentru experimente în care se utilizează soluții tampon de tip HEPES care sunt combinate cu mediul de cultură pentru a menține pH-ul necesar cultivării specimenului în condiții optime.

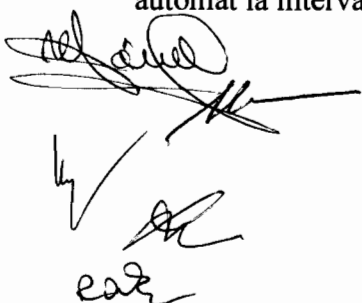
### Exemple de realizare a invenției

#### Exemplul 1. Cultură de celule în atmosferă de CO<sub>2</sub>

[15]. Un număr de  $3 \times 10^6$  fibroblaști (linie celulară de fibroblaști dermici umani, PromoCell Heidelberg, Germania) au fost însămânțați în cameră interioară a NewInc în 7 ml mediu de cultură Dulbeco complet. Dispozitivul a fost închis cu un capac prevăzut cu un filtru de aer (220 nm), precum și cu orificii de admisie și respectiv de evacuare a CO<sub>2</sub>. Gazul a trecut lent prin filtru și a pătruns în camera interioară, înprospătând treptat și continuu atmosfera celulelor.

[16]. NewInc a fost conectat la o baie de apă termostată prin intermediul tuburilor celei de-a doua camere, permițând o circulație continuă a apei încălzite prin camera B. Mantaua de apă realizată a menținut o temperatură constantă de 37 ° C în interiorul camerei interioare.

[17]. NewInc a fost așezat mai întâi într-un incubator convențional pentru a permite celulelor să sedimenteze și să adere la suprafața de plastic. După 24 de ore de la incubare, NewInc a fost transferat pe măsuța unui microscop inversat, iar evenimentele celulare au fost înregistrate automat la intervale de 15 minute timp de 24 de ore.



[18]. Un recipient de control care a conținut același număr de celule și un volum identic de mediu de cultură ca NewInc a fost păstrat în incubatorul convențional pentru comparație.

[19]. După 24 de ore, experimentul a fost oprit iar creșterea celulară a fost evaluată calitativ sub microscop (Figura 13), în timp ce numărul celulelor și viabilitatea lor (via Albastru Trypan) au fost evaluate folosind un numărător automat de celule (TC20™ BioRad). Viabilitatea celulară a fost evaluată și prin testul MTT. Rezultatele au arătat că viabilitatea a fost aproape identică atât în probă cât și în control, în timp ce numărul celulelor a fost în medie mai mare cu aproximativ 15% în probă comparativ cu cel din control. Experimentele au fost repetate de trei ori.

### **Exemplul 2. Cultură de celule în atmosferă normală (fără CO<sub>2</sub>)**

[20]. Un număr de  $3.2 \times 10^6$  fibroblaști au fost însămânțați în cameră interioară a NewInc în 7 ml mediu de cultură Dulbeco complet modificat cu soluție tampon HEPES (pH 7.4). Dispozitivul de incubare a fost închis cu un capac prevăzut cu un filtru de 220 nm.

[21]. NewInc a fost conectat la baia de apă termostată prin intermediul tuburilor celei de-a doua camere, permițând o circulație continuă a apei încălzite. Mantaua de apă realizată în jurul primei camere a menținut o temperatură constantă de 37 ° C în interiorul acesteia.

[22]. NewInc a fost introdus într-o primă etapă în incubatorul convențional pentru a permite celulelor să sedimenteze și să adere la suprafața de plastic. După 24 de ore de la incubare, NewInc a fost transferat pe măsura microscopului inversat, iar evenimentele celulare au fost înregistrate automat la intervale de 15 minute timp de 24 de ore.

[23]. Un recipient de control care a conținut același număr de celule și un volum identic de mediu de cultură ca NewInc a fost păstrat în incubatorul convențional pentru comparație.

[24]. După 24 de ore, experimentul a fost oprit iar creșterea celulară a fost evaluată calitativ sub microscop (Figura 14), în timp ce numărul celulelor și viabilitatea acestora au fost evaluate folosind numărătorul automat de celule. Viabilitatea celulară a fost evaluată și prin testul MTT. Rezultatele au arătat că nu au existat diferențe semnificative statistic între probă și control. Experimentele au fost repetate de trei ori.



**Avantajele invenției față de nivelul actual al domeniului**

[25]. Deoarece camera interioară poate fi inclusă într-un circuit închis sau cel puțin poate fi parcursă continuu de un flux de gaze unidirecțional și filtrat care evită orice amestec cu atmosfera laboratorului, incubatorul permite condiții de sterilitate identice cu ale unui incubator convențional.

[26]. În cazul în care alimentarea cu curent este oprită accidental, datorită pereților dubli izolați și a mantalei de gaz sau de apă, temperatura în interiorul camerei de incubare scade mult mai lent decât în cazul unui perete simplu, riscul afectării majore a viabilității culturii celulare fiind astfel mult diminuat.

[27]. Incubatorul este flexibil și permite realizarea cu ușurință de geometrii cu suprafețe de la foarte mici până la foarte mari pentru atașarea specimenului, fără a se limita zona de observare optică a câmpului de cultură celulară. Toate celulele atașate și cultivate în camera de incubare pot fi observate și înregistrate în mod succesiv.

[28]. Datorită costului foarte redus și a compoziției bazate pe un singur tip de material, incubatorul este foarte susceptibil pentru producerea în masă.

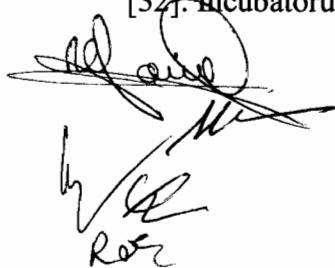
[29]. Dispozitivul permite o înprospătare continuă a atmosferei gazoase în interiorul recipientelor de cultură celulară.

[30]. Cantitatea de gaz utilizată pentru incubarea specimenelor este foarte redusă. Dat fiind faptul că pentru înprospătarea atmosferei gazoase sunt utilizate volume de gaz foarte mici, chiar dacă există o răcire a atmosferei specimenului datorită proceselor de ventilație inerente deplasării gazului prin camera interioară, aceasta este minoră.

[31]. Nu este necesar ca incubatorul să fie modificat în funcție de măsura fiecărui model de microscop optic. Incubatorul poate fi utilizat pentru aproape toate microscopicele optice inversate dedicate observării și monitorizării în timp real a culturilor celulare.

**Aplicabilitate industrială**

[32]. Incubatorul conform prezentei invenții prezintă următoarele avantaje industriale.



[33]. Datorită producției cu costuri foarte scăzute, a procesului de fabricare nesofisticat și a structurii pe bază de materiale plastice, incubatorul este foarte susceptibil pentru producția în masă, inclusiv prin utilizarea echipamentului actual pentru fabricarea recipientelor de plastic pentru culturi celulare.

[34]. Prin furnizarea de tuburi de acces suplimentare către camera interioară care conține specimenul, mediul de cultură poate fi reîmprospătat, iar medicamentele sau alte substanțe organice și anorganice de interes pot fi introduse simplu peste specimen. În plus, în camera interioară pot fi introduși diferiți senzori și sonde prin modificări mecanice realizate la nivel industrial.

A handwritten signature in black ink, followed by a large checkmark.A handwritten signature in black ink.A handwritten signature in black ink.



**FIGURI**

**Figura 1.** Vedere în perspectivă a dispozitivului de incubare pentru culturi de celulare dependente de gaz. Tuburile pentru circulația lichidului (1) și (2) pătrund numai în camera (B). Admisia (3) și evacuarea gazului (4) în camera A au loc prin capacul dispozitivului.

**Figura 2.** Secțiune longitudinală prin dispozitiv pentru culturi celulare dependente de gaz. Filtrul (9) poate forma un corp comun cu capacul.

**Figura 3.** Secțiune transversală a dispozitivului pentru culturi de celule bazate pe gaz. Secțiunea este realizată prin tuburile pentru transportul lichidului (1) și (2) și prin camera interioară (A) înconjurată de a doua cameră (B).

**Figura 4.** Secțiune transversală prin camere, filtru (9), capac și tubul de admisie a gazului (3) ale dispozitivului de culturi celulare pe bază de gaz.

**Figura 5.** Vedere în perspectivă a dispozitivului pentru culturi celulare dependente de gaz. Tuburile pentru transportul lichidului (1) și (2) pătrund în camera (B). Tuburile pentru admisia (5) și evacuarea gazului (6) traversează pereții ambelor camerelor.

**Figura 6.** Secțiune longitudinală prin dispozitiv pentru culturi celulare dependente de gaz. Filtrele (7) și (8) fac parte din tuburile pentru transportul gazului (5) și (6).

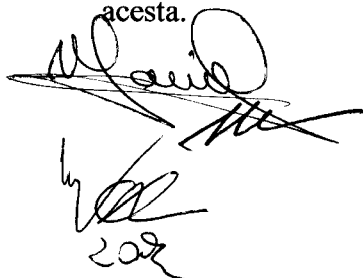
**Figura 7.** Secțiune transversală prin tubul pentru transportul de lichid (1) și prin camerele unei versiuni a dispozitivului de incubare.

**Figura 8.** Secțiune transversală prin camera B, tubul de admisie a lichidului (1) și cel de admisie a gazului (5).

**Figura 9.** Reprezentare tridimensională a dispozitivului pentru o cultură de celule care nu necesită utilizarea de gaz. Tuburile pentru transportul lichidului (1) și (2) intră în camera (B).

**Figura 10.** Secțiune longitudinală prin dispozitiv pentru o cultură celulară care nu necesită utilizarea de gaz. Filtrul (9) este plasat în interiorul capacului și poate forma un corp comun cu

acesta.



Handwritten signature and date: 2018



Handwritten signature

**Figura 11.** Secțiune transversală prin tuburile pentru transportul lichidului (1) și (2) și prin camere.

**Figura 12.** Secțiune transversală prin camere și tubul de admisie a lichidului (1).

**Figura 13.** (a) Fibroblaști (linie celulară normală de fibroblaști dermici umani) cultivați în atmosferă de 5% CO<sub>2</sub> în interiorul primei camere a dispozitivului de incubare; (b) fibroblaști cultivați pentru comparație într-un recipient de control într-o atmosferă de 5% CO<sub>2</sub> în interiorul unui incubator convențional.

**Figura 14.** (a) Fibroblaști cultivați în atmosferă normală (fără CO<sub>2</sub>) în interiorul primei camere a NewInc; (b) fibroblaști cultivați pentru comparație într-un recipient de control în atmosferă normală în interiorul unui incubator convențional.

  
Roe



**REVENDICĂRI**

1. Dispozitiv de incubare pentru culturi celulare cuprinzând o cameră interioară (A), înconjurată de o cameră exterioară (B), ambele realizate parțial sau total din materiale plastice, care nu comunică una cu cealaltă. Camera interioară este prevăzută cu o deschidere pentru introducerea culturilor celulare și a mediului de cultură.
2. Dispozitiv de incubare, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se poate conecta la un mijloc de încălzire cu apă, inclusiv la o baie de apă termostată cu recirculare, prin intermediul conectorilor pentru apă ai camerei B.
3. Dispozitiv de incubare, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se poate conecta la mijloc de alimentare cu gaz, eventual umidificat și încălzit, prin intermediul conectorilor pentru gaz ai camerei B sau prin conectori practicați în capac.
4. Dispozitiv de incubare, conform revendicărilor 1-3, **caracterizat prin aceea că** permite reîmprospătarea continuă sau intermitentă a mediului de cultură cu nutrienți din exteriorul unității în interiorul camerei interioare.
5. Dispozitiv de incubare, conform revendicărilor 1-4, **caracterizat prin aceea că** permite înregistrări intermitente sau continue ale culturilor celulare aflate în câmpul de observație al unui microscop optic inversat.
6. Dispozitiv de incubare conform revendicărilor 1-5 **caracterizat prin aceea că** poate fi re-dimensionat în vederea creșterii și monitorizării culturilor celulare la scară industrială. Un astfel de dispozitiv poate conține o fereastră pentru observații intermitente sau continue ale culturilor celulare pentru controlul calității și documentarea procesului de creștere.



Figura 1

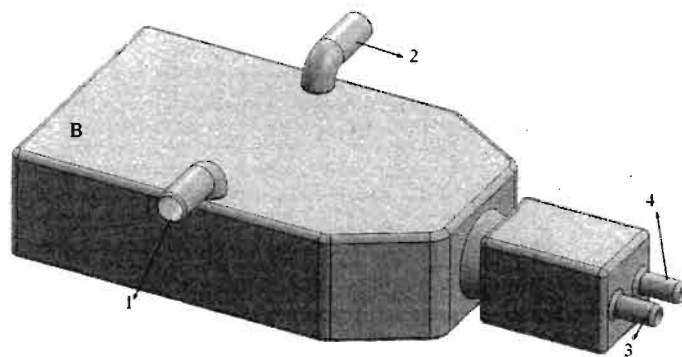
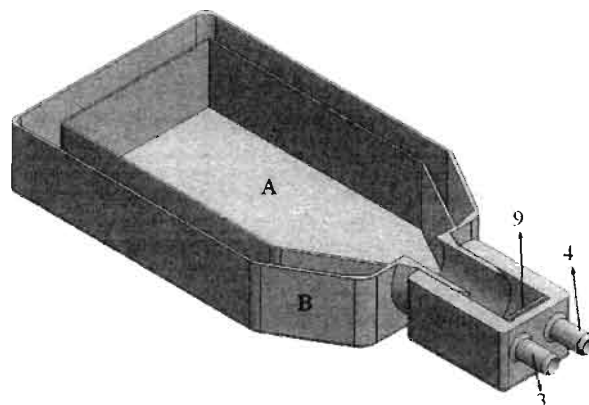


Figura 2



*Handwritten signature and initials*

*Handwritten signature*

Figura 3

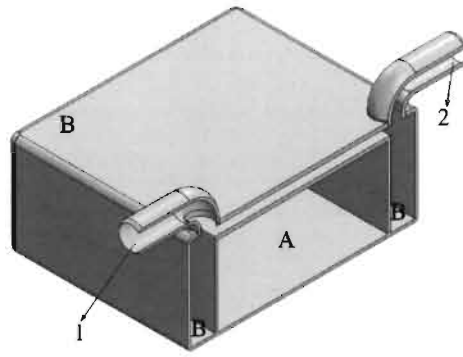


Figura 4

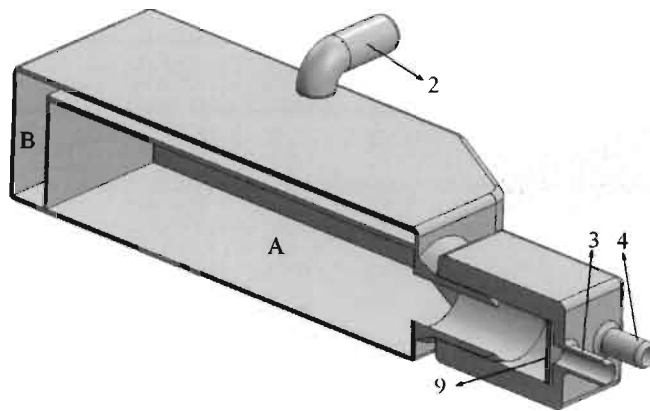
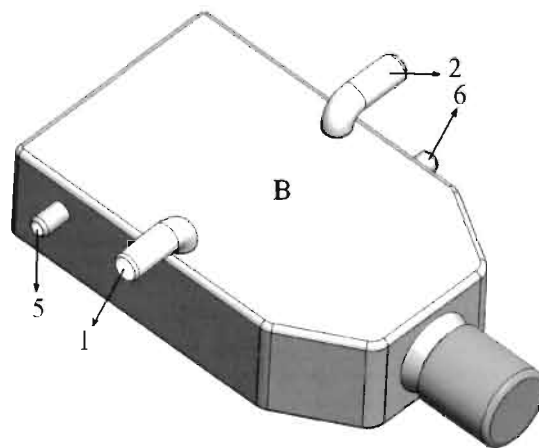


Figura 5



*Handwritten signatures and initials:*  
- A large signature at the top left.  
- A signature below it.  
- The initials "ROT" at the bottom left.

*Handwritten signature:* Lura

Figura 6

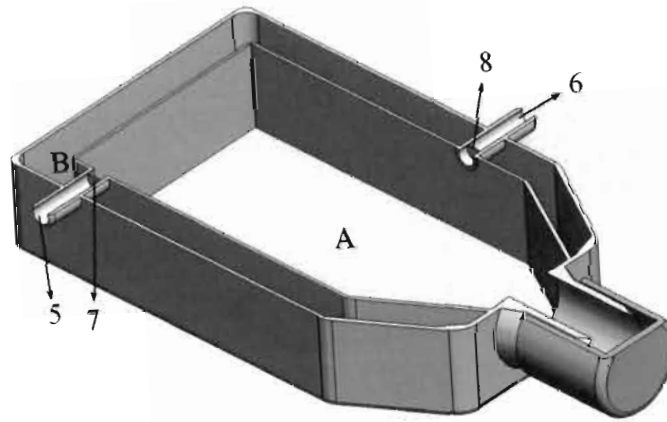


Figura 7

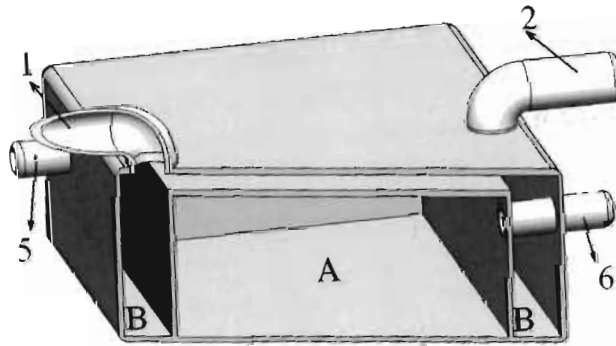
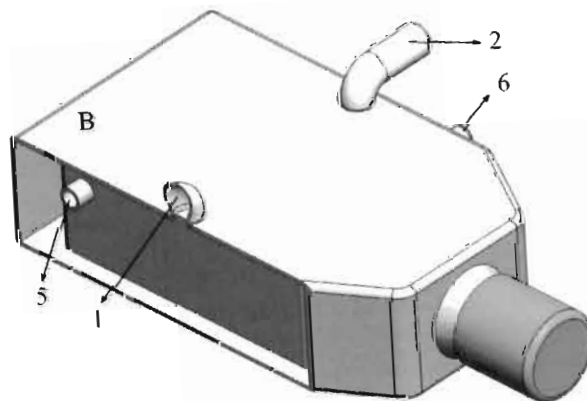


Figura 8



*Handwritten signature*

*Handwritten signature*  
*Res*



Figura 9

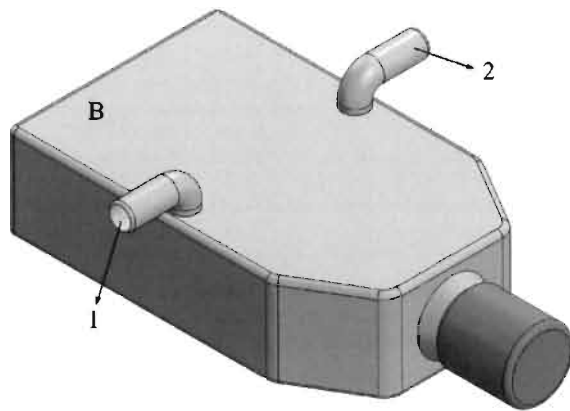


Figura 10

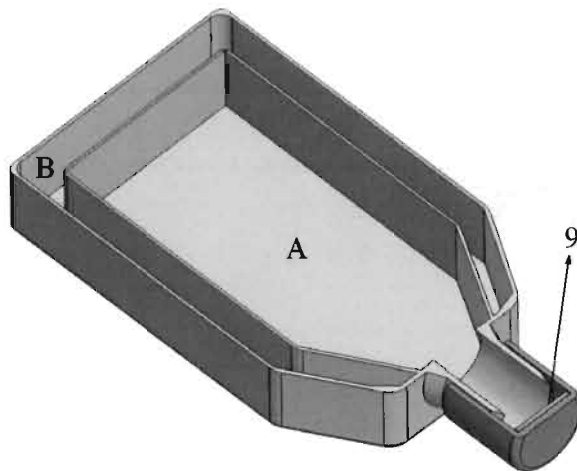
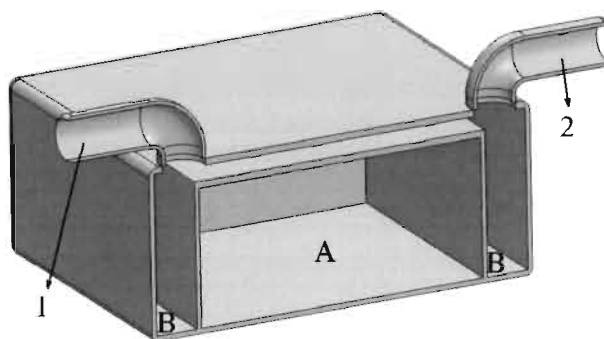


Figura 11



*Handwritten signature and initials*

*Handwritten signature*

Figura 12

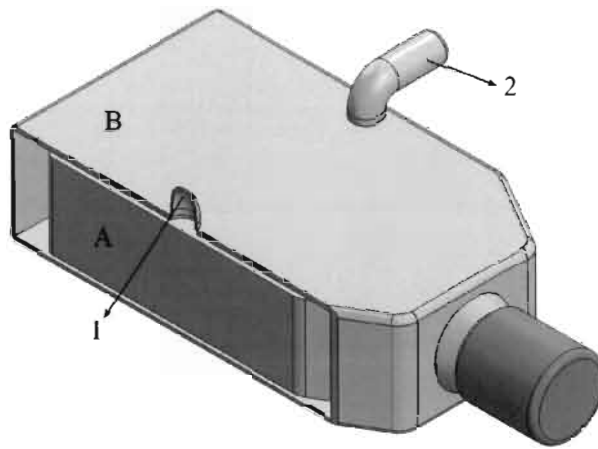


Figura 13a

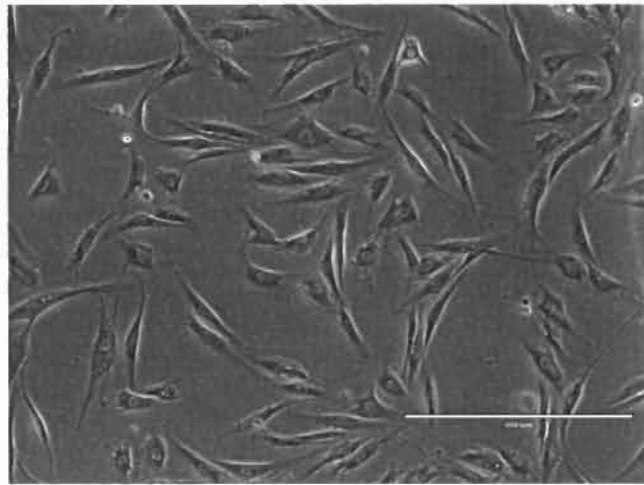
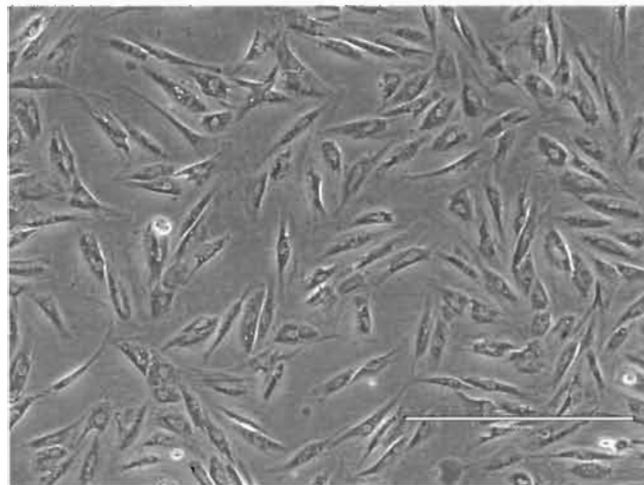


Figura 13b



*[Handwritten signature]*  
*[Handwritten signature]*  
*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*



2

Figura 14a

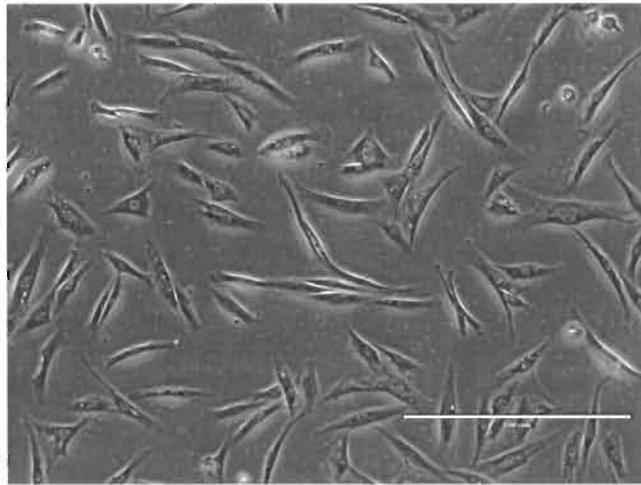
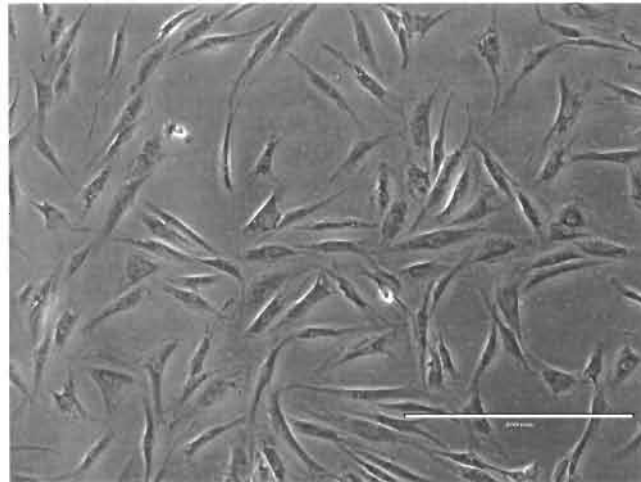


Figura 14b



~~Alain~~  
✓

1/11

Ch  
RZ