

(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2010-519936  
(P2010-519936A)

(43) 公表日 平成22年6月10日(2010.6.10)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/00 (2006.01)		C 1 2 N 1/00	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/07 (2010.01)		C 1 2 N 5/00	2 0 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2009-552858 (P2009-552858)  
 (86) (22) 出願日 平成20年3月5日(2008.3.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月16日(2009.10.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/055904  
 (87) 国際公開番号 W02008/109668  
 (87) 国際公開日 平成20年9月12日(2008.9.12)  
 (31) 優先権主張番号 60/892, 903  
 (32) 優先日 平成19年3月5日(2007.3.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/892, 962  
 (32) 優先日 平成19年3月5日(2007.3.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/892, 981  
 (32) 優先日 平成19年3月5日(2007.3.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

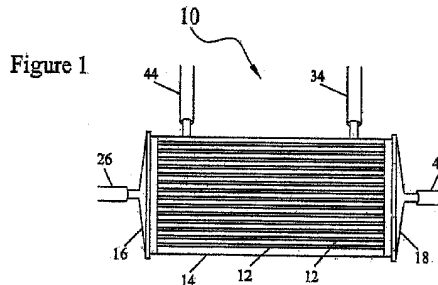
(71) 出願人 507114521  
 カリディアンビーシーティー、インコーポ  
 レーテッド  
 CaridianBCT, Inc.  
 アメリカ合衆国、コロラド州 80215  
 、レイクウッド、ウエスト・コリンズ・ア  
 ベニュー 10811  
 10811 West Collins  
 Avenue, Lakewood, C  
 olorado 80215, U. S.  
 A.  
 (74) 代理人 100058479  
 弁理士 鈴江 武彦  
 (74) 代理人 100108855  
 弁理士 蔵田 昌俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中空繊維バイオリクター内における細胞の動きを制御する方法

(57) 【要約】

この発明は、流体の流れを利用して中空繊維バイオリクターを通して細胞を移動させる方法に指向されている。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

中空繊維バイオリクター内で細胞を移動させる方法であって、  
上記中空繊維は、毛管内空間および毛管外空間を有し、  
上記毛管内空間および上記毛管外空間の一方へ細胞を充填する工程と；  
細胞を収容している上記一方の毛管内空間或いは毛管外空間へ流体を流す工程と；  
上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方を流れる流体の圧力より大きい圧力を上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の一方を流れる流体へ与える工程と；  
を有する方法。

**【請求項 2】**

上記流体に圧力を与える工程は、上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方と比較して、細胞を収容している上記一方の空間を流れる流体の圧力を変える工程を含む、請求項 1 の方法。

**【請求項 3】**

上記細胞を収容している空間を流れる流体の体積を増加させることによって流体の圧力を増大させる工程をさらに有する、請求項 2 の方法。

**【請求項 4】**

上記移動される細胞は、上記毛管内空間にある、請求項 1 の方法。

**【請求項 5】**

上記中空繊維の表面へ細胞を移動させる工程をさらに有する、請求項 1 の方法。

**【請求項 6】**

上記中空繊維は、複数の細孔を有する、請求項 1 の方法。

**【請求項 7】**

上記流体を流す工程は、上記細胞を収容している空間から、上記中空繊維の上記複数の細孔を介して、上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方へ、上記流体の一部を流す工程をさらに有する、請求項 6 の方法。

**【請求項 8】**

上記中空繊維の表面へ細胞を移動させる工程は、該表面へ細胞が付着することを許容する工程をさらに有する、請求項 5 の方法。

**【請求項 9】**

上記流体の圧力を増大させる工程は、流体の流量を増やして流体の送り速度を速くする工程を有する、請求項 3 の方法。

**【請求項 10】**

上記流体を流す工程は、上記中空繊維の表面上に細胞を保持する工程を有する、請求項 5 の方法。

**【請求項 11】**

上記空間内で上記細胞を浮遊モードに維持する工程をさらに有する、請求項 1 の方法。

**【請求項 12】**

上記中空繊維の表面から離れる方向に細胞を移動させる工程をさらに有する、請求項 1 の方法。

**【請求項 13】**

中空繊維バイオリクター内に収容されている細胞を再供給する方法であって、  
上記中空繊維は、毛管内空間および毛管外空間を有し、  
上記中空繊維の壁から離れる方向に細胞を移動させるように選択された流れで、上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の一方に流体を流す工程と；  
上記バイオリクターの中から細胞を移動させる工程と；  
上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の一方を通して細胞を収容した流体を流すことによって再供給される、上記除去された細胞を、上記バイオリクターへ戻す工程と；  
を有する方法。

**【請求項 14】**

10

20

30

40

50

上記中空繊維の壁から離れる方向に細胞を移動させる工程は、上記中空繊維の壁から細胞をはずす工程をさらに有する、請求項13の方法。

【請求項15】

上記中空繊維の壁から細胞をはずす工程は、上記流体に分離化学剤を加える工程をさらに有する、請求項14の方法。

【請求項16】

第1の面および第2の面を有するバイオリアクターの膜壁から付着した細胞をはずす方法であって、

上記細胞は、上記第1の面に付着され、

上記第1の面から細胞を移動させるために上記膜壁をいくらかの流体が通過するのに十分な圧力で上記第2の面に沿って流体を流す工程を有する方法。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

【0001】

優先権主張

本願は、2007年3月5日に出願された米国仮出願No. 60/892903、2007年3月5日に出願された米国仮出願No. 60/892962、2007年3月5日に  
出願された米国仮出願No. 60/892981、2007年4月12日に  
出願された米国仮出願No. 60/911393、2007年9月11日に  
出願された米国仮出願No. 60/971494、および2007年9月11日に  
出願された米国仮出願No. 60/971511の優先権を主張する。

20

【0002】

背景

少量のドナー細胞から培養された人間の幹細胞は、傷付けられた、或いは欠陥のある組織の修復、或いは置き換えに使用でき、疾病の広い範囲の処置のため広く臨床的に利用される。再生医療の分野における最近の進歩は、幹細胞が、自己再生能力、分化しない状態を維持できること、および特別な状態の下で多くの細胞に分化できること、などのユニークな特性を有することを明らかにしている。

【0003】

再生医療の1つの重要な要素として、バイオリアクターや細胞拡散システムは、細胞の成長および拡散のための最適化された環境を与える役割を果す。バイオリアクターは、閉塞された無菌システムにて細胞の成長に影響する物理化学の環境を与えるとともに、細胞に栄養分を与えて代謝産物を除去する。細胞拡散システムは、幹細胞と同様な他のタイプの細胞の成長に利用できる。

30

【0004】

現在、多くのタイプのバイオリアクターが利用できる。最も一般的な2つは、平板バイオリアクターと中空繊維バイオリアクターを含む。平板バイオリアクターは、広い複数の平面上での細胞の成長が可能である。一方、中空繊維バイオリアクターは、複数本の中空繊維の内側或いは外側のいずれかで細胞の成長が可能である。

【0005】

40

中空繊維バイオリアクターを用いた場合、細胞が複数の中空繊維の全長および全幅に亘ってきちんと分布し、一端だけに片寄らないように、細胞を複数本の中空繊維内に詰めることが望ましい。本発明は、このような側面に向けられている。

【0006】

発明の要約

この発明は、毛管内空間および毛管外空間を有する複数本の中空繊維を備えたバイオリアクター内で細胞を移動させるための方法に指向されている。この方法は、上記毛管内空間内へ細胞を充填する工程と、上記複数本の繊維の長さに沿って細胞を移動および分配するための流れ比圧力で上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の一方へ流体を流す工程と、を有する。

50

## 【 0 0 0 7 】

また、この発明は、毛管内空間を有する複数本の中空繊維を備えたバイオリアクター内に収容された細胞を再供給するための方法に指向されている。この方法は、上記複数本の中空繊維の壁から離れる方向に細胞を移動させるための流れ比圧力で上記毛管内空間内へ流体を流す工程と、上記バイオリアクターの中から細胞を移動させる工程と、再供給される上記除去された細胞を上記バイオリアクターへ戻す工程と、を有する。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 0 8 】

【 図 1 】 図 1 は、この発明に有用なバイオリアクターの概略図である。

【 図 2 】 図 2 は、本発明とともに使用される細胞拡散システムのフロー図である。

10

## 【 0 0 0 9 】

## 詳細な説明

上述したように、細胞を培養するためのいくつかのバイオリアクターの形態がある。そして、この発明は、バイオリアクターが毛管内空間および毛管外空間を備えていることのみを要求するものであることに気付くべきである。

## 【 0 0 1 0 】

しかしながら、これに限定しない 1 つの実施例が図 1 に示す中空繊維バイオリアクターである。この発明で使用される細胞増殖モジュール、すなわちバイオリアクター 1 0 は、ハウジング 1 4 内に封入された中空繊維膜 1 2 の束で形成されている。ハウジング、すなわちモジュール 1 4 は、円筒形状に形成され、生体適合可能ないかなるタイプの重合材料でも形成される。上記の中空繊維は、一まとめにして膜組織と呼ばれる。中空繊維内の空間、すなわち管腔は、毛管内空間（IC 空間）として規定され、複数本の中空繊維の外側を囲む空間は、毛管外空間（EC 空間）として規定される。上述したように、上記細胞は、IC 空間内で成長および分布される。代りに、上記細胞は、上記 EC 空間内で成長し、同様の原理を与えることができる。

20

## 【 0 0 1 1 】

上記モジュール 1 4 の各端部は、エンドキャップ、すなわちヘッダー 1 6、1 8 で閉塞されている。これらエンドキャップ 1 6、1 8 は、バイオリアクター内で成長する細胞と生体適合可能な材料であるところのポリカーボネートなどのいかなる適した材料でも形成される。

30

## 【 0 0 1 2 】

おおよそ 9 0 0 0 本の長さ約 2 9 5 mm の繊維 1 2 が、ポリウレタンポット（図示せず）とともに上記ハウジング 1 4 内に保持される。これら繊維 1 2 およびポットは、上記 IC 空間内へおよびこの空間からの流体の流れを許容するよう、その各端部で切断される。しかしながら、上記複数本の繊維の膜組織および長さは、その実施例としてのみ変更可能であることが理解される。

## 【 0 0 1 3 】

上記モジュール内へおよびモジュールからつながる少なくとも 4 つのポートがある。2 つのポートは、上記毛管外空間に流体接続され、1 つのポート 3 4 は、例えば、上記中空繊維を囲む上記毛管外空間内へ流入する毛管外媒体のためのものであり、1 つのポート 4 4 は、上記モジュールから出る毛管外媒体のためのものである。また、2 つのポートは、毛管内空間に流体接続され、1 つのポート 2 6 は、増殖される細胞の入口であるところの上記中空繊維の管腔内へ流入する毛管内媒体のためのものであり、1 つのポート 4 2 は、毛管内媒体の出口のため、および再循環され或いは上記バイオリアクターから除去される増殖された細胞のためのものである。これら図示した複数のポートは、入口、出口、或いは除去ポートである。流体を上述した方向と反対方向に流すことも可能であることが理解される。

40

## 【 0 0 1 4 】

上記バイオリアクター内で増殖される細胞は、上述した実施例において、上述した複数本の中空繊維の毛管内空間、すなわち IC 空間内へ流される。これら複数本の中空繊維は、ポンプ

50

を用いて細胞で満たされ、或いは、細胞は、容器から直接、上記複数の毛管内空間へ分配される。細胞は、限外濾過で使用された流体、或いは以下に説明する媒体によって複数本の繊維に与えられる。また、細胞は、バイオリアクターのIC空間に直接的に無菌接続された細胞入力バッグ30(図2参照)から、成長モジュール、すなわちバイオリアクター内へ導かれても良い。

**【0015】**

複数本の繊維の間の空間(EC空間)は、細胞に栄養分を与るとともに細胞の代謝副産物を除去するための媒体貯蔵部として利用される。細胞がEC空間内で成長する場合、IC空間が、細胞に栄養分を与るとともに細胞の代謝副産物を除去するための媒体貯蔵部として利用される。この媒体は、必要に応じて置き換えられる。媒体は、必要に応じて、ガス交換のため、酸素供給器4(図2参照)を通して循環される。成長媒体は、細胞とともに中空繊維空間内へ供給される。

10

**【0016】**

上述した複数本の中空繊維は、透過可能で生体適合可能な重合材料により形成されている。使用可能なこのような重合材料の1つは、ポリアミド、ポリアリールエーテルスルホン、およびポリビニルピロリドンの混合物である。上記透過可能な膜組織は、EC空間とIC空間との間の膜組織にある複数の細孔を通った、栄養分、排泄物、およびガスの透過を許容する。上記中空繊維膜の上述した分子の透過特性は、IC側、すなわち細胞側から、成長因子、シトキンなど、細胞の成長に必要な高価な反応物の口スを最小限にする一方、除去される代謝廃棄物が、EC側、すなわち細胞を含まない側へ膜を拡散透過することを許容するよう選択される。

20

**【0017】**

バイオリアクターにおいて、上述した材料のような半透膜は、拡散或いは伝達によって、ICおよびEC間の仕切りを通る分子の移動に使用される。

**【0018】**

拡散は、半透膜を横切る濃度勾配を確立することによって成し遂げられる。分子は、濃度差および膜浸透性に起因した割合で高濃度側から低濃度側へ拡散する。

**【0019】**

分子の伝達は、流体の流れが膜に押し付けられたときに起り、膜を通る一致する圧力低下を伴う。この流体の流れ、すなわち限外濾過の流れは、膜の細孔による拒絶のため、或いは廃棄生成物または膜のいずれかの表面電荷のため、膜を通過できない生成物を除く、いかなる廃棄生成物や媒体をも、膜を通過させて運ぶ。

30

**【0020】**

限外濾過、すなわち膜を通る流体の流れは、複数本の繊維内における細胞の動き、および再分配を助けるためにも使用される。

**【0021】**

膜内側(IC側)と膜外側(EC側)との間の流体の流れによって生じる圧力の差は、膜内外圧力(以下、TMPとする)と称される。中空繊維の内部圧力が繊維を囲む空間の圧力を超える場合、この圧力差は、繊維の膜壁を通過して外側に向けて流体を付勢する。半透過性を有する中空繊維の壁は、極端に小さな複数の細孔を含む。これら複数の細孔は、細胞のように大きな粒子が通過するには小さすぎる。従って、細胞は、中空繊維の内部を通過して流れ続ける。膜に含まれる複数の細孔を通過するのに十分小さい水やその他の成分は、上記膜の複数の細孔を通して種々の量で押し出される。細孔の径より小さな成分は、容易に繊維の膜を流通してEC空間へ流れる。同様に、より大きな膜内外圧力は、例えばEC空間への高い割合での限外濾過など、濾過の高い割合を生じる。中空繊維の内部を流れる流体の圧力がチャンバの外側の流体の圧力を大きく超えると、膜を通過してEC空間へ成分を押し出す力が大きくなる。

40

**【0022】**

流体の送りを速くして中空繊維を通る流れ或いは流れの割合を増大することで、繊維の内部圧力が上昇され、膜内外圧力が上昇される。

50



## 【 0 0 3 4 】

以下に説明するように、上記バイオリアクターシステムは、当該システムの順応性を増大するための複数のポンプを使用可能である。

## 【 0 0 3 5 】

IC側で増殖される細胞とともに、栄養媒体がバイオリアクターのEC側を通過して循環する。細胞は、一定の栄養成分をEC液体から消費し、EC媒体へ代謝廃棄生成物を放出する。栄養液体が十分な細胞培養を保证するために置き換えられることが重要である。この置き換えは、少なくとも1つのポンプP3によって達成される。

## 【 0 0 3 6 】

P3は、新鮮な置き換え媒体を置き換え媒体バッグ16（EC媒体バッグ）からバイオリアクターのEC側へ送り込む。1つの実施例において、P3は、約500mLの置き換え媒体を約50mL/minの速度で上記システム内へ送り込む。媒体置き換えの周期は、バイオリアクター内における細胞の数や細胞によって製造された代謝廃棄生成物の量などのいくつかの要因に基づくが、媒体置き換えの平均値は、およそ2日おきである。

10

## 【 0 0 3 7 】

P3は、ユーザーによって定義可能である。すなわち、ユーザーは、安定した状態が必要である場合には、置き換え媒体の流れを制御できる。例えば、システムの洗浄或いは流出が望まれるのであれば、高速で多量の媒体を流すことがユーザーによって選択される。また、EC媒体の置き換え、或いは既にバイオリアクター内にある媒体への栄養の補充は、ゆっくりとした連続した流れによって生じる。例えば、約0.2mL/minの新鮮な媒体が、システム内へ連続して送り込まれる。P3の速度は、バイオリアクターのEC側で負圧流を発生させるために増大され、IC液体がEC側からIC側へ膜を通過して流れる。

20

## 【 0 0 3 8 】

ポンプP5は、IC媒体バッグ22から新鮮なIC媒体を、および細胞入口バッグ30から細胞を、バイオリアクターの複数本の中空繊維（IC空間）内へ送り込むために使用される。また、このポンプは、バイオリアクターのIC空間にIC媒体を詰め込むために使用され、増殖される細胞が複数本の繊維内に供給される前に上記繊維内にある空気を排出させる。また、IC媒体の置き換えが必要な場合、或いは異なる割合のシトキンまたは成長因子を含む新鮮なIC媒体が所望される場合、このポンプが使用される。以下に説明

30

## 【 0 0 3 9 】

代替の実施例において、IC媒体および細胞を再循環するため、さらなるポンプが、基システムに追加可能である。以下に説明するように、ポンプP4は、IC媒体の再循環のため、および/或いはバイオリアクターを通してIC媒体を流すため、毛管内ポンプとして使用される。また、P4は、IC空間内の細胞に剪断流れ率を生じるために使用でき、繊維表面から細胞を剥離してIC空間内で再供給或いは再分配する。また、P4は、バイオリアクターから細胞を除去するために使用され、この細胞を、さらなる増殖のためにバイオリアクター内に戻して再供給し、或いは細胞収穫バッグ内へ集める。P4は、膜を

40

## 【 0 0 4 0 】

複数のポンプP1 - P4の動作速度、および複数のチューブの径は、これらポンプの動作中において、これらチューブを通る毎分0 - 150mLの流れを生出するように、選択される。P5は、0 - 250mL/minの流れの割合を作ることができる。

## 【 0 0 4 1 】

例 1

チューブライン36および62は、IC側で付着および浮遊した細胞を両方とも再分配および/或いは再循環するために使用可能である。

## 【 0 0 4 2 】

50

バイオリアクター内の複数の繊維を通して成長した細胞を再分配することが望まれる場合、バイオリアクター（特に、中空繊維バイオリアクター）内で成長する付着および浮遊した培養組織にとって好機である。付着した細胞が成長しない場合であっても、チューブおよびバイオリアクターを通して細胞を連続して再循環させることが望ましい。付着した細胞が成長する場合、これら付着した細胞は、まず最初に、一般に知られた技術を用いて膜から分離されなければならない。このような技術として、切断率、負圧流（以下に説明する）、カルシウム濃度の変更、トリプシン、および/或いは冷却および加熱を含む他の化学的或いは物理的方法がある。

#### 【0043】

この処置において、再循環ライン（例えば、図2のチューブ36を参照）が設けられる。このパスは、出口42を介して、ポンプP4の動作によりバイオリアクター10から流出する細胞を受け入れる。そして、この細胞は、入口26の近くの位置“A”でIC入口ライン24に再入力される。また、細胞を逆流させるための媒体の供給源22がある。新鮮な媒体の導入位置から、細胞は、以下に説明する両方向に流され、細胞が再循環ライン36からバイオリアクターへ戻される。

10

#### 【0044】

バルブv6およびv8を閉じた状態で、ポンプP4は、細胞混合の所望する均一性が達成されるまで、結果として閉じたループ36内で、バイオリアクター10を通して細胞を循環させるために使用可能である。

#### 【0045】

細胞が効果的に混合された後、バルブv6が開かれるとともにバルブv8が閉じられて、ポンプP5が作動されて、ポンプP4がポンプP5より低速で動作するようセットされる。ポンプP5は、IC媒体をシステム内へ送り込む。ポンプP4は、バイオリアクター入口26に向かう再循環された流れの一部を効果的に迂回させ、ライン62および36およびバルブV6を通る媒体の流れによって、残留物をバイオリアクター出口42へ付勢する。両方のポンプは、効果的に、バイオリアクター内へ細胞を戻す。IC流体の流圧がEC流体の流圧より高ければ、バイオリアクター内へ送り込まれる全ての過剰な流体は、限外濾過として中空繊維を通して付勢される。また、限外濾過は、中空繊維の壁に向けて細胞を押し、逆流ライン62が再循環ライン36に接続する位置（図2に合流点Cとして示す）およびこの合流点の両側での細胞の体積比は、どれだけ多くの細胞が再分配されて出口42を通過して戻されるかを定める。この接続位置は、可能であれば両方向に流れる媒体の必要性を排除して、効果的に全ての細胞がバイオリアクター入口26を通過して再分配されるように、バイオリアクターに近付けて配置することが可能である。

20

30

#### 【0046】

上記は、限外濾過および逆流を用いてバイオリアクターを通して細胞をどのようにして分配および再循環するかを示している。この方法は、付着した細胞が、上述した化学的分離剤や他の方法によって膜から分離された後、この分離された細胞にも適用できる。

#### 【0047】

代りに、細胞は、始めにバイオリアクターおよびチューブから除去して細胞収穫バッグ32内へ回収することによって、バイオリアクター内へ再供給することができる。細胞を再供給するため、収穫バッグ32は、細胞の充填のときと同様の方法で、バイオリアクターの入口ポート26に取り付けられる。

40

#### 【0048】

さらに代りに、細胞は、バイオリアクターから除去されて細胞収穫バッグ32内へ回収される。そして、バイオリアクター内にいくらか残った細胞は増殖される。この工程は、連続して繰り返し可能である。

#### 【0049】

さらに、図2に示すように、EC再循環ループ40は、バイオリアクターのEC側の媒体が再循環されるのを許可する。このEC再循環ループ40は、EC媒体がEC出口ポート44を介してバイオリアクターから出てEC入口ポート34を介してバイオリアクター

50



内へ戻る流れを許容する。このループは、複数本の中空繊維の周りにあるEC媒体の再循環に使用され、バイオリアクターの1つの部分から他の部分へ栄養分を運ぶ。EC流体の流れをIC流体の流れより少なく保持することにより、IC流体の流圧は、EC流体の流圧より高くなり、IC流体の流れが膜を通して流れることを許可し、正圧での流体の流れを生出する。

【0050】

代りに、EC側での細胞の成長が望まれる場合、EC流体の流れは、IC側の流体の流れより大きくでき、EC側からIC側へ流体を付勢し、負圧での流体の流れを生出する。この流れは、ポンプP3およびP2の付勢力に基づく。P3がP2より強い場合、EC側における再供給を助けるため、出口44で逆流が生じることができる。

10

【0051】

細胞の成長にともなう代謝破壊生成物を含むICおよびEC媒体は、チューブ58を介してシステムから除去されて廃棄物バッグ60内へ送られる。

【0052】

例2

実質的に精製されたMSCsの膜への付着をアシストするための正圧限外濾過の使用

間葉系幹細胞(MSCs)のような付着細胞が中空繊維バイオリアクター内で増殖される場合、この細胞は、その通常の成長サイクルを開始するため、始めに、複数本の繊維の表面に付着しなければならない。この付着を増加/促進するため、IC側で増加された流体の流れによって生じる正圧が与えられ、細胞側区画(IC側)内における圧力が非細胞側(EC側)内における圧力より高くされる。上述した細胞増殖システムにおいて、正圧流は、ポンプの速度を上げてIC側における流体の流れ或いは流圧を高めることにより達成される。これは、バイオリアクターの中空繊維内へのIC媒体の流れをコントロールするポンプP5の速度を上げることでなされる。

20

【0053】

上述したように、流体の増大された流れは、複数本の繊維を通る流体の流れを生じ、繊維の壁へMSCsを引き込む助けをする正圧流を生じる。このような流れは、細胞繊維表面の全ての部位へ細胞を引き込むことから効果的である。これに対し、バイオリアクター内で細胞を分配する際に重力のみを使用した場合、細胞は、バイオリアクターヘッダー16(図1参照)内、或いは短い距離でのみ複数本の繊維内へ優先的に置かれ、複数本の繊維の全長にわたっておよびその周囲全体に置かれることはない。

30

【0054】

正圧限外濾過および正圧流は、細胞が付着されるまで、可能であれば数時間或いは数日の間、繊維表面でMSCsを保持するため、(可能であれば減少されたレベルで)続けて与えられる。

【0055】

この方法は、バイオリアクターへ加えられる前に実質的に精製された増殖される細胞に最も便利である。この例の目的のため、実質的に精製された1つの細胞種が他の細胞種と比較して細胞浮遊の点で優位である。

【0056】

付着が終わった後、実質的に流体の流れがない、複数本の繊維を通る僅かな負圧流が、膜に付着されなかった細胞がバイオリアクターから除去されるように使用される。この負圧流は、IC流れ割合の圧力がEC側の圧力と比較して下落させることにより生出可能である。

40

【0057】

中空繊維バイオリアクター内で付着する細胞が成長しない場合、古いIC媒体が新鮮なIC媒体に置き換えられるときにバイオリアクターから細胞が排出されることのないように、正圧流が、繊維の壁に細胞を保持するために使用される。

【0058】

例3

50

細胞浮遊モードを生出するための負圧流或いは逆限外濾過の使用

負圧流体の流れ或いは逆限外濾過は、細胞を浮遊モードに保持する助けに使用可能である。例えば、負圧流は、EC側からIC側への流体の流れを生出する。複数本の繊維内への流体の流れは、壁から引き離すように細胞を押し出す。上述した細胞増殖システムにおいて、負圧流は、バイリアクターへのEC流体の流れをコントロールするポンプP2の速度を増大し、バルブv9を閉じ、クランプc2を開くことによって、達成される。加えて或いは代わりに、P3の速度がP2の速度より速く或いは等しくなるように、バルブv7を開いて、ポンプP3の速度を増大する。

【0059】

正圧流と負圧流の組み合わせは、バイリアクター内への細胞の充填のために使用可能である。負圧流は、細胞浮遊を維持できないバイリアクター内の正圧流の領域（例えば、付着モード）に続くバイリアクターの入口において浮遊モードを生出するために使用可能である。このような正圧および負圧流の組み合わせを利用することにより、バイリアクターの第1の領域における細胞の堆積を防止でき、第2の領域における細胞の堆積を増すことができる。

【0060】

#### 例4

中空繊維バイリアクターから付着していない細胞を分配および除去するための正圧および負圧流体の流れの使用

例2で説明したように、中空繊維バイリアクター内で増殖される細胞は、バイリアクター内へ装填される前に、始めに精製可能である。しかしながら、健康な骨髄などの精製されていない細胞は、中空繊維バイリアクター内へ直接的に充填することもできる。正圧流は、始めに、健康な骨髄の付着細胞部分が複数本の繊維へ付着するのを助けるために使用可能であり、その後、負圧流を与えることにより、赤血球、白血球、および血小板などの健康な骨髄の付着しない細胞部分が複数本の中空繊維から流れることを助ける。

【0061】

50 mLの健康な骨髄（一般に、単一の骨髄引きから引かれる量）が、細胞入口バッグ30（図2参照）からIC入口ポート26を通して複数本の中空繊維内へ直接的に流される。IC出口ポート42は、正圧流の流れを生出させることに加えて細胞口スを防止するため、装填中はクランプされる。一度装填されると、骨髄は、骨髄内の付着細胞が複数本の繊維へ付着する時間を許容する約1 - 4日の間、培養される。代わりに、正圧限外濾過或いは流体の流れは、細胞の付着を助けるための膜への細胞の引き込みを助けるため、付与可能である。

【0062】

負圧流は、出口42を開いた後、膜へ付着されなかった全ての余分な細胞をバイリアクターの外へ押し出すために付与可能である。これは、P3を用いることによってなされ、バイリアクターを通るEC媒体の流量を増大する。P2およびP3は、バイリアクター内で負圧流を生じ、バイリアクターの複数本の繊維に付着した細胞だけを残して、付着しなかった細胞を複数本の繊維から剥がし、この剥がした細胞を複数本の繊維から排出する。

【0063】

#### 例5

濃度勾配を用いた中空繊維内における選択的分配。

【0064】

バイリアクターのIC空間およびEC空間は、イニシャル状態で濃度 $d_1$ を有する媒体で満たされている。バイリアクター内で成長される細胞は、濃度 $d_2$  ( $d_2 > d_1$ )を有する媒体内で浮遊されており、この媒体がバイリアクターのIC空間内へ充填される。バイリアクターが水平に保持されて細胞をゆっくりとした流速で送り込むと、（より重い媒体内の）細胞は、バイリアクター入口ヘッダーの底に落ち、そして、バイリアクターの底にある複数本の繊維にだけ流れる。また、粘度 ( $\mu_1$ 、 $\mu_2$ ) および流速の

10

20

30

40

50

使用は、複数本の繊維に対する細胞の位置決め役に役立つ。

【0065】

例6

分裂細胞を中空繊維に沿って分配するための流体の流れの使用

細胞分裂、すなわち有糸分裂の間、付着した細胞は、その細胞が付着された膜から引き剥がされる傾向にあり、或いは少なくともよりゆるく付着するようになる。

【0066】

本実施の形態において、細胞は、膜のIC側で成長され、媒体の流れは、複数本の中空繊維を通して押し付けられる。この複数本の中空繊維を通る流体の流れは、細胞に剥ぎ取る力を与える。この力は、有糸分裂した細胞を膜から剥ぎ取る助けとして使用され、剥ぎ取った細胞を媒体の流れを伴って中空繊維から排出する。

10

【0067】

膜を通る流体の流れは、剥ぎ取った細胞が媒体の流れから外れて落ちる程度に十分にゆっくりとしなければならない。一旦媒体の流れから外れると、細胞は、より下流側の位置で膜に再付着し、繊維に沿ったより多くの位置で、細胞の再分配および成長を促進する。

【0068】

流量可変の複数のポンプの組み合わせを選択することは、複数本の繊維を通る流体の流れを調節するために使用可能である。このようなポンプの組み合わせは、膜から細胞を離すための高い剥離の時期を生出し、その後、細胞を膜に置いて再付着することを許容するための低い剥離の時期を生出するために使用可能である。

20

【0069】

このような方法は、複数本の中空繊維への入口を介して、増殖される細胞をバイオリアクター内へ始めて充填するために使用でき、複数本の繊維を通して細胞を移動させる間欠的な流れに使用できる。

【0070】

上述した複数の例は、本発明の主題に沿って適用可能な実施例のいくつかであり、添付した請求の範囲によって規定されたものとして本発明の範囲を限定するものではない。

【 図 1 】

図 1

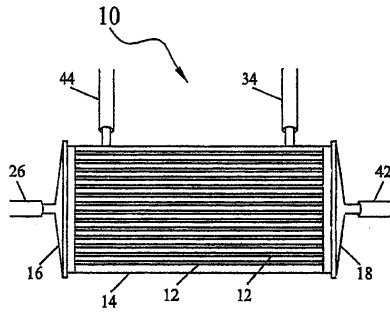


Figure 1

【 図 2 】

図 2

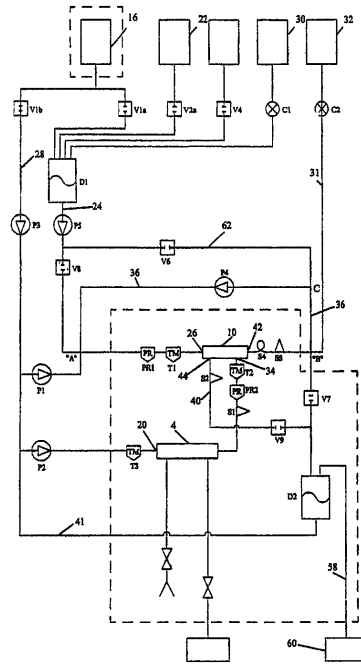


Figure 2

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成21年12月1日 (2009.12.1)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】特許請求の範囲

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

中空繊維バイオリアクター(10)内で細胞を移動させる方法であって、  
 上記中空繊維(12)は、毛管内空間および毛管外空間を有し、  
 上記毛管内空間および上記毛管外空間の一方へ細胞を充填する工程と；  
 細胞を収容している上記一方の毛管内空間或いは毛管外空間へ流体を流す工程と；  
 上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方を流れる流体の圧力より大きい圧力を上記  
 毛管内空間或いは上記毛管外空間の一方を流れる流体へ与える工程と；  
 を有する方法。

【 請求項 2 】

上記流体に圧力を与える工程は、上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方と比較して、細胞を収容している上記一方の空間を流れる流体の圧力を変える工程を含む、請求項1の方法。

【 請求項 3 】

上記細胞を収容している空間を流れる流体の体積を増加させることによって流体の圧力を増大させる工程をさらに有する、請求項2の方法。

【 請求項 4 】

上記移動される細胞は、上記毛管内空間にある、請求項1の方法。

## 【請求項 5】

上記中空繊維の表面へ細胞を移動させる工程をさらに有する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 6】

上記中空繊維は、複数の細孔を有する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 7】

上記流体を流す工程は、上記細胞を収容している空間から、上記中空繊維の上記複数の細孔を介して、上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方へ、上記流体の一部を流す工程をさらに有する、請求項 6 の方法。

## 【請求項 8】

上記中空繊維の表面へ細胞を移動させる工程は、該表面へ細胞が付着することを許容する工程をさらに有する、請求項 5 の方法。

## 【請求項 9】

上記流体の圧力を増大させる工程は、流体の流量を増やして流体の送り速度を速くする工程を有する、請求項 3 の方法。

## 【請求項 10】

上記流体を流す工程は、上記中空繊維の表面上に細胞を保持する工程を有する、請求項 5 の方法。

## 【請求項 11】

上記空間内で上記細胞を浮遊モードに維持する工程をさらに有する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 12】

上記中空繊維の表面から離れる方向に細胞を移動させる工程をさらに有する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 13】

上記中空繊維の表面から離れる方向に細胞を移動させる工程は、上記中空繊維の表面から細胞をはずす工程をさらに有する、請求項 12 の方法。

## 【請求項 14】

上記中空繊維の表面から細胞をはずす工程は、上記流体に分離化学剤を加える工程をさらに有する、請求項 13 の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

1つの実施例として、これに限定するものではなく、上述した中空繊維バイオリアクターを含む細胞増殖システムにおいて、流体の流れは、上記システムの一部である種々のポンプおよび/或いはバルブを用いて調整可能である。可能な細胞増殖システムの概略図が図 2 に示されている。この発明で使用される可能性のある他の細胞増殖システムは、2008年3月5日出願された特許出願PCT/US08/55915(WO2008/109674)に開示されており、その全体が参考としてここに組み込まれる。この発明の目的を成し遂げるために必要な図 2 の部分についてのみ説明される。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

上述した複数の例は、本発明の主題に沿って適用可能な実施例のいくつかであり、添付した請求の範囲によって規定されたものとして本発明の範囲を限定するものではない。

以下に、本願出願の当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

- [ 1 ] 中空繊維バイオリクター内で細胞を移動させる方法であって、  
上記中空繊維は、毛管内空間および毛管外空間を有し、  
上記毛管内空間および上記毛管外空間の一方へ細胞を充填する工程と；  
細胞を収容している上記一方の毛管内空間或いは毛管外空間へ流体を流す工程と；  
上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方を流れる流体の圧力より大きい圧力を上記  
毛管内空間或いは上記毛管外空間の一方を流れる流体へ与える工程と；  
を有する方法。
- [ 2 ] 上記流体に圧力を与える工程は、上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方と  
比較して、細胞を収容している上記一方の空間を流れる流体の圧力を変える工程を含む、  
[ 1 ]の方法。
- [ 3 ] 上記細胞を収容している空間を流れる流体の体積を増加させることによって流体  
の圧力を増大させる工程をさらに有する、[ 2 ]の方法。
- [ 4 ] 上記移動される細胞は、上記毛管内空間にある、[ 1 ]の方法。
- [ 5 ] 上記中空繊維の表面へ細胞を移動させる工程をさらに有する、[ 1 ]の方法。
- [ 6 ] 上記中空繊維は、複数の細孔を有する、[ 1 ]の方法。
- [ 7 ] 上記流体を流す工程は、上記細胞を収容している空間から、上記中空繊維の上記  
複数の細孔を介して、上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の他方へ、上記流体の一部を  
流す工程をさらに有する、[ 6 ]の方法。
- [ 8 ] 上記中空繊維の表面へ細胞を移動させる工程は、該表面へ細胞が付着することを  
許容する工程をさらに有する、[ 5 ]の方法。
- [ 9 ] 上記流体の圧力を増大させる工程は、流体の流量を増やして流体の送り速度を速  
くする工程を有する、[ 3 ]の方法。
- [ 10 ] 上記流体を流す工程は、上記中空繊維の表面上に細胞を保持する工程を有する  
、[ 5 ]の方法。
- [ 11 ] 上記空間内で上記細胞を浮遊モードに維持する工程をさらに有する、[ 1 ]の  
方法。
- [ 12 ] 上記中空繊維の表面から離れる方向に細胞を移動させる工程をさらに有する、  
[ 1 ]の方法。
- [ 13 ] 中空繊維バイオリクター内に収容されている細胞を再供給する方法であって  
、  
上記中空繊維は、毛管内空間および毛管外空間を有し、  
上記中空繊維の壁から離れる方向に細胞を移動させるように選択された流れで、上記毛  
管内空間或いは上記毛管外空間の一方に流体を流す工程と；  
上記バイオリクターの中から細胞を移動させる工程と；  
上記毛管内空間或いは上記毛管外空間の一方を通過して細胞を収容した流体を流すこと  
によって再供給される、上記除去された細胞を、上記バイオリクターへ戻す工程と；  
を有する方法。
- [ 14 ] 上記中空繊維の壁から離れる方向に細胞を移動させる工程は、上記中空繊維の  
壁から細胞をはずす工程をさらに有する、[ 13 ]の方法。
- [ 15 ] 上記中空繊維の壁から細胞をはずす工程は、上記流体に分離化学剤を加える工  
程をさらに有する、[ 14 ]の方法。
- [ 16 ] 第1の面および第2の面を有するバイオリクターの膜壁から付着した細胞を  
はずす方法であって、  
上記細胞は、上記第1の面に付着され、  
上記第1の面から細胞を移動させるために上記膜壁をいくらかの流体が通過するのに十  
分な圧力で上記第2の面に沿って流体を流す工程を有する方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2008/055904
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12M1/12 C12M3/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M C12N C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 001 585 A (GRAMER MICHAEL J [US]) 14 December 1999 (1999-12-14) column 1, lines 5-10, 39-45, 64-67 column 2, lines 1-22 column 3, lines 33-67 column 4 column 5, lines 39-59 claims; figures column 9, lines 5-8	1-13, 16
X	WO 95/04813 A (UNISYN TECHNOLOGIES INC [US]; GOFFE RANDAL A [US]; LOWREY DAVID M [US]) 16 February 1995 (1995-02-16) page 6 - page 12 claims	1-13, 16
-/--		
<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 document 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		**I* 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 16 January 2009		Date of mailing of the international search report 29/01/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5016 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Böhm, Ingo

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/055904
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT .		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 391 912 A (YOSHIDA KOICHI [JP] ET AL) 5 July 1983 (1983-07-05) column 2 - column 3 claims	1,13,16
A	US 5 622 857 A (GOFFE RANDAL A [US]) 22 April 1997 (1997-04-22) column 2 - column 5 claims; figures	1,13,14, 16
A	US 4 647 539 A (BACH BERT R [US]) 3 March 1987 (1987-03-03) column 2 - column 3	1,13,16
A	WO 00/75275 A (UNIV NORTH CAROLINA [US]) 14 December 2000 (2000-12-14) pages 7,8,12	1,13,16
A	WO 03/105663 A (STELSYS LLC [US]; LI ALBERT [US]; MURRAY SONYA H [US]; COWGER NANCY [U] 24 December 2003 (2003-12-24) paragraphs [0026], [0027] claims; figures	1,13,16
A	US 5 981 211 A (HU WEI-SHOU [US] ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) column 9 - column 10 claims	1,13,16
A	WO 95/11048 A (UNIV MICHIGAN [US]) 27 April 1995 (1995-04-27) page 7 - page 9 page 14, paragraph 1 page 18, paragraph 2 - paragraph 3	1,13,16



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/055904

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6001585	A	14-12-1999	NONE	
WO 9504813	A	16-02-1995	AU 7520894 A	28-02-1995
US 4391912	A	05-07-1983	DE 3035118 A1 FR 2476124 A1 GB 2062006 A JP 56042584 A	19-03-1981 21-08-1981 20-05-1981 20-04-1981
US 5622857	A	22-04-1997	US 5882918 A	16-03-1999
US 4647539	A	03-03-1987	NONE	
WO 0075275	A	14-12-2000	AT 274571 T AU 780160 B2 AU 5180100 A CA 2376039 A1 DE 60013277 D1 DE 60013277 T2 EP 1185612 A2 ES 2226850 T3 HK 1045323 A1 JP 2003501078 T ZA 200109939 A	15-09-2004 03-03-2005 28-12-2000 14-12-2000 30-09-2004 11-08-2005 13-03-2002 01-04-2005 15-04-2005 14-01-2003 13-02-2003
WO 03105663	A	24-12-2003	AU 2003275991 A1	31-12-2003
US 5981211	A	09-11-1999	US 5595909 A	21-01-1997
WO 9511048	A	27-04-1995	AT 257018 T AU 692191 B2 AU 7970194 A CA 2173594 A1 DE 69433464 D1 DE 69433464 T2 EP 0746343 A1 JP 3614853 B2 JP 9503941 T JP 3795900 B2 JP 2004267795 A US 5686289 A	15-01-2004 04-06-1998 08-05-1995 27-04-1995 05-02-2004 11-11-2004 11-12-1996 26-01-2005 22-04-1997 12-07-2006 30-09-2004 11-11-1997

## フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/911,393  
(32)優先日 平成19年4月12日(2007.4.12)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/971,511  
(32)優先日 平成19年9月11日(2007.9.11)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 60/971,494  
(32)優先日 平成19年9月11日(2007.9.11)  
(33)優先権主張国 米国(US)

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

- (74)代理人 100091351  
弁理士 河野 哲  
(74)代理人 100088683  
弁理士 中村 誠  
(74)代理人 100109830  
弁理士 福原 淑弘  
(74)代理人 100075672  
弁理士 峰 隆司  
(74)代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎  
(74)代理人 100084618  
弁理士 村松 貞男  
(74)代理人 100103034  
弁理士 野河 信久  
(74)代理人 100140176  
弁理士 砂川 克

(72)発明者 アントウィラー、グレン・デルバート  
アメリカ合衆国、コロラド州 80215、レイクウッド、ゼノン・ストリート 2905  
Fターム(参考) 4B065 AA90X BA30 BC22 BD14 CA44 CA60