

(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2016-536998

(P2016-536998A)

(43) 公表日 平成28年12月1日(2016.12.1)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/00</b>	<b>B</b>	<b>4 B 0 2 9</b>
<b>C 1 2 M</b>	<b>3/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 M</b>	<b>3/00</b>	<b>A</b>	<b>4 B 0 6 5</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/071</b>	<b>(2010.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/071</b>		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

(21) 出願番号 特願2016-530921 (P2016-530921)  
 (86) (22) 出願日 平成26年11月14日 (2014.11.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月12日 (2016.7.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/065829  
 (87) 国際公開番号 W02015/073918  
 (87) 国際公開日 平成27年5月21日 (2015.5.21)  
 (31) 優先権主張番号 61/905,182  
 (32) 優先日 平成25年11月16日 (2013.11.16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507114521  
 テルモ ビーシーティ、インコーポレー  
 テッド  
 アメリカ合衆国、コロラド州 80215  
 、レイクウッド、ウエスト・コリンズ・ア  
 ベニュー 10811  
 10811 West Collins  
 Avenue, Lakewood, C  
 olorado 80215, U. S.  
 A.  
 (74) 代理人 100077665  
 弁理士 千葉 剛宏  
 (74) 代理人 100116676  
 弁理士 宮寺 利幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオリアクターにおける細胞増殖

## (57) 【要約】

## 【課題】

【解決手段】 バイオリアクターにおける細胞増殖のための実施形態が記載される。一実施形態において、バイオリアクター全体にわたって細胞を分配させ、細胞をバイオリアクターの特定の部分に付着させて、バイオリアクターにおける細胞増殖を改善する方法が提供される。実施形態は、細胞の投入、分配、付着、増殖を行う細胞増殖システムにおいて実行される。

【選択図】 図13C

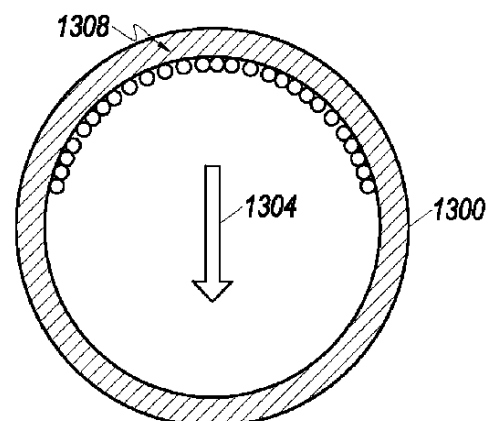


FIG. 13C

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞増殖システムにおいて細胞を成長させる方法であって、該方法は、  
複数の細胞を有する流体を、細胞増殖システムのバイオリアクター内において循環させるステップと、

流体の循環レートを減少させるステップと、

第 1 所定期間の間、前記バイオリアクターを、第 1 水平方向に維持して、前記複数の細胞の少なくとも 1 部分を沈殿させ、前記バイオリアクターの第 1 部分に付着させるステップと、

前記第 1 所定期間の後、前記バイオリアクターを、前記第 1 水平方向から略 180 度回転した第 2 水平方向に回転させるステップと、

前記回転させるステップの後、前記第 2 水平方向にある前記バイオリアクターにおいて、前記複数の細胞の少なくとも前記第 1 の部分を増殖させるステップと、

を有することを特徴とする方法。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 記載の方法において、前記バイオリアクターは、中空系膜を備えることを特徴とする方法。

**【請求項 3】**

請求項 2 記載の方法において、前記中空系膜は、複数の中空系を備えることを特徴とする方法。

20

**【請求項 4】**

請求項 3 記載の方法において、前記バイオリアクターの前記第 1 部分は、中空系の少なくとも頂部であることを特徴とする方法。

**【請求項 5】**

請求項 4 記載の方法において、前記複数の細胞の少なくとも前記第 1 の部分を増殖させるステップは、前記複数の細胞の前記第 1 の部分の成長に重力を影響させて、前記複数の細胞の前記第 1 の部分を、前記第 1 部分の下方に位置する前記バイオリアクターの第 2 部分に向かって成長させることを含むことを特徴とする方法。

**【請求項 6】**

請求項 5 記載の方法において、前記バイオリアクターの前記第 2 部分は、中空系の少なくとも底部であることを特徴とする方法。

30

**【請求項 7】**

請求項 1 記載の方法において、前記第 1 所定期間は、前記細胞の前記 1 部分を付着及び増殖させるに十分な長さの時間であることを特徴とする方法。

**【請求項 8】**

請求項 7 記載の方法において、前記第 1 所定期間は、約 10 時間よりも長いことを特徴とする方法。

**【請求項 9】**

請求項 1 記載の方法において、前記第 1 所定期間は、約 8 分よりも短いことを特徴とする方法。

40

**【請求項 10】**

請求項 9 記載の方法において、前記第 1 所定期間は、約 5 分であることを特徴とする方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 記載の方法において、該方法はさらに、前記第 1 所定期間の後で且つ前記バイオリアクターを第 2 水平方向に回転させるステップの前に、

前記バイオリアクターを第 1 鉛直方向に回転させ、前記バイオリアクターを、第 2 所定期間の間、前記第 1 鉛直方向に維持するステップと、

前記第 2 所定期間の後、前記バイオリアクターを、前記第 1 鉛直方向から略 180 度回転させた第 2 鉛直方向に回転させ、前記バイオリアクターを、第 3 所定期間の間、前記第

50

2 鉛直方向に維持するステップと、  
を有することを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 記載の方法において、前記第 2 所定期間は、前記細胞の前記 1 部分を増殖させるのに十分な長さであることを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の方法において、前記第 3 所定期間は、前記第 2 所定期間と同じ長さであることを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 記載の方法において、前記第 2 所定期間は、少なくとも約 1 0 時間であることを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

細胞を増殖させるシステムであって、該システムは、  
バイオリアクターと、  
前記バイオリアクターに接続され前記バイオリアクターを回転させる少なくとも 1 つのモータと、

前記バイオリアクターと流体的に結合された少なくとも 1 つの流体循環路と、

前記少なくとも 1 つの流体循環路と前記バイオリアクターとにおいて流体を循環させる少なくとも 1 つのポンプと、

プロセッサ実行可能命令を実行するプロセッサと、

プロセッサ実行可能命令を記憶するメモリと、

を備えたシステムであって、

前記プロセッサ実行可能命令は、前記プロセッサによって実行される場合、

前記少なくとも 1 つのポンプを作動させて、複数の細胞を有する流体を、前記バイオリアクター内において循環させるステップと、

前記少なくとも 1 つのポンプの流量を減少させるステップと、

第 1 所定期間の間、前記バイオリアクターを第 1 水平方向に維持して、前記複数の細胞の少なくとも 1 部分を沈殿させ、前記バイオリアクターの第 1 部分に付着させるステップと、

前記第 1 所定期間の後、前記少なくとも 1 つのモータを作動させて、前記バイオリアクターを、前記第 1 水平方向から略 1 8 0 度回転した第 2 水平方向に回転させるステップと、

前記回転の後、前記少なくとも 1 つのポンプを作動させて、前記バイオリアクターにおいて流体を循環させ、前記第 2 水平方向に位置づけた前記バイオリアクターにおいて、前記細胞を増殖させるステップと、

を有する方法を実行することを特徴とするシステム。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 記載のシステムにおいて、前記バイオリアクターは、中空系膜を備えることを特徴とするシステム。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 記載のシステムにおいて、前記中空系膜は、複数の中空系を備えることを特徴とするシステム。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載のシステムにおいて、前記バイオリアクターの前記第 1 部分は、中空系の少なくとも頂部であることを特徴とするシステム。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 記載のシステムにおいて、前記複数の細胞の前記第 1 の部分を増殖させるステップは、前記複数の細胞の前記第 1 の部分の成長に重力を影響させて、前記複数の細胞の前記第 1 の部分を、前記第 1 部分の下方に位置する前記バイオリアクターの第 2 部分に向かって成長させることを含むことを特徴とするシステム。

**【請求項 20】**

請求項 18 記載のシステムにおいて、前記バイオリアクターの前記第 2 部分は、中空系の少なくとも底部であることを特徴とするシステム。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2013 年 11 月 16 日に提出された米国特許仮出願第 61/905,182 号明細書（タイトル：細胞増殖システムのバイオリアクターにおける細胞の投入・分配方法）の優先権を主張するものであり、該米国特許仮出願の全体は、ここでの開示により明確に本出願に組み込まれる。

10

**【背景技術】****【0002】**

種々の治療や療法における幹細胞の使用可能性に対して特に注目が集まっている。細胞増殖システムを使用することにより、幹細胞や、骨髄細胞のようなその他のタイプの細胞を増殖（例えば、成長）させることができる。ドナー細胞から増殖した幹細胞を使用することで、損傷を受けた又は欠陥のある組織を修復又は交換することができ、広範囲な疾病に対する幅広い臨床応用が存在する。再生医療分野における近年の前進により、幹細胞は、増殖能力、自己再生能力、未分化状態を維持する能力及び特定の条件下で特殊化した細胞に分化する能力といった特性を有することが示されている。

20

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0003】**

細胞増殖システムは、細胞を増殖させるための 1 以上の分室、例えば、細胞成長チャンバー（「バイオリアクター」とも称される）を有している。細胞を増殖させるため、通常、初期量の細胞を、バイオリアクターに投入し分配する。従って、細胞増殖システムに関連付けられたバイオリアクターにおける細胞の投入・分配方法の要求が存在する。本発明は、上記及び他の要求に対応するためになされた。

**【0004】**

本発明の実施形態は、これら及びその他を考慮してなされた。しかしながら、上述の課題によって、本発明の実施形態の他の問題への適用が制限されるものではない。

30

**【課題を解決するための手段】****【0005】**

本節は、本発明のいくつかの実施形態の態様を簡単な形式で説明するためのものであり、主張される本発明の重要な又は必須の要素を特定することを意図していないし、また、請求項の範囲を制限することを意図しているものでもない。

**【0006】**

本発明は、様々な異なる実施形態を含むと理解されるべきであり、また本節は、本発明を限定するものでないし、またそれら全ての実施形態を含むものでもない。本節では、実施形態に含まれる特徴が概略的に記載されるが、それ以外の実施形態に含まれる他の特徴のより具体的な記載を含む場合もある。

40

**【0007】**

1 以上の実施形態は一般には、細胞増殖システムのバイオリアクターにおける細胞の投入・分配のための方法及びシステムに関する。従って、実施形態には、細胞増殖システムのバイオリアクター内において第 1 レートで循環する流体に、複数の細胞を付加することを行う方法が含まれる。ある実施形態では、バイオリアクターは、複数の中空系を有する中空系膜を備えてもよい。細胞や他の流体は、該中空系を介して循環する。まず、流体がバイオリアクターの中空系膜を循環させられ、循環する流体に、細胞が付加される。この流体は、第 1 所定循環レートで循環する。循環中は、バイオリアクターは水平位置に置かれる。循環流体に付加することによって、細胞を投入した後、細胞は、中空系膜の中空系に対して流入・流出を行いながら、システム全体にわたって循環し均一に分配される。そ

50

して、循環が停止される。細胞は、重力の影響により沈殿し、バイオリアクターの中空系の第1部分に付着する。ある実施形態では、細胞は、第1所定期間の間、沈殿する。いくつかの実施形態では、所定の期間を選択することによって、細胞を中空系の第1部分に付着させる。

【0008】

前記第1所定期間経過後、バイオリアクターを180度回転させる。バイオリアクターの回転後、バイオリアクター内の細胞を再度沈殿させる。そして、細胞を、中空系の対向部分に、第2所定期間だけ沈殿させる。第2所定期間は、細胞が対向部分に付着するように選択される。第2所定期間経過後、バイオリアクターを、元の水平位置に戻し、細胞に対して増殖プロセスを行う。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、投入プロセスは、付加工程を有する。いくつかの実施形態において、バイオリアクターを元の水平位置に戻した後、循環を再度始める。その際の循環レートは、前記第1所定循環レートよりも低いレートに設定される。循環を行うと、表面に付着しなかった細胞は再び分配される。この循環は、第3所定期間の間、行われ、未付着の細胞が、バイオリアクターを含むシステム全体にわたって均一に分配されるようになる。そして、循環を停止し、バイオリアクター内の細胞を沈殿させ、中空系の部分への付着を再度行う。

【0010】

細胞を再度沈殿させるための第4所定期間の後、バイオリアクターを180度回転させる。バイオリアクターの回転の後、バイオリアクター内の細胞は、再び沈殿する。そして、細胞は、中空系の対向部分に付着可能なように設定された第5所定期間の間、中空系の対向部分に向かって沈殿する。第5所定期間の後、バイオリアクターを元の水平位置に戻す。

20

【0011】

上記プロセスを、システム内における細胞の循環により繰り返し行って、未付着の細胞を再度均一に分配させる。しかしながら、循環を再始動するたびに、前回の循環レートよりも低い循環レートで行う。循環を停止させ、細胞を沈殿・付着させる。そして、バイオリアクターを180度回転させて、細胞を沈殿・付着させる。そして、バイオリアクターを元の位置に戻す。循環、沈殿、回転、沈殿、回転のこれらステップは、所定の回数繰り返され、その後、層状に付着した細胞が、バイオリアクターにおいて増殖される。

30

【0012】

他の実施形態はまた、細胞増殖システムのバイオリアクターにおける細胞の投入及び分配のための方法及びシステムに関する。実施形態には、細胞増殖システムのバイオリアクター内において第1レートで循環する流体に複数の細胞を付加することを行う方法が含まれる。ある実施形態では、該バイオリアクターは、複数の中空系を有する中空系膜を備えてもよい。細胞や他の流体は、該中空系を介して循環する。まず、流体がバイオリアクターの中空系膜を循環させられ、循環する流体に、細胞が付加される。この流体は、第1所定循環レートで循環する。循環中は、バイオリアクターは水平位置に置かれる。循環流体に付加することによって、細胞を投入した後、細胞は、中空系膜の中空系に対して流入・流出を行いながら、システム全体にわたって循環し均一に分配される。そして、循環が停止される。細胞は、重力の影響により沈殿し、バイオリアクターの中空系の第1部分に付着する。ある実施形態では、細胞は、第1所定期間の間、沈殿する。いくつかの実施形態では、所定の期間を選択することによって、細胞を中空系の第1部分に付着させる。

40

【0013】

前記第1所定期間経過後、バイオリアクターを180度回転させる。バイオリアクターの回転後、細胞に対して、増殖プロセスを行う。理解されるように、先に付着した細胞は、中空系の頂部にある。細胞が増殖すると、細胞は重力の影響を受けて、中空系底部に向かう細胞成長が促される。

【0014】

50

ここで提示される実施形態におけるさらなる効果は、以下の記載、添付図面から容易に理解されよう。

【0015】

本発明の上記及びその他の効果及び特徴をさらに明確にするため、添付の図面における具体的な実施形態を参照して、本発明がより具体的に説明される。これら図面は、本発明の代表的な実施形態を示すだけであり、従って、本発明の範囲を制限するものではない。以下では、添付図面を用いて、本発明が詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】図1Aは、細胞増殖システム(CES)の一実施形態の図である。

10

【図1B】図1Bは、CESの第2実施形態の図である。

【図1C】図1Cは、CESの第3実施形態の図である。

【図1D】図1Dは、CES動作中に細胞成長チャンバーを回転方向又は横方向に動かす揺動装置の一実施形態の図である。

【図2A】図2Aは、中空系型細胞成長チャンバーの一実施形態の側面図である。

【図2B】図2Bは、図2Aの中空系型細胞成長チャンバーの実施形態の一部切欠側面図である。

【図3】図3は、循環路を示したバイオリアクターの他の実施形態の切欠側面図である。

【図4】図4は、一実施形態に係る、脱着可能なバイオリアクターを有するCESの一部の斜視図である。

20

【図5】図5は、一実施形態に係るCESにおいて細胞を増殖する方法のフローチャートである。

【図6】図6は、いくつかの実施形態において、図5で示されたフローチャートの方法に用いられるステップを有する、細胞の投入、分配、付着及び増殖のためのプロセスのフローチャートである。

【図7】図7は、いくつかの実施形態において、図5で示されたフローチャートの方法に用いられるステップを有する、細胞の投入、分配、付着及び増殖のためのプロセスのフローチャートである。

【図8】図8は、第1の姿勢における一実施形態に係るバイオリアクターの正面図である。

30

【図9】図9は、図8の状態からバイオリアクターを90度回転させた場合のバイオリアクターの正面図である。

【図10】図10は、図8の状態からバイオリアクターを180度回転させた場合のバイオリアクターの正面図である。

【図11】図11は、図8のバイオリアクターを回転させて図8に示す元の位置へ戻した場合のバイオリアクターの正面図である。

【図12】図12は、図8の状態から90度回転させ、図9の状態から180度回転させた場合のバイオリアクターの正面図である。

【図13】図13A～図13Cは、一実施形態に係るバイオリアクターにおける細胞の分配、付着及び増殖のプロセスの工程を経て進行中にある、バイオリアクターの一部である中空系の(中心軸に対して垂直な)断面図である。図13D～図13Eは、一実施形態に係るバイオリアクターにおける細胞の増殖のプロセスの工程を経て進行中にある、バイオリアクターの一部である中空系の(中心軸に対して平行な)断面図である。

40

【図14】図14A～図14Dは、他の実施形態に係るバイオリアクターにおける細胞の分配、付着及び増殖のプロセスの工程を経て進行中にある、バイオリアクターの一部である中空系の(中心軸に対して垂直な)断面図である。

【図15】図15A～図15Fは、さらに他の実施形態に係るバイオリアクターにおける細胞の分配、付着及び増殖のプロセスの工程を経て進行中にある、バイオリアクターの一部である中空系の(中心軸に対して垂直な)断面図である。

【図16】図16は、複数の中空系及び細胞含有流体がそれぞれ異なる流量で循環する各

50

中空系ゾーンを示すバイオリアクターの断面図である。

【図１７】図１７は、本発明の実施形態を実施するために使用される基本的なコンピュータのブロック図である。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

本発明の原理は、以下の詳細な説明及び添付図面に示される実施形態を参照することで、さらに理解されよう。詳細な実施形態において具体的な特徴が示され説明されるが、本発明は、以下で説明される実施形態に限定されないと理解されるべきである。本開示は一般には、細胞増殖システムのバイオリアクターにおける複数の細胞の分配方法に関するものである。以下で記載されるように、バイオリアクター内での細胞の分配方法は、バイオリアクターへの細胞の投入、バイオリアクターの回転、及びバイオリアクターのある特定の姿勢における保持を含んでよい。

10

【００１８】

細胞増殖システム（ＣＥＳ）の一例が、図１Ａに概略的に示される。ＣＥＳ１０は、第１流体循環路１２と第２流体循環路１４とを有する。第１流体流路１６は、中空系型細胞成長チャンバー２４（「バイオリアクター」とも呼ばれる）に流体的に関連付けられた少なくとも両端部１８、２０を有する。詳細には、端部１８は、細胞成長チャンバー２４の第１入口２２と流体的に関連付けられ、端部２０は、細胞成長チャンバー２４の第１出口２８と流体的に関連付けられる。第１循環路１２において、流体は、細胞成長チャンバー２４に配置された中空系膜の中空系の内部を通る（細胞成長チャンバー及び中空系膜は以下でより詳細に説明される）。また、第１流量コントローラ３０が、第１流体流路１６に動作可能に接続され、第１循環路１２における流体の流れを制御する。

20

【００１９】

第２流体循環路１４は、第２流体流路３４と、細胞成長チャンバー２４と、第２流量コントローラ３２と、を有する。第２流体流路３４は、少なくとも両端部３６、３８を有する。第２流体流路３４の端部３６は、細胞成長チャンバー２４の入口ポート４０に、端部３８は、出口ポート４２にそれぞれ流体的に関連付けられる。細胞成長チャンバー２４を流れる流体は、細胞成長チャンバー２４の中空系膜の外側と接触する。第２流体循環路１４は、第２流量コントローラ３２と動作可能に接続される。

【００２０】

30

このように、第１及び第２流体循環路１２、１４は、中空系膜によって、細胞成長チャンバー２４において分離されている。第１流体循環路１２の流体は、細胞成長チャンバーにおいて中空系の毛細管内側（ＩＣ）空間を流れる。従って、第１流体循環路１２を「ＩＣループ」と呼ぶ。第２流体循環路１４の流体は、細胞成長チャンバーにおいて中空系の毛細管外側（ＥＣ）空間を流れる。従って、第２流体循環路１４を「ＥＣループ」と呼ぶ。第１流体循環路１２の流体は、第２流体循環路１４の流体の流れに対して、並流方向又は逆流方向のどちらを流れてもよい。

【００２１】

流体入口路４４は、第１流体循環路１２に流体的に関連付けられる。流体入口路４４によって、流体は第１流体循環路１２に導入され、流体出口路４６によって、流体は、ＣＥＳ１０から排出される。第３流量コントローラ４８が、流体入口路４４に動作可能に関連付けられる。或いは、第３流量コントローラ４８は、流体出口路４６に関連付けられてもよい。

40

【００２２】

ここで使用される流量コントローラとしては、ポンプ、バルブ、クランプ、又はそれらの組み合わせが可能である。複数のポンプ、複数のバルブ、複数のクランプを、任意に組み合わせ配置してもよい。種々の実施形態において、流量コントローラは、蠕動ポンプであるか又は蠕動ポンプを含む。他の実施形態において、流体循環路、入口ポート、出口ポートは、任意の材料の配管で構成されてよい。

【００２３】

50

種々の部材に対して、「動作可能に関連付けられた」と記載されているが、ここで使用される「動作可能に関連付けられた」とは、動作可能な方式で互いに連結された部材を指し、部材が直接連結されている実施形態や、2つの連結された部材の間に別の部材が配置されている実施形態等も包含する。「動作可能に関連付けられた」部材は、「流体的に関連付けられる」ことができる。「流体的に関連付けられた」とは、流体が部材間を移動可能なように互いに連結された部材を指す。「流体的に関連付けられた」という用語は、2つの流体的に関連付けられた部材間に別の部材を配置する実施形態や、部材を直接接続する実施形態等を包含する。流体的に関連付けられた部材は、流体と接触しないが他の部材と接触することにより、システムを操作する部材を含んでもよい（例えば、可撓性の管の外側を圧縮することにより、該管を介して流体をポンピングする蠕動ポンプ等）。

10

#### 【0024】

一般に、緩衝液、タンパク質含有流体、細胞含有流体のように、如何なる種類の流体でも、循環路、入口路、出口路を流れることが可能である。本明細書で使用される用語「流体」「培地」「流体培地」は交換可能に使用される。

#### 【0025】

図1Bは、細胞増殖システム800をより詳細に示している。CES800は、第1流体循環路802（「毛細管内側ループ」又は「ICループ」とも呼ぶ）と第2流体循環路804（「毛細管外側ループ」又は「ECループ」とも呼ぶ）とを有する。第1流体循環路806は、第1流体循環路802を介して、細胞成長チャンバー801に流体的に関連付けられる。流体は、IC入口ポート801Aを介して細胞成長チャンバー801に流入し、細胞成長チャンバー801内の中空系を通して、IC出口ポート801Bを介して流出する。圧力センサ810は、細胞成長チャンバー801を離れる培地の圧力を測定する。圧力の他に、センサ810は、作動中において、培地圧力及び培地温度を検知する温度センサであってもよい。培地は、培地流量（例えば、ICループにおける循環レート）を制御するために用いられるIC循環ポンプ812を介して、流れる。IC循環ポンプ812は、第1方向又は第1方向の反対の第2方向に、流体をポンピング可能である。出口ポート801Bは、逆方向では、入口として使用することができる。ICループ802に流入する培地は、バルブ814を介して流入することができる。当業者であれば理解できるように、追加のバルブ及び/又は他の装置を種々の位置に配置して、流体経路のある部分において、培地を隔離し及び/又は該培地の特性を測定することもできる。従って、示される概略図は、CES800の要素に対する1つの可能な構成であり、1以上の実施形態の範囲において、変形可能であると理解されるべきである。

20

30

#### 【0026】

ICループ802に対して、培地のサンプルは、動作中に、サンプルコイル818から得られる。そして、培地は、IC入口ポート801Aに戻って、流体循環路802を完了する。細胞成長チャンバー801で成長/増殖した細胞は、細胞成長チャンバー801から流し出され、バルブ898及びライン897を介して収穫バッグ899に入る。或いは、バルブ898が閉じている場合、細胞は、チャンバー801に再分配され（例えば、循環して戻され）、さらに成長されるか又は投入される。

#### 【0027】

第2流体循環路804において、流体は、EC入口ポート801Cを介して、細胞成長チャンバー801に入り、EC出口ポート801Dを介して細胞成長チャンバー801を離れる。ECループ804では、培地は、細胞成長チャンバー801の中空系の外側と接触し、それによって、チャンバー801内における小分子の中空系への及び中空系からの拡散が可能となる。

40

#### 【0028】

培地が細胞成長チャンバー801のEC空間に入る前に、第2流体循環路804に配置された圧力/温度センサ824によって、該培地の圧力及び温度が測定される。培地が細胞成長チャンバー801を離れた後、センサ826によって、第2流体循環路804の培地の圧力及び温度が測定される。ECループ804に対して、培地のサンプルは、動作中

50



に、サンプルポート 830 から又はサンプルコイルから得られる。

【0029】

細胞成長チャンバー 801 の EC 出口ポート 801D を離れた後、第 2 流体循環路 804 の流体は、EC 循環ポンプ 828 を通って、ガス輸送モジュール 832 に至る。EC 循環ポンプ 828 は、両方向に流体をポンピング可能である。第 2 流体流路 822 は、ガス輸送モジュール 832 の入口ポート 832A 及び出口ポート 832B を介してガス輸送モジュール 832 と流体的に関連付けられている。動作中は、流体培地は、入口ポート 832A を介して、ガス輸送モジュール 832 に流入し、出口ポート 832B を介して、ガス輸送モジュール 832 から流出する。ガス輸送モジュール 832 は、CES 800 における培地に対して、酸素を付加し、気泡を除去する。種々の実施形態において、第 2 流体循環路 804 における培地は、ガス輸送モジュール 832 に入るガスと平衡状態にある。ガス輸送モジュール 832 は、当分野で知られているような、酸素供給又はガス輸送に有用な、適当なサイズの任意の装置でよい。空気又はガスは、フィルタ 838 を介してガス輸送モジュール 832 に流入し、フィルタ 840 を介して、酸素供給器又はガス輸送装置 832 から流出する。フィルタ 838、840 は、酸素供給器 832 及び関連する培地の汚染を減少又は防止する。プライミング工程の一部を行っている際に CES 800 からパー

10

【0030】

CES 800 として示された該構成において、第 1 流体循環路 802 及び第 2 流体循環路 804 における流体培地は、同じ方向で（並流構成で）細胞成長チャンバー 801 を流れる。CES 800 は、対向流で流れるように構成してもよい。

20

【0031】

少なくとも 1 つの実施形態において、（細胞容器、例えばバッグのようなソースからの）細胞を含む培地は、取り付け点 862 に取り付けられ、培地源からの流体培地は、取り付け点 846 に取り付けられる。細胞及び培地は、第 1 流体流路 806 を介して第 1 流体循環路 802 に導入される。取り付け点 862 は、バルブ 864 を介して、第 1 流体流路 806 と流体的に関連付けられる。取り付け点 846 は、バルブ 850 を介して、第 1 流体流路 806 と流体的に関連付けられる。試薬源を、点 844 に流体的に関連付けて、バルブ 848 を介して流体入口路 842 に関連付けてもよいし、又はバルブ 848 及び 872 を介して第 2 流体入口路 874 に関連付けてもよい。

30

【0032】

空気除去チャンバー（ARC）856 が、第 1 循環路 802 に流体的に関連付けられる。空気除去チャンバー 856 は、1 以上のセンサを有してもよい。該センサには、空気除去チャンバー 856 内における特定の測定点において、空気、流体の不足、及び / 又はガス / 流体境界、例えば、空気 / 流体境界、を検知するための上部センサ及び下部センサが含まれる。例えば、空気除去チャンバー 856 の底部近傍及び / 又は頂部近傍で、超音波センサを用いて、それらの場所における空気、流体、及び / 又は空気 / 流体境界を検知することができる。実施形態において、本開示の範囲を逸脱しない範囲で、他のタイプのセンサを使用することができる。例えば、本開示の実施形態に従って、光学センサを使用してもよい。プライミング工程の一部又はその他のプロトコルを行っている際に CES 800 からパー

40

【0033】

EC 培地源が、EC 培地取り付け点 868 に取り付けられる。洗浄液源が、洗浄液取り付け点 866 に取り付けられる。これにより、EC 培地及び / 又は洗浄液が第 1 流体流路又は第 2 流体流路に付加される。取り付け点 866 は、バルブ 870 と流体的に関連付けられる。バルブ 870 は、バルブ 872 及び第 1 流体入口路 842 を介して第 1 流体循環路 802 と流体的に関連付けられる。また、バルブ 870 を開け、バルブ 872 を閉じることにより、取り付け点 866 は、第 2 流体入口路 874 及び EC 入口路 884 を介して第 2 流体循環路 804 と流体的に関連付けることができる。同様に、取り付け点 868 は

50

、バルブ 876 と流体的に関連付けられる。バルブ 876 は、第 1 流体入口路 842 及びバルブ 872 を介して第 1 流体循環路 802 と流体的に関連付けられる。また、バルブ 876 を開け、バルブ 872 を閉じることにより、流体容器 868 は、第 2 流体入口路 874 と流体的に関連付けることができる。

【0034】

ＩＣループ 802 において、流体はまず、ＩＣ入口ポンプ 854 によって送られる。ＥＣループ 804 では、流体はまず、ＥＣ入口ポンプ 878 によって送られる。超音波センサのようなエア検知器 880 がＥＣ入口路 884 と関連付けられてもよい。

【0035】

少なくとも 1 つの実施形態において、第 1 及び第 2 流体循環路 802、804 は、廃棄ライン 888 と接続される。バルブ 890 を開けると、ＩＣ培地は、廃棄ライン 888 を流れ、廃棄バッグ 886 に至る。同様に、バルブ 892 を開けると、ＥＣ培地は、廃棄バッグ 886 に流れる。

【0036】

細胞が細胞成長チャンバー 801 にて成長した後、該細胞は、細胞収穫路 897 を介して収穫される。細胞成長チャンバー 801 からの細胞は、バルブ 898 を開けた状態において、細胞を含むＩＣ培地をポンピングすることにより、細胞収穫路 897 を介して、細胞収穫バッグ 899 に収穫される。

【0037】

ＣＥＳ 800 の各部品は、細胞増殖機のような装置又はハウジング 899 内に收容され、該装置は、細胞及び培地を所定温度に維持する。ある実施形態において、ＣＥＳ 800 の部品は、ＣＥＳ 10 (図 1 A) 又はＣＥＳ 900 (図 1 C) のような他のＣＥＳと組み合わせてもよい。他の実施形態において、ＣＥＳは、本開示の範囲内において、図 1 A ~ 図 1 C に示されるよりも少ない部品を含んでもよい。

【0038】

図 1 C は、ＣＥＳの他の実施形態を示す。ＣＥＳ 900 は、第 1 流体循環路 902 (「毛細管内側 (ＩＣ) ループ」とも呼ぶ) と、第 2 流体循環路 904 (「毛細管外側ループ」又は「ＥＣループ」とも呼ぶ) とを有する。

【0039】

第 1 流体流路 906 は、第 1 流体循環路 902 を介して、細胞成長チャンバー 908 と流体的に関連付けられる。流体は、入口ポート 910 を通って、細胞成長チャンバー 908 に流入し、細胞成長チャンバー 908 内の中空系を通り、出口ポート 907 を介して外に出る。圧力計 917 は、細胞成長チャンバー 908 を離れる培地の圧力を測定する。培地は、バルブ 913 及びポンプ 911 を介して流通する。バルブ 913 及びポンプ 911 は、培地の流量を制御するために使用される。培地のサンプルは、動作中に、サンプルポート 905 又はサンプルコイル 909 から得ることができる。第 1 流体循環路 902 に配置された圧力 / 温度計 915 によって、動作中における培地圧力及び培地温度が検知できる。培地は、入口ポート 910 に戻って、流体循環路 902 を完了する。細胞成長チャンバー 908 で増殖した細胞は、細胞成長チャンバー 908 から流し出されるか又はさらなる成長のために中空系内に再分配される。

【0040】

第 2 流体循環路 904 は、細胞成長チャンバー 908 とループ状で流体的に関連付けられた第 2 流体流路 912 を有する。第 2 流体循環路 904 において、流体は、入口ポート 914 を介して細胞成長チャンバー 908 に入り、出口ポート 916 を介して細胞成長チャンバー 908 を離れる。培地は、細胞成長チャンバー 908 内の中空系の外側と接触することにより、小分子が、中空系へ及び中空系から拡散可能となる。

【0041】

培地が細胞成長チャンバー 908 のＥＣ空間に入る前に、第 2 循環路 904 に配置された圧力 / 温度計 919 によって、該培地の圧力及び温度が測定可能である。培地が細胞成長チャンバー 908 を離れた後、圧力計 921 によって、第 2 循環路 904 において該培

10

20

30

40

50

地の圧力が測定可能である。

【 0 0 4 2 】

第 2 流体循環路 9 0 4 において、流体は、細胞成長チャンバー 9 0 8 の出口ポート 9 1 6 を離れた後、ポンプ 9 2 0 及びバルブ 9 2 2 を通って、酸素供給器 9 1 8 へ至る。第 2 流体流路 9 1 2 は、酸素供給器入口ポート 9 2 4 及び酸素供給器出口ポート 9 2 6 を介して酸素供給器 9 1 8 と流体的に関連付けられる。動作において、流体培地は、酸素供給器入口ポート 9 2 4 を通って、酸素供給器 9 1 8 に流入し、酸素供給器出口ポート 9 2 6 を通って、酸素供給器 9 1 8 から流出する。

【 0 0 4 3 】

酸素供給器 9 1 8 は、CES 9 0 0 の培地に酸素を付加する。種々の実施形態において、第 2 流体循環路 9 0 4 の培地は、酸素供給器 9 1 8 に入るガスと平衡状態にある。酸素供給器は、当分野で知られる如何なる酸素供給器でもよい。ガスは、フィルタ 9 2 8 を通って、酸素供給器 9 1 8 に入り、フィルタ 9 3 0 を通って、酸素供給器 9 1 8 から出る。フィルタ 9 2 8、9 3 0 は、酸素供給器 9 1 8 及び関連する培地の汚染を減少又は防止する。

10

【 0 0 4 4 】

CES 9 0 0 として示された構成において、第 1 循環路 9 0 2 及び第 2 循環路 9 0 4 における流体培地は、細胞成長チャンバー 9 0 8 を同じ方向（並流構成）に流れる。CES 9 0 0 は、対向流構成にしてもよいことは、当業者であれば理解できよう。また、入口ポート及び出口ポートは、細胞成長チャンバー 9 0 8 において如何なる箇所に配置してもよいことは、当業者であれば理解できよう。

20

【 0 0 4 5 】

細胞と流体培地は、第 1 流体入口路 9 3 2 を介して流体循環路 9 0 2 に導入される。流体容器 9 3 4 はバルブ 9 3 8 を介して、流体容器 9 3 6 はバルブ 9 4 0 を介して、それぞれ第 1 流体入口路 9 3 2 と流体的に関連付けられる。同様に、細胞容器 9 4 2 は、バルブ 9 4 3 を介して、第 1 流体循環路 9 0 2 と流体的に関連付けられる。いくつかの実施形態において、細胞及び流体は、熱交換器 9 4 4、ポンプ 9 4 6 を通って、ドリップチャンバー 9 4 8 に導入される。細胞容器 9 4 2 からの細胞を熱交換器 9 4 4 に通す実施形態では、追加ライン（図示せず）を用いて、細胞容器 9 4 2 を熱交換器 9 4 4 に接続してもよい。ドリップチャンバー 9 4 8 は、第 1 循環路 9 0 2 と流体的に関連付けられる。ドリップチャンバー 9 4 8 からのオーバーフローは、バルブ 9 5 2 を介してオーバーフローライン 9 5 0 から流れ出す。

30

【 0 0 4 6 】

流体容器 9 5 4 及び 9 5 6 から、流体が、第 1 及び第 2 流体循環路 9 0 2、9 0 4 に追加される。流体容器 9 5 4 は、バルブ 9 5 8 と流体的に関連付けられる。バルブ 9 5 8 は、バルブ 9 6 4、流路 9 6 0 及び流路 9 3 2 を介して第 1 流体循環路 9 0 2 と流体的に関連付けられる。また、流体容器 9 5 4 は、第 2 流体入口路 9 6 2 と流体的に関連付けられる。同様に、流体容器 9 5 6 は、バルブ 9 6 6 と流体的に関連付けられ、バルブ 9 6 6 は、第 1 流体入口路 9 6 0 を介して第 1 流体循環路 9 0 2 と流体的に関連付けられる。また、流体容器 9 5 6 は、第 2 流体入口路 9 6 2 と流体的に関連付けられる。

40

【 0 0 4 7 】

第 2 流体入口路 9 6 2 は、流体がドリップチャンバー 9 7 0 に入る前に熱交換器 9 4 4 及びポンプ 9 6 8 を流れるように構成される。第 2 流体入口路 9 6 2 は、第 2 流体循環路 9 0 4 へと続く。流体のオーバーフローは、バルブ 9 7 4 を通って、オーバーフローライン 9 7 2 を経由して、廃棄容器 9 7 6 へ向かう。

【 0 0 4 8 】

細胞は、細胞収穫路 9 7 8 を介して収穫される。細胞成長チャンバー 9 0 8 からの細胞は、バルブ 9 8 2 を開けた状態で、該細胞を含む培地をポンピングすることにより、細胞収穫路 9 7 8 を通って、細胞収穫バッグ 9 8 0 へ収穫される。

【 0 0 4 9 】

50

第1及び第2流体循環路902、904は、接続路984によって、接続される。バルブ986を開けると、培地は、接続路984を介して、第1循環路902と第2循環路904との間を流れることができる。同様に、ポンプ990は、別の接続路988を介して、第1流体循環路902と第2流体循環路904との間において、培地をポンピングすることができる。

【0050】

CES900の各部品は、インキュベーター999に収容される。インキュベーター999は、細胞及び培地を一定温度に保つ。

【0051】

当業者であれば理解できるように、任意の数の流体容器（例えば、培地バッグ）を、任意の組み合わせで、CES900と流体的に関連付けることができる。さらに、ドリップチャンバー948の位置又はドリップチャンバー948とは独立のセンサの位置は、CES900において、入口ポート910の前の任意の位置にしてよい。

【0052】

CES800及び900は、他の部品を含んでもよい。例えば、CESにおける蠕動ポンプの位置に、1以上のポンプルーブ（図示せず）を付加することができる。ポンプルーブは、例えばポリウレタン（PU）（Tygotherane C-210Aとして市販）から形成することができる。また、蠕動ポンプ用の配管ルーブを含む、配管ラインを構成するためのカセットを、使い捨ての部分として、含んでもよい。

【0053】

いくつかの実施形態において、着脱可能な流れ回路（「着脱式循環モジュール」とも呼ぶ）を設けてもよい。着脱可能な流れ回路は、CESの永久固定された部分に取り付けるように構成された細胞増殖モジュールの一部であってもよい。通常、CESの固定部分は、蠕動ポンプを含む。種々の実施形態において、CESの固定部分は、バルブ及び/又はクランプを含むことができる。

【0054】

着脱可能な流れ回路は、少なくとも2つの端部を有する第1流体流路を含むことができる。第1流体流路の第1の端部は、細胞成長チャンバーの第1端部と流体的に関連付けられるように構成され、第1流体流路の第2の端部は、細胞成長チャンバーの第2端部と流体的に関連付けられるように構成される。

【0055】

同様に、着脱可能な流れ回路は、少なくとも2つの端部を有する第2流体流路を含むことができる。着脱可能な流れ回路の一部は、酸素供給器及び/又はバイオリアクターと流体的に関連付けられるように構成することができる。着脱可能な流れ回路は、酸素供給器及び細胞成長チャンバーと流体的に関連するように構成される第2流体流路を含むことができる。

【0056】

種々の実施形態において、着脱可能な流れ回路は、取り外し可能に且つ使い捨て方式で、流量コントローラに取り付けてよい。着脱可能な流れ回路は、CESのいくつかの部分に接続する着脱可能な流体管（例えば、可撓性チューブ）を含むことができる。

【0057】

他の実施形態において、着脱可能な流れ回路は、細胞成長チャンバーと、酸素供給器と、培地及び細胞を含むバッグとを含む。種々の実施形態において、各部品は、一体に接続されていてもよいし、別体でもよい。さらに、着脱可能な流れ回路は、バルブ、ポンプ及びそれらの組み合わせのような流体流量コントローラが取り付けられるように構成された1以上の部分を含むことができる。蠕動ポンプを使用する形態においては、着脱可能な流れモジュールは、配管の蠕動部分の周りに取り付けられるように構成された蠕動ルーブを含む。他の実施形態では、蠕動ルーブは、循環路、入口路、出口路と流体的に関連付けられるように構成される。着脱可能な流れ回路は、ポンプやバルブのような流体流量コントローラへの組み付けのための説明書に従って、キットの形式で組み立てられてもよい。

## 【0058】

実施形態においては、細胞をCESのバイオリアクターに導入するために種々の方法が用いられる。以下で詳細に説明するように、実施形態は、細胞の着実な増殖を促進するために、バイオリアクター内において細胞を分配する方法及びシステムを含む。

## 【0059】

実施形態によれば、細胞は、ICループ又はECループにおいて、成長（増殖）される。接着性懸濁細胞及び非接着性懸濁細胞が増殖される。一実施形態において、細胞成長チャンバーの中空系の内腔は、フィブロネクチンがコーティングされる。2価陽イオンを含まない（例えば、カルシウム及びマグネシウムを含まない）PBSがCESシステムに付加される。接着性細胞が細胞成長チャンバー（例えば、チャンバー24、801、908）に導入された後、それら細胞が中空系に付着するように、十分な時間で培養される。IC及びEC培地は、十分な栄養が細胞に確実に供給されるように、循環させられる。

## 【0060】

ICループ及びECループの流量は、ある特定の値に調整される。種々の実施形態において、ICループ及びECループの流量はそれぞれ独立に、約2、約4、約6、約8、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約200、約300、約400、又は約500 mL / 分に設定される。種々の実施形態において、IC回路ループの流量は、約10～約20 mL / 分に、EC回路ループの流量は、約20～約30 mL / 分（培地が酸素供給器を流れて酸素レベルを回復可能な程度）に設定される。ガス交換/酸素供給器832及び918のようなガス交換モジュールを通じて蒸発する培地を補うため、追加の培地が、低い流量（例えば、いくつかの実施形態では0.1 mL / 分）で、CES内にポンピングされてよい。種々の実施形態において、ECループは細胞廃棄物（cellular waste）を除去し、ICループは培地内に成長因子を含む。

## 【0061】

これらCESは、様々な成長条件及び成長基準において、大きな自由度を提供できる。培地を連続循環させることによって、細胞を、ICループ内において、懸濁状態にしておくことができる。又は、培地循環を停止することで、細胞を沈殿（settle）させることもできる。限外濾過によって、新鮮な培地をICループに付加して、細胞を取り去ることなく、余剰体積を調整することができる。EC培地循環によって、ガス、栄養、廃棄物の交換を可能とし、また、細胞を取り去ることなく、新しい培地の付加が可能となる。

## 【0062】

当分野において、増殖される細胞としては、接着性細胞、非接着性細胞、又はそれら細胞を任意の組み合わせで共培養したものが挙げられる。実施形態に係るCESにおいて成長される細胞の例としては、限定はされないが、例えば、幹細胞（例えば、間葉細胞、造血細胞等）、線維芽細胞、角化細胞、前駆細胞、その他の完全分化細胞、又はそれらの組み合わせが挙げられる。

## 【0063】

実施形態において、接着性細胞を収穫するため、IC培地及びEC培地を、2価陽イオンを含まない培地（例えば、2価陽イオンフリーPBS）に置換する。一実施形態において、トリプシンを第1循環路に投入し、ある時間の間（いくつかの実施形態では、約5分から約10分）、接着性細胞を培養する。そして、該トリプシンをシステムから排出する。細胞成長チャンバーにおける流量を増やすことによって、細胞にせん断力を付加し、細胞成長チャンバーから離脱される接着性細胞を、細胞収穫バッグへポンピングする。

## 【0064】

非接着性細胞を増殖する場合、該細胞は、循環しているIC回路から放出することができる。非接着性細胞を取り出しながら、接着性細胞は細胞成長チャンバー内に維持している。

## 【0065】

前記CESを用いて、様々な細胞増殖方法を実行することができる。一実施形態におい

10

20

30

40

50

て、播種した細胞集団を増殖させることができる。細胞は、CESに、導入すなわち播種される。ある状況では、細胞接着が可能となるように、中空系の内腔状態が調整される。そして、細胞は細胞成長チャンバーに付加され、接着性細胞が中空系に接着し、非接着性細胞（例えば、造血幹細胞すなわちHSC）は接着しない。非接着性細胞は、システムから放出される。ある時間の間、培養した後、接着性細胞は、取り離され収穫される。

【0066】

実施形態において、細胞増殖システムの細胞成長チャンバーは、中空系膜を有する。該中空系膜は、複数の半透過性中空系から構成され、第1流体循環路と第2流体循環路とを分離している。

【0067】

CESは、回転方向及び/又は横方向揺動装置に取り付けることによって、細胞増殖システムの他の部品に対して細胞成長チャンバーを動かす、すなわち「揺らす」ように構成された装置を有する。図1Dは、そのような装置の1つを示す。該装置において、バイオリアクター400は、2つの回転方向揺動部品に回転するように接続され、さらに1つの横方向揺動部品に接続されている。

【0068】

第1回転方向揺動装置部品402は、バイオリアクター400を、バイオリアクターの中心軸410を中心に回転させる。バイオリアクター400は、横方向揺動装置404にも接続されている。回転方向揺動装置部品402は、バイオリアクター400に、回転するように関連付けられる。そして、回転方向揺動装置402は、バイオリアクター400を、バイオリアクターの中心軸410を中心に回転させる。回転は、時計回り又は反時計回りの方向に可能である。バイオリアクター400は、中心軸410を中心に、単一方向（時計回り方向又は反時計回り方向）に連続して回転させることができる。或いは、バイオリアクター400は、中心軸410を中心に、最初は時計回り、続いて反時計回りのように、交互に回転させることも可能である。

【0069】

CESはまた、バイオリアクター400を回転軸412中心に回転させる第2回転方向揺動部品を有する。回転軸412は、バイオリアクター400の中心点を通り、中心軸410に対して垂直である。バイオリアクター400は、回転軸412を中心に、時計回り方向又は反時計回り方向のいずれかの単一方向に連続回転可能である。或いは、バイオリアクター400は、回転軸412を中心に、最初は時計回り、続いて反時計回りのように、交互に回転させることが可能である。種々の実施形態において、バイオリアクター400を、回転軸412を中心に回転させることが可能であり、重力に対して水平方向姿勢に又は垂直方向姿勢に配置することができる。

【0070】

横方向揺動部品404は、バイオリアクター400と横方向に動くように関連付けられる。横方向揺動部品404の平面は、X方向及びY方向に動く。これにより、バイオリアクター400における細胞の沈殿は、中空系内の細胞含有培地の動きに伴って、減らされる。

【0071】

揺動装置の回転方向及び/又は横方向の動きによって、装置内における細胞の沈殿が減らされ、また、バイオリアクター400のある部分に細胞が捕獲される可能性も抑えられる。細胞成長チャンバー（例えば、バイオリアクター400）における細胞の沈殿速度は、ストークスの式に従って、細胞と懸濁培地との密度差に比例する。ある実施形態において、上述のように、180度回転（速い）と休止（合計時間30秒）を繰り返すことにより、非接着性の赤血球の懸濁状態を維持する。いくつかの実施形態では、約180度の最小回転が行われる。しかしながら、他の実施形態では、360度以上の回転を行うこともできる。異なる揺動部品を別個に又は組み合わせて使用してもよい。例えば、バイオリアクター400を中心軸410中心に回転させる揺動部品を、バイオリアクター400を軸412中心に回転させる揺動部品と組み合わせることができる。同様に、異なる軸を中心

10

20

30

40

50

に時計回り及び反時計回りを独立に組み合わせで行うこともできる。

【 0 0 7 2 】

上述の揺動装置及び該装置の部品は、適当な構造を用いることで、実施形態において実行することができる。例えば、実施形態において、1以上のモータを揺動装置として、又は揺動装置の部品（例えば、402及び404）として使用できる。一実施形態において、揺動装置は、2013年3月19日発行の米国特許第8,339,245号明細書（タイトル：細胞増殖システムの細胞成長チャンバ用回転システム及びその使用方法）に示される実施形態を用いて、実施することもできる。該米国特許の全体は、ここでの開示により本出願に組み込まれる。

【 0 0 7 3 】

細胞成長チャンバーの一実施形態が、図2B及び図2Aに示される。「バイオリアクター」と呼ばれる中空系型細胞成長チャンバー200が一部切欠側面図で示されている。細胞成長チャンバー200は、細胞成長チャンバーハウジング202に収納されている。細胞成長チャンバーハウジング202は、4つの開口部すなわち4つのポート（入口ポート204、出口ポート206、入口ポート208、出口ポート210）を有する。

【 0 0 7 4 】

第1循環路の流体は、入口ポート204を通して細胞成長チャンバー200に入り、複数の中空系212の毛細管内側（中空系膜の毛細管内側（IC）又はIC空間とも呼ぶ）を通して、出口ポート206を介して細胞成長チャンバー200から出る。用語「中空系」、「中空系毛細管」、及び「毛細管」は、交換可能である。複数の中空系212は集合的に「膜」と呼ばれる。第2循環路の流体は、入口ポート208を通して細胞成長チャンバーに入り、中空系212の外側（膜のEC側又はEC空間とも呼ぶ）と接触し、出口ポート210を介して細胞成長チャンバー200から出る。細胞は、第1循環路又は第2循環路に含ませることが可能であり、膜のIC側又はEC側のどちらにも存在させることができる。

【 0 0 7 5 】

細胞成長チャンバーハウジング202は、円筒状として図示されているが、当分野で知られるような任意の形状が可能である。細胞成長チャンバーハウジング202は、任意のタイプの生体適合性ポリマー材料から作製することができる。細胞成長チャンバーハウジングは、異なる形状、異なるサイズでもよい。

【 0 0 7 6 】

用語「細胞成長チャンバー」が用いられるが、CESにおいて成長又は増殖される全ての細胞が細胞成長チャンバーで成長されるとは限らないことは、当業者であれば理解できるように。多くの実施形態において、接着性細胞は、成長チャンバーに配置された膜に接着するか、又は関連する配管内において成長する。非接着性細胞（「懸濁細胞」とも呼ぶ）も同様に成長される。細胞は、第1又は第2流体循環路内の他の領域で成長されることもできる。

【 0 0 7 7 】

例えば、中空系212の端部は、接続材（本明細書で「ポッティング」又は「ポッティング材」とも呼ぶ）によって細胞成長チャンバー200の側部にポッティングされる。ポッティング材は、培地及び細胞の中空系内への流れを妨害しないのであれば且つIC入口ポートを介して細胞成長チャンバー200に流入する液体を中空系212だけに流入させるようにできるのであれば、中空系212を束ねるのに適する任意の材料でよい。ポッティング材の例として、ポリウレタン又は他の適切な結束材又は接着材が挙げられるが、これらに限定されない。種々の実施形態において、流体がIC側に対して流入及び流出可能となるように、中空系212及びポッティングは、各端部において、中空系212の中心軸に対して垂直に切断されてよい。端部キャップ214及び216が、細胞成長チャンバーの端部に配置される。

【 0 0 7 8 】

入口ポート208を通して細胞成長チャンバー200に入る流体は、中空系212の外

10

20

30

40

50

側に接触する。中空系型細胞成長チャンバーのこの部分は、「毛細管外側（ＥＣ）空間」と呼ばれる。小分子（例えば、水、酸素、乳酸塩等）は、中空系２１２を通じて中空系の内部からＥＣ空間へ、又はＥＣ空間からＩＣ空間へ拡散することができる。成長因子のような高分子量の分子は、通常は、大きすぎるため中空系２１２を通過できず、中空系のＩＣ空間内にとどまる。細胞をＩＣ空間で成長させる実施形態の場合、ＥＣ空間は、栄養を細胞に供給し細胞代謝の副生成物を取り去るための培地貯蔵部として使用される。培地は、必要であれば交換してもよい。また、必要であれば、培地を酸素供給装置を通じて循環させて、ガスを交換してもよい。

#### 【００７９】

種々の実施形態において、細胞は、注射器を含む任意の方法で、中空系２１２に投入される。細胞は、細胞成長チャンバーと流体的に関連付けられるバッグのような流体容器から細胞成長チャンバー２００に導入されてもよい。

#### 【００８０】

中空系２１２は、毛細管内側空間内で（すなわち、中空系内腔内で）細胞を成長できるように構成される。中空系２１２は、培地の中空系内腔における流れを妨げることなく、細胞が内腔に接着できる程度に十分な大きさである。種々の実施形態において、中空系の内径は、約１００００、約９０００、約８０００、約７０００、約６０００、約５０００、約４０００、約３０００、約２０００、約１０００、約９００、約８００、約７００、約６５０、約６００、約５５０、約５００、約４５０、約４００、約３５０、約３００、約２５０、約２００、約１５０、又は約１００μｍ以上である。同様に、中空系の外径は、約１００００、約９０００、約８０００、約７０００、約６０００、約５０００、約４０００、約３０００、約２０００、約１０００、約９００、約８００、約７００、約６５０、約６００、約５５０、約５００、約４５０、約４００、約３５０、約３００、約２５０、約２００、約１５０、又は約１００μｍ以下である。中空系の壁厚は、いくつかの実施形態において、小分子が拡散するのに十分な厚さであるべきである。

#### 【００８１】

中空系が細胞成長チャンバーの入口ポート及び出口ポートと流体的に関連付けられることができるのであれば、細胞成長チャンバーにおいて、任意の数の中空系を使用することができる。種々の実施形態において、細胞成長チャンバーは、約１０００、約２０００、約３０００、約４０００、約５０００、約６０００、約７０００、約８０００、約９０００、約１００００、約１１０００、又は約１２０００以上の数の中空系を有する。他の実施形態において、細胞成長チャンバーは、約１２０００、約１１０００、約１００００、約９０００、約８０００、約７０００、約６０００、約５０００、約４０００、約３０００、又は約２０００以下の数の中空系を有する。他の実施形態において、中空系の長さは、約１００、約２００、約３００、約４００、約５００、約６００、約７００、約８００、又は約９００mm以上である。実施形態において、細胞成長チャンバーは、平均長約２９５mm、平均内径２１５μｍ、平均外径約３１５μｍの中空系を約９０００本、有する。

#### 【００８２】

中空系は、細胞成長チャンバーの入口ポートから出口ポートへ液体が移動可能な系（fiber）を形成できる程度に十分なサイズを構成することが可能な任意の材料で構成することができる。種々の実施形態において、中空系は、接着性幹細胞（例えば、MSC）のような、ある特定のタイプの細胞を結合可能なプラスチックの接着性材料から構成可能である。種々の実施形態において、中空系は、フィブロネクチンのような化合物で処理されて、接着性表面が形成される。

#### 【００８３】

ある実施形態において、中空系は、半透過性の生体適合性ポリマー材料から作製される。そのようなポリマー材料としては、ポリアミドとポリアリルエーテルスルホンとポリビニルピロリドンの混合物（ここでは、「PA/PAES/PVP」と呼ぶ）がある。半透

10

20

30

40

50



過性膜によって、栄養、廃棄物、溶存ガスは該膜を通じてEC空間とIC空間との間で移動可能となる。種々の実施形態において、中空系膜の分子移動特性は、代謝廃棄生成物が膜を通じて中空系内腔側に拡散して取り出されるようにすると同時に、細胞成長に必要とされる高価な試薬（成長因子、サイトカイン等）の中空系からの損失を最小限にするように選択される。

#### 【0084】

ある変形例では、PA/PAES/PVP中空系の外側層は、規定の表面粗さを有する一様な細孔構造によって特徴付けられる。細孔の開口は、約0.5 μmから約3 μmの範囲のサイズであり、中空系の外側表面の細孔数は、1平方ミリメートル当たり約10,000から約150,000の範囲の数である。この外側層は、約1 μmから約10 μmの厚さを有する。次の層は、スポンジ構造を有する第2層であり、ある実施形態では、約1 μmから約15 μmの厚さを有する。この第2層は、前記外側層の支持体として機能する。第2層の隣の第3層は、指状構造を有する。この第3層によって機械的安定性が得られ、また、分子の膜移動抵抗が低くなるような高い空隙容量が提供される。使用中は、指状空隙は流体で満たされ、該流体によって、拡散及び対流における抵抗は、空隙容量が小さいスポンジ充填（sponge-filled）構造を有するマトリックスの場合よりも、低くなる。この第3層は、約20 μmから約60 μmの厚さを有する。

#### 【0085】

他の実施形態において、中空系膜は、約65重量%から約95重量%の少なくとも1つの疎水性ポリマーと、約5重量%から約35重量%の少なくとも1つの親水性ポリマーと、を有する。疎水性ポリマーは、ポリアミド（PA）、ポリアラミド（PAA）、ポリアリルエーテルスルホン（PAES）、ポリエーテルスルホン（PES）、ポリスルホン（PSU）、ポリアリルスルホン（PASU）、ポリカーボネート（PC）、ポリエーテル、ポリウレタン（PUR）、ポリエーテルイミド、及びポリエーテルスルホンのような任意の上記ポリマーの共重合体混合物、又はポリアリルエーテルスルホンとポリアミドの混合物からなる群から選択されることができる。親水性ポリマーは、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリグリコールモノエステル（polyglycol monoester）、水溶性セルロース誘導体、ポリソルベート、ポリエチレン-ポリプロピレンオキサイド共重合体からなる群から選択されることができる。

#### 【0086】

細胞成長チャンバーで増殖させる細胞のタイプに応じて、高分子系は、フィブロンectinのような物質によって処理され、細胞成長及び/又は細胞の膜への接着が高められる。

#### 【0087】

図3は、他の細胞成長チャンバー例、バイオリアクター300、の切欠側面図を示す。バイオリアクター300は、長手方向軸LA-LAを有し、バイオリアクターハウジング304を備える。少なくとも1つの実施形態において、バイオリアクターハウジング304は、4つの開口部又は4つのポート、すなわち、IC入口ポート308、IC出口ポート320、EC入口ポート328、EC出口ポート332を有する。

#### 【0088】

第1循環路内の流体は、バイオリアクター300の第1の長手方向端312におけるIC入口ポート308を通してバイオリアクター300に進入し、複数の中空系316の毛細管内側（種々の実施形態において、中空系膜の毛細管内（「IC」）側又は「IC空間」と呼ぶ）に進入して通過し、バイオリアクター300の第2の長手方向端324に位置するIC出口ポート320を通してバイオリアクター300の外に出る。第2循環路内の流体は、EC入口ポート328を通してバイオリアクター300に進入し、中空系316の毛細管外側又は外側（該膜の「EC側」又は「EC空間」と呼ぶ）に接触して、EC出口ポート332を通してバイオリアクター300の外に出る。EC入口ポート328を通してバイオリアクターに入った流体は、中空系の外側に接触する。小分子（例えば、水、酸素、乳酸塩等）は、中空系を通じて中空系の内部からEC空間へ、又はEC空間からIC空間へ拡散することができる。成長因子のような高分子量の分子は、通常は、大きすぎ

るため中空系を通過できず、中空系の I C 空間内にとどまる。培地は、必要であれば交換してもよい。また、必要であれば、培地を酸素供給装置を通じて循環させて、ガスを交換してもよい。細胞は、第 1 循環路及び / 又は第 2 循環路内に含有させることができ、該膜の I C 側及び / 又は E C 側に存在させることができる。一例として、限定するものではないが、一実施形態において、バイオリアクター 300 は、約  $2.15 \times 10^{-6}$  m の内径 ( I D ) を有する約 11520 本の系を有してもよい。

#### 【0089】

バイオリアクターハウジング 304 は、円筒形状として示されているが、例えば、直方体のように、種々の形状を取ることができる。バイオリアクターハウジング 304 は、任意の種類の生体適合性高分子材料で作製されることができ、該材料は、複数の中空系 316 のうちの 1 本以上の中空系やバイオリアクターハウジング 304 内に存在する流体を観察できるように略透明な材料で作製されてもよい。その他種々のバイオリアクターハウジングは、様々な形状及びサイズを有してよい。

10

#### 【0090】

図 4 は、CES 430 の一部を示す斜視図である。CES 430 の一部は、CES 430 の本体 408 の後部 434 を含む。明確にするため、本体 408 の前部は示さないが、前部は、例えば、蝶番 438 によって後部 434 に取り付けられる。これにより、前部は、CES 430 のバイオリアクター 300 にアクセスするために開けることが可能なドア又はハッチを備えることが可能となる。バイオリアクター 300 には、配管のためのスプール 416 とサンプリングポート 420 が取り付けられる。バイオリアクター 300 の周りの環境は、細胞成長に適した条件となるように温度調整される。

20

#### 【0091】

図 5 は、CES を用いた細胞増殖プロセスの一実施形態のフローチャート 500 を示す。該プロセスは、以下で記載するように、バイオリアクター (例えば、バイオリアクター 300) に細胞を投入・分配することに関するステップを含む。CES (例えば、CES 430) の特徴が、フローチャート 500 のいくつかのステップを実行するように記載されるが、本発明はそれらに限定されない。本明細書では記載されないが (例えば、CES 10、800、900 では記載されないが)、異なる特徴を有する他の CES が、他の実施形態において、使用されてもよい。従って、バイオリアクター 300 のような CES 430 の特徴に対する言及は、あくまで例示のためであって、フローチャート 500 が、如何なる特定の CES における使用に限定されるものではない。

30

#### 【0092】

フローチャート 500 は、ステップ 502 で始まり、ステップ 504 において、バイオリアクター 300 及び関連する配管、関連する構造を本体 408 に取り付け、CES 430 を操作可能な状態にする。本体 408 に接続したら、ステップ 508 において、生理食塩水のような適当なプライミング流体を用いて、バイオリアクター 300、関連する配管、関連する構造に対して、プライミングを行う。ステップ 512 において、細胞を、バイオリアクター 300 に投入・分配する。

#### 【0093】

実施形態において、細胞の投入・分配は、いくつかのサブステップを含む。例えば、ある実施形態において、ステップ 512 は、バイオリアクター 300 を第 1 方向に合わせて配置するオプションであるサブステップ 516 と、バイオリアクター 300 において細胞を投入・分配するオプションであるサブステップ 520 と、を有する。オプションである、サブステップ 524 では、細胞は、バイオリアクターに付着させられる。

40

#### 【0094】

細胞をバイオリアクター 300 に投入・分配した後、ステップ 528 において、細胞増殖が行われる。すなわち、バイオリアクター 300 内の細胞を増殖、すなわち成長及び / 又は繁殖させる。ステップ 532 において、細胞をバイオリアクター 300 に追加する必要があるかどうか、及び / 又は、バイオリアクター 300 内で細胞を分配させるためにバイオリアクター 300 を回転させる必要があるかどうか、について判断が行われる。細胞

50

をバイオリアクター 300 に追加投入する必要がある場合、及び／又は細胞をバイオリアクター 300 において分配させる必要がある場合、フローチャート 500 は、ステップ 512 に戻る。細胞を追加する必要がある場合、及び／又は、バイオリアクター 300 を回転させる必要がある場合、ステップ 536 において、細胞増殖ステップ 528 が完了したかどうか、判断される。ここでは、十分な細胞数及び／又は細胞特徴の変化が達成された場合、細胞増殖プロセスは完了したと判断される。細胞増殖ステップ 528 が完了した場合、ステップ 540 において、細胞は収穫される。細胞増殖ステップ 528 が完了していない場合、細胞増殖ステップ 528 が続けられる。フローチャート 500 は、ステップ 544 で終了する。

#### 【0095】

いくつかの実施形態において、バイオリアクター及び C E S において細胞を投入、分配、増殖させるために使用されるプロセス（例えば、ステップ 512、ステップ 528（図 5））について、さらに詳細な説明がなされる。図 6 及び図 7 は、細胞を投入、分配、付着及び増殖させるために用いられるプロセスのフローチャートを示す。これらプロセスは、フローチャート 500 のプロセスの一部として、例えば、上述のステップにおけるサブステップ（例えば、ステップ 512、ステップ 528）として、実行される。他の実施形態において、フローチャート 600、700 に記載されるプロセスは、フローチャート 500 のステップとは関係なく、行われてもよい。さらに、以下で示すように、フローチャート 600 及び 700 のステップは、部品（例えば、揺動部品 402、404 として使用されるモータ）やバイオリアクター（例えば、バイオリアクター 24、300、400、801、908）又はバイオリアクターの一部を含む C E S 又はそれら（例えば、C E S 10、800、900）の一部によって、又はそれらに対して行われてよい。ここでの記載は、フローチャート 600 及び 700 に限定することは意図していない。他のシステム、装置、部品、特徴等によって、又はそれらに対して行われるステップを有してもよい。

#### 【0096】

フローチャート 600 は、ステップ 604 で始まり、ステップ 608 において、細胞を有する流体が、バイオリアクター 300（図 3 及び図 8～図 12 参照）のようなバイオリアクター内を循環させられる。ある実施形態では、ステップ 608 において、1 以上のポンプを作動させて、バイオリアクター 300 内における流体の循環を行う。例えば、I C 循環ポンプ（例えば、812 又は 911）を作動させて、流体を、第 1 循環流量で、バイオリアクター 300 の I C 側において循環させてもよい。少なくとも 1 つの実施形態において、細胞を運ぶ流体は、バイオリアクター 300 の中空系を介して、I C 側から E C 側へと移動する。他の実施形態では、細胞は、バイオリアクター 300 の E C 側に投入され、該細胞を運ぶ流体を E C 側から I C 側へと流す。これら実施形態において、E C 循環ポンプ（例えば、828、974）を作動させて、第 1 循環流量で、バイオリアクター 300 の E C 側において循環させてもよい。

#### 【0097】

いくつかの実施形態において、ステップ 608 は、バイオリアクター 300 及びバイオリアクター 300 に流体的に関連づけられた C E S の循環路において細胞の分配を促進するため、ある特定のシーケンスでバイオリアクター 300 を回転させる工程を伴う。循環又は投入において細胞の分配を促進するために、ある特定のシーケンスでバイオリアクター 300 を回転させる実施形態の例は、2010 年 12 月 15 日に出願された米国特許出願公開第 12/968,483 号明細書（タイトル：細胞増殖システムのバイオリアクターにおける細胞の投入及び分配方法）に記載されている。該米国特許出願の全体は、ここでの開示により本出願に組み込まれる。他の実施形態において、循環ステップ 608 は、バイオリアクター 300 をある時間で回転させ、さらに、バイオリアクター 300 をある時間の間、静止させる工程を伴ってもよい。

#### 【0098】

ステップ 608 の後、ステップ 612 において、流体循環レートを減少させる。循環レートは、略ゼロ（0）m l / 分に減らしてもよいし、他の実施形態では、ゼロ（0）m l

10

20

30

40

50

／分以上だが、細胞がバイオリアクター 300（例えば、バイオリアクター 300 の中空系 316 の内側表面）において沈殿・付着できる程度のレートに減らしてもよい。ある実施形態では、ステップ 612 において、ステップ 608 で使用した 1 以上のポンプを停止して、流体を循環させてもよい。

#### 【0099】

フローチャートは、ステップ 612 からオプションとしてのステップ 616 に進む。該ステップでは、バイオリアクター（例えば、バイオリアクター 300）を初期方向に位置づけるステップが行われる。ある実施形態では、バイオリアクターは、すでに初期方向にある場合もある。その場合は、ステップ 616 は不要である。ステップ 616 を行う場合は、1 以上のモータによって行うことができる。

10

#### 【0100】

図 8～図 12 を参照すると、図 8 には、初期方向にあるバイオリアクター 300 が示されている。オプションとしてのステップ 616 の一部として、バイオリアクターの長手方向軸 LA-LA を始動方向（例えば、図 8 に示されるような、第 1 水平方向）に合わせるようにして、バイオリアクター 300 を位置付けるようにしてもよい。

#### 【0101】

フローチャートは、ステップ 616 からステップ 620 に進む。該ステップでは、バイオリアクターを、第 1 方向に維持し、細胞を沈殿させて、バイオリアクター 300 の第 1 部分に付着させる。ステップ 620 は、第 1 所定期間の間、行われる。

#### 【0102】

20

図 13A～図 13C は、バイオリアクター 300 の複数の中空系 316 のうちの 1 つの中空系 1300 の（中空系 1300 の中心軸及びバイオリアクター 300 の中心軸に垂直な）断面図を示す。これらの図面は、フローチャート 600 のあるステップ中に起こり得るであろう中空系 316 内における細胞の配置を示している。図 13A に示されるように、ステップ 612 において循環レートを減少させる前は、各中空系 1300 内における細胞は、中空系 1300 の容積全体にわたって、均一に分布している。循環レートを減少させると、細胞は、重力 1304 の影響によって、沈殿を始める。

#### 【0103】

ある実施形態では、バイオリアクター 300 が第 1 水平方向（図 8）にある場合、バイオリアクター 300 内の細胞は、バイオリアクターの第 1 部分に沈殿していく。図 13B に示されるように、バイオリアクター 300 の該第 1 部分は、中空系 1300 の少なくとも 1 部分 1308 を有する。細胞は、沈殿するだけでなく、中空系 1300 の該部分 1308 に付着するように選択された第 1 所定期間（フローチャート 600 のステップ 620）の間、沈殿させられる。

30

#### 【0104】

いくつかの実施形態では、第 1 所定期間は、細胞が沈殿し、該部分 1308 に付着するような十分な時間長さがよい。これらの実施形態において、細胞は、中空系 1308 の内径の距離を移動しさえすればよい。例えば、中空系の内径が、約 150  $\mu\text{m}$ ～約 300  $\mu\text{m}$  である実施形態の場合、第 1 所定期間は、約 20 分より短い、約 15 分より短い、又は約 10 分より短くてよい。他の実施形態では、第 1 所定期間は、約 1 分より長い、約 2 分より長い、約 3 分より長い、又は約 4 分より長くてよい。一実施形態において、第 1 所定期間は、約 3 分～約 8 分の間であればよい（例えば、約 5 分）。

40

#### 【0105】

他の実施形態において、第 1 所定期間は、細胞が沈殿して中空系に付着するだけでなく、付着した細胞が成長するような長さの時間でもよい。これらの実施形態において、横方向の抵抗が最も小さいため、細胞は横方向に成長する。すなわち、部分 1308 上の細胞が中空系壁から上方向に成長しようとする場合、細胞は重力 1304 に抗して成長することになるであろうという理由によって、細胞は、少なくとも初期の段階では、横方向に成長すると考えられる。これら実施形態において、細胞を付着後に成長させる場合、第 1 所定期間は、約 5 時間より長い、約 10 時間より長い、約 15 時間より長い、約 2

50

0 時間より長い、又は約 2 4 時間より長くてよい。他の実施形態において、第 1 所定期間は、約 6 0 時間より短い、約 5 5 時間より短い、約 5 0 時間より短い、又は約 4 5 時間より短くてよい。一実施形態において、第 1 所定期間は、約 1 0 時間 ~ 約 4 8 時間の間であればよい。

【 0 1 0 6 】

図 6 に戻って、いくつかの実施形態では、ステップ 6 2 0 の後、フローチャートは、ステップ 6 4 0 に進む。そこでは、バイオリアクター 3 0 0 を、第 1 水平方向から約 1 8 0 度回転した第 2 水平方向へ回転させる。図 8 ~ 図 1 0 に示すように、バイオリアクターは、まず、第 1 水平方向 ( 図 8 ) から、該第 1 水平方向から約 9 0 度回転させた第 1 鉛直方向へ回転させられる ( 例えば、L A - L A 軸を鉛直方向にするように ( 図 9 ) ) 。そして、バイオリアクター 3 0 0 を、さらに 9 0 度回転させて ( 図 1 0 ) 、第 2 水平方向への回転を完了させる。

10

【 0 1 0 7 】

ある実施形態では、第 2 水平方向への回転の後、フローチャート 6 0 0 は、ステップ 6 4 4 へ進む。該ステップにおいて、第 2 水平方向にあるバイオリアクター 3 0 0 において細胞増殖が行われる。図 1 3 C は、第 2 水平方向において、中空系 1 3 0 0 に付着した細胞が、中空系 1 3 0 0 内側頂部に位置している状態を示す。ステップ 6 4 4 は、流体をバイオリアクター内で循環させて、バイオリアクター内に付着した細胞に栄養素を供給するような、複数のサブステップを含んでもよい。理解されるように、ステップ 6 4 4 は、増殖させるために、細胞に酸素を供給するサブステップを含んでもよい。バイオリアクターにおけるその他複数のパラメータを制御することで、増殖、すなわち細胞の成長、を最適化することができる。いくつかの実施形態では、ステップ 6 4 4 において、流体を循環させて細胞に栄養を与える工程を、約 2 4 時間又は約 3 6 時間又は約 4 8 時間又は約 6 0 時間又は約 7 2 時間、行ってもよい。いくつかの実施形態において、細胞に栄養を与えるステップをステップ 6 4 4 の一部として、約 1 2 0 時間より短い期間又は約 1 0 8 時間より短い期間又は約 9 6 時間より短い期間又は約 8 4 時間より短い期間又は約 7 2 時間より短い期間、行うようにしてもよい。そして、フローチャート 6 0 0 は、ステップ 6 4 8 で終了する。

20

【 0 1 0 8 】

理論に束縛されるものではないが、細胞を図 1 3 C に示されるように重力の影響下において成長させると、細胞増殖は改善されると考えられる。細胞は、中空系 1 3 0 0 において下向きに、細胞が存在しない中空系の部分に向かって、成長する。細胞は、中空系のうち、頂部 1 3 0 8 の下方に位置する部分のように ( 図 1 3 C 参照 ) 、抵抗が最も少ない部分に向かって成長すると考えられる。重力の影響下における成長は、従来のプロセスと比較すると、細胞の収率を改善し、細胞倍加時間を減少させる。

30

【 0 1 0 9 】

他の実施形態において、フローチャート 6 0 0 は、他のステップを含んでもよい。例えば、いくつかの実施形態では、ステップ 6 2 0 の後に、フローチャート 6 0 0 は、ステップ 6 2 4 に進み、該ステップにおいて、バイオリアクター 6 2 8 を鉛直方向に回転させる。例えば、バイオリアクター 3 0 0 を、図 9 に示すように、第 1 鉛直方向に回転させる。ステップ 6 2 4 の後、フローチャートは、ステップ 6 2 8 に進み、該ステップにおいて、バイオリアクターを、第 2 所定期間の間、第 1 鉛直方向に維持する。

40

【 0 1 1 0 】

図 1 3 D 及び図 1 3 E は、バイオリアクター 3 0 0 の複数の中空系 3 1 6 のうちの 1 つである中空系 1 3 0 0 の ( 中空系 1 3 0 0 の中心軸及びバイオリアクター 3 0 0 の中心軸に平行な ) 断面図を示す。図 1 3 D 及び図 1 3 E は、ステップ 6 2 0 後の中空系 1 3 0 0 を示す。そこでは、細胞は、沈殿して、中空系 1 3 0 0 のある部分に付着する。図 1 3 D に示されるように、バイオリアクター 3 0 0 が第 1 鉛直方向に回転すると、中空系 1 3 0 0 の第 1 端部 1 3 1 2 は、第 2 端部 1 3 1 6 の上方に位置する。

【 0 1 1 1 】

50

上述したように、理論に束縛されるものではないが、中空系 1300 に付着した細胞は、重力 1304 に影響を受け、端部 1316 に向かって長手方向に、成長、すなわち増殖を始める。従って、ステップ 628 (第 1 鉛直方向の維持) は、細胞が長手方向に成長ができるような十分な時間長さである第 2 所定期間の間、行われる。いくつかの実施形態では、第 2 所定期間は、約 5 時間より長いか又は約 10 時間より長いか又は約 15 時間より長いか又は約 20 時間より長いか又は約 24 時間より長くてよい。他の実施形態では、第 2 所定期間は、約 60 時間より短いか又は約 55 時間より短いか又は約 50 時間より短いか又は約 45 時間より短くてよい。一実施形態において、第 2 所定期間は、約 10 時間～約 48 時間の間であればよい。

#### 【0112】

ステップ 628 の後、フローチャートは、ステップ 632 に進む。該ステップにおいて、バイオリアクターは第 2 鉛直方向に回転される。第 2 鉛直方向にあるバイオリアクター 300 の一例が図 12 に示される。ステップ 624 の後、ステップ 636 に進む。該ステップにおいて、バイオリアクターは、第 3 所定期間の間、第 2 鉛直方向に維持される。

#### 【0113】

図 13E は、ステップ 632 後の中空系 1300 を示す。そこでは、細胞は沈殿して、中空系 1300 のある部分に付着し、バイオリアクター 300 は、第 1 鉛直方向から第 2 鉛直方向へと回転させられ、第 2 鉛直方向に維持されている。図 13E に示されるように、バイオリアクター 300 が第 2 鉛直方向に回転すると、中空系 1300 の第 1 端部 1312 は、第 2 端部 1316 の下方に位置する。

#### 【0114】

ステップ 628 (第 1 鉛直方向の維持) と同様に、中空系 1300 に付着した細胞は、重力 1304 に影響を受け、端部 1312 に向かって長手方向に、成長、すなわち増殖を始めると考えられるので、ステップ 636 (第 2 鉛直方向の維持) が行われる。ステップ 636 は、図 13E に示されるように、細胞が端部 1312 に向かって長手方向に成長ができるような十分な時間長さである第 3 所定期間の間、行われる。いくつかの実施形態では、第 3 所定期間は、約 5 時間より長いか又は約 10 時間より長いか又は約 15 時間より長いか又は約 20 時間より長いか又は約 24 時間より長くてよい。他の実施形態では、第 3 所定期間は、約 60 時間より短いか又は約 55 時間より短いか又は約 50 時間より短いか又は約 45 時間より短くてよい。一実施形態において、第 3 所定期間は、約 10 時間～約 48 時間の間であればよい。

#### 【0115】

フローチャート 600 に戻って、ステップ 636 の後、ステップ 640 に進む。該ステップでは、上述したように、バイオリアクターは、図 11 に示すような第 2 水平位置に回転される。上述したように、フローチャートは、ステップ 640 からステップ 644 へ進み、細胞が増殖、すなわち繁殖される。そして、フローチャートは、ステップ 648 で終了する。

#### 【0116】

図 7 に目を向けると、フローチャート 700 は、ステップ 704 から始まり、ステップ 708 に進む。該ステップでは、細胞を含む流体が、バイオリアクター 300 (図 3、図 8～図 12 参照) のようなバイオリアクター内を循環させられる。ある実施形態では、ステップ 708 において、1 以上のポンプを作動させて、バイオリアクター 300 内における流体の循環を行う。例えば、IC 循環ポンプ (例えば、812 又は 911) を作動させて、流体を、第 1 循環流量で、バイオリアクター 300 の IC 側において循環させてもよい。少なくとも 1 つの実施形態において、細胞を運ぶ流体は、バイオリアクター 300 の中空系を介して、IC 側から EC 側へと移動する。他の実施形態では、細胞は、バイオリアクター 300 の EC 側に投入され、該細胞を運ぶ流体を EC 側から IC 側へと流す。これら実施形態において、EC 循環ポンプ (例えば、828、974) を作動させて、第 1 循環流量で、バイオリアクター 300 の EC 側において循環させてもよい。

#### 【0117】

ある実施形態では、第1循環流量は、比較的高い流量でよい。ある実施形態では、第1循環流量は、約500ml/分よりも小さいか又は約400ml/分よりも小さいか又は約300ml/分よりも小さくてよい。他の実施形態では、第1循環流量は、約50ml/分よりも大きい又は約100ml/分よりも大きい又は約150ml/分よりも大きくてよい。一実施形態において、第1循環流量は、約100ml/分～約300ml/分の間、例えば、約200ml/分である。

#### 【0118】

いくつかの実施形態において、ステップ708は、バイオリアクター300及びバイオリアクター300に流体的に関連づけられたCESの循環路において細胞の分配を促進するため、ある特定のシーケンスでバイオリアクター300を回転させる工程を伴う。他の実施形態において、循環ステップ708は、バイオリアクター300をある時間で回転させ、さらに、バイオリアクター300をある時間の間、静止させる工程を伴ってもよい。

10

#### 【0119】

ステップ708の後、ステップ712において、流体循環レートを減少させる。循環レートは、略ゼロ(0)ml/分に減らしてもよいし、他の実施形態では、ゼロ(0)ml/分以上だが、細胞がバイオリアクター300(例えば、バイオリアクター300の中空系316の内側表面)において沈殿・付着できる程度のレートに減らしてもよい。ある実施形態では、ステップ712において、ステップ708で使用した1以上のポンプを停止して、流体を循環させてもよい。

20

#### 【0120】

フローチャートは、ステップ712からオプションとしてのステップ716に進む。該ステップでは、バイオリアクター(例えば、バイオリアクター300)を初期方向に位置づけるステップが行われる。ある実施形態では、バイオリアクターは、すでに初期方向にある場合もある。その場合は、ステップ716は不要である。いくつかの実施形態において、ステップ716を行う場合は、1以上のモータによって行うことができる。

#### 【0121】

図8～図12を参照すると、図8には、初期方向にあるバイオリアクター300が示されている。オプションとしてのステップ716の一部として、バイオリアクターの長手方向軸LA-LAを始動方向(例えば、図8に示されるような、第1水平方向)に合わせるようにして、バイオリアクター300を位置付けるようにしてもよい。

30

#### 【0122】

フローチャートは、ステップ716からステップ720に進む。該ステップでは、バイオリアクターを、第1方向に維持し、細胞を沈殿させて、バイオリアクター300の第1部分に付着させる。ステップ820は、第1所定期間の間、行われる。

#### 【0123】

図14A～図14D及び図15A～図15Fは、バイオリアクター300の複数の中空系316のうちの1つの中空系1400の(中空系1400の中心軸及びバイオリアクター300の中心軸に垂直な)断面図を示す。これらの図面は、フローチャート700のあるステップ中に起こり得るであろう中空系316内における細胞の配置を示している。図14Aに示されるように、ステップ712において循環レートを減少させる前は、各中空系1400内における細胞は、中空系1400の容積全体にわたって、均一に分布している。循環レートを減少させると、細胞は、重力1404の影響によって、沈殿を始める。図15Aもまた、中空系1500及び重力1504に対して同様の状況を示している。

40

#### 【0124】

ある実施形態では、バイオリアクター300が第1水平方向(図8)にある場合、バイオリアクター300内の細胞は、バイオリアクターの第1部分に沈殿していく。図14B及び図15Bに示されるように、バイオリアクター300の該第1部分は、中空系1400の少なくとも1部分1408及び/又は中空系1500の少なくとも1部分1508を有する。ある実施形態では、細胞は、沈殿するだけでなく、中空系1400の該部分1408(及び中空系1500の該部分1508)に付着するように選択された第1所定期

50

間の間、沈殿させられる。

【0125】

いくつかの実施形態では、第1所定期間は、細胞が沈殿し、該部分1408及び1508に付着するよう長さの期間でよい。これらの実施形態において、細胞は、中空系1400又は1500の内径の距離を移動しさえすればよい。例えば、中空系の内径が、約150 $\mu$ m～約300 $\mu$ mである実施形態の場合、第1所定期間は、約20分より短いか、約15分より短いか、又は約10分より短くてよい。他の実施形態では、第1所定期間は、約1分より長いか、約2分より長いか、約3分より長いか、又は約4分より長くてよい。一実施形態において、第1所定期間は、約3分～約8分の間であればよい（例えば、約5分）。

10

【0126】

ステップ720の後、フローチャートは、ステップ724に進む。そこでは、バイオリアクター300を、第1水平方向から約180度回転した第2水平方向へ回転させる。図8～図10に示すように、バイオリアクターは、まず、第1水平方向（図8）から、該第1水平方向から約90度回転させた第1鉛直方向へ回転させられる（例えば、LA-LA軸を鉛直方向にするように（図9））。そして、バイオリアクター300を、さらに90度回転させて（図10）、第2水平方向への回転を完了させる。いくつかの実施形態において、ステップ724は、バイオリアクター300に接続された1以上のモータによって行われてもよい。これらモータは、揺動装置の一部であってもよい。

【0127】

20

いくつかの実施形態において、フローチャート700は、ステップ724からステップ736に進む。該ステップにおいて、中空系1400の部分1412（図14C）や中空系1500の部分1512（図15C）のような、バイオリアクターの第2部分に細胞が沈殿するように、第2所定期間の間、バイオリアクター300を第2水平方向（図10）に維持する。

【0128】

いくつかの実施形態において、フローチャート700は、ステップ736を実行する前に、オプションのステップ728、732を有してもよい。ステップ708と同様に、ステップ728は、流体をバイオリアクター300中において循環させる。ある実施形態では、ステップ728において、1以上のポンプを作動させて、バイオリアクター300内における流体の循環を行う。上述のように、IC循環ポンプ（例えば、812又は911）を作動させて、流体を、第2循環流量で、バイオリアクター300のIC側において循環させてもよい。少なくとも1つの実施形態において、細胞を運ぶ流体は、バイオリアクター300の中空系を介して、IC側からEC側へと移動する。他の実施形態では、細胞は、バイオリアクター300のEC側に投入され、該細胞を運ぶ流体をEC側からIC側へと流す。これら実施形態において、EC循環ポンプ（例えば、828、974）を作動させて、第2循環流量で、バイオリアクター300のEC側において循環させてもよい。

30

【0129】

ある実施形態では、第2循環流量は、第1循環流量よりも低くてよい。ある実施形態では、第2循環流量は、約400ml/分よりも小さいか又は約300ml/分よりも小さいか又は約200ml/分よりも小さくてよい。他の実施形態では、第2循環流量は、約25ml/分よりも大きいか又は約500ml/分よりも大きいか又は約75ml/分よりも大きくてよい。一実施形態において、第2循環流量は、約50ml/分～約150ml/分の間、例えば、約100ml/分である。

40

【0130】

いくつかの実施形態において、ステップ728は、ステップ708で行われる循環とは異なる方向の循環を行ってもよい。すなわち、いくつかの実施形態において、ステップ708では、流体を反時計回り方向に循環させてもよい（図8及び図9のICループ参照）。いくつかの実施形態において、ステップ728における循環は時計回り方向でもよい。すなわち、循環は、ステップ708における循環と反対方向の流れでもよい。他の実施形

50



態において、ステップ708における循環は、ステップ708と同じ方向、つまり時計回り方向か反時計回り方向でもよい。

【0131】

いくつかの実施形態において、オプションとしてのステップ728は、バイオリアクター300及びバイオリアクター300に流体的に関連づけられたCESの循環路において細胞の分配を促進するため、ある特定のシーケンスでバイオリアクター300を回転させる工程を伴う。他の実施形態において、循環ステップ728は、バイオリアクター300をある時間で回転させ、さらに、バイオリアクター300をある時間の間、静止させる工程を伴ってもよい。

【0132】

オプションとしてのステップ728の後、ステップ732において、流体循環レートを再度減少させる。循環レートは、略ゼロ(0)ml/分に減らしてもよいし、他の実施形態では、ゼロ(0)ml/分以上だが、細胞がバイオリアクター300(例えば、バイオリアクター300の中空系316の内側表面)において沈殿・付着できる程度のレートに減らしてもよい。ある実施形態では、ステップ732において、ステップ728で使用した1以上のポンプを停止して、流体を循環させてもよい。

【0133】

ステップ736では、バイオリアクターを第2水平方向に維持することによって、細胞を、部分1408に対向する側の部分1412(又は図15Cの1512)に沈殿させる。例えば、部分1408(又は1508)を「底部」と呼び、部分1412(又は図15Cの1512)を「頂部」と呼ぶことにする。図14C及び図15Cでは、細胞は、部分1412及び1512に沈殿しているが、いくつかの実施形態では、逆である。ある実施形態において、細胞は、沈殿するだけでなく、中空系1400の部分1412(又は中空系1500の部分1512)に付着するように選択された第2所定期間の間、沈殿させられる。

【0134】

いくつかの実施形態では、第2所定期間は、細胞が沈殿し、該部分1412(図15Cの該部分1512)に付着するような十分な時間長さがよい。これらの実施形態において、細胞は、中空系1400又は1500の内径の距離を移動すればよい。例えば、中空系の内径が、約150 $\mu$ m~約300 $\mu$ mである実施形態の場合、第2所定期間は、約20分より短いか、約15分より短いか、又は約10分より短くてよい。他の実施形態では、第2所定期間は、約1分より長いか、約2分より長いか、約3分より長いか、又は約4分より長くてよい。一実施形態において、第2所定期間は、約3分~約8分の間であればよい(例えば、約5分)。

【0135】

いくつかの実施形態において、ステップ736の後に、フローチャート700は、ステップ772に進む。該ステップでは、細胞が増殖される。ステップ772は、流体をバイオリアクター内で循環させて、バイオリアクター内に付着した細胞に栄養素を供給するような、複数のサブステップを含んでもよい。理解されるように、ステップ772は、増殖させるために、細胞に酸素を供給するサブステップを含んでもよい。バイオリアクターにおけるその他複数のパラメータを制御することで、増殖、すなわち細胞の成長、を最適化することができる。いくつかの実施形態では、ステップ772において、流体を循環させて細胞に栄養を与える工程を、約24時間又は約36時間又は約48時間又は約60時間又は約72時間、行ってもよい。いくつかの実施形態において、細胞に栄養を与えるステップをステップ772の一部として、約120時間より短い期間又は約108時間より短い期間又は約96時間より短い期間又は約84時間より短い期間又は約72時間より短い期間、行うようにしてもよい。図14Dは、本実施形態における中空系1400を示す。そして、フローチャート700は、ステップ776で終了する。

【0136】

他の実施形態において、フローチャート700は、ステップ740へ進む。該ステップ

10

20

30

40

50

では、バイオリアクター 300 は、最初の第 1 水平方向に戻される。図 11 は、第 1 水平方向に戻されたバイオリアクター 300 を示す。ステップ 740 は、バイオリアクター 300 に接続された 1 以上のモータによって行われてよい。これらモータは、揺動装置の一部でよい。ある実施形態では、ステップ 740 からステップ 772 へ進み、細胞の増殖が行われる。そして、フローチャート 700 は、ステップ 776 にて終了する。

#### 【0137】

他の実施形態において、フローチャート 700 は、ステップ 740 からステップ 744 へ進む。或いは、ステップ 736 からステップ 744 へ直接進む（この場合、追加の回転は行われない）。該ステップでは、第 3 循環流量で、流体が循環される。ステップ 708、728 と同様に、流体はバイオリアクター 300 を循環させられる。ある実施形態では、ステップ 744 において、1 以上のポンプを作動させて、バイオリアクター 300 内における流体の循環を行う。上述のように、IC 循環ポンプ（例えば、812 又は 911）を作動させて、流体を、第 3 循環流量で、バイオリアクター 300 の IC 側において循環させてもよい。少なくとも 1 つの実施形態において、細胞を運ぶ流体は、バイオリアクター 300 の中空系を介して、IC 側から EC 側へと移動する。他の実施形態では、細胞は、バイオリアクター 300 の EC 側に投入され、該細胞を運ぶ流体を EC 側から IC 側へと流す。これら実施形態において、EC 循環ポンプ（例えば、828、974）を作動させて、第 3 循環流量で、バイオリアクター 300 の EC 側において循環させてもよい。

10

#### 【0138】

ある実施形態では、第 3 循環流量は、第 2 循環流量よりも低くてよい。ある実施形態では、第 3 循環流量は、約 200 ml / 分よりも小さいか又は約 150 ml / 分よりも小さいか又は約 100 ml / 分よりも小さくてよい。他の実施形態では、第 3 循環流量は、約 10 ml / 分よりも大きい又は約 20 ml / 分よりも大きい又は約 30 ml / 分よりも大きくてよい。一実施形態において、第 3 循環流量は、約 20 ml / 分～約 100 ml / 分の間、例えば、約 50 ml / 分である。

20

#### 【0139】

いくつかの実施形態において、ステップ 744 は、ステップ 728 で行われる循環とは異なる方向の循環を行ってもよい。すなわち、いくつかの実施形態において、ステップ 728 では、流体を時計回り方向に循環させてもよい。いくつかの実施形態において、ステップ 744 における循環は、ステップ 708 と同様でよく、反時計回り方向でよい（図 8 及び図 9 の IC ループ参照）。すなわち、ステップ 744 における循環は、ステップ 728 における循環と反対方向の流れであり、ステップ 708 の循環方向と同じ方向でもよい。他の実施形態において、ステップ 708、728、744 における循環は、時計回り方向或いは反時計回り方向の同じ方向でもよい。

30

#### 【0140】

いくつかの実施形態において、オプションとしてのステップ 744 は、バイオリアクター 300 及びバイオリアクター 300 に流体的に関連づけられた CES の循環路において細胞の分配を促進するため、ある特定のシーケンスでバイオリアクター 300 を回転させる工程を伴う。他の実施形態において、循環ステップ 744 は、バイオリアクター 300 をある時間で回転させ、さらに、バイオリアクター 300 をある時間の間、静止させる工程を伴ってもよい。

40

#### 【0141】

ステップ 744 からステップ 748 に進む。該ステップにおいて、流体循環レートを再度減少させる。循環レートは、略ゼロ（0）ml / 分に減らしてもよいし、他の実施形態では、ゼロ（0）ml / 分以上だが、細胞がバイオリアクター 300（例えば、バイオリアクター 300 の中空系 316 の内側表面）において沈殿・付着できる程度のレートに減らしてもよい。ある実施形態では、ステップ 748 において、ステップ 744 で使用した 1 以上のポンプを停止して、流体を循環させてもよい。

#### 【0142】

ステップ 748 からステップ 752 へ進む。該ステップでは、バイオリアクターが水平

50

方向に維持される。ステップ 7 4 4 (第 1 方向への回転)を含む実施形態では、ステップ 7 5 2 は、第 1 水平方向に維持する工程を含む。ステップ 7 4 0 の回転を含まない実施形態では、ステップ 7 5 2 は、第 2 水平方向に維持する工程を含む。いかなる場合においても、ステップ 7 5 2 は、細胞を、例えば部分 1 5 0 8 に再び沈殿させるために行われる (回転ステップ 7 4 0 を行う場合は、図 1 5 D 及び図 1 5 E を参照)。ある実施形態において、細胞は、沈殿するだけでなく、付着するように選択された第 3 所定期間の間、沈殿させられる。

#### 【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、第 3 所定期間は、細胞が沈殿し、部分 1 5 0 8 に付着する程度に十分な時間長さでよい。これらの実施形態において、細胞は、中空系 1 5 0 0 の内径の距離を移動すればよい。例えば、中空系 1 5 0 0 の内径が、約 1 5 0  $\mu\text{m}$  ~ 約 3 0 0  $\mu\text{m}$  である実施形態の場合、第 3 所定期間は、約 2 0 分より短いか、約 1 5 分より短いか、又は約 1 0 分より短くてよい。他の実施形態では、第 3 所定期間は、約 1 分より長いか、約 2 分より長いか、約 3 分より長いか、又は約 4 分より長くてよい。一実施形態において、第 3 所定期間は、約 3 分 ~ 約 8 分の間であればよい (例えば、約 5 分)。

10

#### 【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態において、フローチャート 7 0 0 は、ステップ 7 5 2 からステップ 7 7 2 へ進む。該ステップにおいて、細胞の増殖が行われる。図 1 5 F は、これら実施形態における中空系 1 5 0 0 を示す。そして、フローチャートはステップ 7 7 6 で終了する。

20

#### 【 0 1 4 5 】

他の実施形態において、以下で記載するように、フローチャート 7 0 0 は、細胞を増殖させるステップ 7 7 2 へ進む前に、追加の回転ステップ (7 5 6)、循環ステップ (7 6 0)、循環レート減少ステップ (7 6 4)、方向維持ステップ (7 6 8) を有してもよい。これら実施形態において、フローチャート 7 0 0 は、ステップ 7 5 2 からステップ 7 5 6 に進む。ステップ 7 5 6 において、ステップ 7 4 0 において第 1 水平方向に回転していた場合は、バイオリアクター 3 0 0 は、第 2 水平方向に戻る。図 1 0 は、第 2 水平方向にあるバイオリアクター 3 0 0 を示す。ステップ 7 5 6 は、バイオリアクター 3 0 0 に接続された 1 以上のモータによって行われてよい。これらモータは、揺動装置の一部でよい。いくつかの実施形態において、バイオリアクターを第 1 水平方向に回転させるステップ 7 4 0 が行われなかった場合は、このステップは必要ないこともある。

30

#### 【 0 1 4 6 】

フローチャート 7 0 0 は、ステップ 7 6 0 へ進む。該ステップでは、第 4 循環流量で、流体が再度循環される。ステップ 7 0 8、7 2 8、7 4 4 と同様に、流体はバイオリアクター 3 0 0 を循環させられる。ある実施形態では、ステップ 7 4 4 において、1 以上のポンプを作動させて、バイオリアクター 3 0 0 内における流体の循環を行う。上述のように、IC 循環ポンプ (例えば、8 1 2 又は 9 1 1) を作動させて、流体を、第 4 循環流量で、バイオリアクター 3 0 0 の IC 側において循環させてもよい。少なくとも 1 つの実施形態において、細胞を運ぶ流体は、バイオリアクター 3 0 0 の中空系を介して、IC 側から EC 側へと移動する。他の実施形態では、細胞は、バイオリアクター 3 0 0 の EC 側に投入され、該細胞を運ぶ流体を EC 側から IC 側へと流す。これら実施形態において、EC 循環ポンプ (例えば、8 2 8、9 7 4) を作動させて、第 4 循環流量で、バイオリアクター 3 0 0 の EC 側において循環させてもよい。

40

#### 【 0 1 4 7 】

ある実施形態では、第 4 循環流量は、第 3 循環流量よりも低くてよい。ある実施形態では、第 4 循環流量は、約 1 0 0  $\text{m l} / \text{分}$  よりも小さいか又は約 7 5  $\text{m l} / \text{分}$  よりも小さいか又は約 5 0  $\text{m l} / \text{分}$  よりも小さくてよい。他の実施形態では、第 4 循環流量は、約 5  $\text{m l} / \text{分}$  よりも大きい又は約 1 0  $\text{m l} / \text{分}$  よりも大きい又は約 1 5  $\text{m l} / \text{分}$  よりも大きくてよい。一実施形態において、第 4 循環流量は、約 1 5  $\text{m l} / \text{分}$  ~ 約 3 5  $\text{m l} / \text{分}$  の間、例えば、約 2 5  $\text{m l} / \text{分}$  である。

50

## 【0148】

いくつかの実施形態において、ステップ760は、ステップ744で行われる循環とは異なる方向の循環を行ってもよい。すなわち、いくつかの実施形態において、ステップ744では、流体を反時計回り方向に循環させてもよい。いくつかの実施形態において、ステップ760における循環は、ステップ728と同様でよく、時計回り方向でよい。すなわち、ステップ760における循環は、ステップ744における循環と反対方向の流れであり、ステップ728の循環方向と同じ方向でもよい。他の実施形態において、ステップ708、728、744、760における循環は、時計回り方向或いは反時計回り方向の同じ方向でもよい。

## 【0149】

10

いくつかの実施形態において、ステップ760は、バイオリアクター300及びバイオリアクター300に流体的に関連づけられたCESの循環路において細胞の分配を促進するため、ある特定のシーケンスでバイオリアクター300を回転させる工程を伴う。他の実施形態において、循環ステップ760は、バイオリアクター300をある時間、回転させ、さらに、バイオリアクター300をある時間の間、静止させる工程を伴ってもよい。

## 【0150】

ステップ760からステップ764に進む。該ステップにおいて、流体循環レートを再度減少させる。循環レートは、略ゼロ(0)ml/分に減らしてもよいし、他の実施形態では、ゼロ(0)ml/分以上だが、細胞がバイオリアクター300(例えば、バイオリアクター300の中空系316の内側表面)において沈殿・付着できる程度のレートに減らしてもよい。ある実施形態では、ステップ764において、ステップ760で使用した1以上のポンプを停止して、流体を循環させてもよい。

20

## 【0151】

ステップ764からステップ768へ進む。該ステップでは、バイオリアクターを第2水平方向に維持して、細胞を、例えば部分1512に再び沈殿させる(図15Fを参照)。ある実施形態において、細胞は、沈殿するだけではなく、再び付着するように選択された第4所定期間の間、沈殿させられる。

## 【0152】

いくつかの実施形態では、第4所定期間は、細胞が沈殿し、付着する程度に十分な時間長さがよい。これらの実施形態において、細胞は、中空系(例えば、中空系1500)の内径の距離を移動すればよい。例えば、中空系1500の内径が、約150 $\mu$ m~約300 $\mu$ mである実施形態の場合、第4所定期間は、約20分より短いか、約15分より短いか、又は約10分より短くてよい。他の実施形態では、第4所定期間は、約1分より長いか、約2分より長いか、約3分より長いか、又は約4分より長くてよい。一実施形態において、第4所定期間は、約3分~約8分の間であればよい(例えば、約5分)。

30

## 【0153】

ステップ768の後、フローチャート700は、ステップ772へ進む。該ステップにおいて、バイオリアクター300(例えば、バイオリアクターの中空系)へ沈殿・付着した細胞が増殖、すなわち繁殖される。そして、フローチャート700は、ステップ776において終了する。

40

## 【0154】

理論に束縛されるものではないが、ある実施形態において、フローチャート700のステップが行われる場合、細胞増殖は改善されると考えられる。これら実施形態によって、細胞増殖を行う前に、バイオリアクターのより多くの部分(例えば、バイオリアクターの中空系の表面)に対して細胞を播種することを確実にできると考えられる。これにより、従来のプロセスと比較して、より多くの細胞を初期段階で播種可能となり、最終的に、細胞の収率が改善され、細胞倍加時間を減少できる。

## 【0155】

フローチャート700には、バイオリアクターの回転、循環、循環レート減少、方向維持のための特定の数のステップが含まれるが、他の実施形態は、これら特定の数のステッ

50

ブに限定されない。他の実施形態において、ステップ 768 の後にさらに、バイオリアクターを再び回転させ、循環を再度行い、循環レートを減らして、細胞を沈殿させ、ある特定の時間だけ方向を維持させて、バイオリアクターのある部分に細胞を付着させてもよい。これらステップは、何度行ってもよい。ある実施形態では、循環を再始動するたびに、前回の循環よりも低いレートで行う。他の実施形態では、循環を始動するごとに、循環レートは同じでもよい。さらに他の実施形態では、まず、第 1 方向で循環を行い、循環を停止して、細胞を沈殿・付着させ、続いて、第 1 方向とは反対の方向（時計回り方向に対する反時計回り方向のように）で循環させ、再度停止して細胞を沈殿させるというように、循環方向を変化させてもよい。

#### 【0156】

図 16 は、バイオリアクター（例えば、バイオリアクター 300）の（中心軸に垂直な）断面図 1600 を示す。断面図 1600 は、ハウジング 1604 に収容された複数の中空系 1608 を示す。断面図 1600 は、バイオリアクターの一端側から描かれており、中空系 1608 の他に、中空系 1608 を一体に保持する（上記でポッティング材と呼んだ）マトリクス材 1628 も示されている。

#### 【0157】

図 16 では、複数のゾーン 1612、1616、1620、1624 が示されている。これら各ゾーンにおける中空系では、流体は異なる流量で循環する。すなわち、理論に束縛されるものではないが、循環ステップ 708 や 728（図 7）におけるレートのように、比較的高い流量での循環は、主にゾーン 1612 における中空系中を流れると考えられる。理論に束縛されるものではないが、高い流量であれば、流体は、外側のゾーンの中空系内に均等に流れる程十分には分散することはできないと考えられる。ステップ 744 や 760 のように、流量を減らすと、ゾーン 1616、1620、1624 のような外側のゾーンの中空系に分散していくと考えられる。

#### 【0158】

従って、理論に束縛されるものではないが、ステップ 708、728、744、752 において異なる流量で循環させることにより、単一の流量を用いた場合と比べて、流体は、より多くの中空系 1608 を流れるようになると考えられる。フローチャート 700 に従うプロセスの一実施形態において、（上記した流量である）ステップ 708 では、流体は、ゾーン 1612 の中空系を流れる。（上記した流量である）ステップ 728 では、レートが遅くなり、流体がそれに伴って、より分散するので、流体は、ゾーン 1612 とゾーン 1616 の中空系を流れる。（上記した流量である）ステップ 744 では、レートがさらに遅くなり、それに伴ってさらに分散するので、流体は、ゾーン 1612、1616、1620 内の中空系を流れる。（上記した流量である）ステップ 752 では、レートはより一層遅くなり、それに伴って、全てのゾーンの全ての中空系に分散するので、流体は、全てのゾーン 1612、1616、1620、1624 内の中空系を流れる。従って、単一の高流量レートで循環させる場合と比較すると、一連の異なる流量を用いることによって、細胞を有する流体は、より多くの中空系を流れるようになると考えられる。

#### 【0159】

さらに、異なる流量によって、バイオリアクターに沿った（例えば、中空系に沿った）細胞の長手方向分布が影響を受けると考えられる。すなわち、より高い流量であれば、細胞は、中空系内部に沿って、より遠くに流れる。例えば、より高い流量では、流体によって運ばれる細胞は、中空系の長さの半分以上の位置に到達するであろう。より低い流量では、流体によって運ばれる細胞は、中空系の長さの半分の位置に到達するであろう。さらに低い流量では、流体によって運ばれる細胞は、中空系の長さの半分よりも手前の位置に到達するであろう。従って、いくつかの実施形態において、異なる流量を用いることによって、バイオリアクター（例えば、中空系）の長さに沿った細胞の長手方向の分布が改善されることが考えられる。

#### 【0160】

フローチャート 500、600、700 について記載された実施形態は、限定はされな

10

20

30

40

50

いが、例えば、幹細胞（間葉細胞、造血細胞等）、線維芽細胞、角化細胞、前駆細胞、内皮細胞、その他の完全分化細胞、及びそれらの組み合わせのような、如何なるタイプの細胞の増殖においても使用できる。フローチャート500、600及び/又は700について上述したステップを含み、また異なる特徴、及びそれら特徴の組合せを含むプロセスを用いることにより、異なる細胞に対して増殖を行うことができる。

#### 【0161】

フローチャート500（図5）、600（図6）、700（図7）を、複数のステップをある特定の順序で例示して説明してきたが、本発明は、それらに限定されない。他の実施形態において、ステップは、異なる順序で、或いは並行して、或いは任意の回数で（例えば、別のステップの前後）、行われてもよい。上述のように、フローチャート500、600、700は、いくつかのオプションとしてのステップやサブステップを含む。しかしながら、オプションとして示されなかった上記それらのステップは、本発明にとって必須と考えられるべきではなく、ある実施形態では行われ、他の実施形態では行われない。

10

#### 【0162】

図17は、本発明の実施形態が実行される基本的なコンピュータシステム1700の構成要素例を示す。コンピュータシステム1700は、細胞を投入・分配する方法のいくつかのステップを実行する。システム1700は、増殖のために細胞を投入・分配する上述のCESシステム10、430、800、900の構成要素や特徴事項（例えば、流量制御装置、ポンプ、バルブ、バイオリアクターの回転、モータ等）を制御するためのコントローラである。

20

#### 【0163】

コンピュータシステム1700は、出力装置1704、及び/又は入力装置1708を有する。出力装置1704は、CRT、LCD、プラズマディスプレイのような、1以上のディスプレイを有してよい。出力装置1704は、プリンター、スピーカ等を有してもよい。入力装置1708は、キーボード、タッチ式入力装置、マウス、音声入力装置等を含んでよい。

#### 【0164】

本発明の実施形態において、基本的なコンピュータシステム1700は、処理装置1712、及び/又はメモリ1716を有してもよい。処理装置1712は、メモリ1716に記憶された命令を実行するために動作可能な汎用プロセッサであってよい。処理装置1712は、本発明の実施形態では、単一のプロセッサ又は複数のプロセッサを含んでよい。さらに、各プロセッサは、別個に命令を読み込んで実行するための1以上のコアを有するマルチコアプロセッサが可能である。プロセッサは、汎用プロセッサ、特定用途向け集積回路（ASIC）、フィールド・プログラマブル・ゲート・アレイ（FPGA）、その他の集積回路を含んでよい。

30

#### 【0165】

本発明の実施形態において、メモリ1716は、データ及び/又はプロセッサ実行可能命令を短期に又は長期に記憶する任意の有形媒体を含んでよい。メモリ1716は、例えば、ランダム・アクセス・メモリ（RAM）、リード・オンリ・メモリ（ROM）、又は電氣的消去・プログラム可能型リード・オンリ・メモリ（EEPROM）を含む。他の記憶媒体としては、例えば、CD-ROM、テープ、デジタル多用途ディスク（DVD）、又は、他の光学記憶装置、テープ、磁気ディスク記憶装置、磁気テープ、その他の磁気記憶装置等がある。実施形態において、システム1700を使用して、バイオリアクター300の回転、及び/又はCESシステムの種々の流量制御装置、ポンプ、バルブ等を制御する。メモリ1716は、循環ポンプ、バルブ、バイオリアクターの回転等の操作を制御する、バイオリアクターにおいて細胞を投入・分配するためのプロトコル及びプロシージャのような、プロトコル1720及びプロシージャ1724を記憶することができる。

40

#### 【0166】

記憶装置1728は、任意の長期データ記憶装置又は部品である。本発明の実施形態において、記憶装置1220は、メモリ1716と関連して記載されたシステムのうちの1

50

以上を含んでよい。記憶装置 1728 は、常設してもよいし、取り外し可能でもよい。システム 1700 は、CES システムの一部であり、記憶装置 1728 は、種々のタイプの細胞の投入、分配、付着、増殖、収穫を行うために CES システムを利用するための種々のプロトコルを記憶できる。

#### 【0167】

##### 実施例

以下では、本発明の実施形態に係るいくつかの例が記載される。しかしながら、以下の実施形態において、例えば、CES (すなわち、QUANTUM (登録商標) 細胞増殖システム) のプログラミングを行うために、パラメータ、特徴事項及び / 又は値が以下で記載されるが、それらはあくまでも例示のためであり、本発明は、以下で記載されるそれら特定の事項に限定されない。

10

#### 【0168】

##### 実施例 1

ここでの目的は、QUANTUM (登録商標) 細胞増殖システムにおいて 2 つの特徴的な細胞播種方法を用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) の増殖を説明することである。

#### 【0169】

事前に選択した hMSCs に対して、QUANTUM 細胞増殖システムにおいて現在用いられている細胞投入プロシージャでは、均一な細胞懸濁液を介して、バイオリアクター内に細胞が分配される。細胞は、QUANTUM 細胞増殖システムの IC 循環ループ内に投入され、比較的高い流量 (200 mL / 分) で 2 分間循環される。この循環方法では、設定されたバイオリアクターの動作も同時に行うことで、均一な細胞懸濁液が得られる。細胞が均一に懸濁されると、循環及びバイオリアクターの動きは停止され、細胞は、バイオリアクター表面に沈殿する。

20

#### 【0170】

この細胞投入プロシージャの限界の 1 つは、バイオリアクターの中空系の谷状部分 (trough) にしか、細胞を播種できないことである。hMSCs はしばしば、ある指定された細胞密度 (例えば、500 細胞数 /  $\text{cm}^2$ ) で播種される。指定された播種密度を達成するために、投入すべき適正な細胞数を決定する際、バイオリアクター表面の略 50 % のみしか考慮することができない。500 細胞数 /  $\text{cm}^2$  の場合、QUANTUM 細胞増殖システムバイオリアクターには、 $1.0 \times 10^6$  細胞数 (500 細胞数 /  $\text{cm}^2 \times 21000 \text{ cm}^2$ ) が播種される。しかしながら、現在の細胞投入プロトコルの上述の機構によって、バイオリアクター表面積のうちの 50 % のみしか「播種可能」とみなすことができない。さらに、「播種不可能」表面を利用するため、バイオリアクターの「播種不可能」表面に移動していった、細胞が増殖するには、重力に打ち勝つ必要がある。移動する細胞は、最も抵抗の少ない経路をとると考えられ、その結果、フラスコにおける同様の増殖と比較して、細胞集団内においてコンフルエンス (confluence) が急速に起こると考えられる。

30

#### 【0171】

バイオリアクターを有する滅菌した Quantum CES ディスポーザブルセットを合計 7 つ用意し、フィブロンクチンコート (5 mg) を一晩行う。全ての Quantum システムに、前培養した hMSCs を播種する。1 つの Quantum 細胞増殖システムに対しては、現状で行われている循環・投入タスク (Load with Circulation Task) を用い、対照実験とする。3 つの Quantum 細胞増殖システムに対しては、循環・投入タスク：変形例 1 (変形例 1) を用い、さらに別の 3 つの Quantum 細胞増殖システムに対しては、循環・投入タスク：変形例 2 (変形例 2) を用いる。

40

#### 【0172】

ディスポーザブルセット：全てのバイオリアクターは、QUANTUM 細胞増殖システム (CES) ディスポーザブルセットに統合され、エチレンオキシドによって滅菌される

50

。

## 【0173】

細胞源及び密度：使用するバイオリアクターの内側（IC）表面面積は、 $2.1\text{ m}^2$ である。従って、対照フラスコに対する播種密度の調整は、ICループのバイオリアクター容積率に基づいて行う必要がある。全てのバイオリアクターには、同じ細胞源の直接再投入によって（既存の経路1 - 3）最大で $2.0 \times 10^6$ の事前に選択されたMSCsが均一に投入される。単一のドナーからの細胞が好ましい。比較の目的のため、バイオリアクターとして、単位面積 $\text{cm}^2$ 当たり同じ密度でhMSCsを3つのT25対照フラスコに播種する。

## 【0174】

CES培地IC入力Q管理及び収穫：グルコースレベルが $70\text{ mg/dL}$ を下回る場合、培地供給レート（IC入力Q）を2倍にする。グルコースレベルが $70\text{ mg/dL}$ を下回り続ける場合、IC入力Qは、1日の間に2回、2倍にする。全てのディスプレイセットは、同時に収穫され、可能性のある細胞凝集を制限するため、8日目より遅くしない。細胞収穫時間は、細胞培養によって示される代謝特性によって決定する。目標収穫時間は、細胞の対数増殖期の後がよい。

## 【0175】

収穫後評価：各収穫物に対して評価を行う。これら評価には、細胞数及び生存率（viability）が含まれる。

## 【0176】

Quantum CES細胞投入 変形例1

## 【0177】

現状で行われている細胞投入プロシーダを、太字で示された以下の変更点を付加して行う。細胞を5分間付着させた後、全てのバイオリアクターを180度回転させ、付着していない細胞を中空系膜の頂部に向けて、さらに5分間沈殿させる。そして、バイオリアクターをホームポジションである水平位置に戻し、増殖プロトコルを行う。変更点を行うこと理由は、細胞をバイオリアクター中空系の全表面積に分布させることである。

## 【0178】

0日目（Day：0） 1回転して細胞を付着

## 【0179】

目的：接着細胞をバイオリアクター膜に付着させると同時にEC循環ループを流す。ICループに対するポンプ流量はゼロに設定される。

## 【0180】

表1は、細胞付着を行う際に各ラインに取付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

## 【0181】

表1：変形例1の細胞付着のための溶液

## 【0182】

10

20

30



## 【表 1】

表 1：細胞付着ための溶液

表 1：細胞付着のための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく 推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	無し	該当なし
I C 培地	タンパク質を有する培地	6 mL/時間
洗浄	無し	該当なし
E C 培地	無し	該当なし

10

## 【0183】

細胞経路：タスク＞投入及び付着＞細胞付着

20

## 【0184】

プロトコル表 2 a - c に示される細胞付着の各設定値を入力。

## 【0185】

## 【表 2】

表 2 a：タスク＞投入及び付着＞細胞付着、ステップ 1 変形例 1

表 2 a：細胞付着のタスク設定、ステップ 1			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0		
I C 循環レート	0		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	0		
E C 循環レート	0		
出力	E C 廃棄		
揺動制御	停止 (0°)		停止 180°
停止条件	手動		時間：5分

30

40

## 【0186】

## 【表 3】

表 2 b : タスク＞投入及び付着＞細胞付着、ステップ 2 変形例 1

表 2 b : 細胞付着のタスク設定、ステップ 2			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0		
I C 循環レート	0		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	0		
E C 循環レート	0		
出力	E C 廃棄		
揺動制御	停止 (0°)		
停止条件	手動		時間 : 5 分

10

## 【 0 1 8 7】

20

## 【表 4】

表 2 c : タスク＞投入及び付着＞細胞付着、ステップ 3 変形例 1

表 2 c : 細胞付着のタスク設定、ステップ 3			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0		
I C 循環レート	0		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	0. 1		
E C 循環レート	3 0		
出力	E C 廃棄		
揺動制御	停止 (0°)		停止 1 8 0°
停止条件	手動		

30

## 【 0 1 8 8】

Quantum CES 細胞投入 変形例 2

40

## 【 0 1 8 9】

現状で行われている細胞投入プロシージャ、事前に選択した M S C 増殖プロトコルを、太字で示された以下の変更点を付加して行う。細胞付着フェーズの間 ( 1 8 ~ 2 4 時間 ) 、バイオリアクターを 1 8 0 度位置に回転させ、細胞を中空系の頂部に付着させる。そして、バイオリアクターをホームポジションに戻し、増殖プロトコルを行う。変更点を行うこと理由は、細胞増殖中に、重力によって、空いている成長表面へと細胞を移動させることを促すことである。

## 【 0 1 9 0】

重力を用いて、増殖中の細胞移動に影響を及ぼす。これは、現状の細胞投入プロシージャで記載されるように細胞を播種して、増殖中、バイオリアクターを 1 8 0 度回転させる

50

ことによって実現される。この場合、バイオリアクターのうち占められていない成長表面は、播種された細胞の下方にある。そして、細胞は、最も抵抗の少ない方向（例えば、重力に促進される下方向）に増殖する。

【0191】

0日目（Day：0） 1回転して細胞を付着

【0192】

目的：接着細胞をバイオリアクター膜に付着させると同時にEC循環ループを流す。ICループに対するポンプ流量は、ゼロに設定される。

【0193】

表5は、細胞付着を行う際に各ラインに取付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

【0194】

【表5】

表5：変形例2の細胞付着のための溶液

表5：細胞付着のための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	無し	該当なし
IC培地	タンパク質を有する培地	6 mL/時間
洗浄	無し	該当なし
EC培地	無し	該当なし

10

20

30

【0195】

細胞経路：タスク＞投入及び付着＞細胞付着

【0196】

【表6】

表6：タスク＞投入及び付着＞細胞付着、変形例2

表6：細胞付着のタスク設定、ステップ1			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
IC投入	無し		
IC投入レート	0		
IC循環レート	0		
EC投入	EC培地	IC培地	
EC投入レート	0.1		
EC循環レート	30		
出力	EC廃棄		
揺動制御	停止(0°)		停止180°
停止条件	手動		

40

50

【 0 1 9 7 】

結果は以下のとおりである。

【 0 1 9 8 】

【 表 7 】

表 7

Quantum 実行 No.	変更内容	hMSC 播種数	hMSC 播種数/cm <sup>2</sup>	hMSC 収穫数	hMSC 収穫数/cm <sup>2</sup>	増加率
Q621	対照実験	1.05E+07	500	2.56E+08	12,194	0%
Q622	変形例 1	1.05E+07	500	3.02E+08	14,376	18%
Q623	変形例 1	1.05E+07	500	3.70E+08	17,620	36%
Q624	変形例 1	1.05E+07	500	3.49E+08	16,596	51%

10

【 0 1 9 9 】

【 表 8 】

表 8

Quantum 実行	変更内容	hMSC 播種数	hMSC 播種数/cm <sup>2</sup>	hMSC 収穫数	hMSC 収穫数/cm <sup>2</sup>	増加率
	対照実験	1.05E+07	500	2.56E+08	12,194	0%
平均	変形例 1	1.05E+07	500	3.40E+08	16,197	35%

20

【 0 2 0 0 】

【 表 9 】

表 9

投入条件	播種細胞数	収穫細胞数	倍 加 時 間 (hrs)
対照実験	$10.5 \times 10^6$	$256 \times 10^6$	34.9
重力影響下での増殖 (変形例 2)	$10.5 \times 10^6$	$345 \times 10^6$	30.9
重力影響下での増殖 (変形例 2)	$10.5 \times 10^6$	$347 \times 10^6$	31.9
重力影響下での増殖 (変形例 2)	$10.5 \times 10^6$	$388 \times 10^6$	31.9

30

【 0 2 0 1 】

実施例 2

本発明において中心となる細胞投入プロシーダは、Q U A N T U M (登録商標) 細胞増殖システムのバイオリアクター内において、より均一な細胞分布を可能にすることによって、また播種プロセスにおいて失われる細胞数を減らすことによって、細胞収率を増加するように設計された一連のステップである。

【 0 2 0 2 】

Q U A N T U M 細胞増殖システムのための本発明において中心となる細胞投入技術は、バイオリアクターに播種するために一般に使用されている (ソフトウェアバージョン 2.0 の Q u a n t u m 細胞増殖システムマニュアル) 「均一懸濁液による細胞投入 (L o a d C e l l s w i t h U n i f o r m S u s p e n s i o n)」プロトコルを含

40

50

み且つさらに該プロトコルに付加される一連のステップを提供する。均一懸濁液による細胞投入（LCWUS）では、懸濁された細胞は、細胞懸濁液が200 mL / 分でICループを循環した後、バイオリアクターのある1つの中空系の内側表面に入って付着するには唯1度の機会があるのみである。本発明の細胞投入技術では、最初の懸濁後に付着しない細胞及びバイオリアクター内というよりもICループ内に残った細胞は、再度懸濁され、次の付着のために、バイオリアクター内の別の中空系へと運ばれる。

【0203】

本発明の投入方法は、ICループの循環を通じてバイオリアクターに導入される細胞懸濁液は、ICループ内の細胞懸濁液の循環レートによって、異なる中空系セットを通過するという原理に基づいている。

10

【0204】

均一懸濁液による細胞投入（LCWUS）では、初期的には、200 mL / 分で懸濁液の循環が行われる。そのような状態の後に、ICループにおける細胞懸濁液を、循環方向を正方向と逆方向と交互に変えて行い、同時に順次に循環レートを下げて行う（すなわち、-100 mL / 分、50 mL / 分、-25 mL / 分のように）。ICループの循環を徐々に遅くすることによって、懸濁液に残留している細胞には、バイオリアクター中空系の内側表面に入って付着するためのさらに別の機会を与えることができる。

【0205】

ICループでの流体の各サイクルの後、IC循環レートをゼロにする細胞付着期間が7分間行われる。QUANTUM細胞増殖システムにおいて使用されるバイオリアクターでは、MSC細胞は、中空系の内側表面に、5分以内に付着することが実証されている。従って、7分間の付着期間では、5分間で細胞の付着が可能となり、さらに2分間で、より遅く付着する細胞にも対応できる。ICループにおける細胞懸濁及び細胞付着の合計で4回のサイクルの後、24時間の付着期間を維持し、その後、必要に応じて、適切な細胞フィーディングスケジュールを投入してもよい。

20

【0206】

1日前（Day：-1）バイオリアクターのコーティング

【0207】

目的：バイオリアクター膜を試薬にてコーティングする

【0208】

ステップ1：バッグが空になるまで、ICループ内に試薬を投入。

30

【0209】

ステップ2：ARCから試薬をICループ内に追い込む。

【0210】

ステップ3：試薬をICループ内で循環させる。

【0211】

このタスクが始まる前に、以下の条件を満足させる。

【0212】

細胞投入バッグ内に少なくとも40 mLの空気を含ませる。

40

【0213】

表10は、バイオリアクターコーティングを行う際に各ラインに取り付けて使用される溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

【0214】

【表 1 0】

表 1 0 : バイオリアクターコーティングのための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	フィブロネクチン	1 0 0 mL の P B S に 5 m g のフィ ブロネクチン
I C 培地	無し	該当なし
洗浄	P B S	0 . 1 L + 6 m L / 時間 (一晩)
E C 培地	無し	該当なし

10

【 0 2 1 5】

バイオリアクターコーティング経路：タスク＞システム管理＞バイオリアクターコー  
ティング

【 0 2 1 6】

20

表 1 1 に示されるステップ 1 の各設定のための値を入力する。

【 0 2 1 7】

【表 1 1】

表 1 1 : バイオリアクターコーティングのためのステップ 1			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	試薬		
I C 投入レート	1 0 mL / 分		
I C 循環レート	1 0 0 mL / 分		
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 ( 0 ° )		
停止条件	バッグが空		

30

【 0 2 1 8】

表 1 2 に示されるステップ 2 の各設定のための値を入力する。

40

【 0 2 1 9】

【表 1 2】

表 1 2 : バイオリアクターコーティングのためのステップ 2 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	洗浄		
I C 投入レート	1 0 mL / 分		
I C 循環レート	1 0 0 mL / 分		
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 ( 0 ° )		
停止条件	I C 容積 ( 2 2 mL )		

10

【 0 2 2 0】

表 1 3 に示されるステップ 3 の各設定のための値を入力する。

【 0 2 2 1】

【表 1 3】

20

表 1 3 : バイオリアクターコーティングのためのステップ 3 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	2 0 mL / 分		
E C 投入	洗浄		
E C 投入レート	0 . 1 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 ( 0 ° )		
停止条件	手動		

30

【 0 2 2 2】

0 日目 ( Day : 0 ) I C ・ E C 洗浄

【 0 2 2 3】

目的 : I C 循環ループ及び E C 循環ループの両方における流体を交換する。交換容積は、交換される I C 体積及び E C 体積の数によって指定される。表 1 4 は、I C ・ E C 洗浄を行う際、各ラインに取り付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

40

【 0 2 2 4】

【表 1 4】

表 1 4 : I C ・ E C 洗浄のための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	無し	該当なし
I C 培地	タンパク質を有する培地	1. 4 L
洗浄	無し	該当なし
E C 培地	無し	該当なし

10

【 0 2 2 5】

I C ・ E C 洗浄経路 : タスク &gt; 洗浄 &gt; I C ・ E C 洗浄

【 0 2 2 6】

表 1 5 に示される I C ・ E C 洗浄のための各設定の値を確認する。

【 0 2 2 7】

20

【表 1 5】

表 1 5 : I C ・ E C 洗浄のためのタスク設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	I C 培地		
I C 投入レート	1 0 0 mL / 分		
I C 循環レート	－ 1 7 mL / 分		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	1 4 8 mL / 分		
E C 循環レート	－ 1. 7 mL / 分		
出力	I C 及び E C 出力		
揺動制御	作動 (－ 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、 1 秒)		
停止条件	交換 (2. 5 I C 体積) (2. 5 E C 体積)		

30

40

【 0 2 2 8】

0 日目 ( D a y : 0 ) 培地調整

【 0 2 2 9】

このタスクの説明書に従って、細胞を投入する前に、培地を、規定のガス供給と平衡になるようにする。このタスクは、2つのステップを有する。

【 0 2 3 0】

ステップ 1 : 高い E C 循環レートを使用することによって、培地とガス供給とを迅速に接触させる。

【 0 2 3 1】

ステップ 2 : オペレータが細胞投入をできる状態になるまで、システムを適切な状態に

50



維持する。

【 0 2 3 2 】

表 1 6 は、培地調整を行う際、各ラインに取り付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

【 0 2 3 3 】

【表 1 6】

表 1 6：培地調整のための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく 推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	無し	該当なし
I C 培地	無し	該当なし
洗浄	無し	該当なし
E C 培地	タンパク質を有する培地	0. 1 L + 6 mL / 時間

10

20

【 0 2 3 4 】

培地調整経路：タスク＞システム管理＞培地調整

【 0 2 3 5 】

表 1 7 に示されるステップ 1 の各設定のための値を入力する。

【 0 2 3 6 】

【表 1 7】

表 1 7：培地調整のためのステップ 1 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	1 0 0 mL / 分		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	0. 1 mL / 分		
E C 循環レート	2 5 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 (0°)		
停止条件	時間 (1 0 分)		

30

40

【 0 2 3 7 】

表 1 8 に示されるステップ 2 の各設定のための値を入力する。

【 0 2 3 8 】

【表 18】

表 18： 培地調整のためのステップ2 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL／分		
I C 循環レート	100 mL／分		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	0.1 mL／分		
E C 循環レート	30 mL／分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 (0°)		
停止条件	手動		

10

## 【0239】

0 日目 (Day : 0) 均一懸濁液による細胞の投入

## 【0240】

目的：バッグが空になるまで、細胞投入バッグから、細胞をバイオリアクター内に投入する。このタスクでは、I C 循環のみを使用して、細胞を分配させ、細胞を、ラインからバイオリアクター内へは追い込まない。このタスクは、3つのステップを有する。

20

## 【0241】

ステップ1：細胞投入バッグから細胞をバイオリアクター内へ投入する。

## 【0242】

ステップ2：A R C から、細胞をバイオリアクターへ追い込む。追い込み体積 (chase volumes) が大きい程、細胞を分散させ、I C 出口へと移動させる。

## 【0243】

ステップ3：I C 入口ひいては限外濾過によらず、I C 循環によって、膜への細胞分配を促進する。

30

## 【0244】

このタスクを始める前に、以下の条件を満足させる。

## 【0245】

細胞投入バッグ内に少なくとも40 mLの空気を含ませる。

## 【0246】

表19は、均一懸濁液による細胞投入を行う際、各ラインに取り付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

## 【0247】

【表 19】

表 19：均一懸濁液による細胞投入のための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく 推定値)
細胞投入	細胞	該当なし
試薬	無し	該当なし
I C 培地	タンパク質を有する培地	0.2 L
洗浄	無し	該当なし
E C 培地	無し	該当なし

10

## 【0248】

均一懸濁液による細胞投入経路：タスク＞投入及び付着＞均一懸濁液による細胞投入

## 【0249】

表 20 に示されるステップ 1 の各設定のための値を確認する。

20

## 【0250】

【表 20】

表 20：均一懸濁液による細胞投入のためのステップ 1 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	細胞		
I C 投入レート	50 mL/分		25 mL/分
I C 循環レート	200 mL/分		150 mL/分
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL/分		
E C 循環レート	30 mL/分		
出力	E C 出力		
揺動制御	作動 (−90°、 180°、1 秒)		
停止条件	バッグが空		

30

## 【0251】

表 21 に示されるステップ 2 の各設定のための値を確認する。

40

## 【0252】

【表 2 1】

表 2 1 : 均一懸濁液による細胞投入のためのステップ 2 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	I C 培地		
I C 投入レート	5 0 mL / 分		2 5 mL / 分
I C 循環レート	2 0 0 mL / 分		1 5 0 mL / 分
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	作動 ( - 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、 1 秒 )		
停止条件	I C 体積 ( 2 2 mL )		

10

## 【 0 2 5 3 】

表 2 2 に示されるステップ 3 の各設定のための値を確認する。

20

## 【 0 2 5 4 】

## 【表 2 2】

表 2 2 : 均一懸濁液による細胞投入のためのステップ 3 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	2 0 0 mL / 分		
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	作動 ( - 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、 1 秒 )		
停止条件	時間 ( 2 . 0 分 )		

30

## 【 0 2 5 5 】

0 日目 ( Day : 0 ) 中心となる ( B u l l ' s E y e ) 細胞付着

40

## 【 0 2 5 6 】

目的 : E C 循環ループのフローを行いながら、接着細胞を、バイオリアクターに付着させる。I C ループに対するポンプ流量は、ゼロに設定される。

## 【 0 2 5 7 】

ステップ 1 : 1 8 0 度の状態で、バイオリアクターの内側表面に、細胞を、7 分間付着させる。

## 【 0 2 5 8 】

ステップ 2 : 最初の投入方向とは反対の方向に、高レートで、I C 流体及び残留懸濁細胞を循環させる。

50

## 【 0 2 5 9 】

ステップ 3：このステップは、細胞をさらに付着させるための、第 2 の 7 分間付着期間である。I C ループから或いはバイオリアクターの別の領域から移動してきた細胞に、バイオリアクターに沈殿・付着する機会が与えられる。

## 【 0 2 6 0 】

ステップ 4：I C ループに残留している細胞及び表面にまだ付着していない細胞を再度循環させる。循環は正方向に行われ、すでに付着した細胞が離れることを避けるため、また、これまでのステップで播種されなかったバイオリアクターの領域に優先的に播種させるため、循環レートは低くする。

## 【 0 2 6 1 】

ステップ 5：このステップは、細胞をさらに付着させるための、第 3 の 7 分間付着期間である。I C ループから或いはバイオリアクターの別の領域から移動してきた細胞に、バイオリアクターに沈殿・付着する機会が与えられる。

## 【 0 2 6 2 】

ステップ 6：I C ループに残留している細胞及び表面にまだ付着していない細胞を再度循環させる。循環は負方向に行われ、すでに付着した細胞が離れることを避けるため、循環レートは低くする。

## 【 0 2 6 3 】

ステップ 7：24 時間の細胞付着期間。フィーディング ( f e e d i n g ) が始まる前に、細胞を、24 時間かけて、バイオリアクターに堅固に固着させる。

## 【 0 2 6 4 】

表 2 3 は、本発明において中心となる細胞付着を行う際、各ラインに取り付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

## 【 0 2 6 5 】

## 【表 2 3】

表 2 3：中心となる細胞付着のための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく 推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	無し	該当なし
I C 培地	タンパク質を有する培地	6 mL / 時間
洗浄	無し	該当なし
E C 培地	無し	該当なし

## 【 0 2 6 6 】

中心となる細胞付着経路：タスク > カスタム > カスタム

## 【 0 2 6 7 】

表 2 4 に示される各設定のための値を入力する。

## 【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

【表 2 4】

表 2 4 : 中心となる細胞付着のためのタスク設定ステップ 1			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	0 mL / 分		
E C 投入	E C 培地		
E C 投入レート	0. 1 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 (0°)	停止 (1 8 0°)	
停止条件	時間 (7. 0 分)		

10

【 0 2 6 9 】

表 2 5 に示される各設定のための値を入力する。

20

【 0 2 7 0 】

【表 2 5】

表 2 5 : 中心となる細胞付着のためのタスク設定ステップ 2			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	<del>0 mL / 分</del>		- 1 0 0 mL / 分
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	<del>0 mL / 分</del>		3 0 mL / 分
出力	E C 出力		
揺動制御	停止		作動 (- 9 0°、 1 8 0°、1 秒)
停止条件	手動		時間 (2. 0 分)

30

【 0 2 7 1 】

表 2 6 に示される各設定の値を入力する。

40

【 0 2 7 2 】

【表 2 6】

表 2 6 : 中心となる細胞付着のためのタスク設定ステップ 3			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C投入	無し		
I C投入レート	0 mL / 分		
I C循環レート	0 mL / 分		
E C投入	E C培地	I C培地	
E C投入レート	0. 1 mL / 分		
E C循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C出力		
揺動制御	停止 (0°)		
停止条件	時間 (7. 0分)		

10

【 0 2 7 3】

表 2 7 に示される各設定のための値を入力する。

20

【 0 2 7 4】

【表 2 7】

表 2 7 : 中心となる細胞付着のためのタスク設定ステップ 4			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C投入	無し		
I C投入レート	0 mL / 分		
I C循環レート	0 mL / 分		5 0 mL / 分
E C投入	無し		
E C投入レート	0 mL / 分		
E C循環レート	0 mL / 分		3 0 mL / 分
出力	E C出力		
揺動制御	停止		作動 (− 9 0°、 1 8 0°、1 秒)
停止条件	手動		時間 (4. 0分)

30

【 0 2 7 5】

表 2 8 に示される各設定の値を入力する。

40

【 0 2 7 6】

【表 2 8】

表 2 8 : 中心となる細胞付着のためのタスク設定ステップ 5			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	0 mL / 分		
E C 投入	E C 培地		
E C 投入レート	0. 1 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 (0°)		
停止条件	時間 (7. 0 分)		

10

【 0 2 7 7】

表 2 9 に示される各設定のための値を入力する。

【 0 2 7 8】

【表 2 9】

20

表 2 9 : 中心となる細胞付着のためのタスク設定ステップ 6			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	0 mL / 分		- 2 5 mL / 分
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	0 mL / 分		3 0 mL / 分
出力	E C 出力		
揺動制御	停止		作動 (- 9 0°、 1 8 0°、1 秒)
停止条件	手動		時間 (8. 0 分)

30

【 0 2 7 9】

表 3 0 に示される各設定の値を入力する。

【 0 2 8 0】



【表 3 0】

表 3 0 : 中心となる細胞付着のためのタスク設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	0 mL / 分		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	0. 1 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	停止 (0°)		
停止条件	手動		時間 (1 4 4 0. 0 分)

10

## 【 0 2 8 1】

1 日目 (D a y : 1 ) 細胞フィード

20

## 【 0 2 8 2】

目的 : I C 循環ループ及び / 又は E C 循環ループに対して、連続して低い流量を与える。このタスク中にシステムに付加される流体を除去するために使用できる出口用の設定がいくつかある。

## 【 0 2 8 3】

表 3 1 は、細胞フィードを行う際、各ラインに取り付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

## 【 0 2 8 4】

## 【表 3 1】

30

表 3 1 : 細胞フィードのための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく 推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	無し	該当なし
I C 培地	タンパク質を有する培地	6 mL / 時間
洗浄	無し	該当なし
E C 培地	無し	該当なし

40

## 【 0 2 8 5】

細胞フィード経路 : タスク &gt; フィード及び付加 &gt; 細胞フィード

## 【 0 2 8 6】

表 3 2 に示されるステップ 1 の各設定のための値を確認する。

## 【 0 2 8 7】

【表 3 2】

表 3 2 : 細胞フィードのためのタスク設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	I C 培地		
I C 投入レート	0. 1 mL / 分		
I C 循環レート	2 0 mL / 分		
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	I C 出力		
揺動制御	停止 ( 0 ° )		
停止条件	手動		

10

## 【 0 2 8 8 】

必要であれば、I C 投入レートを増やす。

## 【 0 2 8 9 】

接着細胞の剥離及び収穫

20

## 【 0 2 9 0 】

目的：細胞を膜から剥離させ、I C ループに放ち、I C 循環ループから懸濁状態の細胞（バイオリアクター内の細胞も含む）を収穫バッグへ移送する。

## 【 0 2 9 1 】

ステップ 1：試薬付加に備えて、I C・E C 洗浄タスクを行う。例えば、システムにおいて、I C・E C 培地を P B S に置換して、トリプシン付加に備えて、タンパク質、C a ++、M g ++ を除去する。

## 【 0 2 9 2 】

ステップ 2：バッグが空になるまで、システムに試薬を投入。

## 【 0 2 9 3 】

ステップ 3：試薬を I C ループに追い込む。

30

## 【 0 2 9 4 】

ステップ 4：I C ループ内で試薬を混ぜる。

## 【 0 2 9 5 】

ステップ 5：I C 循環ループから懸濁状態の細胞（バイオリアクター内の細胞も含む）を収穫バッグへ移送する。

## 【 0 2 9 6 】

このタスクを始める前に、以下の条件を満足させる。

## 【 0 2 9 7 】

細胞投入バッグに少なくとも 4 0 m L の空気を含ませる。

40

## 【 0 2 9 8 】

表 3 3 は、接着細胞の剥離及び収穫を行う際、各ラインに取り付けられる溶液バッグを示す。これら溶液及び体積は、このタスク用のデフォルトの設定に基づいている。

## 【 0 2 9 9 】

【表 3 3】

表 3 3 : 接着細胞の剥離及び収穫のための溶液		
バッグ	バッグ内の溶液	体積 (工場出荷時設定に基づく 推定値)
細胞投入	無し	該当なし
試薬	トリプシン	1 8 0 mL
I C 培地	タンパク質を有する培地	0. 6 L
洗浄	P B S	1. 4 L
E C 培地	無し	該当なし

10

## 【 0 3 0 0 】

接着細胞の剥離経路：タスク＞剥離及び収穫＞接着細胞の剥離及び収穫

## 【 0 3 0 1 】

表 3 4 に示されるステップ 1 のための各設定の値を確認する。

20

## 【 0 3 0 2 】

## 【表 3 4】

表 3 4 : 接着細胞の剥離及び収穫のためのステップ 1 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	洗浄		
I C 投入レート	1 0 0 mL / 分		
I C 循環レート	－ 1 7 mL / 分		
E C 投入	洗浄		
E C 投入レート	1 4 8 mL / 分		
E C 循環レート	－ 1. 7 mL / 分		
出力	I C 及び E C 出力		
揺動制御	作動 (－ 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、秒)		
停止条件	交換 (2. 5 I C 体積) (2. 5 E C 体積)		

30

40

## 【 0 3 0 3 】

表 3 5 に示されるステップ 2 の各設定のための値を確認する。

## 【 0 3 0 4 】

【表 3 5】

表 3 5 : 接着細胞の剥離及び収穫のためのステップ 2 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	試薬		
I C 投入レート	5 0 mL / 分		
I C 循環レート	3 0 0 mL / 分		
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	作動 (− 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、 1 秒)		
停止条件	バッグが空		

10

## 【 0 3 0 5 】

表 3 6 に示されるステップ 3 の各設定のための値を確認する。

20

## 【 0 3 0 6 】

【表 3 6】

表 3 6 : 接着細胞の剥離及び収穫のためのステップ 3 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	洗浄		
I C 投入レート	5 0 mL / 分		
I C 循環レート	3 0 0 mL / 分		
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	作動 (− 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、 1 秒)		
停止条件	I C 容積 ( 2 2 mL )		

30

## 【 0 3 0 7 】

表 3 7 に示されるステップ 4 の各設定のための値を確認する。

40

## 【 0 3 0 8 】

【表 3 7】

表 3 7 : 接着細胞の剥離及び収穫のためのステップ 4 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	無し		
I C 投入レート	0 mL / 分		
I C 循環レート	3 0 0 mL / 分		
E C 投入	無し		
E C 投入レート	0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	E C 出力		
揺動制御	作動 ( - 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、 1 秒 )		
停止条件	時間 ( 4 分 )		

10

【 0 3 0 9 】

表 3 8 に示されるステップ 5 の各設定のための値を確認する。

20

【 0 3 1 0 】

【表 3 8】

表 3 8 : 接着細胞の剥離及び収穫のためのステップ 5 設定			
設定	工場出荷時設定	実験室用初期設定	変更点
I C 投入	I C 培地		
I C 投入レート	4 0 0 mL / 分		
I C 循環レート	- 7 0 mL / 分		
E C 投入	E C 培地	I C 培地	
E C 投入レート	6 0 mL / 分		
E C 循環レート	3 0 mL / 分		
出力	収穫		
揺動制御	作動 ( - 9 0 ° 、 1 8 0 ° 、 1 秒 )		
停止条件	I C 容積 ( 3 7 8 mL )		

30

40

【 0 3 1 1 】

結果は以下である。

【 0 3 1 2 】

【表 3 9】

投入	時間 (日数)	投入細胞数	収穫細胞数	生存率	Agg (0-5)	69% 調整された倍加時間(hr)	調整されていない倍加時間(hr)	平均プラスコ倍加時間(hr)
本 発 明	4.8	1.52E+06	1.97E+08	98.1%	2	27.2	31.2	24.1
本 発 明	4.8	1.52E+06	2.05E+08	98.0%	2	26.8	30.7	24.1
本 発 明	4.8	1.52E+06	2.01E+08	99.3%	2	27.1	31.0	24.1
対 照 実験	4.8	1.52E+06	1.38E+08	99.3%	2	31.0	36.2	24.1

10

## 【 0 3 1 3 】

本発明の投入技術が、4つの異なるドナーからのMSCを用いて評価される。本発明に係る投入の収穫数に基づく収率は、LCWUSを用いて投入し同条件で培養した場合の収率よりも、一貫して高い。LCWUS (n = 4) に対する本発明 (n = 6) を用いた場合の平均細胞収率増加は、25%である。

20

## 【 0 3 1 4 】

本発明に係る投入を行った直後にICループから取り出したMSCサンプルの生存率は100%である。本発明の収穫数に基づくMSCの生存率は、全てのサンプルにおいて、98%を超えている。本発明を用いた収穫によるMSCは、培養下において典型的な形態を示し、フローサイトメトリーによって測定したMSCバイオマーカーは全て、ISCT標準に適合している。

## 【 0 3 1 5 】

## 実施例 3

実施例 2 で記載された同じプロトコルを用いて、本発明の中心となる付着プロトコルの変更例を研究した。上記形態及び上記プロトコルに対する変形 (実施形態 2) は、循環レート (100 ml / 分 ; - 50 ml / 分 ; 25 ml / 分) 後の付着期間の省略である。すなわち、上記した7分間停止の条件の代わりに、停止条件を省略して、次の循環レートが前回の循環レートの直後に続く。対照実験及び実施例 2 の本発明実験 (実施形態 1) も比較として行った。

30

## 【 0 3 1 6 】

結果は以下のとおりである。

## 【 0 3 1 7 】

【表 4 0】

表 4 0

ロード	時 間 (日数)	投入 細胞数	収穫 細胞数	生存率	Agg (0-5)	69% 調 整された倍 加時間(hr)	調整されて いない 倍 加時間(hr)	平 均フラス コ倍加時間 (hr)
変更形 態1	4.9	1.52E+07	2.60E+08	99.2%	0	25.4	28.7	26.0(500 細 胞 数 /cm <sup>2</sup> )
対照実 験	4.9	1.52E+07	1.94E+08	97.5%	1	27.9	32.0	25.5(345 細 胞 数 /cm <sup>2</sup> )
変更形 態2	4.9	1.52E+07	2.10E+08	98.1%	1	27.2	31.1	?
変更形 態2	4.9	1.52E+07	2.07E+08	98.7%	1	27.3	31.2	?

10

## 【 0 3 1 8 】

種々の構成要素は、ここにおいて、「動作可能に関連付けられている」と言及される場合がある。ここに使用される「動作可能に関連付けられている」とは、構成要素が動作可能な方式で相互に結合されていることを指し、これは、構成要素が直接結合された実施形態及び2つの結合された構成要素の間に付加的な構成要素が置かれる実施形態をも包含する。

20

## 【 0 3 1 9 】

本発明の1以上の実施形態の上述の記載は、本発明を例示する目的でなされたものであり、本発明を、限定するものではない。上述の詳細な説明において、例えば、本発明の1以上の実施形態の種々の特徴は、本発明の開示の理解容易性のために、グループ化されている。しかしながら、このような開示の手法は、各請求項の範囲に明示される特徴より多くの特徴を本発明の実施形態が必要とするという意図を反映していると解釈されるべきではない。むしろ、本出願の請求項の範囲が記載するように、本発明の態様は、ここで開示した一実施形態の全ての特徴よりは少ない。従って、請求項の範囲は、詳細な説明に含まれるものであり、各請求項の範囲は、本発明の実施形態とは離れて、それ自身で成り立つものである。

30

## 【 0 3 2 0 】

さらに、本発明の記載は、1以上の実施形態及びある変更形態、ある改変形態の記載を含むが、その他の変更形態、改変形態も本発明の範囲にある（例えば、本発明を理解した後の当業者の技能及び知識の範疇なので、当業者であれば理解できよう）。許容される範囲において、すなわち他の、交換可能な、及び/又は同等な、構造、機能、範囲、工程が、開示されているか否かにかかわらず、特許可能な主題を公にすることだけを意図しているのではなく、そのような構造、機能、範囲、工程を有する他の実施形態をも含む権利を取得することを意図する。

40

【図 1 A】

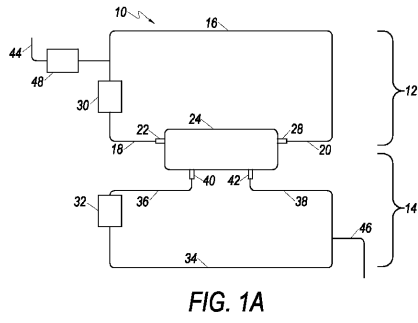


FIG. 1A

【図 1 B】

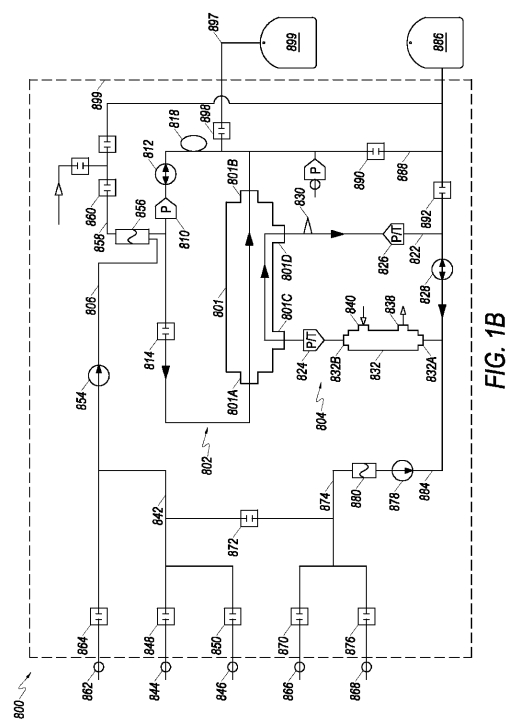


FIG. 1B

【図 1 C】

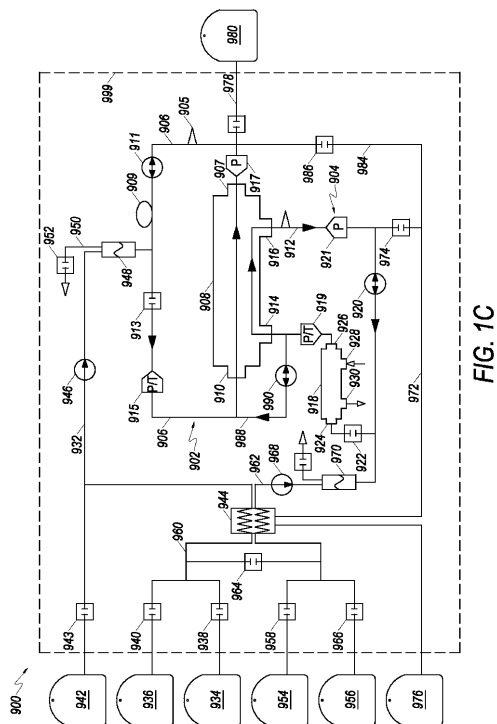


FIG. 1C

【図 1 D】

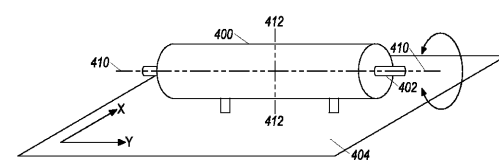


FIG. 1D

【図 2 A】

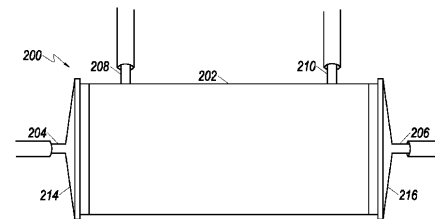
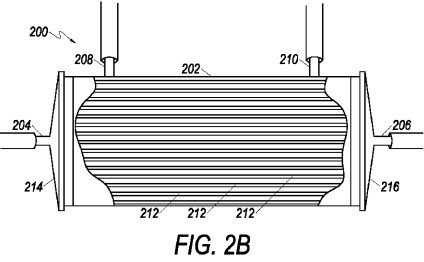


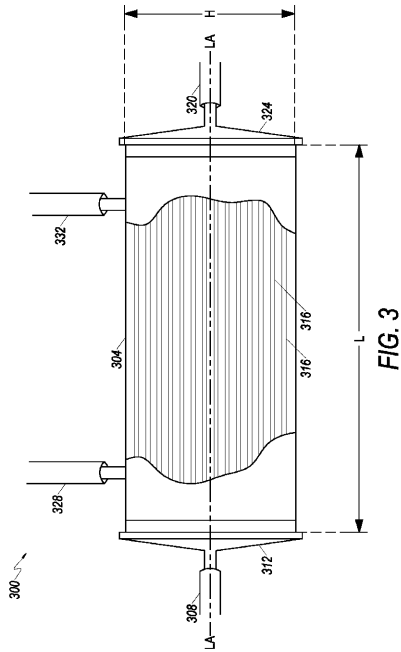
FIG. 2A



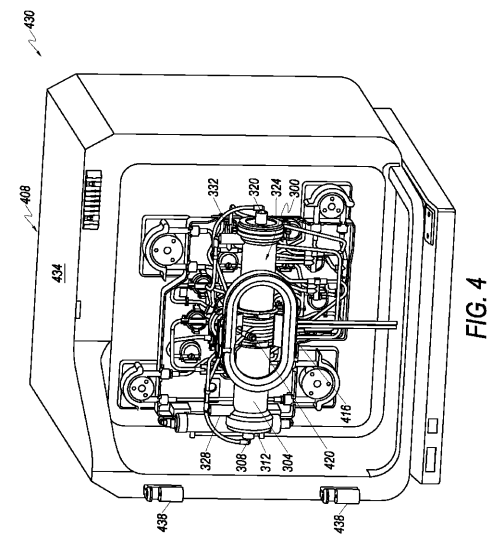
【図 2 B】



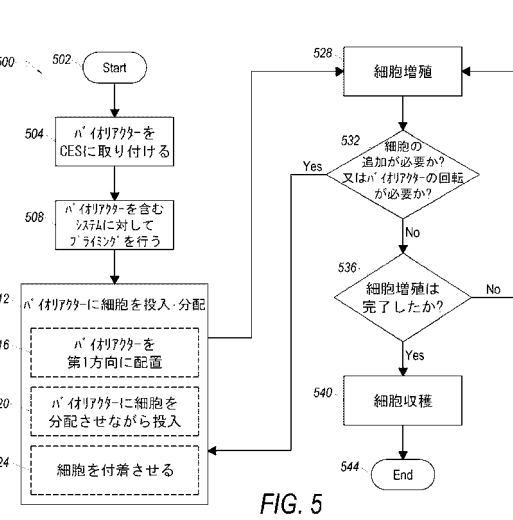
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

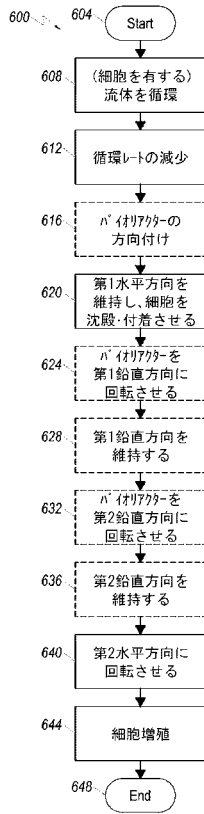


FIG. 6

【図 7】

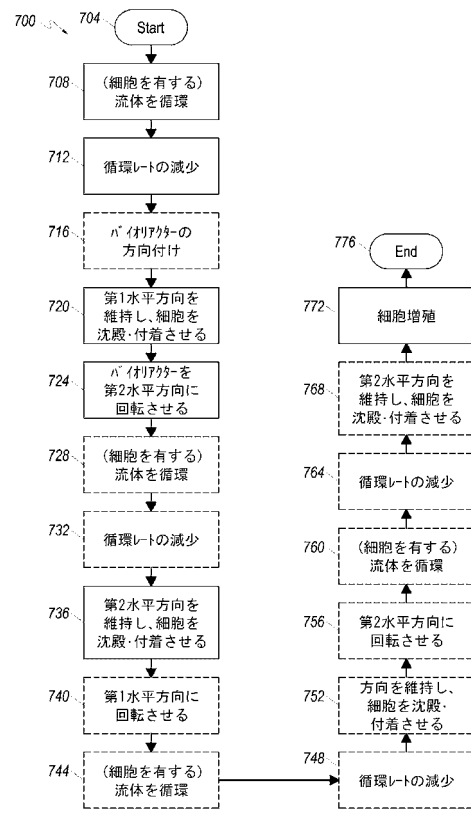


FIG. 7

【図 8】

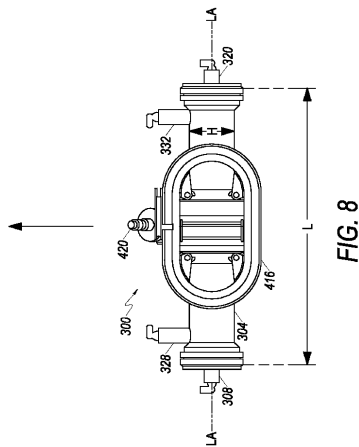


FIG. 8

【図 10】

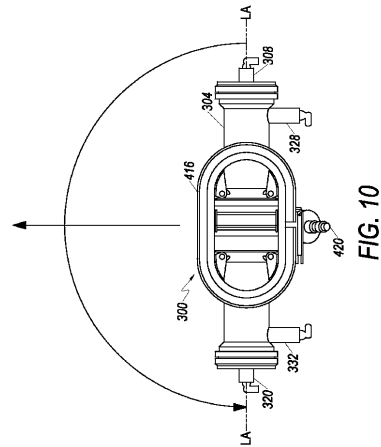


FIG. 10

【図 9】

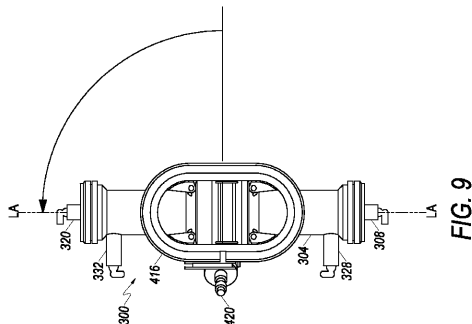
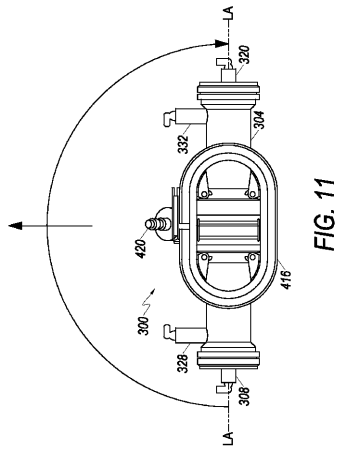
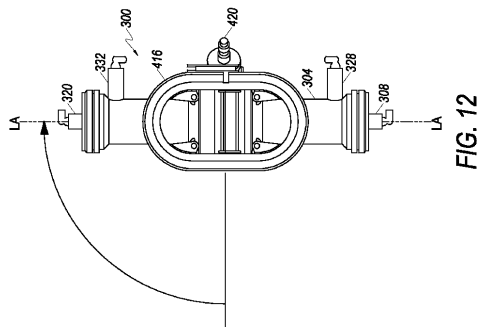


FIG. 9

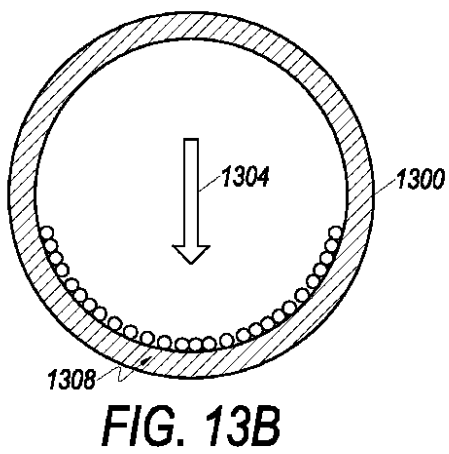
【 図 1 1 】



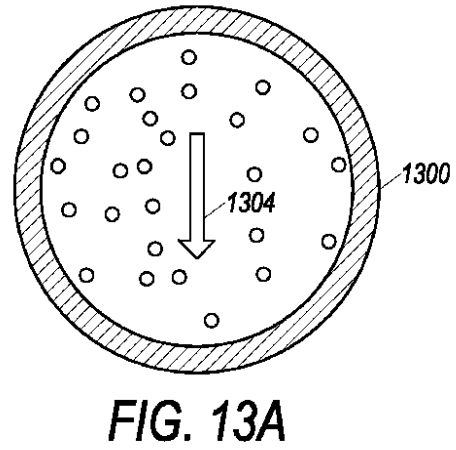
【 図 1 2 】



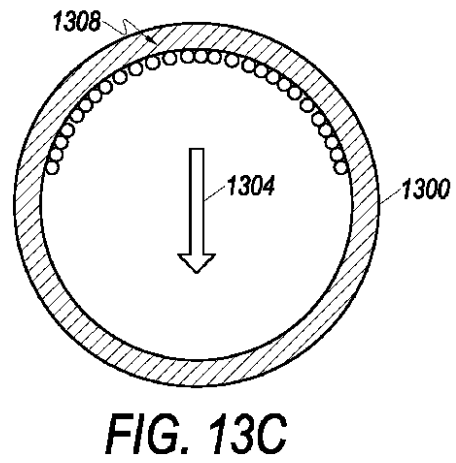
【 図 1 3 B 】



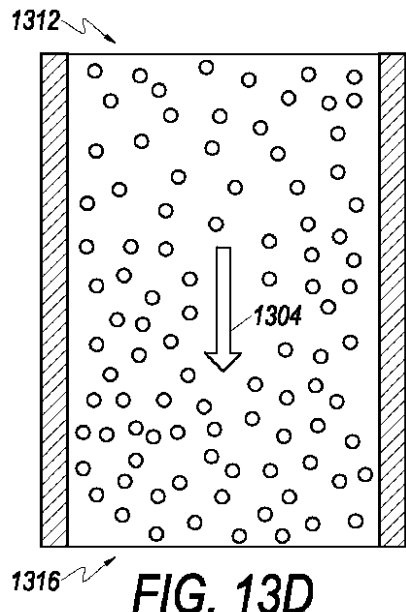
【 図 1 3 A 】



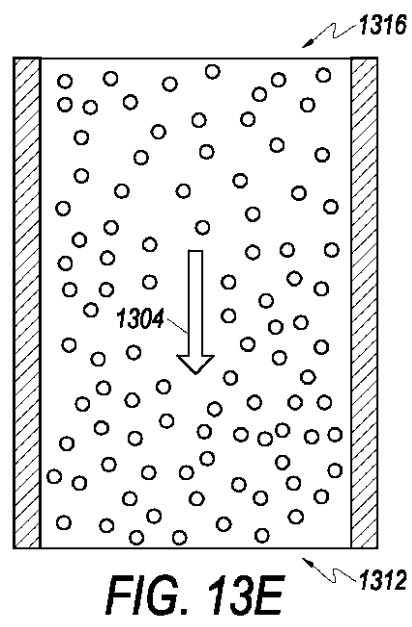
【 図 1 3 C 】



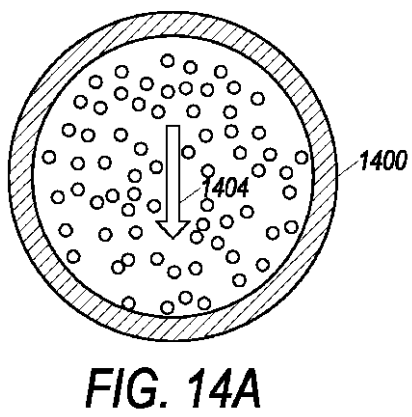
【図 13 D】



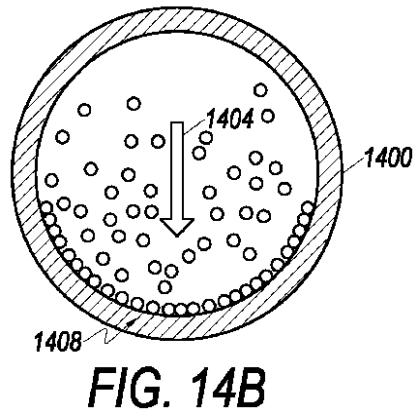
【図 13 E】



【図 14 A】



【図 14 B】



【図 14 C】

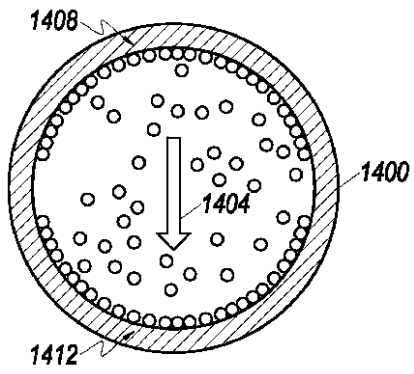


FIG. 14C

【図 14 D】

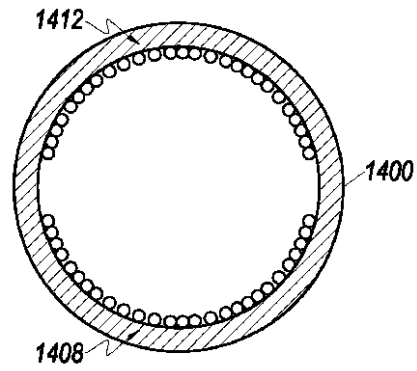


FIG. 14D

【図 15 A】

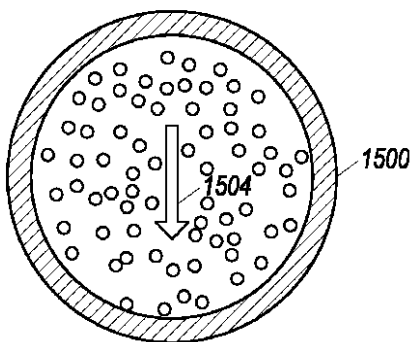


FIG. 15A

【図 15 B】

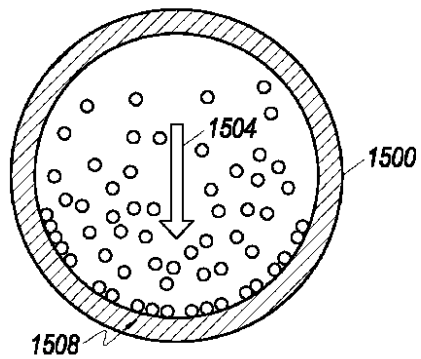


FIG. 15B

【図 15 C】

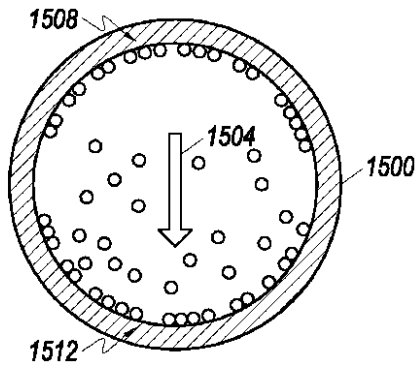


FIG. 15C

【図 15 D】

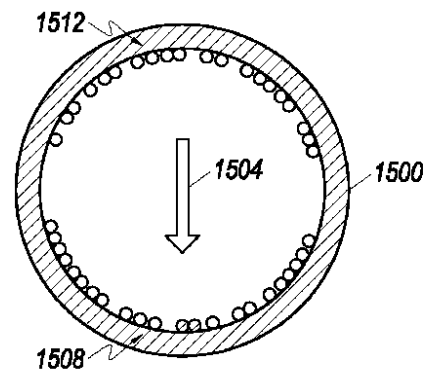


FIG. 15D

【図 15 E】

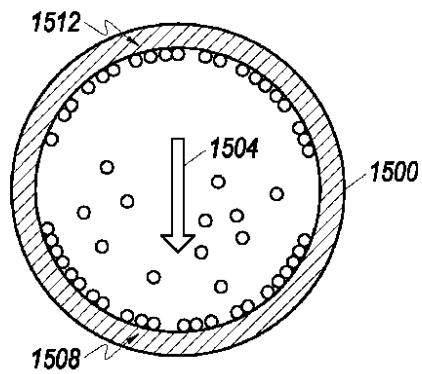


FIG. 15E

【図 15 F】

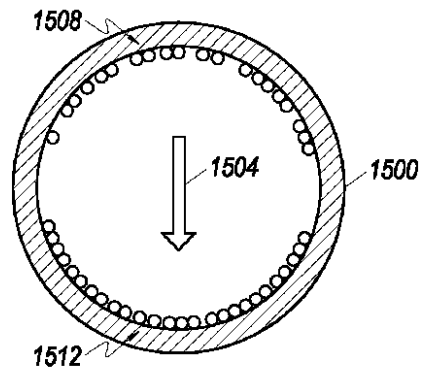


FIG. 15F

【図 16】

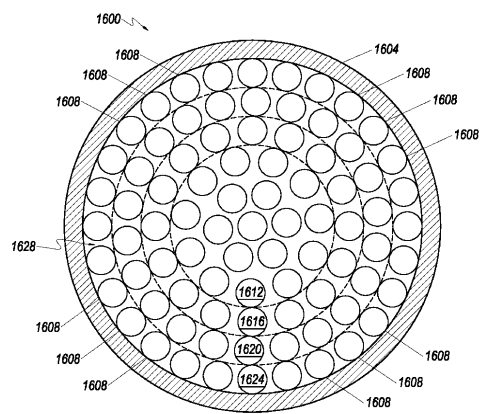


FIG. 16

【図 17】

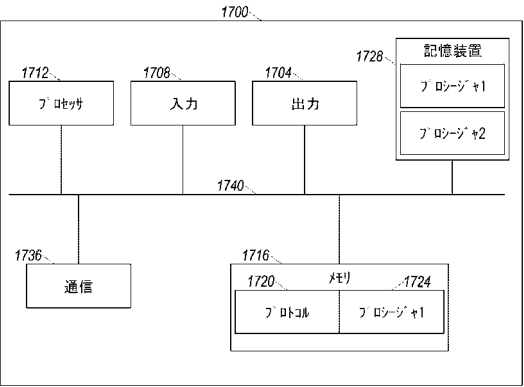


FIG. 17

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/065829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12M3/00	C12M1/00 C12M1/12 C12M3/06 C12M1/34
	C12N5/0775	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12M C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/109674 A2 (GAMBRO BCT INC [US]; ANTWILER GLEN DELBERT [US] CARIDIANBCT INC [US];) 12 September 2008 (2008-09-12)	1-20
Y	paragraphs [0095] - [0100] examples 1, 2, 6 claims 1-27	1-14
X	US 2011/159584 A1 (GIBBONS DAVID M [US] ET AL) 30 June 2011 (2011-06-30)	15-20
Y	pages 1,6 claims 1-30	1-14
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 January 2015		21/01/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bayer, Martin



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/065829

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MARK JONES ET AL: "Genetic stability of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in the Quantum System", CYTOTHERAPY, vol. 15, no. 11, 28 August 2013 (2013-08-28), pages 1323-1339, XP055160794, ISSN: 1465-3249, DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.05.024 the whole document</p> <p>-----</p>	15-20
X	<p>Brian Nankervis ET AL: "Shear Stress Conditions in the Quantum Cell Expansion System", Poster Session - TERMIS AM Annual Conference 2013, 12 November 2013 (2013-11-12), XP055160795, Retrieved from the Internet: URL:https://imgsvr.eventrebel.s.com/ERimg/00/91/88/2337796/27446-2-10311.pdf [retrieved on 2015-01-09] the whole document</p> <p>-----</p>	15-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/065829

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008109674 A2	12-09-2008	CA 2680130 A1	12-09-2008
		EP 2129764 A2	09-12-2009
		JP 2010519937 A	10-06-2010
		JP 2013176377 A	09-09-2013
		US 2008220523 A1	11-09-2008
		US 2013102070 A1	25-04-2013
		WO 2008109674 A2	12-09-2008
-----			
US 2011159584 A1	30-06-2011	US 2011159584 A1	30-06-2011
		WO 2011090605 A2	28-07-2011
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100149261

弁理士 大内 秀治

(74)代理人 100136548

弁理士 仲宗根 康晴

(74)代理人 100136641

弁理士 坂井 志郎

(72)発明者 ナンカーヴィス、ブライアン ジェイ .

アメリカ合衆国、コロラド州 8 0 6 0 2、ソーントン、イースト 1 3 4 番 プレイス 8 1 5 5

(72)発明者 ジョーンズ、マーク イー .

アメリカ合衆国、コロラド州 8 0 1 2 7、リットルトン、ブラックテイル マウンテン 1 1 9 7 6

F ターム(参考) 4B029 AA02 AA09 BB11 CC02 CC11 DA04 DB19 DC07 GA02 GB10

HA05

4B065 AA93X AC20 BA30 CA44 CA60