

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-514432

(P2004-514432A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

|                              |               |             |
|------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup>   | F I           | テーマコード (参考) |
| C 1 2 M 3/00                 | C 1 2 M 3/00  | A 4 B O 2 4 |
| C 1 2 N 1/02                 | C 1 2 N 1/02  | 4 B O 2 9   |
| C 1 2 N 5/06                 | C 1 2 N 5/00  | E 4 B O 6 5 |
| C 1 2 N 5/10                 | C 1 2 N 5/00  | B           |
| C 1 2 N 15/09                | C 1 2 N 15/00 | A           |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) |               |             |

(21) 出願番号 特願2002-545125 (P2002-545125)  
 (86) (22) 出願日 平成13年11月21日 (2001.11.21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年7月22日 (2002.7.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/043718  
 (87) 国際公開番号 W02002/042419  
 (87) 国際公開日 平成14年5月30日 (2002.5.30)  
 (31) 優先権主張番号 09/723,008  
 (32) 優先日 平成12年11月27日 (2000.11.27)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 09/724,153  
 (32) 優先日 平成12年11月28日 (2000.11.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 09/975,889  
 (32) 優先日 平成13年10月11日 (2001.10.11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500426560  
 バイオクリスタル・リミテッド  
 BioCrystal Limited  
 アメリカ合衆国、オハイオ州 43082  
 -8888、ウェスターヴィル、マッコ  
 ークル・ブルヴァード 575  
 (74) 代理人 100058479  
 弁理士 鈴江 武彦  
 (74) 代理人 100084618  
 弁理士 村松 貞男  
 (74) 代理人 100092196  
 弁理士 橋本 良郎  
 (74) 代理人 100095441  
 弁理士 白根 俊郎

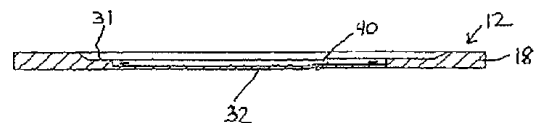
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養装置および使用方法

(57) 【要約】

【課題】 細胞培養装置および使用方法

【解決手段】 提供されるのは、細胞を培養し、且つオプションで、培養されることが所望される細胞の磁気的分離を行うための細胞培養装置 (12) である。この細胞培養装置 (12) は、好ましくは、フレーム (18) と、フレーム (18) およびそれとの間に培養チェンバー (40) を形成する際に剛性表面を含む対向する表面 (32) に対して非漏洩シール状態に確実にシールされる少なくとも1つのガス透過性膜 (31) と、物質が培養チェンバー (40) に導入されるかまたは培養チェンバー (40) から取り出されることを可能にする少なくとも1つの再シール可能な開口部 (23) とを備える。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ハウジングおよびフレームを通る開口を含む少なくとも 1 つの開口部を含み、前記少なくとも 1 つの開口部の各開口が隔膜を含むフレーム、培養チェンバーの壁の一部を形成する際に前記フレームに非漏洩シール状態として確実にシールされる少なくとも 1 つのガス透過性膜と、前記少なくとも 1 つのガス透過性膜と剛性表面および前記膜との間で形成される前記培養チェンバーの壁を形成する剛性表面とを備え、前記少なくとも 1 つのガス透過性膜が光学的に透明であり、かつ明瞭である細胞培養装置。

## 【請求項 2】

前記フレームは、2 つまたはそれ以上の開口部を備えている請求項 1 に記載の細胞培養装置。 10

## 【請求項 3】

前記一部は、約 10 % から約 100 % までの範囲内の量である請求項 1 に記載の細胞培養装置。

## 【請求項 4】

前記一部は、約 10 % から約 60 % までの範囲内の量である請求項 1 に記載の細胞培養装置。

## 【請求項 5】

前記少なくとも 1 つのガス透過性膜は、細胞付着を改善すべく処理された表面を備えている請求項 1 に記載の細胞培養装置。 20

## 【請求項 6】

細胞は、個別の細胞、組織を形成する細胞およびそれからの組み合わせからなるグループから選択された請求項 1 に記載の細胞培養装置。

## 【請求項 7】

前記隔膜は、さらに殺菌剤を備えている請求項 1 に記載の細胞培養装置。

## 【請求項 8】

前記殺菌剤は、前記隔膜のエラストマー材料に組み込まれ、かつ前記隔膜上に表面コーティングを形成し、かつ前記殺菌剤は、殺菌剤の前記表面コーティングが激減されたとき前記エラストマー材料を通る移動を示す請求項 7 に記載の細胞培養装置。

## 【請求項 9】

前記少なくとも 1 つのガス透過性膜および前記対向する剛性表面は、約 0.1 インチから約 0.5 インチまでの範囲内の距離だけ離隔されている請求項 8 に記載の細胞培養装置。 30

## 【請求項 10】

前記フレームは、前記少なくとも 1 つのガス透過性膜の平面に対して傾斜している斜面部分を備える請求項 1 に記載の細胞培養装置。

## 【請求項 11】

前記細胞培養装置は、それに脱離可能に固定される磁気シートアセンブリを備え、前記磁気シートアセンブリは、前記磁気シートアセンブリを前記細胞培養装置の前記細胞チェンバーを形成する少なくとも 1 つのガス透過性膜と粘着性接触することによって面と向かう方法で細胞培養装置の上に、かつ細胞培養装置に脱離可能に固定される請求項 1 に記載の細胞培養装置。 40

## 【請求項 12】

流体通路は、複数の細胞培養装置間に設けられ、かつ前記流体通路は、前記流体通路によって結合される細胞培養装置の培養チェンバーの流体流伝達を可能にする請求項 1 に記載の複数の細胞培養装置を含むバイオリアクター。

## 【請求項 13】

請求項 1 に記載の細胞培養装置で細胞を培養する方法であって、

(a) 懸濁液を形成する際に細胞の成長を助けるために適切な量の組織細胞媒体で培養される細胞を懸濁し、

(b) 前記懸濁液を前記細胞培養装置に注入する器具に前記懸濁液を導入し、 50

(c) 前記器具の先端を前記隔膜および開口部を通して、かつ前記細胞培養装置の前記細胞培養チェンバーに挿入し、

(d) 前記懸濁液を前記器具から、かつ前記細胞培養チェンバーの中に放出し、

(d) 前記先端を前記細胞培養装置から引き抜き、

(e) 培養基および細胞の前記懸濁液を含む前記細胞培養装置を保温することを含む請求項 1 に記載の細胞培養装置で細胞を培養する方法。

【請求項 14】

培養される前記細胞は、付着依存性細胞である請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

培養される前記細胞は、付着依存性細胞である請求項 13 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記付着依存性細胞は、ステップ (f) で前記細胞培養装置の前記少なくとも 1 つのガス透過性膜に取り付けられた後、前記方法は、前記培養チェンバーで前記細胞を転位された態様で培養するときに前記細胞培養装置を 180°回転させるさらなるステップを含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記付着依存性細胞は、ステップ (f) で前記細胞培養装置の膜に取り付けられた後、前記方法は、

(g) 前記細胞培養装置を 180°回転させるステップと、

(h) ステップ (c) からステップ (f) を繰り返すステップとのさらなるステップを含み、

20

少なくとも 1 つのガス透過性膜および前記剛性表面が細胞が培養される付着面として役立つ請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 11 に記載の前記細胞培養装置を使用する磁気装置の方法であって、

(a) 磁気分離反応物と結合特異性を有するタイプの細胞との間に合成物を含む混合物を形成する際に、分離されることが望まれる細胞のタイプに対して結合特異性を有する磁気分離反応物とともに磁気分離によって隔離されるのが望まれる細胞のタイプの集団がある細胞の混交集団を含む液体を混合すること、

(b) 前記混合物が磁気シートを脱離可能に固定される平面に沿って前記少なくとも 1 つのガス透過性膜によって形成される前記培養チェンバーの壁に接触するように前記細胞培養装置の前記培養チェンバーに前記混合物を導入すること、及び

30

(c) 前記合成物は、前記磁気シートの磁界強度に対する前記複合体の引力のために前記培養チェンバーの壁に沿って接触し、かつ所定の位置に保持されるのに十分な時間前記合成物を前記細胞培養装置で培養することを含む請求項 11 に記載の前記細胞培養装置を使用する磁気装置の方法。

【請求項 19】

前記培養チェンバーで未結合されたままである前記混合物を前記細胞培養装置から取り除くことをさらに含み、かつ前記取り除かれた混合物は、ネガティブ選択のプロセスによって分離された細胞を含む請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 20】

前記混合物を取り除かれた後、前記培養チェンバーで結合され、かつ前記細胞培養装置に残る前記混合物を含む前記細胞は、ポジティブ選択のプロセスによって分離される細胞を含む請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

さらに、組織培養基を前記培養チェンバーに導入し、前記磁気シートを前記細胞培養装置から取り除き、かつ前記ポジティブ選択のプロセスによって分離された前記細胞を培養する際に前記細胞培養装置を保温することを含む請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

組み換え DNA 分子を請求項 1 に記載の前記細胞培養装置で培養された細胞に導入する方

50

法であって、

(a) 前記組み換えDNA分子を含む混合物を形成する際にトランスフェクション反応物をベクターを含む前記組み換えDNA分子と混合すること、

(b) 前記組み換えDNA分子を含む培養基を形成する際に前記組み換えDNA分子を含む前記混合物を組織培養基と混合すること、

(c) 前記細胞培養装置で前記培養される細胞に接触するように前記組み換えDNA分子を含む前記培養基を前記培養チェンバーに導入すること、

(d) 前記組み換え分子を前記培養チェンバーの培養細胞に導入することを推進する際に前記培養される細胞に接触している前記組み換えDNA分子を含む培養基を培養することを含む組み換えDNA分子を請求項1に記載の前記細胞培養装置で培養された細胞に導入する方法。 10

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

本出願は、2001年10月11日に出願された米国特許出願第09/975,889号、2000年11月28日に出願された米国特許出願第09/724,153号、2000年11月27日に出願された米国特許出願09/723,008号、2000年11月21日に出願された米国特許出願第09/717,651号の優先権を主張する、特許協力条約の下で米国受理官庁で受理された国際特許出願である。

#### 【0002】

発明の分野

20

本発明は、おおむね細胞または組織培養物をインビトロで生育させるための装置および方法に関する。より詳細には、本発明は、細胞培養容器装置内に収容される細胞の環境と細胞培養装置がその中に保温されるインキュベーターの雰囲気との間での急速で且つ均一なガスの転移を可能とさせる少なくとも1つのガス透過性の膜を含む細胞培養装置に関する。

#### 【0003】

発明の背景

真核生物の細胞培養システムにおいて、細胞の培養は、一般に、コントロールされた、pH、温度、湿度、容量オスモル濃度、イオン濃度、およびガスの交換の条件下にある。最後のものに関し、酸素と二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)は、細胞の培養に対して特に重要なものである。一般的な真核生物の細胞培養システムにおいて、当該インキュベーター内で約5%のCO<sub>2</sub>の雰囲気を維持させるべくCO<sub>2</sub>が導入されるインキュベーターが用意される。該CO<sub>2</sub>は、前記pHを生理的レベルに維持するために、組織培養基、特にそのバッファリングシステムと相互に作用する。従来の細胞培養容器は、組織培養フラスコ、組織培養ボトル、および組織培養プレートを含んでいる。インキュベーター雰囲気から組織培養プレートへのCO<sub>2</sub>の入口は、概して、微粒子汚染物質がプレートチェンバーに入らないように除去するために、前記プレートに被さるように突出してゆるくフィット(適合)するカバーを含んでいるが、前記インキュベーター雰囲気と前記組織培養プレート内の雰囲気との間のガス交換を許容する。同様に、組織培養フラスコまたはボトルについては、ゆるくフィットするキャップが、前記フラスコまたはボトルのチェンバーに入らないように微粒子汚染物質を除去するが、前記インキュベーター雰囲気と前記フラスコまたはボトル内の雰囲気との間のガス交換を許容する。さらに最近では、キャップは、ガス透過性の膜またはフィルタが設けられていて、それによってきつくフィットするキャップによるガス交換を可能としている。 30 40

#### 【0004】

CO<sub>2</sub>に加えて、細胞の培養は、細胞呼吸および代謝機能に必要とされる十分な量の酸素を前記細胞に供給する能力に依存する。従来の細胞培養容器における細胞呼吸のための酸素の供給は、前記組織培養基の表面の上方にある前記容器のヘッダー空間、例えば該容器における中空空間、において行なわれる。培養される細胞への酸素濃度の増大への努力は、機械的な攪拌、培養基の散布またはエアレーション、酸素の局部圧力の増大、および/ 50

または大気圧の増大を含んでいる。それゆえ、従来の細胞培養容器においては、容器全体の容量または表面に比例するような、ガス交換のために提供される容量または表面は、いづれも、非能率的に用いられおおよび／または結果としてガス交換のレートの制限またはガスの平衡に帰着する。このことは、細胞成長、細胞密度、および総細胞数のレートが、空間、表面積、およびガス交換制限に起因して、しばしば低い、小規模の培養（15 ml またはそれ以下）において、なお一層注目に値する。

#### 【0005】

ガス透過性膜を横切るガス交換のレートは、「改善された」として記述されている。しかしながら、ガス透過性膜は、種々の理由により、細胞培養システムに用いるために好ましくないとして記述されている。例えば、米国特許第5,523,228号において、酸素毒性の境界レイヤーが、前記ガス透過性膜と組織培養基との間の界面に生じる。そしてさらに、前記毒性境界レイヤー内に入る細胞は、修復できないほど損傷を受けることが教示されている。さらに、米国特許第5,707,869号において、ガス透過性、液体非透過性物質の表面の化学的性質は、多くの細胞タイプと両立せず；そして加えて、非特異的なタンパク質結合を生じさせるそれらの性質に起因して、そのような物質は、溶解し得る成長因子の枯渇に導き得ることが教示されている。

10

#### 【0006】

したがって、細胞培養装置には、従来の細胞培養容器に比較してガス交換のための増大された表面積を提供し得て、且つ比較的短い時間の期間に高い細胞密度を達成して高いレートの細胞成長を、そして付着面に沿って付着依存性細胞の分布さえももたせて提供する必要性がある。

20

#### 【0007】

##### 発明の概要

本発明は、フレームと；ガス透過性である少なくとも1つの膜、且つ少なくとも1つの膜は、培養チェンバーを形成して、前記フレームに対して（非漏洩シール状態として）確実にシールされる、と；そして前記フレームを通り、物質が、前記培養チェンバー内に導入され、またはそこから引き抜かれる、ことを許容する少なくとも1つの再シール可能な開口部とを備える細胞培養装置を提供する。

#### 【0008】

1つの好ましい実施形態では、前記細胞培養装置は、その上にガス透過性膜が延ばされ、確実にそれに対してシールされ、その間に培養チェンバーを形成する際に固定プラスチック表面を含む付加的表面を含むフレームを備えている。前記フレームは、本発明の前記細胞培養装置を組み立てるためのハウジングを提供すべく十分にリジッドである。前記膜は、前記チェンバー内における細胞成長に適合するために十分なガス透過性を提供し、且つ前記装置を取り扱うために十分な構造的完全性を提供すべく、適切な厚みからなる。さらに、前記膜は、前記細胞培養（例えば、組織培養基の色；および顕微鏡に観察され得るような、細胞の成長および形態のような細胞の特性）を観察するように十分な光学的透明性および明瞭性からなる。前記フレームは、物質を細胞チェンバー内に導入し、またはそこから引き抜くことを可能とさせる、少なくとも1つの再シール可能な開口部、そして好ましくは少なくとも2つの再シール可能な開口部を、有する。各開口部は、その中で前記培養チェンバー内に物質を導入しまたは該培養チェンバーから物質を引き抜くための器具（例えば、針またはピペットまたはピペット先端）の一部が案内される通路として役立つフレームを通る開口を備えている。好ましい実施形態においては、前記器具の部分が、前記フレームの再シール可能な開口部を通して挿入されたときに、培養チェンバーの膜により形成される壁のいずれかに孔をあけるのを防止するために、前記フレームは十分な厚みからなり且つ前記開口部は十分に制限した直径からなる。

30

40

#### 【0009】

前記細胞培養装置は、従来の細胞培養デバイスと比較して、ガス交換および平衡、前記装置内で培養される細胞の酸化、細胞培養および培養中の細胞特性を観察するための付加的な透明性および明瞭性、付着依存性細胞の分布さえも助長する取り付け面および状態、空

50

間効率、多用途性、および比較的短い時間の期間における高い細胞密度を達成して高レートの細胞成長を助長し得る条件、を含む予期していない特徴の組み合わせを提供する。

#### 【0010】

本発明の上述し且つ他の目的、特徴、および利点は、以下の発明の詳細な説明において、そこでは参照数字がいくつかの図解された図面および実施形態を通して同一または類似した部分を示す添付図面を関連させて読んだときに、明白となるであろう。

#### 【0011】

発明の詳細な説明

定義

用語「ガス透過性膜」は、ここでより詳細に説明されるであろうように、ここでは、明細書および特許請求の範囲の目的のために、細胞培養チェンバー内へおよびその外部へのガスの転移を許可し得て、そして（例えば、孔サイズが、細胞培養の汚染に通例遭遇する微生物の通過を除外するために必要なほど十分に小さい）微生物汚染を除外し得て、そして細胞培養の（例えば、pHインジケータを含む組織培養基の色の；並びに顕微鏡により検出し得るような細胞の成長および形態のような培養される細胞の特性の）観察を許容するための光学的透明性および明瞭性を有する液体不浸透性の生体適合物質を意味すべく用いられている。前記ガス透過性膜の厚みは、それに限定されないが、構造的完全性、ガス透過性の度合い、およびガスの転送レートを含む所望される結果特性に依存するであろう。一般に、ガス透過性膜の厚みは、約0.00125インチ未満から約0.005インチまでの範囲とすることができる。好ましい実施形態においては、前記膜の厚みは、約0.002インチから約0.004インチまでの範囲内にあり、そしてより好ましい実施形態においては、0.004インチである。前記ガス透過性膜は、当該技術において知られる1つまたはそれ以上の膜からなっているてもよい。膜は、一般的には、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリオレフィン、エチレンビニールアセテート、ポリプロピレン、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、またはシリコンコーポリマーを含む適切なポリマーからなる。前記ガス透過性膜の組成の選定は、培養されるべき細胞のタイプ（例えば、付着されて生育する（付着依存性）細胞、懸濁浮遊して生育する（付着非依存性）細胞、および付着されまたは懸濁浮遊して生育するであろう細胞）、ガス透過性の程度、ガスの転送のレート、並びに光学的透明性および明瞭性に依存するであろう。より好ましい実施形態においては、前記ガス透過性膜は、培養における付着依存性細胞の付着のための面として役立つであろう前記膜の一方の面上で、付着依存性細胞に対して該処理された膜面の粘着力を改善するためのイオン化により、処理された。前記膜のイオン化は、該処理された膜面をより親水性とし、且つプラズマ放電、コロナ放電、ガスプラズマ放電、イオン衝撃、イオン化放射、および高強度UV光を含む当該技術において知られた方法を用いて実行され得る。付着非依存性細胞の成長を助長するための好ましい実施形態においては、前記ガス透過性膜は、イオン化によって処理されることはない。好ましい実施形態においては、前記ガス透過性膜は、ポリスチレン、またはポリプロピレンからなる1つの膜であり、少なくとも1つの面上で、コロナ処理によって、処理され、そして約0.004インチである。好ましい実施形態において、本発明に従った前記細胞培養装置の少なくとも1つのガス透過性膜は、酸素および二酸化炭素ガスに対して下記のガス透過性特性を有し： $O_2$  に対し1気圧、37℃での透過性性能は、約15 Barriersから約40 Barriersまでの範囲内であり、そしてより好ましくは、約23 Barriersであり；また $CO_2$  に対し1気圧、37℃での透過性性能は、約80 Barriersから約95 Barriersまでの範囲内であり、そしてより好ましくは、約88 Barriersである。

#### 【0012】

用語「光学的透明性および明瞭性」は、ここでは、明細書および特許請求の範囲の目的のために、ガス透過性膜の特性に関し、そして本発明に従った前記細胞培養装置において培養される細胞の観察について、ガス透過性膜が明瞭であり、且つ透明であること、そしてより好ましくは、約250nmから約900nmまでのスペクトル範囲において透明であ

り；励起光が約260nmから約700nmまでの範囲のスペクトルを有するとき励起光のもとでは蛍光が十分でなく；そして従来のプラスチック組織培養フラスコ、または組織培養プレートの拡散イメージと比べてよりシャープな拡散イメージを有していることを意味するために用いられている。最後のものに関しては、消すことのできないブラックインクマーカーは、本発明に従った細胞培養装置の前記ガス透過性膜と組織培養フラスコの硬質プラスチック面との両面で幅が約1mmの線を引くのに使用された。20x対物レンズおよび標準の光顕微鏡を使用して、前記ガス透過性膜上で観察された線は、約1mmのはっきりした線であった。これに対し、前記線の拡散されたイメージは、前記組織培養フラスコ面で観察された；例えば、観察された前記線の幅はほぼ3mmであり、前記主要なラインは、コントラストが失われたダークシャドーによって囲まれていた。その結果、前記組織培養フラスコ面は、本発明に従った前記細胞培養装置の前記膜面について観察されたものよりも少なくとも100%大きい拡散イメージを表示した。 10

### 【0013】

用語「磁気シートアセンブリ」は、ここでは、明細書および特許請求の範囲の目的のために、構造上の順位で、磁気シート、永久接着剤、キャリアシート、および磁気分離の用途において本発明に従った前記細胞培養装置の面への即座の接着およびそれからの除去を可能とするように特に構成される非永久接着剤からなる組み立てられた組み合わせを意味するために用いられている。磁気シートアセンブリは、さらに、前記永久接着剤と対向する面上で前記磁気シートと接触した状態の層からなっているとしてもよく、前記層は、保護コーティング、ラベル、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される物質であってもよい。磁気用の種々の保護コーティングは、それに限定されないが、ポリウレタン、ポリウレタンゴム化合物、ポリエステル、ポリエステルイミド、ポリアミドなどを含むべく当該技術において知られており；そして、さらに、着色料からなってもよい。好ましい磁気シートアセンブリは、2000年11月27出願の米国特許出願番号09/723,008により詳細に説明されており、その開示は、ここに参照として含まれている。簡単に言えば、磁気シートは、下記の特徴：(a) ガウスメーターによって測定されると、約250ガウスから約1500ガウスまでの範囲内にある、より好ましくは、約450ガウスから約1200ガウスまでの範囲内である電界強度を有する表面磁界；(b) アセンブリの一部分として、前記シートが、前記装置から該磁気シートを引張ることにより取り外し可能に接着される前記細胞培養装置から分離されることを可能とさせるために十分な柔軟性； 20 30 (c) 交番極性の磁極で磁化され、その極は、一般に、磁気分離効率を最大化するべく間隔が置かれる複数の並列に間隔が開けられたラインとして配置され（好ましい実施形態においては、1インチにつき7極から9極）、そして、さらに、磁気分離の効率を最大化するためにグリッドパターンを形成するにあたり、複数の並列に間隔が開けられたラインと複数の垂直に間隔が開けられたラインとの組み合わせを形成するように位置決めされる磁極からなってもよく（好ましい実施形態においては、1インチにつき14極から18極）；および(d) 一般に、寸法的に、前記磁気シートアセンブリが取り外し可能に接着される前記面と同一の広がりを持つ特性を有する少なくとも1つの実質的に平坦なシートからなっている。磁気シートは、それに限定されるわけではないが、熱可塑性バインダー内に添加されたバリウムフェライトのような微細な磁性粉末からなるシート、強磁性物質が注入されたプラスチックまたはビニール材料のシート；磁性粉末がその中に混入された構成樹脂材料のシート；一般的には0.7mmまたは0.030インチの厚みのポリマーシートに埋設された磁性粒子；それを通して分散された磁性物質を含むビニール材料；あるいはその意図された目的に適合性のある特性を有する他の適切な材料を含む。好ましい実施形態においては、前記磁気シートは、可撓性に富むバリウムフェライト磁性物質、可撓性に富むストロンチウムフェライト磁性物質、ネオジム、鉄、ボロン結合磁気材料、それらの組み合わせなどからなっている。当業者には明らかなように、前記磁気シートの厚みは、それに限定されるわけではないが、前記磁気シート材料の組成、前記磁気シートが1つまたはそれ以上のシートからなるかどうか、所望とされる磁界強度、および磁極の間隔を含むファクターに依存して変化されるであろう。それに関して、限定ではないが説明の目的の 40 50

ために、前記磁気シートの厚みは、約 0.2 mm から約 5 mm までの範囲であってよい。約 450 ガウスから約 1000 ガウスの適切な商業的に購入可能な可撓性に富むストロンチウムフェライトベースの材料の好ましい厚みは、約 0.03 インチから約 0.06 インチまでの範囲内である。感圧永久接着剤は、前記磁気シートを、前記感圧永久接着剤、前記キャリアシート、および前記感圧非永久接着剤からなる前記感圧接着剤ラミネートに固定して結合されるために供される。従来の感圧永久接着剤は、当該技術において知られ、接着剤製造業者から商業的に購入可能であり、そしてそれに限定されるわけではないが、アクリルベース接着剤、ゴムベース接着剤、および類似したものを含む。前記感圧永久接着剤または前記感圧非永久接着剤の典型的な厚みは、約 0.0003 インチから約 0.003 インチまでの範囲にあり；より好ましくは約 0.0005 インチである。前記感圧永久接着剤および感圧非永久接着剤は、コーティング（例えば、ブラシコーティング、ナイフコーティング、転送コーティング、ロールコーティング、および類似したもの）、分散、スプレーなどのような当該技術において知られたあらゆる従来の方法で、両面感圧接着剤ラミネートを製造するにおいて、前記キャリアシートのそれぞれの独立した面に塗布されてよい。前記感圧非永久接着剤は、（a）磁気分離プロセスが開始されたり、完了されるのに必要な規定された時間の期間（一般に、約 10 分から約 4 時間までの範囲における時間）の間前記細胞培養装置の面に粘着接触した状態に前記磁気シートアセンブリを保持するべく十分な粘着であり；そして（b）前記磁気シートアセンブリが、近接して粘着接触した状態の前記細胞培養装置から持ち上げられるのを許容し得るべく、かすかな粘着性から適度の粘着性であり、前記非永久接着剤は、前記磁気シートアセンブリが取り外されるとき、前記細胞培養装置の面から、明瞭に（前記接着剤によってカバーされる面の 0% から 5% 未満が、取り外し時になんらかの可視接着剤残留物を保有する）、解放する。特に、上記に概説されるような前記意図された目的に適する従来の感圧非永久接着剤は、当該技術において知られており、接着剤製造業者から商業的に購入可能であり、そしてそれに限定されないが、合成または天然ゴムベースの接着剤組成、アクリルベースの接着剤組成、および類似したものでもよい。前記キャリアシートは、感圧接着剤製品とともに使用するのに適切な種々のキャリアシート物質から選択されてもよい。前記キャリアシートシートは、一般に、薄くて、フレキシブルであり（可撓性であり）、そして、前記キャリアシートは、約 0.03 mm から約 0.25 mm までの範囲における厚みを有すること好ましく、また、前記キャリアシートは、約 0.002 インチの厚みを有することがより好ましい。前記キャリアシート物質は、繊維質、非繊維質、またはそれらの組み合わせでもよい。前記キャリアシートは、適切なポリマーフィルム、ファブリック（例えば、ナイロン）、ペーパー、セルロース、および類似したものでもよく；そしてそれに限定されないが、好ましくは、ポリスチレン、アクリルポリマー（例えば、ポリメチルメタクリレート）、ビニールポリマー（例えば、塩化ビニールまたはエステル、可塑化されたビニールポリマー、および類似したもの）、ポリカーボネート、ポリオレフィン、ポリエステル、酢酸セルロースを含むとよい。

#### 【0014】

用語「隔膜」は、ここでは、明細書および特許請求の範囲の目的のために、前記隔膜を適合するように構成されるアクセスポートに挿入されるとき、中央に向けられた圧縮を生ずるような大きさにされるエラストマー物質からなるプレスリットされた隔膜を意味するために用いられ、すなわち、先端が、前記隔膜アクセスポートアセンブリの前記スリットに挿入され、そしてアクセスするとき、前記スリットは、非漏洩シールを維持するように、前記先端とスリットとの間の漏れを防止するべく、前記隔膜にアクセスする先端の外部面の周りを閉じて、そして密閉してそれを噛み合い、；そして前記隔膜が先端によって繰返しアクセスされた後でさえ、前記スリットから前記先端の引抜き後それ自体を再シール（「再シール性」）するべく前記隔膜の能力を向上する。好ましい隔膜は、2000 年 1 月 7 日出願の米国特許出願番号 09/707,588 により詳細に説明されており、その開示は参照としてここに含まれている。前記隔膜は、さらに、着色料、フィラーのような 1 つまたはそれ以上の接着剤からなってもよい。前記エラストマー物質は、天然または

合成でよく、またそれに限定されないが、シリコンゴム、フルオロカーボンゴム、ブチルゴム、ポリクロロプレングム、シリコンエラストマー複合材料、熱可塑性エラストマー、シリコンゴムの医療グレード、ポリイソプレン、合成イソプレンおよびそれらの組み合わせを含む物質でよい。前記エラストマー物質は、約30から約80までの範囲内の Shore Aデュロメーターを有するように選択されてよい。

#### 【0015】

好ましい実施形態においては、前記隔膜は、エラストマー物質および混合されて、そして前記エラストマー隔膜に形成される抗微生物剤からなり、前記抗微生物剤は、前記エラストマー隔膜に組み込まれ、そして前記エラストマー隔膜上に面コーティングを形成し、また前記抗微生物剤は、抗微生物剤の前記面コーティングが潤滑されるとき、前記エラストマー隔膜を通しての移動を示す。適切且つ例示的な広い隔膜抗微生物剤は、それに限定されないが、トリクロサン(2, 4, 4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル)、5-クロロ-2-(2, 4-ジクロロフェノキシ)フェノール、および2-2'-メチレンビス-4-クロロフェノール、3-(トリフルオメチル)-4, 4'-ジクロロカルバニリドまたは塩酸ポリヘキサメチレンビグアニドを含んでもよい。

#### 【0016】

用語「組織培養基」は、ここでは、明細書および特許請求の範囲の目的のために、十分な栄養分(例えば、ビタミン、アミノ酸、必須栄養分、塩、および類似したもの)および生存細胞(または組織中の生存細胞)を維持し且つそれらの成長をサポートするための特性(例えば、容量オスモル濃度、バッファリング)を供するために用いられる溶液を意味するために用いられている。商業的に入手可能な組織培養基は、当業者には既知である。

#### 【0017】

##### 実施例 1

この実施例においては、本発明に従った細胞培養装置の種々の実施形態が説明されている。しかしながら、ここでこの実施例およびそれに続く実施例に説明される本発明に従った細胞培養装置の全ての実施形態において、必須の特徴は、そこに形成される培養チャンバーが、少なくとも1つのガス透過性膜からなることである。さて、図1から図7を参照すると、細胞培養装置12は、フレーム18を備えている。フレーム18は、それによってその意図される目的のために必要とされる構造の完全性を達成する、フレームワーク構造に製作され得る適切な可塑性の、熱可塑性の、合成の、または天然材料を含み得る基本的な生体適合性のある組成からなるであろう。フレーム18の形成および/製造に適する材料の選択において、広い選定の許容範囲が、行使し得ることは当業者にとっては明らかであるはずである。細胞培養装置12、およびフレーム18、の寸法は、それに限定されるわけではないが、そこに形成される培養チャンバーの所望の液体容量、および該培養チャンバーの寸法を含む1つまたはそれ以上のファクターに依存するであろう。好ましい実施形態においては、細胞培養装置12は、顕微鏡のための標準の機械的ステージ試料ホルダーによって、適合され、且つ実質的に適正位置に保持されることを可能とするために、一般的な形状およびサイズである。さらに好ましい実施形態においては、細胞培養装置12(およびフレーム18)は、約10cmから約13.5cmまでの範囲の長さ、約7cmから約9cmまでの範囲の幅、および約0.2cmから約2.0cmまでの範囲の高さ；またより好ましくは、約12.6cmの長さ×約8.4cmの幅×約0.5cmの高さであり、従来の細胞培養デバイスを用いて対応する成長レートまたは対応する細胞密度にて、細胞を培養するために必要とされるよりも少ないインキュベーター空間による細胞の培養を許容させる細胞培養装置を提供する。好ましい実施形態においては、および図1、および図4から図7を参照するにおいては、フレーム18の傾斜した部分は、少なくとも1つのガス透過性膜の平面に対して、角度で(例えば、約25°から約40°までの範囲の度合いで)傾いている。

#### 【0018】

さて図1から図6を参照すると、フレーム18は、本発明の細胞培養装置12を組み立てるときに、そこに対するガス透過性膜31の位置合わせ、接触および固定(非漏洩シーリ

ングによる)を適応させるべき形状とされたハウジングである。フレーム18は、さらにボックスのようなハウジングからなってもよい。さらに細胞培養チェンバー40の壁部を形成する別の表面32が提供されている。表面32は、1つのモールドオペレーションによってフレーム18の部分として形成されるのが好ましいリジッドな面であり、そしてそれに限定されないが、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、または細胞培養適用に適切な他のプラスチックを含む高密度樹脂質材料からなることが好ましい。表面32は、液体不透過性およびガス不透過性である。膜31および32は、機械的手段、化学的手段(それに限定されないが、アクリル系感圧接着剤、ホットメルト接着剤、ゴムセメント、あるいは本発明に付随する目的のために有用な接着剤またはボンディング剤の他のいかなる形態も含む接着剤)または他の適切な手段を含み得る手段を用いて、非漏洩シーリングにてフレーム18に固定されるであろう。最後のものに関し、他の適切は手段は、それにおいて、前記膜がフレームの一体的な部分となる(例えば、押し出し成形)、熱ボンディング、音波ウェルディング、非漏洩シールを形成する加圧嵌合シーリング、およびモールドプロセスのうちの1つまたはそれ以上を含み得る。好ましい実施形態においては、膜31は、本発明に従った細胞培養装置を組み立てのプロセスにおいて、培養チェンバーの形成においてフレームに固定される膜の間に非漏洩シーリングを結果的に生じるような方法で前記フレームを切離すことと、実質的にフレームの切離し部分に膜をボンディング(溶融)することを含む音波ウェルディングプロセスによってフレームに固定される。

10

#### 【0019】

20

この記述から当業者には明らかとなるであろうように、膜31(またはその一部)は、本発明に従った細胞培養装置の培養チェンバーに培養される細胞のさらなる操作を容易にするためにフレーム18から取り外され得る。付着依存性細胞が培養されており、そしてそれに付着依存性細胞が付着される膜31は、該フレームからそれを切離しまたははぎ取ることによって、前記フレームから取り外される。代替的には、膜は、付着依存性細胞のための付着面として役立たない(例えば、表面32は付着面として役立つ)が、前記培養チェンバー40およびそれに含有される細胞にアクセスするためにフレームから切り取られまたははぎ取られる。付着依存性細胞が前記膜に付着される場合、前記膜は、それから、標準染料または着色料、および当業者にとって既知の着色のための方法を用いて直接的に着色される。例えば、前記付着された細胞は、蛍光顕微鏡検査法、位相コントラスト顕微鏡検査法、ノーマースキー(Normarsky)コントラスト顕微鏡検査法、電子走査顕微鏡法、およびそれに関連するイメージング(例えば、写真またはデジタルイメージング)による分析のために着色されるであろう。代替的には、前記付着された細胞は、前記膜31または表面32から(前記付着面として役立つことに依存する)酵素処理(例えば、トリプシン処理)なしに細胞を採取することが望まれる状況においては、前記膜から静かに削り取られるであろう。そのような状況は、トリプシン感応性細胞面分子が、無傷であること;例えば、フロー血球計算分析における、または機能的バイオアッセイ(例えば、細胞毒性アッセイ)におけるような、直接的なさらなる分析が必要とされる場合、前記採取された細胞のさらなる使用または分析を含んでいてもよい。

30

#### 【0020】

40

図1から図7に示されるように、フレーム18は、少なくとも1つの開口部23、そして好ましくは少なくとも2つの開口部、を有する。ここで、既に説明されたように、フレーム18の開口部23は、培養チェンバーに物質を導入し、または物質をそれから引抜き、またはそれから排出されるための器具をその中に案内される通路として役立っているであろう。それゆえ、各開口部23の直径は、培養チェンバーに物質を導入し、または物質をそれから引抜き、またはそれから輩出されるその意図された目的のために必要とされる器具の該当部分(参照目的のためのみであり、以下、器具の「先端」と称する)の進入を許容させるのに充分である。当業者には、明らかであろうように、各開口部23の直径は、意図された目的のために用いられる器具のタイプ、および前記器具の先端のサイズ、に依存するであろう。例えば、前記器具が、シリンジおよび鈍い先端であれば、各開口部23

50

の直径は先端をそこに通過させるのを許容するのに充分とする（例えば、直径で約1 mmから約2 mm）。前記器具の先端は、フレーム18の開口部23を通して案内され、そして培養チェンバー40内に導入される。好ましい実施形態においては、前記フレームは、十分な厚みからなり、そして1つまたはそれ以上の開口部23は、開口部23を通して挿入されたときに、前記器具の先端を、膜31および32によって形成されている培養チェンバー40の壁部のいずれかに接触し且つ孔をあけてしまうことを防止するために十分に制限された直径からなっている。前記少なくとも1つの開口部23は、当該技術において既知の適切な手段；例えば、カップ、プラグ、隔膜、または他の適切な手段；によって再シール可能である。図3から図6および図8を参照すれば、そして1つの好ましい実施形態において、開口部23は、隔膜36で、そしてさらに好ましくは、ここにさらに詳細に既に説明されたように、エラストマー材料および抗微生物剤からなる隔膜36で、実質的に（部分的にまたは完全に）満たされ且つシールされている。 10

#### 【0021】

さて、ガス透過性膜に移り、前記ガス透過性膜は、本発明に従った細胞培養装置における培養チェンバーの壁部を形成する面の約10%から約100%までの範囲における部分を形成する。そのことについては、図1および図8が、培養チェンバー40を形成する壁部の全面からなるガス透過性膜を示している。図5および図6は、培養チェンバー40を形成する壁部の面の約10%および約60%をそれぞれに形成する1つのガス透過性膜を示している。図7は、培養チェンバー40を形成する壁部の面の約50%をとともに形成する複数のガス透過性膜を図示している。本発明に従った細胞培養装置の培養チェンバーにお 20  
ける実質的に付着面のすべてとしてのガス透過性膜の使用において、培養の間に、付着依存性細胞が、（チェンバーの縁部を含む）付着面全体にわたって相対的に均一に成長しがりであることが観察される。付着面全体にわたっての細胞付着および成長における顕著な多様性の不在は、本発明の1つの実施形態に従った細胞培養装置によって提供されるような培養チェンバーにおけるガス透過性膜の長さおよび幅を横切るガス（例えば、酸素および二酸化炭素）交換における多様性の相対的な不在に起因すると信じられている。したがって、本発明に従った細胞培養装置において、前記ガス透過性膜は、より高い、付着依存性細胞成長の密度、およびそのための空間効率に役立つ付着面を提供する。このことは、個々の付着面上における不均一ガス交換を示すために報告された従来の細胞培養容器；お 30  
よび、それゆえ、ガス交換の勾配に対するそれらの空間関係に依存して成長させるための細胞の能力における多様性に対して有利である。

#### 【0022】

ここに含まれる記述から当業者には明であろうように、膜31と表面32との間の距離は、フレーム18のサイズ（例えば、高さ）に依存する。培養チェンバー40の形状またはサイズのいずれかにおける一般的な相対制限は存在しないけれども、細胞の高密度を達成する培養のために好ましい実施形態においては、膜31と表面32との間の平均距離は、約0.05インチから約0.5インチまでの範囲内にある。より好ましい実施形態においては、膜31と表面32との間の平均距離は、約0.07インチから約0.08インチまでの範囲内の距離である。好ましい実施形態においては、付着依存性細胞は、それに前記付着依存性細胞が付着され、そして均一のガス交換を提供する面である面として膜31を 40  
有する細胞培養装置において培養される。膜31および表面32の両方を同時的に付着依存性細胞の付着のための面として役立たせることを許容させるために、本発明に従った細胞培養装置を回転することによって、空間効率、多用途性、および比較的短い時間の期間内における高い細胞密度を達成して高レートの細胞成長を助長し得る条件が提供される。例えば、付着依存性細胞が、細胞培養装置内に導入され、そして導入された細胞は、重力、およびガス透過性膜31に対する細胞の付着、によって定着するのを許容させるために、十分な時間（細胞タイプに依存する）保温される。前記細胞培養装置は、それから、培養において、膜31から懸垂されて、転移された細胞が生育されるように、180°回転されるであろう。付加的な細胞は、それから、表面32に因子が供給される。好ましくは、膜31は、光学的に透明性および明瞭性である；例えば、細胞培養の間における、一般 50

的に観察される培養基のpHインジケータの色の、および細胞特性（例えば、顕微鏡検査によるように細胞の成長および形態）の、変化の観察を容易にする。

#### 【0023】

付加的な実施形態においては、バイオリアクターは、複数の細胞培養装置の培養チェンバーを接続する液体通路を提供することによって適切に作用するようにリンクされた本発明に従った複数の細胞培養装置を備える。そのようなバイオリアクター環境における細胞の培養を容易にするために、前記複数の細胞培養装置の各々は当該通路を通り且つ相互接続された細胞培養装置の培養チェンバーの間の組織培養基の流れを可能とする接続通路によって他の細胞培養装置に相互接続されてもよい。バイオリアクターを形成するための第1の細胞培養装置の大にの細胞培養装置への相互接続の1例は、2つのシリンジ針の間に介挿される1ピースの滅菌したチュービングの使用による。1つの針が、再シール可能な開口部23に挿入され、フレームを通して、そして第1の細胞培養装置の培養チェンバー内に至り；そして第2の針が、再シール可能な開口部23に挿入され、フレームを通して、そして第2の細胞培養装置の培養チェンバー内に至る。1ピースのチュービングは、そこで、前記第1の針に適切に作用するように接続された1つの開口端を有し、そして該チュービングの逆側の開口端は、適切に作用するように前記第2の針に接続されているであろう。2つの針の間に配置され且つ適切に作用するようにそれらに接続されたチュービングは、前記第1の細胞培養装置の前記培養チェンバーと前記第2の細胞培養装置の前記培養チェンバーとの間に液体通路を提供する。同様な方法論および複数のチュービングを用いて、複数の前記細胞培養装置が適切に作用するように接続されて、バイオリアクターを形成する。

10

20

#### 【0024】

##### 実施例2

この実施例においては、細胞が個別の細胞であるか（組織のような構造を形成することとは独立に生育される細胞；実例となる実施例は細胞ラインである）、または組織を形成する細胞であるか（一般的には、構成されたまたは組織化された組織を形成するのにそれらの組織間物質を有する細胞のメッシュまたはネットワークである）、あるいはそれらの組み合わせであるのかの、細胞を培養するための本発明に従った細胞培養装置を用いる種々の実施形態が説明されている。細胞培養装置において培養され得る個別の細胞は、それに限定されるわけではないが、動物細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、人間細胞、トランスジェニック細胞、異電子工学による細胞、形質転換された細胞、細胞ライン、付着依存性細胞、および付着非依存性細胞、を含む1つまたはそれ以上の細胞タイプを有することは当業者には明らかであろう。培養において細胞により形成された組織も、本発明に従った細胞培養装置において培養され得ることも当業者には明らかであろう。本発明の細胞培養装置は、一般に、培養される特定のタイプの細胞にも、該培養基が、さ言棒背言超を維持させ且つサポートするために十分な栄養分および特性（例えば、浸透圧）を提供する限り、細胞成長を維持させることの可能な組織培養基にも限定されないことは当業者にはさらに明らかであろう。さらに、細胞を培養するために使用する前に、滅菌された細胞培養装置は技術において従来の方法を用いることは当業者には明らかであろう。好ましい実施形態においては、前記細胞培養装置は、ガンマ放射線への露呈によって滅菌される。

30

40

#### 【0025】

1つの実施形態においては、本発明に従った細胞培養装置において付着依存性細胞が培養される。付着依存性細胞を成長するために、膜31あるいは表面32のいずれか、または両方は、培養されることを所望する細胞の粘着力を促進するために十分な親水性を備える内側面（前記培養チェンバーの内側面を形成する）を有し；そしてそれゆえ、細胞がそれに付着し且つ成長し得る面として作用し得る。たとえば、前記少なくとも1つの膜は、そのような粘着力を促進する固有の化学的特性を有していてもよく、あるいは内側面がそのような粘着力を促進するように（例えば、電氣的に、イオンの、または化学的に）処理されていてよい。そのような処理が、前記内側面の化学的エッチング、前記内側面のイオン化、または適切なコーティング反応物による前記内側面のコーティング、のうちの1

50

つまたはそれ以上を含んでいてもよいことは、当業者には明らかとなるであろう。適切なコーティング反応物は、ゼラチン、コラーゲン、フィブロンネクチン、粘着プロテイン（粘着たんぱく質）、粘着ペプチド（例えば、PCT国際出願第PCT/US95/00817号参照）を含めて、当業者には知られている。

#### 【0026】

本発明に従った細胞培養装置12を用いて細胞を培養する方法は、細胞の成長をサポートすべく、適切な量の組織培養基内に懸濁液を形成させるように、培養されるべき細胞（例えば、付着依存性細胞または付着非依存性細胞）を懸濁させることと；前記細胞培養装置12内に前記懸濁液を注入するための適切な器具（例えば、シリンジと鈍い先端との組み合わせ）内に前記懸濁液を導入することと；滅菌（無菌）技術を用い、そして再シール可能な開口部36（隔膜と開口部との組み合わせ）を通し、そして前記細胞培養装置12の前記細胞培養チェンバー40内に、前記器具の一部（例えば、針の先端）を挿入することと；前記器具から（例えば、シリンジのチェンバーからそして前記先端を通して）そして前記細胞培養チェンバー内に前記懸濁液を放出することと；前記細胞培養装置から前記先端を引き抜くことと；、培養基と細胞との前記懸濁液を収容する（例えば、適切な温度およびCO<sub>2</sub>濃度を含む当該技術において知られているように細胞の成長に十分な細胞培養インキュベーターまたは条件にて）、前記細胞培養装置を保温することとを有している。細胞培養装置12の培養チェンバー40内に導入されるであろう物質は、組織培養基単独、細胞を含む組織培養基、生理学的なバッファー内に懸濁された細胞、および薬剤またはシトキンまたは成長因子または酵素（例えば、トリプシンの溶液）またはそこで培養される細胞を処理するための他の生物学上の反応物、のうちの1つまたはそれ以上を含むであろうことは、当業者には明らかであろう。

#### 【0027】

好ましい実施形態においては、そして細胞の高い成長レートが好ましい応用のために、本発明にしたがった細胞培養装置12において細胞を培養する方法において、細胞培養チェンバー40は、成長させることが所望される細胞または組織を培養するための組織培養基または他の適切な成長媒体によって完全に充填される。当業者には、培養チェンバー手段を培養チェンバー内に上部空間（例えば、エアバブル）を実質的に残さないほど完全に充填することは明らかであろう。培養基とガス相（気相）との間の溶解されたCO<sub>2</sub>の分布に主として起因する従来の細胞培養容器における最初の1ないし2時間以内の組織培養基のpHにおける初期上昇を急峻化し得ることが注目される。このpH変化は、細胞が顕著な量のCO<sub>2</sub>を生成することが可能となるよりも十分に以前の、インキュベーションの主として最初の1時間以内に生じる。結果的なpH変化は、細胞が、細胞呼吸を通してCO<sub>2</sub>を提供することにより、最適なCO<sub>2</sub>レベルを回復させるのに十分な数になるまで、細胞成長のレートに否定的に作用する。しかしながら、前記従来の細胞培養容器とは異なり、本発明に従った細胞培養装置12は、実質的な上部空間が生じないような方法で充填され得る。本発明の細胞培養装置12は、1つまたはそれ以上のガス透過性膜31の使用および配置によって呈示される拡大されたガス交換に起因すると信じられているガス平衡のための予想外の容量を提供する。本発明に従った細胞培養装置12のこれらの特徴は、協力して、従来の細胞培養容器において観察されたような、初期pHにおける急峻な変化を防止する。培養基のpHにおけるそのような急峻な変化を防止することによって、初期培養条件は、最適な細胞成長に一層助けとなるpH平衡を達成する。それゆえ、本発明に従った細胞培養装置12とは逆に、従来の細胞培養容器の欠点は、前記従来の細胞培養容器が、前記容器の上部と前記組織培養培養基の表面との間の上部空間を必要とすることである。加えて、本発明に従った細胞培養装置12における細胞を培養する方法においては、前記培養チェンバー40が、実質的な上部空間がないような方法で充填され、前記細胞培養装置は、検出可能な泡沫形成または細胞外傷を生じることなく、そこに収容された前記培養基と細胞を混合させるべく傾斜されまたは静かに振動される。特に、前記少なくともガス透過性膜31は、前記膜が太鼓の皮のようにピンと張られて前記フレームに固定され、そしてそれによって、前記充填された培養チェンバーにおいて混合することを容易にす

る。

#### 【0028】

本発明に従った細胞培養装置12を用いる細胞の培養方法の付加的な実施形態においては、該方法は、細胞の成長をサポートすべく、適切な量の組織培養基内に、懸濁液を形成して、培養されるべき付着依存性細胞を懸濁させることと；前記細胞培養装置12内に1つまたはそれ以上の再シール可能な開口部23を介して前記懸濁液を注入するために適切な器具内に前記懸濁液を導入することと；滅菌（無菌）手法を用い、且つ1つまたはそれ以上の再シール可能な開口部23を通し、そして前記細胞培養装置12の前記細胞培養チェンバー40内に、前記器具の先端を挿入することと；前記器具の前記先端を通し、そして前記細胞培養チェンバー40内に前記懸濁液を放出することと；前記細胞培養装置12から前記器具の前記先端を引き抜くことと；培養基と細胞との前記懸濁液を収容する前記細胞培養装置を、重力、並びに付着面として提供される膜に対して接触および付着により細胞が定着することを可能とするのに十分な時間（例えば、細胞タイプに依存して、30分から3時間）保温することとを有する。前記方法は、その後前記細胞培養装置を180°回転させることと、細胞が、培養チェンバー内において転移された態様で保温されるように、前記細胞培養装置をインキュベーター内に位置させることとをさらに有していてもよい；すなわち、前記細胞は、その上に細胞培養装置が載置されるインキュベーターシェルフに対して前記培養チェンバーの上側壁部として供する幕に付着される。それゆえ、この実施形態においては、細胞は前記培養チェンバー内に垂下され、そして上側膜の表面に沿って懸垂された状態で成長する。これは、細胞くずを重力により、懸垂された培養から下側の表面へ落下させ、そこでは、そのような分離された細胞くずが、吸引およびまたは洗浄ステップによって、容易に前記培養チェンバーから除去されるであろう。

#### 【0029】

##### 実施例3

前記細胞培養装置は、磁気分離アプリケーションのために使用してもよい。この実施例においては、細胞培養装置が、そこに脱離可能に固定された磁気シートをさらに備える種々の実施形態が説明されている。一つの実施形態においては、そして図8を参照すれば、磁気シートアセンブリ51は、該磁気シートが、前記細胞培養装置の前記少なくとも1つのガス透過性膜31の表面の実質的に全て（全てまたは培養チェンバー40の壁部を形成する部分）に粘着接触するような位置に配置されるように、対向して、細胞培養装置12上に延在され且つそれに離脱可能に固定される。前記磁気シートアセンブリ51は、培養チェンバー40内に配置される磁性粒子が、前記脱離可能に固定される磁気シートアセンブリ51の磁界強度によって吸引され、そして適正な位置（膜31の内面からなる培養チェンバー40の内壁に沿って）に保持されるような方法で、細胞培養装置12に脱離可能に固定されるであろう。好ましい実施形態において、磁気シートアセンブリ51は、それに粘着接触して配置される前記表面32とおおむね共通の寸法の形状を有している。磁気シートアセンブリ51が脱離可能に固定された細胞培養装置12を用いる磁気分離の方法において、そしてここに従前の実施例にて説明された方法を用いて、培養チェンバー内に導入されるのは；（a）対象細胞の集団（例えば、細胞タイプの混交集団を含む液体から隔離されることが所望される細胞タイプ）をその中に有する細胞の混交集団を含む液体；および（b）リガンドによってコーティングされた磁性粒子を有する磁気分離反応物であり、前記リガンドは、分離されることが所望される細胞についてのおよび磁気分離を達成するために十分な結合特異性および親和性を有する。磁気分離反応物と対象細胞の間の接触および結合の相互作用が生じるために十分な時間について内容を混合した後、前記時期分離反応物は、前記リガンドコーティングを介して、合生物を形成して流体内に存在する対象細胞と接触し且つ結合する。細胞混交集団を含む流体、および磁気分離反応物は、まず混合され、そしてそれから該混合物が前記磁気分離を実行するために前記細胞培養装置に導入されることは当業者にとって明らかであろう。いずれの実施形態においても、形成された合成物が、（磁気吸引力によって）引きつけられ、そして、そこに前記磁気シートが脱離可能に固定されている細胞培養装置12の平面に沿って、膜の内面を含む培養チェン

パー４０の壁部に接触する。合成物が膜３１に沿う適正位置に保持されるのを十分な時間について許容した後は、前記流体は、細胞培養装置から除去される。ネガティブ選択の方法においては、特定の細胞集団が潤滑されているので前記除去された流体が利用される。ポジティブ選択のプロセスにおいては、分離されることが所望されている細胞タイプが、磁気吸引力により且つ培養チェンバー内における合成物として適性位置に保持されるので、除去された流体は、前記混交細胞集団の実質的に全ての（不要な）残余を含んでいる。このポジティブ選択プロセスにおいては、培養チェンバー４０は、前記対象細胞が、磁気吸引力を介して、磁気分離反応物との合成物の一部として結合される場合、結合されずに残った細胞をも除去するために、溶液（例えば、組織培養基または生理的な溶液）によって洗浄されるであろう。ポジティブに選択された細胞を培養することが所望される一つの実施形態においては、当該細胞タイプに関する適切な量およびタイプの組織培養基が、そこで培養チェンバー４０内に導入されて；それから磁気シートアセンブリ５１が、前記細胞培養装置１２から（例えば、図８に図示されるように、引き出しまたは引きはがし動作によって）除去され、それによって細胞培養チェンバー４０内で適正位置に前記合成物を保持する磁力を取り除き、且つそれによって該合成物を前記培養基内に解放して；そしてそれから前記細胞培養装置１２が、細胞培養インキュベーター内に配置され且つ保温される。

#### 【００３０】

##### 実施例４

本発明に従った細胞培養装置１２は、組み換えＤＮＡ分子が培養される細胞に導入されたアプリケーションにも用いられてよい。この実施例においては、細胞培養装置１２の培養チェンバー４０内に収容された培養される細胞にベクターが接触するように（培養される細胞内への導入のために）有効な量のベクターが細胞培養装置１２内に導入されることによってベクターが細胞内に導入された細胞培養装置１２の使用が説明されている。細胞培養装置１２内に物質を導入するための方法が、この中で実施例２において説明されたように、ベクターを細胞培養装置１２内に導入するためにも用いられてよい。当業者には明らかであろうように、前記ベクターは、プラスミドベクター、ウィルス性ベクター、エキスプレッションベクター、またはそれらの組合せを含んでもよい。当業者には明らかであろうように、前記ベクターは、ベクターを含む細胞によって表現されるべく所望のＤＮＡ分子に、影響を及ぼすように（例えば、プロモーターに）リンクされたベクターを備える組み換えＤＮＡ分子を含んでもよい。分子生物学の技術における熟達者には知られているように、動物細胞（そしてより好ましくは、哺乳類細胞）または植物細胞は、細胞における遺伝子生成への所望の遺伝子の表現を助長するエキスプレッションベクターのような組み換えＤＮＡ分子がその中に導入されることが望まれる一般的な細胞である。

#### 【００３１】

例えば、細胞培養装置１２内に収容された培養された細胞は、細胞内に導入されることが所望される一定量の組み換えＤＮＡ分子、およびトランスフェクション反応物を含む混合物と共に保温されてもよい。前記ＤＮＡ分子は、トランスフェクション反応物と混合され、そして組織培養基、トランスフェクション反応物およびベクターを含む混合物は、前記開口部２３を通して導入され且つ培養された細胞が粘着支持物に接触するように、培養チェンバー４０内に放出される。細胞培養装置１２は、それから、培養された細胞と（組織培養基とトランスフェクション反応物とベクターとからなる）混合物との間の接触が、ベクターの培養された細胞による摂取および該細胞内への導入を促進するために５％ＣＯ<sub>2</sub>内で一晩中３７°に保温される。前記組織培養基は、それから細胞培養装置１２から取り出され、そして新鮮な組織培養基と置き換えられる。それから、トランスフェクション効率は、技術において知られている従来の方法を用いてまたは使用されるベクターによって可能とされるように、決定される。当業者においては明らかであろうように、前記トランスフェクション効率は、それに限定されるわけではないが、その中にベクターを導入することが所望される細胞のタイプ、トランスフェクションのための条件の最適化（例えば、細胞数当たりのＤＮＡの量、トランスフェクションのために使用された培養基、トランス

フェクションプロセスの時間)、並びに使用されたトランスフェクション反応物のタイプおよび量、を含むファクターに依存して増大するであろう。また、同様のステップを用いてベクターも本発明に従った細胞培養装置 1 2 内で培養される付着依存性細胞内に導入されてもよいことは当業者には明らかであろう。

#### 【0032】

本発明の特定の実施形態の先の記述は、説明のために詳細に記述されている。記述およびイラストレーションを考慮すれば、当該技術における他の熟達者は、最新の知識、を適用することによって、種々のアプリケーションのために、基本的なコンセプトから逸脱することなく本発明を容易に変更しおよび／または適合させることができ、そしてそれゆえ、そのような変更および／または適合は添付された特許請求の範囲の意味および視野の範囲内にあることが意図されている。

10

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

本発明における細胞培養装置の一つの実施形態の平面図である。

##### 【図 2】

図 1 に示された細胞培養装置の線 2-2 についての断面図である。

##### 【図 3】

本発明における細胞培養装置の一つの実施形態の側面図である。

##### 【図 4】

サンプルが導入されるかまたは培養チェンバーから取り出される一つの実施形態を示す細胞培養装置の斜視図である。

20

##### 【図 5】

本発明における細胞培養装置のその他の実施形態の斜視図である。

##### 【図 6】

本発明における細胞培養装置のその他の実施形態の平面図である。

##### 【図 7】

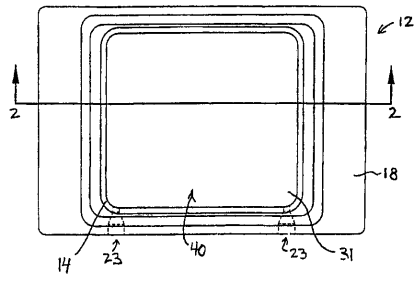
本発明における細胞培養装置のその他の実施形態の平面図である。

##### 【図 8】

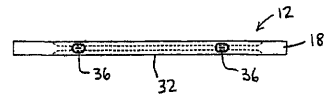
細胞培養装置に粘着接触で脱着可能に固定される磁気シートアセンブリの除去を示す細胞培養装置の斜視図である。

30

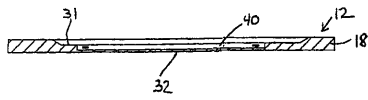
【図 1】



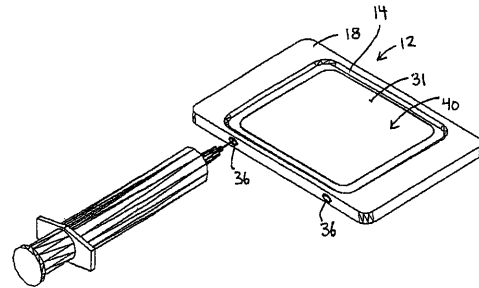
【図 3】



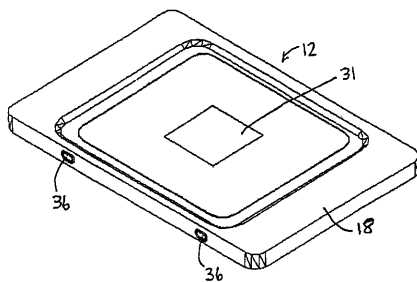
【図 2】



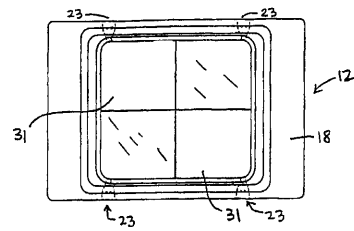
【図 4】



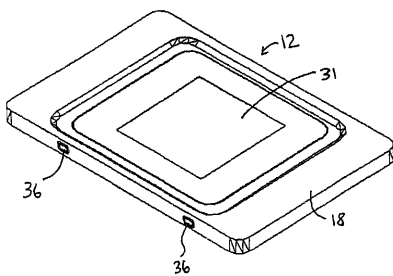
【図 5】



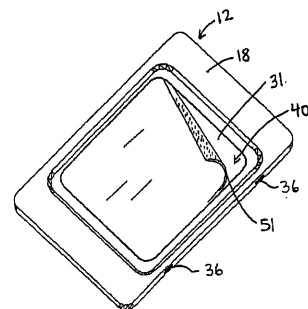
【図 7】



【図 6】



【図 8】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

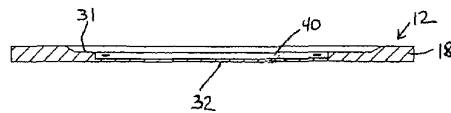
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/42419 A2**

- (51) International Patent Classification: C12N (74) Agent: CASEY, Sean, M., Sean M. Casey Co., L.P.A., P.O. Box 710, New Albany, OH 43054-0710 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/43718
- (22) International Filing Date: 21 November 2001 (21.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/723,008 27 November 2000 (27.11.2000) US  
09/724,153 28 November 2000 (28.11.2000) US  
09/975,889 11 October 2001 (11.10.2001) US  
09/717,651 21 November 2001 (21.11.2001) US
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOCRYSTAL, LTD. [US/US]; 575 McCorkle Boulevard, Westerville, OH 44114-2518 (US).
- (72) Inventors; and  
(73) Inventors/Applicants (for US only): BARBERA-GUILLEM, Emilio [—/US]; 1555 Picardie Court, Powell, OH 44164 (US). NELSON, M. Bad [—/US]; 575 McCorkle Boulevard, Westerville, OH 44114-2518 (US).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CELL CULTURE APPARATUS AND METHODS OF USE



(57) Abstract: Provided is a cell culture apparatus (12) for culturing cells, and optionally, for performing magnetic separation of cells desired to be cultured. The cell culture apparatus (12) preferably comprises a frame (18), at least one gas permeable membrane (31) securely sealed in

a leak-proof sealing to a frame (18) and an opposing surface (32) comprising a rigid surface in forming a culture chamber (40) therebetween; and at least one resealable aperture (23) to allow substances to be introduced into, or withdrawn from, the culture chamber (40).

WO 02/42419 A2

WO 02/42419

PCT/US01/43718

**CELL CULTURE APPARATUS AND METHODS OF USE**

5

This is an international patent application filed under the Patent Cooperation Treaty in  
10 the United States Receiving Office that claims priority to U.S. Patent Appl. No. 09/975,889,  
filed 11 OCT 01; U.S. Patent Appl. No. 09/724,153, filed 28 NOV 00; U.S. Patent Appl. No.  
09/723,008, filed 27 NOV 00; and U.S. Patent Appl. No. 09/717,651, filed 21 NOV 00.

**Field Of The Invention**

15 The present invention generally relates to an apparatus and methods for growing cells  
or tissue culture *in vitro*. More particularly, the present invention relates to a cell culture  
apparatus containing at least one gas permeable membrane which allows rapid and uniform  
transfer of gases between the environment of cells contained in the cell culture container  
apparatus and the atmosphere of the incubator in which the cell culture apparatus is  
20 incubated.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

In eukaryotic cell culture systems, the culture of the cells is generally under  
conditions of controlled pH, temperature, humidity, osmolarity, ion concentrations, and  
25 exchange of gases. Regarding the latter, oxygen and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) are of particular  
importance to the culturing of cells. In a typical eukaryotic cell culture system, an incubator  
is provided in which CO<sub>2</sub> is infused to maintain an atmosphere of about 5% CO<sub>2</sub> within the

WO 02/42419

PCT/US01/43718

incubator. The CO<sub>2</sub> interacts with the tissue culture medium, particularly its buffering system, in maintaining the pH near physiologic levels. Conventional cell culture containers comprise tissue culture flasks, tissue culture bottles, and tissue culture plates. Entry of CO<sub>2</sub> from the incubator atmosphere into a tissue culture plate generally involves a loosely fitting  
5 cover which overhangs the plate in excluding particulate contaminants from entering the plate chamber(s), but allows gas exchange between the incubator atmosphere and the atmosphere within the tissue culture plates. Similarly, for a tissue culture flasks or bottle, a loosely fitting cap excludes particulate contaminants from entering the chamber of the flask or bottle, but allows gas exchange between the incubator atmosphere and the atmosphere within the flask  
10 or bottle. More recently, a cap is provided with a gas permeable membrane or filter, thereby allowing for gas exchange with a tightly fitting cap.

In addition to CO<sub>2</sub>, the culturing of cells is dependent upon the ability to supply to the cells a sufficient amount of oxygen necessary for cell respiration and metabolic function. The supply of oxygen for cell respiration in conventional cell culture containers is in the  
15 header space of the container, e.g., the void space in the container that is above the surface of the tissue culture medium. Efforts to increase oxygen concentration to the cultured cells includes mechanical stirring, medium perfusion or aeration, increasing the partial pressure of oxygen, and/or increasing the atmospheric pressure. Thus, in conventional cell culture containers the volume or surface provided for gas exchange, as relative to the volume or  
20 surfaces of the whole container, is either inefficiently used and/or results in limiting the rate of gas exchange or in the equilibration of gases. This is even more noticeable in small-scale cultures (15 ml or less) in which rate of cell growth, cell densities, and total cell numbers, are frequently low due to space, surface area, and gas exchange limitations.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

The rate of gas exchange across gas permeable membranes has been described as “improved”. However, gas permeable membranes have been described as undesirable for use in a cell culture system for various reasons. For example, in U.S. Patent No. 5,523,228, it is taught that a boundary layer of oxygen toxicity forms at the interface between the gas permeable membrane and the tissue culture medium; and further, cells entering into the toxic boundary layer can be irreparably damaged. Further, in U.S. Patent No. 5,707,869 it is taught that the chemistry of the surface of gas permeable, liquid impermeable materials is incompatible with many cell types; and additionally, due to their propensity to cause non-specific protein binding, such materials can lead to depletion of soluble growth factors.

Thus, there is a need for a cell culture apparatus that can provide an increased surface area for gas exchange as compared to conventional cell culture containers; and which also provides a high rate of cell growth in achieving a high cell density in a relatively short period of time, and with an even distribution of anchorage dependent cells along the attachment surface.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a cell culture apparatus comprising a frame; at least one membrane which is gas permeable, and wherein the at least one membrane is securedly sealed to (in a leak-proof sealing with) the frame, in forming a culture chamber; and at least one resealable aperture through the frame which allows substances to be introduced into, or withdrawn from, the culture chamber.

In one preferred embodiment, the cell culture apparatus comprises a frame over which is extended and securedly sealed thereto a gas permeable membrane, and which contains an additional surface comprising a solid plastic surface in forming a culture chamber

WO 02/42419

PCT/US01/43718

therebetween. The frame is sufficiently rigid to provide a housing for assembling the cell culture apparatus of the present invention. The membrane is of suitable thickness to provide sufficient gas permeability to accommodate cell growth in the chamber, and to provide sufficient structural integrity for handling the apparatus. Further, the membrane is of a

5 sufficient optical transparency and clarity so as to observe the cell culture (e.g., the color of the tissue culture medium; and cellular characteristics such as growth and morphology of cells, as observable by microscopy). The frame has at least one resealable aperture, and preferably at least two resealable apertures, which allows substances to be introduced into, or withdrawn from, the culture chamber. Each aperture comprises an opening through the frame

10 which may serve as a passageway into which is guided a portion of an instrument (e.g., needle or pipette or pipette tip) for introducing a substance into or withdrawing a substance from the culture chamber. In a preferred embodiment, the frame is of sufficient thickness and the apertures are of a sufficient limiting diameter to prevent the instrument portion, when inserted through a resealable aperture of the frame, from puncturing either of the walls

15 formed by the membranes of the culture chamber.

The cell culture apparatus provides an unexpected combination of properties including gas exchange and equilibrium, oxygenation of cells cultured in the apparatus, optical transparency and clarity for observing cell culture and cell characteristics during culture, an attachment surface and conditions which promote even distribution of anchorage

20 dependent cells, spatial efficiency, versatility, and conditions which can promote a high rate of cell growth in achieving a high cell density in a relatively short period of time as compared to conventional cell culture devices.

The above and other objects, features, and advantages of the present invention will be apparent in the following Detailed Description of the Invention when read in conjunction

WO 02/42419

PCT/US01/43718

with the accompanying drawings in which reference numerals denote the same parts throughout the several illustrated views and embodiments.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- 5 FIG. 1 is a top plan view of an embodiment of a cell culture apparatus according to the present invention.;
- FIG. 2 is a cross-sectional view taken along line 2-2 of the cell culture apparatus illustrated in FIG. 1;
- FIG. 3 is a side view of an embodiment of the cell culture apparatus according to the present invention;
- 10 FIG. 4 is a perspective view of a cell culture apparatus showing an embodiment wherein a sample is introduced or withdrawn from the culture chamber;
- FIG. 5 is a perspective view of another embodiment of the cell culture apparatus according to the present invention;
- 15 FIG. 6 is a top view of another embodiment of the cell culture apparatus according to the present invention; and
- FIG. 7 is a top view of another embodiment of the cell culture apparatus according to the present invention.
- FIG. 8 is a perspective view of a cell culture apparatus showing removal of a magnetic sheet assembly which is detachably secured in adhesive contact to the cell culture apparatus.
- 20

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

##### Definitions:

WO 02/42419

PCT/US01/43718

The term "gas permeable membrane" is used herein, for the purposes of the specification and claims, to mean a biocompatible material which is liquid impermeable, which is capable of allowing transfer of gases into and out of the cell culture chamber, and which is capable of excluding microbial contamination (e.g., pore size is sufficiently small  
5 enough to exclude passage of microbes commonly encountered in contamination of cell cultures), and which is optically transparent and clear for permitting observation of the cell culture (e.g., of the color of the tissue culture medium which contains a pH indicator; and of cultured cell characteristics such as growth and morphology of the cells as detectable by light microscopy), as will be described in more detail herein. Thickness of the gas permeable  
10 membrane will depend on the desired resultant characteristics which may include, but are not limited to, structural integrity, degree of gas permeability, and rate of transfer of gases. In general, the thickness of a gas permeable membrane can range from less than about 0.00125 inches to about 0.005 inches. In a preferred embodiment, the thickness of the membrane is in the range of about 0.002 inches to about 0.004 inches, and in a more preferred embodiment,  
15 0.004 inches. The gas permeable membrane may be comprised of one or more membranes known in the art. Membranes typically comprise suitable polymers that may include polystyrene, polyethylene, polycarbonate, polyolefin, ethylene vinyl acetate, polypropylene, polysulfone, poly-tetrafluoroethylene, or a silicone copolymer. The choice of the composition of the gas permeable membrane will depend on the type of cell to be cultured  
20 (e.g., cells which grow attached (anchorage-dependent), cells which grow in suspension (anchorage-independent), cells that may grow as attached or in suspension), degree of gas permeability, rate of transfer of gases, and optical transparency and clarity. In a more preferred embodiment, the gas permeable membrane has been treated, on a side of the membrane which may serve as a surface for attachment of anchorage-dependent cells in

WO 02/42419

PCT/US01/43718

culture, by ionization to improve adhesion of the treated membrane surface to anchorage-dependent cells. Ionization of the membrane may render the treated membrane surface more hydrophilic, and can be performed using methods known in the art which include plasma discharge, corona discharge, gas plasma discharge, ion bombardment, ionizing radiation, and high intensity UV light. In a preferred embodiment for promoting growth of anchorage-independent cells, the gas permeable membrane is not treated by ionization. In a preferred embodiment, the gas permeable membrane is a single membrane comprised of polystyrene or polypropylene, is treated on at least one side by corona treatment, and is about 0.004 inches thick. In a preferred embodiment, the at least one gas permeable membrane of the cell culture apparatus according to the present invention has the following gas permeability characteristics with respect to oxygen and carbon dioxide gases: permeability performance at 1 atmosphere and at 37°C for O<sub>2</sub> is in the range of from about 15 to about 40 Barrers, and more preferably about 23 Barrers; and permeability performance at 1 atmosphere and at 37°C for CO<sub>2</sub> is in the range of from about 80 to about 95 Barrers, and more preferably about 88 Barrers.

The term "optically transparent and clear" is used herein, and in relation to characteristics of a gas permeable membrane and for observation of cells cultured in the cell culture apparatus according to the present invention, for the purposes of the specification and claims, to mean that a gas permeable membrane is clear and transparent, and more preferably: is transparent in the spectrum range of from about 250 nm to about 900 nm; lacks fluorescence under excitation light when the excitation light has a spectrum in the range of from about 260 nm to about 700 nm; and has a sharper diffraction image as compared to the diffraction image of a conventional, plastic tissue culture flask or tissue culture plate. Regarding the latter, an indelible black ink marker was used to draw a line of about 1 mm in

WO 02/42419

PCT/US01/43718

width on both the gas permeable membrane of a cell culture apparatus according to the present invention, and the hard plastic surface of a tissue culture flask. Using a 20x objective and a standard light microscope, the line observed on the gas permeable membrane remained a well-defined line of about 1 mm. In contrast, a diffused image of the line was observed on

5 the tissue culture flask surface; i.e., the width of the line observed was approximately 3 mm, with the main line being surrounded by dark shadows in which contrast was lost. Thus, the tissue culture flask surface demonstrated a diffraction image that is at least 100% greater than that observed for the membrane surface of the cell culture apparatus according to the present invention.

10 The term "magnetic sheet assembly" is used herein, for purposes of the specification and claims, to mean an assembled combination comprising, in structural order, a magnetic sheet, a permanent adhesive, a carrier sheet, and a non-permanent adhesive which together is particularly adapted to permit ready adhesion to and removal from a surface of the cell culture apparatus according to the present invention in an application for magnetic separation.

15 The magnetic sheet assembly may further comprise a layer in contact with the magnetic sheet on a side opposite to the permanent adhesive, wherein the layer may be a material selected from the group consisting of a protective coating, a label, and a combination thereof. Various protective coatings for magnets are known in the art to include, but are not limited to, polyurethane, a polyurethane rubber compound, polyester, polyester-imide, polyamide, and

20 the like; and may further comprise a colorant. A preferred magnetic sheet assembly is described in more detail in United States patent application No. 09/723,008, filed 27 NOV 00, the disclosure of which is herein incorporated by reference. Briefly, a magnetic sheet comprises at least one substantially flat magnetic sheet having the following characteristics:

WO 02/42419

PCT/US01/43718

(a) a surface magnetic field having a field strength, as measured by a gaussmeter, in a range of from about 250 to about 1500 gauss, and more preferably in a range of from about 450 to about 1200 gauss; (b) sufficient flexibility to permit the magnetic sheet, as part of an assembly, to be separated from the cell culture apparatus to which it is removably adhered by  
5 pulling the magnetic sheet apart from the apparatus; (c) is magnetized with magnetic poles of alternating polarities, which poles being generally arranged as a plurality of parallel, spaced apart lines that are spaced to maximize efficiency of magnetic separation (in a preferred embodiment, 7 to 9 poles per inch), and may further comprise magnetic poles which are positioned to form a combination of a plurality of parallel spaced apart lines and a plurality of  
10 perpendicular spaced apart lines in forming a grid pattern for maximizing efficiency of magnetic separation (in a preferred embodiment, 14 to 18 poles per inch); and (d) is generally dimensionally coextensive with the surface to which the magnetic sheet assembly is to be removably adhered. A magnetic sheet may include, but is not limited to, a sheet consisting of a fine magnetic powder such as barium ferrite loaded into a thermoplastic binder; a sheet of  
15 plastics or vinyl material impregnated with a ferromagnetic material; a sheet of synthetic resin material having mixed therein a magnetic powder; magnetic particles embedded in a polymer sheet of typically 0.7 mm or 0.030 inches thickness; a vinyl material including magnetic materials dispersed therethrough; or other suitable material having properties compatible with its intended purpose. In a preferred embodiment, the magnetic sheet is  
20 comprised of a flexible barium ferrite magnet material, or a flexible strontium ferrite magnet material, or a neodymium iron boron bonded magnetic material, or a combination thereof. As apparent to those skilled in the art, the thickness of the magnetic sheet will vary depending on factors which include, but are not limited to, the composition of the magnetic sheet material, whether the magnetic sheet comprises one or more sheets, the desired field

WO 02/42419

PCT/US01/43718

strength, and the spacing of the magnetic poles. In that regard, and for purposes of illustration but not limitation, the thickness of the magnetic sheet may range from about 0.2 mm to about 5 mm. A preferred thickness of a suitable commercially available, flexible strontium ferrite-based material of from about 450 Gauss to about 1000 Gauss is in a range of

5 from about 0.03 to about 0.06 inches. A pressure sensitive permanent adhesive is provided to fixedly bond the magnetic sheet to the pressure sensitive adhesive laminate comprising the pressure sensitive permanent adhesive, the carrier sheet, and the pressure sensitive non-permanent adhesive. Conventional pressure sensitive permanent adhesives are well known in the art, are commercially available from adhesive manufacturers, and include, but are not

10 limited to, acrylic base adhesives, rubber based adhesives, and the like. A typical thickness of the pressure sensitive permanent adhesive or the pressure sensitive non-permanent adhesive may be in a range of from about 0.0003 to about 0.003 inches; and more preferably, is about 0.0005 inches. The pressure sensitive permanent adhesive and pressure sensitive non-permanent adhesive may be applied to a respective separate side of the carrier sheet, in

15 fabricating the double-sided pressure sensitive adhesive laminate, by any conventional method known in the art such as by coating (e.g., brush coating, knife coating, transfer coating, roll coating, and the like), dispersion, spraying, calendaring, and the like.

The pressure sensitive non-permanent adhesive is: (a) of sufficient cohesion to keep the magnetic sheet assembly in adhesive contact with the surface of the cell culture apparatus for

20 a prescribed period of time necessary for a magnetic separation process to be initiated and completed (typically a time in a range of from about 10 minutes to about 4 hours); and (b) is of a light to moderate tack to permit the magnetic sheet assembly to be lifted (e.g., peeled) from the cell culture apparatus to which it was in close adhesive contact, wherein the non-permanent adhesive releases clearly (0% to less than 5% of the surface covered by the

WO 02/42419

PCT/US01/43718

adhesive retains any visible adhesive residue upon removal) from the surface of the cell culture apparatus as the magnetic sheet assembly is removed. Conventional pressure sensitive non-permanent adhesives, particularly suited for the intended purpose as outlined above, are well known in the art, are commercially available from adhesive manufacturers, and may include, but are not limited to, synthetic or natural rubber based adhesive compositions, acrylic based adhesive composition, and the like. The carrier sheet may be selected from a variety of carrier sheet materials suitable for use with pressure-sensitive adhesive products. The carrier sheet is generally thin and flexible, and preferably the carrier sheet has a thickness in the range of from about 0.03 mm to about 0.25 mm; and more preferably, the carrier sheet has a thickness of about 0.002 inches. The carrier sheet material may be fibrous, non-fibrous, or a combination thereof. The carrier sheet may be a suitable polymeric film, fabric (e.g., nylon), paper, cellulose, and the like; and may preferably include, but is not limited to, a polystyrene, an acrylic polymer (e.g., polymethylmethacrylate), a vinyl polymer (e.g., vinyl chloride or ester, plasticized vinyl polymer, and the like), a polycarbonate, a polyolefin, a polyester, a cellulose acetate.

The term "septum" is used herein, for the purposes of the specification and claims, to mean a pre-slit septum comprised of an elastomeric material dimensioned to cause centrally directed compression, when inserted in an access port configured to accommodate the septum, such that: when a tip is inserted into and accesses the slit of the septum-access port assembly, the slit closes around and sealingly engages the outer surface of a tip accessing the septum to prevent leakage between the tip and slit so as to maintain a leak-proof seal; and enhances the ability of the septum to reseal itself ("resealability") after withdrawal of the tip from the slit, even after the septum has been repeatedly accessed by tips. Preferred septums are described in more detail in United States patent application No. 09/707,588, filed 07

WO 02/42419

PCT/US01/43718

NOV 00, the disclosure of which is herein incorporated by reference. The septum may further comprise one or more additives such as a colorant, filler, and the like. The elastomeric material may be natural or synthetic and may be a material including, but not limited to, silicone rubber, fluorocarbon rubber, butyl rubber, polychloroprene rubber, a  
5 silicone elastomer composite material, thermoplastic elastomer, medical grades of silicone rubber, polyisoprene, a synthetic isoprene, and a combination thereof. The elastomeric material may be selected to have a Shore A durometer within the range of from about 30 to about 80.

In a preferred embodiment, the septum comprises an elastomeric material and an  
10 antimicrobial agent mixed and formed into the elastomeric septum, wherein the antimicrobial agent becomes incorporated into the elastomeric septum and forms a surface coating on the elastomeric septum, and wherein the antimicrobial agent exhibits migration through the elastomeric septum as the surface coating of antimicrobial agent is depleted. Suitable and exemplary broad spectrum antimicrobial agents may include, but are not limited to, triclosan  
15 (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether), 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol, and 2-2'-methylene-bis-4-chlorophenol, 3-(trifluoromethyl)-4,4'-dichloro-carbanilide, or polyhexamethylene biguanide hydrochloride.

The term "tissue culture medium" is used herein, for the purposes of the specification and claims, to mean a liquid solution which is used to provide sufficient nutrients (e.g.,  
20 vitamins, amino acids, essential nutrients, salts, and the like) and properties (e.g., osmolality, buffering) to maintain living cells (or living cells in a tissue) and support their growth. Commercially available tissue culture medium is known to those skilled in the art.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

**Example 1**

In this example, illustrated are various embodiments of the cell culture apparatus according to the present invention. However, in all embodiments of the cell culture apparatus according to the present invention described herein in this Example and the following

- 5 Examples, an essential feature is that the culture chamber formed therein comprises at least one gas permeable membrane. Referring now to FIGS. 1-7, the cell culture apparatus 12 comprises frame 18. Frame 18 may be of a basic biocompatible composition that may comprise suitable plastic, thermoplastic, synthetic, or natural materials which can be fabricated into a framework structure, thereby achieving the required structural integrity for
- 10 its intended purpose. It should be apparent to those skilled in the art that a wide latitude of choice can be exercised in selecting a material suitable for formation and/or fabrication of frame 18. The dimensions of cell culture apparatus 12, and frame 18, may depend on one or more factors including, but not limited to, the desired fluid capacity of the culture chamber formed therewith, and the dimensions of the culture chamber. In a preferred embodiment,
- 15 cell culture apparatus 12 is of a general shape and size to be able to be accommodated, and be substantially held in position, by a standard mechanical stage specimen holder for a microscope. In a more preferred embodiment, cell culture apparatus 12 (and frame 18) has a length in a range of from about 10 cm to about 13.5 cm, a width in a range of from about 7 cm to about 9 cm, and a height in a range of from about 0.2 cm to about 2.0 cm; and more
- 20 preferably is about 12.6 cm in length by about 8.4 cm in width by about 0.5 cm in height; providing a cell culture apparatus which permits culturing of cells in less incubator space than would be required for culturing cells at a comparable growth rate or to a comparable cell density using a conventional cell culture device. In a preferred embodiment, and in referring to FIGS. 1 & 4-7, a beveled portion 14 of frame 18 slopes at an angle (e.g., at a degree in a

WO 02/42419

PCT/US01/43718

range of from about 25° to about 40°), in relation to the plane of the at least one gas permeable membrane.

Referring now to FIGS. 1-6, frame 18 is a housing shaped to accommodate the aligning, contacting and securing thereto (in a leak-proof sealing) gas permeable membrane

5 31 in assembling cell culture apparatus 12 of the present invention. Frame 18 may further comprise a box-like housing. Also provided is another surface 32 which forms a wall of cell culture chamber 40. Surface 32 is a rigid surface preferably formed as part of frame 18 by a single molding operation, and preferably comprises a high-density resinous material which may include, but is not limited to, polyethylene, polypropylene, polyvinylchloride, or other

10 plastic suitable for cell culture applications. Surface 32 is liquid impermeable and gas impermeable. Membrane 31 may be secured to frame 18 in a leak-proof sealing using means that may include mechanical means, chemical means (an adhesive agent which may include, but is not limited to, a pressure-sensitive acrylic adhesive, hot-melt adhesive, rubber cement, or any other form of adhesive or bonding agent useful for the purposes attendant to the

15 present invention), or other suitable means. Regarding the latter, other suitable means may include one or more of heat bonding, sonic welding, pressure fit sealing in forming a leak-proof seal, and a molding process in which the membranes become an integral part of the frame (e.g., by extrusion). In a preferred embodiment, the membrane is secured to the frame by a sonic welding process which comprises cutting the frame and bonding (melting) the

20 membrane to substantially the cut portion of the frame in a manner which results in a leak-proof sealing between the membrane secured to the frame in the formation of a culture chamber, in a process of assembling the cell culture apparatus according to the present invention.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

As will become apparent to one skilled in the art from the description herein, membrane 31 (or a portion thereof) may be removed from frame 18 so as to facilitate further manipulations of cells cultured in the culture chamber of the cell culture apparatus according to the present invention. In one embodiment where anchorage-dependent cells are cultured, 5 membrane 31, to which is attached the anchorage-dependent cells, is removed from the frame by cutting it or peeling it away from the frame. Alternatively, the membrane does not serve as the attachment surface for anchorage-dependent cells (e.g., surface 32 serves as the attachment surface) but is cut or peeled from the frame so as to access the culture chamber 40 and the cells contained therein. In the case where anchorage-dependent cells are attached to 10 the membrane, the membrane may then be directly stained using standard dyes or stains, and methods for staining known to those skilled in the art. For example, the attached cells may be stained for analysis by fluorescence microscopy, phase contrast microscopy, Nomarsky contrast microscopy, scanning electron microscopy, and imaging (e.g., photography or digital imaging) associated therewith. Alternately, the attached cells may be gently scraped off 15 membrane 31 or surface 32 (depending which serves as the attachment surface) in circumstances where it is desirable to harvest the cells off of the membrane without enzyme treatment (e.g. trypsinization). Such circumstances may include further use or analysis of the harvested cells where a trypsin-sensitive cell surface molecule is needed to be intact; e.g., for immediate, further analysis such as in flow cytometric analysis, or in a functional bioassay 20 (e.g., cell cytotoxicity assay).

As shown in FIGS. 1-7, frame 18 has at least one aperture 23, and preferably at least two apertures. As previously described herein, aperture 23 of frame 18 may serve as a passageway into which is guided an instrument for introducing a substance into, or withdrawing a substance from, or venting from, the culture chamber. Thus, the diameter of

WO 02/42419

PCT/US01/43718

each aperture 23 is sufficient to allow for entry of that portion of the instrument (for reference purposes only, referred to hereinafter as "tip" of the instrument) which is necessary for its intended purpose of introducing a substance into, or withdrawing a substance from, or venting from, the culture chamber. As will be apparent to one skilled in the art, the diameter of each aperture 23 will depend on the type of instrument being used for the intended purpose, and the size of the tip of the instrument. For example, where the instrument is a syringe and blunt tip, the diameter of each aperture 23 is sufficient to allow the tip to pass therethrough (e.g., about 1 mm to about 2 mm in diameter). The tip of the instrument is guided through aperture 23 of frame 18, and introduced into culture chamber 40. In a preferred embodiment, the frame is of sufficient thickness and one or more of apertures 23 are of a sufficient limiting diameter to prevent the tip of the instrument, when inserted through aperture 23, from contacting and puncturing either of the walls of the culture chamber 40 formed by membrane 31 and surface 32. The at least one aperture 23 is resealable by a suitable means known in the art; e.g., a cap, a plug, a septum, or other suitable means. With reference to FIGS. 3-6 & 8, and in one preferred embodiment, aperture 23 is substantially (partially or completely) filled and sealed with a septum 36, and more preferably with a septum 36 comprising an elastomeric material and an antimicrobial agent as previously described herein in more detail.

Turning now to the gas permeable membrane, the gas permeable membrane forms a portion in the range of from about 10% to about 100% of a surface forming the wall of the culture chamber in the cell culture apparatus according to the present invention. In that regard, FIGS. 1, & 8 show a gas permeable membrane comprising the entire surface of a wall forming culture chamber 40. FIGS. 5 & 6 show a single gas permeable membrane forming about 10% and about 60%, respectively, of the surface of a wall forming culture chamber 40.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

FIG. 7 illustrates a plurality of gas permeable membranes which together form about 50% of the surface of a wall forming culture chamber 40. In using a gas permeable membrane as substantially all of an attachment surface in the culture chamber of the cell culture apparatus according to the present invention, it has been observed that anchorage-dependent cells tend to grow relatively uniformly over the entire attachment surface (including the edges of the chamber) during culture. It is believed that this absence of significant variability in cell attachment and growth over the entire attachment surface is due to the relative absence of variability in gas (e.g., oxygen and carbon dioxide) exchange across the length and width of the gas permeable membrane in the culture chamber as provided by the cell culture apparatus according to one embodiment of the present invention. Thus, in the cell culture apparatus according to the present invention, the gas permeable membrane provides an attachment surface which provides for a higher density of, and spatial efficiency for, anchorage-dependent cell growth. This is an advantage over conventional cell culture containers which have been reported to exhibit non-uniform gas exchange over the respective attachment surface; and hence, a variability in the ability of cells to grow depending on their spatial relation to the gradient of gas exchange.

As will be apparent to one skilled in the art from the description contained herein, the distance between membrane 31 and surface 32 depends on the size (e.g., the height) of frame 18. Although there is no general relative restriction on either the shape or size of culture chamber 40, in a preferred embodiment for culturing to achieve a high density of cells, the average distance between membrane 31 and surface 32 is in a range of from about 0.05 to about 0.5 inches. In a more preferred embodiment, the average distance between membrane 31 and surface 32 is a distance in the range of from about 0.07 to about 0.08 inches. In a preferred embodiment, anchorage-dependent cells are cultured in the cell culture apparatus

WO 02/42419

PCT/US01/43718

with membrane 31 as the surface to which the anchorage-dependent cells may attach, and is a surface which provides uniform gas exchange. By rotating the cell culture apparatus according to the present invention to allow both membrane 31 and surface 32 to simultaneously serve as surfaces for attachment of anchorage-dependent cells, provided are

5 spatial efficiency, versatility, and conditions which can promote a high rate of cell growth in achieving a high cell density in a relatively short period of time. For example, anchorage-dependent cells may be introduced into the cell culture apparatus, and the cells introduced are incubated a sufficient time (depending on the cell type) to allow settling by gravity, and attachment of the cells to gas permeable membrane 31. The cell culture apparatus may then

10 be rotated 180° so that the inverted cells are grown in a culture as suspended from membrane 31. Additional cells may then be seeded on surface 32. Preferably, membrane 31 is optically transparent and clear; e.g., in facilitating observations of changes in the color of the medium's pH indicator typically observed during cell culture, and of cellular characteristics (e.g., growth and morphology of cells such as by microscopy).

15 In an additional embodiment, a bioreactor comprises a plurality of the cell culture apparatuses according to the present invention which are operatively linked by providing a fluid passageway connecting the culture chambers of the plurality of cell culture apparatuses. To facilitate culturing of cells in such a bioreactor environment, each of the plurality of the cell culture apparatuses may be interconnected with another cell culture apparatus by a

20 connecting passageway that allows for the flow of tissue culture medium through the passageway and between the culture chambers of the interconnected cell culture apparatuses. One example of interconnecting a first cell culture apparatus to a second cell culture apparatus in forming a bioreactor is by the use of a piece of sterile tubing interposed between two syringe needles. One needle would be inserted into a resealable aperture 23, through the

WO 02/42419

PCT/US01/43718

frame, and into a culture chamber of the first cell culture apparatus; and the second needle would be inserted into a resealable aperture 23, through the frame, and into a culture chamber of a second cell culture apparatus. A piece of tubing may then have one open end operatively connected to the first needle, and the opposite open end of the tubing operatively connected

5 to the second needle. The tubing, located between and operatively connected to the two needles, provides fluid flow communication between the culture chamber of the first cell culture apparatus and the culture chamber of the second cell culture apparatus. Using similar methodology and a plurality of tubing, a plurality of the cell culture apparatuses may be operatively connected in forming a bioreactor.

10

**Example 2**

In this example, illustrated are various embodiments of using the cell culture apparatus according to the present invention to culture cells, whether the cells are individual cells (cells which are grown independent of forming a structure such as a tissue; an

15 illustrative example being a cell line), or cells forming a tissue (typically, a mesh or network of cells, with their intercellular substance in forming a structured or organized tissue), or a combination thereof. It will be apparent to one skilled in the art that individual cells which can be cultured in the cell culture apparatus comprise one or more cell types including, but not limited to, animal cells, insect cells, mammalian cells, human cells, transgenic cells,

20 genetically engineered cells, transformed cells, cell lines, anchorage-dependent cells, and anchorage-independent cells. It will be also apparent to one skilled in the art, that tissue formed by cells in culture can also be cultured in the cell culture apparatus according to the present invention. It will further be apparent to one skilled in the art that the cell culture apparatus of the present invention is generally not limited to a specific type of cell to be

WO 02/42419

PCT/US01/43718

cultured, nor the tissue culture medium capable of sustaining cell growth as long as the medium provides sufficient nutrients and properties (e.g., osmotic pressure) to maintain and support cell growth. Further, it will be apparent to one skilled in the art that prior to use for culturing cells, the cell culture apparatus is sterilized using a method conventional in the art.

5 In a preferred embodiment, the cell culture apparatus is sterilized by exposure to gamma radiation.

In one embodiment, anchorage-dependent cells are cultured in the cell culture apparatus according to the present invention. For growing anchorage-dependent cells, either membrane 31, or surface 32, or both, has an inner face (forming an inside surface of the culture chamber) which is of sufficient hydrophilicity for promoting adhesion of cells desired to be cultured; and therefore, can act as a surface to which the cells can attach and grow. For example, the at least one membrane 31 may have inherent chemical properties which promote such adhesion, or the inner face may be treated (e.g., electrically, ionically, or chemically) to promote such adhesion. It will be apparent to one skilled in the art that such treatment may include one or more of chemically etching of the inner surface, ionization of the inner surface, or coating the inner surface with a suitable coating reagent. Suitable coating reagents are known to those skilled in the art to include gelatin, collagen, fibronectin, an adhesion protein, an adhesion peptide (see, e.g., PCT/US95/00817).

10

15

A method of culturing cells using the cell culture apparatus 12 according to the present invention comprises suspending the cells to be cultured (e.g., anchorage-dependent cells or anchorage-independent cells) in an appropriate amount of tissue culture medium to support cell growth, in forming a suspension; introducing the suspension into a suitable instrument (e.g., a syringe and blunt tip combination) for injecting the suspension into the cell culture apparatus 12; using sterile (aseptic) technique, and inserting a portion (e.g., the tip of

20

WO 02/42419

PCT/US01/43718

a needle) of the instrument through a resealable aperture 36 (septum and aperture combination) and into the cell culture chamber 40 of the cell culture apparatus 12; expelling the suspension from the instrument (e.g., from the chamber of a syringe and through the tip) and into the cell culture chamber; withdrawing the tip from the cell culture apparatus; and

5 incubating the cell culture apparatus, containing the suspension of medium and cells (e.g., in a cell culture incubator or in conditions sufficient for cell growth as known in the art including suitable temperature, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations). It will be apparent to those skilled in the art that a substance that may be introduced into the culture chamber 40 of the cell culture apparatus 12 may include one or more of tissue culture medium alone, tissue

10 culture medium with cells, cells suspended in a physiological buffer, and a drug or cytokine or growth factor or enzyme (e.g., solution of trypsin) or other biological agent to treat cells cultured therein.

In a preferred embodiment, and for applications in which a high growth rate of cells is desired, in a method of culturing cells in the cell culture apparatus 12 according to the present

15 invention, the cell culture chamber 40 may be filled completely with tissue culture medium or other suitable growth medium for culturing cells or tissue desired to be grown. It will be apparent to one skilled in the art that completely filling the culture chamber means that there is substantially no head space (e.g., air bubbles) remaining in the culture chamber. It is noted that there can be an abrupt, initial rise in the pH of tissue culture medium within the first hour

20 or two in conventional cell culture containers due mainly to the distribution of dissolved CO<sub>2</sub> between the medium and the gas phase. This pH change has mostly occurred within the first hour of incubation, well before cells are capable of producing significant amounts of CO<sub>2</sub>. The resultant pH change negatively affects the rate of cell growth until the cells are in sufficient number to restore the optimal CO<sub>2</sub> level by providing CO<sub>2</sub> through cell respiration.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

However, unlike the conventional cell culture containers, in a preferred embodiment, the cell culture apparatus 12 according to the present invention can be filled in a manner wherein a substantial head space is lacking. Further, the cell culture apparatus 12 of the present invention provides an unexpected capacity for gas equilibrium believed to be due to the enhanced gas exchange exhibited by the use and arrangement of one or more gas permeable membranes 31. Together, these features of the cell culture apparatus 12 according to the present invention prevent the abrupt change in initial pH as observed in conventional cell culture containers. By preventing such an abrupt change in pH of the medium, the initial culture conditions attain a pH equilibrium more conducive to optimal cell growth. Thus, a disadvantage of conventional cell culture containers, as opposed to the cell culture apparatus 12 according to the present invention, is that conventional cell culture containers require a head space between the top of the container and the surface of the tissue culture medium. Additionally, in a method of culturing cells in the cell culture apparatus 12 according to the present invention, wherein the culture chamber 40 is filled in a manner wherein a substantial head space is lacking, the cell culture apparatus may be tilted or gently shaken to mix the medium and cells contained therein, without causing detectable foam formation or cell trauma. In particular, the at least one gas permeable membrane 31 may be secured taut to the frame so that the membrane is tympanic and thereby facilitates mixing in the filled culture chamber.

In an additional embodiment of a method of culturing cells using the cell culture apparatus 12 according to the present invention, the method comprises suspending anchorage-dependent cells to be cultured in an appropriate amount of tissue culture medium to support cell growth, in forming a suspension; introducing the suspension into a suitable instrument for injecting the suspension into the cell culture apparatus 12 via one or more

WO 02/42419

PCT/US01/43718

resealable apertures 23; using sterile (aseptic) technique, and inserting a tip of the instrument through one or more resealable apertures 23 and into the cell culture chamber 40 of the cell culture apparatus 12; expelling the suspension through the tip of the instrument and into the cell culture chamber 40; withdrawing the tip of instrument from the cell culture apparatus 12;  
5 and incubating the cell culture apparatus, containing the suspension of medium and cells, for a sufficient time (e.g., 30 minutes to 3 hours, depending on the cell type) to allow the cells to settle by gravity, and contact and attach to the membrane serving as the attachment surface. The method may further comprise subsequently rotating the cell culture apparatus 180°, and placing the cell culture apparatus in the incubator in a position so that the cells are incubated  
10 in an inverted manner in the culture chamber; i.e., the cells are attached to the membrane serving as the upper wall of the culture chamber with respect to the incubator shelf on which the cell culture apparatus rests. Hence, in this embodiment, the cells hang down into the culture chamber, and grow suspended along the surface of the upper membrane. This allows cell debris to fall by gravity, from the suspended culture, to the lower surface where such  
15 separated cell debris may be easily removed from the culture chamber by aspiration and or a washing step.

**Example 3**

The cell culture apparatus may also be used for magnetic separation applications. In  
20 this example, illustrated are various embodiments wherein the cell culture apparatus further comprises a magnetic sheet detachably secured thereto. In one embodiment, and in referring now to FIG. 8, a magnetic sheet assembly 51 is extended over and detachably secured to cell culture apparatus 12 in a face to face manner such that the magnetic sheet is placed in a position so as to be in adhesive contact with substantially all (all or that portion of the

WO 02/42419

PCT/US01/43718

membrane which forms a wall of culture chamber 40 of the surface of the at least one gas permeable membrane 31 of the cell culture apparatus. The magnetic sheet assembly 51 may be detachably secured to the cell culture apparatus 12 in a manner for magnetic particles placed within the culture chamber 40 to be attracted to, and held into position (along the

5 inside wall of culture chamber 40 comprising the inner surface of the membrane 31) by, the magnetic field strength of the detachably secured magnetic sheet assembly 51. In a preferred embodiment, magnetic sheet assembly 51 has a form generally co-dimensional with the surface 32 to which it is placed in adhesive contact. In a method of magnetic separation using the cell culture apparatus 12 having detachably secured thereto a magnetic sheet

10 assembly 51, and using methods described in the previous Examples herein, introduced into the culture chamber are: (a) a fluid containing a mixed population of cells in which there is a population of target cells (e.g., the cell type desired to be isolated from the fluid containing the mixed population of cells types); and (b) a magnetic separation reagent comprising magnetic particles coated with a ligand, wherein the ligand has sufficient binding specificity

15 and affinity for the cells desired to be separated and for achieving magnetic separation. After mixing the contents together for a sufficient time for contact and binding interactions between the magnetic separation reagent and the target cells to occur, the magnetic separation reagent contacts and binds, via the ligand coating, with target cells present in the fluid in forming complexes. It will be apparent to one skilled in the art that the fluid containing the

20 mixed population of cells, and the magnetic separation reagent may be mixed first, and then the mixture is introduced in the cell culture apparatus for performing the magnetic separation. In either embodiment, complexes formed are drawn to (by magnetic attraction), and contact the wall of culture chamber 40 comprising the inner face of the membrane, along the plane of cell culture apparatus 12 to which is detachably secured the magnetic sheet. After allowing

WO 02/42419

PCT/US01/43718

for a sufficient time for complexes to be held into position along the membrane 31, the fluid is removed from the cell culture apparatus 12. In a method of negative selection, the removed fluid is utilized because it has been depleted of a specific cell population. In a process of positive selection, because the cell type desired to be separated is held in position  
5 by magnetic attraction and as complexes in the culture chamber, the removed fluid contains substantially all of the (unwanted) remainder of the mixed cell populations. In this positive selection process, culture chamber 40 may be washed with a solution (e.g., tissue culture medium or physiological solution) to remove any remaining unbound cells, while the target cells remain bound, via magnetic attraction, as part of the complex with the magnetic  
10 separation reagent. In one embodiment wherein it is desired to culture the positively selected cells, the appropriate amount and type of tissue culture medium relative to that cell type is then introduced into the culture chamber 40; the magnetic sheet assembly 51 is then removed (e.g., by a pulling or peeling action, as illustrated in FIG. 8) from the cell culture apparatus 12, thereby removing the magnetic force holding the complexes in place in the cell culture  
15 chamber 40, and thereby releasing the complexes into the medium; and then the cell culture apparatus 12 is placed into and incubated in a cell culture incubator.

**Example 4**

The cell culture apparatus 12 according to the present invention may also be used for  
20 applications in which recombinant DNA molecules are introduced into cultured cells. In this example, illustrated is the use of the cell culture apparatus 12 in which a vector is introduced into the cells by introducing an effective amount of the vector (for introduction into the cultured cells) into the cell culture apparatus 12 so that the vector contacts the cultured cells contained in the culture chamber 40 of the cell culture apparatus 12. The methods used for

WO 02/42419

PCT/US01/43718

introducing a substance into the cell culture apparatus 12, as described in Example 2 herein, may also be used to introduce the vector into the cell culture apparatus 12. As will be apparent to one skilled in the art, the vector may comprise a plasmid vector, viral vector, expression vector, or a combination thereof. As apparent to one skilled in the art, the vector  
5 may comprise a recombinant DNA molecule comprising the vector operatively linked (e.g., to a promoter) to a desired DNA molecule to be expressed by cells containing the vector. As known to those skilled in the art of molecular biology, animal cells (and more preferably, mammalian cells) or plant cells are typical cells into which it is desired to introduce a recombinant DNA molecule such as an expression vector for promoting expression of a  
10 desired gene into a gene product in the cells.

For example, cultured cells contained in the cell culture apparatus 12 may be incubated with a mixture comprising an amount of a recombinant DNA molecule desired to be introduced into the cells, and a transfection reagent. The DNA molecule is mixed with the transfection reagent and the mixture comprising tissue culture medium, transfection reagent  
15 and vector is introduced through the aperture 23 and expelled into the culture chamber 40 so as to contact the adherent, cultured cells. The cell culture apparatus 12 may then be incubated overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> so that the contact between the cultured cells and the mixture (comprising the tissue culture medium and transfection reagent and vector) promote the uptake by and introduction into cultured cells of the vector. The tissue culture medium  
20 may then be removed from the cell culture apparatus 12, and replaced with fresh tissue culture medium. Transfection efficiency may then be determined using a conventional method known in the art, and as enabled by the vector used. As will be apparent to one skilled in the art, the transfection efficiency may be increased depending on factors which include, but are not limited to, the type of cells into which it is desired to introduce the vector,

WO 02/42419

PCT/US01/43718

optimization of the conditions for transfection (e.g., the amount of DNA per number of cells, the medium used for transfection, the time of the transfection process), and the type and amount of transfection reagent used. Also, it will be apparent to one skilled in the art that using similar steps, a vector may also be introduced into anchorage-independent cells

5 cultured in the cell culture apparatus 12 according to the present invention.

The foregoing description of the specific embodiments of the present invention have been described in detail for purposes of illustration. In view of the descriptions and illustrations, others skilled in the art can, by applying, current knowledge, readily modify and/or adapt the present invention for various applications without departing from the basic

10 concept; and thus, such modifications and/or adaptations are intended to be within the meaning and scope of the appended claims.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. A cell culture apparatus comprising:  
a frame comprising a housing, and at least one aperture which comprises an opening  
through the frame, wherein each aperture of the at least one aperture contains a septum;  
5 at least one gas permeable membrane, wherein the at least one gas permeable membrane is  
securedly sealed in a leak-proof sealing to the frame in forming a portion of a wall of a  
culture chamber; a rigid surface which forms a wall of the culture chamber, wherein the  
culture chamber is formed between the at least one gas permeable membrane and the rigid  
surface and the frame, and wherein the at least one gas permeable membrane is optically  
10 transparent and clear.
2. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein the frame comprises  
2 or more apertures.
- 15 3. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein the portion is an  
amount in a range of from about 10% to about 100%.
4. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein the portion is an  
amount in a range of from about 10% to about 60%.
- 20 5. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein the at least one gas  
permeable membrane comprises a surface treated to improve cell attachment.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

6. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein cells are selected from the group consisting of individual cells, cells forming a tissue, and a combination thereof.

5 7. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein the septum further comprises an antimicrobial agent

8. The cell culture apparatus according to claim 7, wherein the antimicrobial agent is incorporated into elastomeric material of the septum and forms a surface coating on the septum, and wherein the antimicrobial agent exhibits migration through the elastomeric material as the surface coating of antimicrobial agent is depleted.

10

9. The cell culture apparatus according to claim 8, wherein the at least one gas permeable membrane and the opposing rigid surface are spaced apart by a distance in the range of from about 0.1 to about 0.5 inches.

15

10. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein the frame comprises a beveled portion which slopes in relation to the plane of the at least one gas permeable membrane.

20

11. The cell culture apparatus according to claim 1, wherein the cell culture apparatus further comprises a magnetic sheet assembly detachably secured thereto, wherein the magnetic sheet assembly is extended over and detachably secured to cell culture apparatus in a face to face manner by placing the magnetic sheet assembly in adhesive

WO 02/42419

PCT/US01/43718

contact with at least one gas permeable membrane which forms the culture chamber of the cell culture apparatus.

12. A bioreactor comprising a plurality of cell culture apparatuses according to claim 1, wherein a fluid passageway is provided between the plurality of cell culture apparatuses, and wherein the fluid passageway allows for fluid flow communication between culture chambers of cell culture apparatuses connected by the fluid passageway.

13. A method of culturing cells in the cell culture apparatus according to claim 1, the method comprising:

(a) suspending the cells to be cultured in an appropriate amount of tissue culture medium to support cell growth, in forming a suspension;

(b) introducing the suspension into an instrument for injecting the suspension into the cell culture apparatus;

(c) inserting a tip of the instrument through the septum and aperture, and into the cell culture chamber of the cell culture apparatus;

(d) expelling the suspension from the instrument and into the cell culture chamber;

(d) withdrawing the tip from the cell culture apparatus; and

(e) incubating the cell culture apparatus containing the suspension of medium and cells.

14. The method according to claim 13, wherein the cells to be cultured are anchorage-dependent cells.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

15. The method according to claim 13, wherein the cells to be cultured are anchorage-independent cells.

16. The method according to claim 14, wherein after the anchorage-dependent  
5 cells have attached to the at least one gas permeable membrane of the cell culture apparatus in step (f), the method comprises a further step of rotating the cell culture apparatus 180° in culturing the cells in an inverted manner in the culture chamber.

17. The method according to claim 16, wherein after the anchorage-dependent  
10 cells have attached to a membrane of the cell culture apparatus in step (f), the method comprises the further steps:

(g) rotating the cell culture apparatus 180°, and

(h) repeating steps (c) through (f);

wherein both the at least one gas permeable membrane and the rigid surface serve as  
15 attachment surfaces onto which cells are cultured.

18. A method of magnetic separation using the cell culture apparatus according to claim 11, the method comprising:

(a) mixing a fluid containing a mixed population of cells in which there is a  
20 population of a cell type desired to be isolated by magnetic separation together with a magnetic separation reagent having binding specificity for the cell type desired to be separated, in forming a mixture comprising complexes between the magnetic separation reagent and cells of the type for which it has binding specificity;

WO 02/42419

PCT/US01/43718

(b) introducing the mixture into the culture chamber of the cell culture apparatus so that the mixture contacts a wall of the culture chamber formed by the at least one gas permeable membrane, along the plane of which is detachably secured the magnetic sheet; and

(c) incubating the mixture in the cell culture apparatus for a sufficient time for the complexes to contact and be held in position along the wall of the culture chamber due to attraction of the complexes to a magnetic field strength of the magnetic sheet.

19. The method according to claim 18, further comprising removing from the cell culture apparatus the mixture which remains unbound in the culture chamber, and wherein the removed mixture comprises cells separated by a process of negative selection.

20. The method according to claim 19, wherein after removal of the mixture, the cells comprising the complexes bound in the culture chamber and which remain in the cell culture apparatus comprise cells separated by a process of positive selection.

21. The method according to claim 20, further comprising introducing tissue culture medium into the culture chamber, removing the magnetic sheet from the cell culture apparatus, and incubating the cell culture apparatus in culturing the cells separated by the process of positive selection.

22. A method of introducing a recombinant DNA molecule into cells cultured in the cell culture apparatus according to claim 1, the method comprising:

(a) mixing a transfection reagent with the recombinant DNA molecule comprising a vector in forming a mixture comprising the recombinant DNA molecule;

WO 02/42419

PCT/US01/43718

(b) mixing the mixture comprising the recombinant DNA molecule with tissue culture medium in forming medium comprising the recombinant DNA molecule;

(c) introducing the medium comprising the recombinant DNA molecule into the culture chamber so as to contact the cultured cells in the cell culture apparatus; and

5 (d) incubating the medium comprising the recombinant DNA molecule in contact with the cultured cells in promoting introduction of the recombinant DNA molecule into cultured cells in the culture chamber.

WO 02/42419

PCT/US01/43718

1 / 4

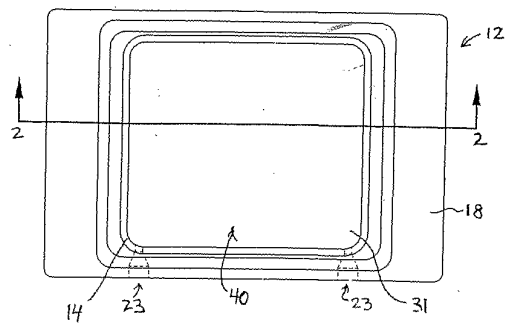


FIG. 1

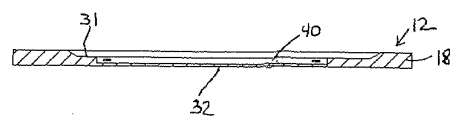


FIG. 2

WO 02/42419

PCT/US01/43718

2 / 4

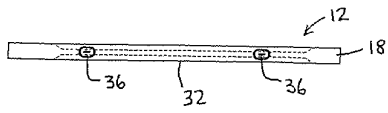


FIG. 3

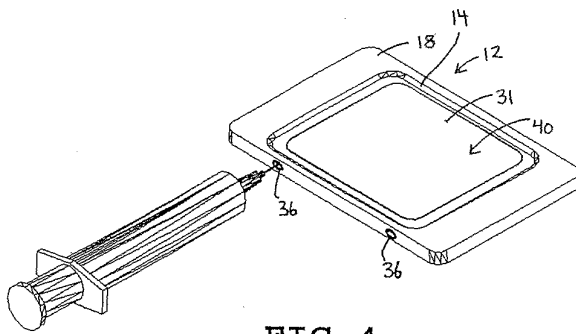


FIG. 4

WO 02/42419

PCT/US01/43718

3 / 4

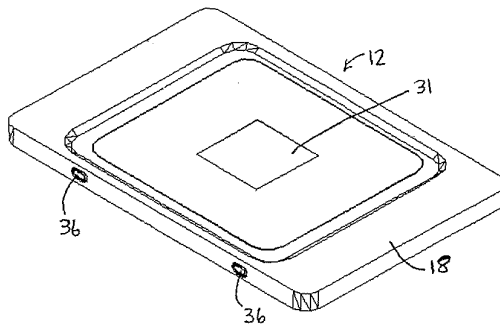


FIG. 5

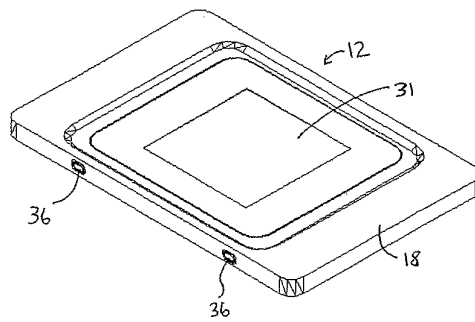


FIG. 6

4 / 4

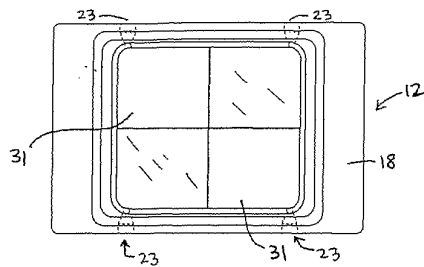


FIG. 7

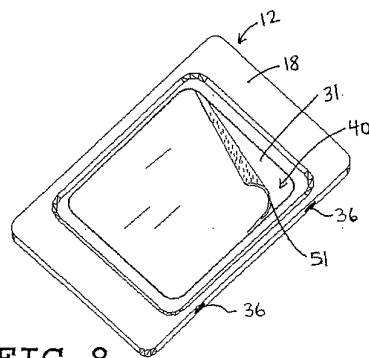


FIG. 8

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
30 May 2002 (30.05.2002)

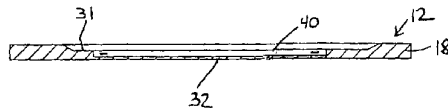
PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/042419 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00, C12M 1/12
- (21) International Application Number: PCT/US01/43718
- (22) International Filing Date: 21 November 2001 (21.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/723,008 27 November 2000 (27.11.2000) US  
09/724,153 28 November 2000 (28.11.2000) US  
09/975,889 11 October 2001 (11.10.2001) US  
09/717,651 21 November 2001 (21.11.2001) US
- (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOCRYSTAL, LTD. [US/US]; 575 McCorkle Boulevard, Westerville, OH 44114-2518 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): BARBERA-GUILLELM, Emilio J. [US]; 1555 Picards Court, Powell, OH 44164 (US); NELSON, M., Bud [—/US]; 575 McCorkle Boulevard, Westerville, OH 44114-2518 (US).
- (74) Agent: CASEY, Sean, M.; Sean M. Casey Co., L.P.A., P.O. Box 710, New Albany, OH 43054-0710 (US).
- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 24 October 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CELL CULTURE APPARATUS AND METHODS OF USE



- (57) Abstract: Provided is a cell culture apparatus (12) for culturing cells, and optionally, for performing magnetic separation of cells desired to be cultured. The cell culture apparatus (12) preferably comprises a frame (18); at least one gas permeable membrane (31) securely sealed in a leak-proof sealing to a frame (18) and an opposing surface (32) comprising a rigid surface in forming a culture chamber (40) therebetween; and at least one rescalable aperture (23) to allow substances to be introduced into, or withdrawn from, the culture chamber (40).

WO 02/042419 A3

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(L)60202242523



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/042419 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00, C12M 1/12 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KB, KG, KP, KR, KZ, LC, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/43718
- (22) International Filing Date: 21 November 2001 (21.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/723,008 27 November 2000 (27.11.2000) US  
09/724,153 28 November 2000 (28.11.2000) US  
09/975,889 11 October 2001 (11.10.2001) US  
09/717,651 21 November 2001 (21.11.2001) US
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (CH, GM, KB, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): BIOCRYSTAL LTD. (US/US); 575 McCorkle Boulevard, Westerville, OH 44114-2518 (US).

(72) Inventors; and  
(73) Inventors/Applicants (for US only): BARBERA-GUTLEBER, Emilio J. (US); 1555 Piedmont Court, Powell, OH 44164 (US); NELSON, M., Rad J. (US); 575 McCorkle Boulevard, Westerville, OH 44114-2518 (US).

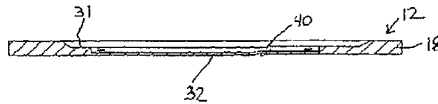
(74) Agent: CASEY, Sean, M.; Sean M. Casey Co., L.P.A., P.O. Box 710, New Albany, OH 43054 0710 (US).

Published:  
— with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report: 24 October 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CELL CULTURE APPARATUS AND METHODS OF USE



WO 02/042419 A3

(57) Abstract: Provided is a cell culture apparatus (12) for culturing cells, and optionally, for performing magnetic separation of cells desired to be cultured. The cell culture apparatus (12) preferably comprises a frame (18), at least one gas permeable membrane (31) securedly sealed in a leak-proof sealing to a frame (18) and an opposing surface (32) comprising a rigid surface in forming a culture chamber (40) therebetween; and at least one rescalable aperture (23) to allow substances to be introduced into, or withdrawn from, the culture chamber (40).

## 【国際調査報告】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                    |                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                    | International application No.<br>PCT/US01/43718                     |
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(Cl) : C12N 5/00; C12M 1/12<br>US CL : 435/395, 401, 297.1, 297.5<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                    |                                                                     |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 435/395, 401, 297.1, 297.5<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                    |                                                                     |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                    |                                                                     |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | US 4,435,508 A (GABRIDGE) 6 March 1984, see abstract.                              | 1-22                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | US 4,748,124 (VOGLER) 31 May 1988, see description of figure 4.                    | 1-22                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | US 5,665,599 A (MINUTH) 9 September 1997, see description of figure 2.             | 1-22                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | US 5,817,509 A (STEVENS et al.) 6 October 1998, see description of figure 2.       | 1-22                                                                |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                    |                                                                     |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                    |                                                                     |
| Date of the actual completion of the international search<br>14 July 2002 (14.07.2002)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                    | Date of mailing of the international search report<br>20 AUG 2002   |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Commissioner of Patents and Trademarks<br>Box PCT<br>Washington, D.C. 20231<br>Facsimile No. (703)305-3230                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | Authorized officer<br>David A Redding<br>Telephone No. 703-308-0661 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

(L)60202230338



| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                    | International application No.<br>PCT/US01/43718                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : C12N 5/06; C12M 1/12<br>US CL : 435/395, 401, 297.1, 297.5<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                    |                                                                     |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 435/395, 401, 297.1, 297.5<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                    |                                                                     |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                    |                                                                     |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | US 4,433,508 A (GABRIDGE) 6 March 1984, see abstract.                              | 1-22                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | US 4,748,124 (VOGLER) 31 May 1988, see description of figure 4.                    | 1-22                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | US 5,665,599 A (MINUTH) 9 September 1997, see description of figure 2.             | 1-22                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | US 5,817,509 A (STEVENS et al.) 6 October 1998, see description of figure 2.       | 1-22                                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                    |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                    |                                                                     |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, etc. exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later documents published after the international filing date in priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step, where the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step where the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"A" document member of the same patent family |                                                                                    |                                                                     |
| Date of the actual completion of the international search<br>14 July 2002 (14.07.2002)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                    | Date of mailing of the international search report<br>20 AUG 2002   |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Consultation of Patents and Trademarks<br>Box PCT<br>Washington, D.C. 20531<br>Facsimile No. (703)305-3230                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                    | Authorized officer<br>David A Redding<br>Telephone No. 703-308-0661 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 09/717,651

(32)優先日 平成13年11月21日(2001.11.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バーベラギレム、エミリオ

アメリカ合衆国、オハイオ州 4 4 1 6 4 ポーウェル、ピカード・コート 1 5 5 5

(72)発明者 ネルソン、エム・パド

アメリカ合衆国、オハイオ州 4 4 1 1 4-2 5 1 8 ウェスタービル、マッコークル・ブールバー  
ド 5 7 5

F ターム(参考) 4B024 AA19 AA20 CA01 CA11 GA11 GA18 HA20

4B029 AA08 BB11 CC02 CC08 GA08 GB03 GB06 GB07 GB09 GB10

4B065 AA90X AB01 AC20 BA01 BA30 BC03 BC05 BD50