

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6494193号
(P6494193)

(45) 発行日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日(2019.3.15)

(51) Int. Cl. F 1
C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 C

請求項の数 16 外国語出願 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2014-136885 (P2014-136885)
 (22) 出願日 平成26年7月2日(2014.7.2)
 (65) 公開番号 特開2015-12863 (P2015-12863A)
 (43) 公開日 平成27年1月22日(2015.1.22)
 審査請求日 平成29年6月26日(2017.6.26)
 (31) 優先権主張番号 13174604.2
 (32) 優先日 平成25年7月2日(2013.7.2)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者 312000044
 ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフ
 ト ミット ベシュレンクテル ハフツン
 グ
 Miltenyi Biotec GmbH
 ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラー
 トバッハ フリードリヒ-エーバート-シ
 ュトラーセ 68
 Friedrich-Ebert-Str
 asse 68, D-51429 Ber
 gisch Gladbach, Germ
 any

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞培養のためのガス透過性膜層を備えた遠心分離チャンバ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ベースプレートおよびカバープレートを有する円筒体と、液体の流入および/または流出用の少なくとも1つのポート、ガスの流入および/または流出用の少なくとも1つのポートおよび細胞培養用の複数の層を有する回転軸と、備える遠心分離チャンバにおいて、
前記細胞培養用の複数の層は、スタックを形成しており、各層は、支持構造と、当該支持構造上に提供された、その上で細胞が培養されるガス透過性膜とから成り、

前記ガス透過性膜は、前記支持構造に液密および気密形式で取り付けられており、前記各層における前記ガス透過性膜と前記支持構造との間には、液密な空間が形成されており、

前記各層は、少なくとも1つの開口を有しており、互いに隣接する前記層の前記空間の間には、前記開口を介した気密なチャネルが形成されており、

全ての前記層の前記空間は、前記ガスの流入および/または流出用の少なくとも1つのポートに流体接続されている

ことを特徴とする、遠心分離チャンバ。

【請求項 2】

前記ベースプレートにはガス透過性膜が液密および気密形式で取り付けられており、当該ガス透過性膜と前記ベースプレートとの間には、液密な空間が形成されており、当該空間が、前記ガスの流入および/または流出のための少なくとも1つのポートに接続されている、請求項 1 記載の遠心分離チャンバ。

10

20

【請求項 3】

前記ガス透過性膜および/または前記支持構造および/または前記ベースプレートには、複数のスペーサエレメントが設けられている、請求項 1 または 2 記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 4】

前記支持構造にはチャンネルが設けられている、請求項 1 または 2 記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 5】

前記層の前記開口は、当該層を構成する前記ガス透過性膜および前記支持構造がそれぞれ有する、ネックを有する開口から構成されており、

前記層の前記ガス透過性膜の前記開口のネックが、隣接する他の前記層の前記支持構造の前記開口のネックと嵌合して、前記気密なチャンネルが形成される、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

10

【請求項 6】

前記ガス透過性膜および前記支持構造は、光学的鏡検に適した光学的透明性を有する、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 7】

ガス流れ方向における前記スタックの第 1 の前記層および/または最後の前記層は、無菌フィルタによってカバーされた開口を有する、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

20

【請求項 8】

2 つの隣接する前記層の前記開口は、回転軸に関して当該層の反対側には配置されていない、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 9】

前記層は、少なくとも 2 つの前記開口によって、隣接する前記層または前記ガスの流入および/または流出のためのポートに接続されている、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 10】

前記ガス透過性膜の表面は、細胞培養のために官能化されている、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

30

【請求項 11】

ガス流れ方向における前記スタックの第 1 の前記層は、ガスの流入のための少なくとも 1 つのポートに接続されている、請求項 1 から 10 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 12】

液体の流入および/または流出のための少なくとも 1 つのポートが、前記遠心分離チャンバ内への、前記ベースプレートおよび/または前記カバープレートに配置された少なくとも 1 つの開口に接続されており、前記開口には、前記円筒体の内周の多くとも 10 分の 1 である、その基底における幅を有する少なくとも 1 つのデフレクタが設けられている、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の遠心分離チャンバ。

40

【請求項 13】

細胞培養のための前記層は、前記円筒体の内径よりも少なくとも 5 % だけ小さな直径を有する、請求項 12 記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの第 1 のデフレクタは、前記ベースプレートおよび/または前記カバープレートに配置された前記開口と前記円筒体の回転軸との間に配置されており、少なくとも 1 つの第 2 のデフレクタは、前記ベースプレートおよび/または前記カバープレートに配置された前記開口と前記円筒体との間に配置されている、請求項 12 または 13 記載の遠心分離チャンバ。

【請求項 15】

50

前記デフレクタは、実質的に前記円筒体に対して平行であり、前記デフレクタが配置されている前記開口の幅の5～50倍の幅を有する、請求項12から14までのいずれか1項記載の遠心分離チャンバ。

【請求項16】

前記遠心分離チャンバにおける細胞の供給は、前記ガス透過性膜を介したガス拡散によって行われる、請求項1から15までのいずれか1項記載の遠心分離チャンバ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高められた細胞培養のための、支持構造に提供されたガス透過性膜から成る複数の層が設けられた遠心分離用のチャンバ、およびこのチャンバを使用する細胞培養のための方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

血液または骨髄などの懸濁液からの細胞の分別および分離は、ますます医学的治療の一部となりつつある。このような治療のために、細胞が患者から抽出され、次いで、所望の標的細胞を提供するために分離される。所望の標的細胞は、通常、同じまたは異なる患者に導入される前に細胞培養によって刺激/操作/膨張される。細胞の抽出、準備、分別、分離、操作および導入は、標的細胞および患者に課せられるストレスをできるだけ迅速に減じるために行われるべきである。これらに要求に対して、細胞培養は、面倒な、時間のかかるプロセスである。

20

【0003】

従来技術

遠心分離による細胞懸濁液の分別および分離は、生物学的起源の試料を2つ以上の成分に分離するために従来公知である。例えば、白血球、赤血球および血漿への人間血液の分離はしばしば行われるプロセスであり、米国特許第6605223号明細書、米国特許第4446014号明細書または米国特許第8124234号明細書に開示されているような半自動化された装置において行うことができる。これらの刊行物は細胞培養について言及していない。

30

【0004】

国際公開第2009/072006号および国際公開第2009/072003号は、細胞分離に適した遠心分離チャンバを備えた遠心分離システムを開示している。チャンバには、分離された細胞を付着させ、培養するための層を設けることができる。国際公開第2009/072006号および国際公開第2009/072003号は、細胞培養条件、および細胞へのガスおよび栄養の供給については言及していない。この遠心分離システムおよび/または遠心分離チャンバは、分離された細胞の細胞培養よりも細胞分離に最適化されている。

【0005】

新たな細胞治療は、標的細胞の分離のみならず、十分な数の細胞を提供するために、標的細胞の膨張をも必要とするので、本発明の課題は、細胞分離および細胞培養を同じ遠心分離チャンバにおいてかつ自動化プロセスにおいて許容する遠心分離チャンバを提供することである。細胞培養において重要な点は、酸素または二酸化炭素などのガスの細胞への供給である。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第6605223号明細書

【特許文献2】米国特許第4446014号明細書

【特許文献3】米国特許第8124234号明細書

50

【特許文献4】国際公開第2009/072006号

【特許文献5】国際公開第2009/072003号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、細胞の手作業による操作なしに1つの容器において細胞培養および細胞分離を可能にする遠心分離チャンバを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の課題

したがって、本発明の課題は、ベースプレートおよびカバープレートを有する円筒体と、液体の流入および/または流出用の少なくとも1つのポート、ガスの流入および/または流出用の少なくとも1つのポートおよび細胞培養用の複数の層を有する回転軸と、を備え、細胞培養用の複数の層は、スタックを形成しており、各層は、支持構造上に提供された、その上で細胞が培養されるガス透過性膜から成り、前記層は、少なくとも1つの開口によって、隣接する層またはガスの流入および/または流出用の少なくとも1つのポートに接続されている、遠心分離チャンバを提供することである。

【0009】

本発明によるガス透過性膜における細胞培養は、細胞が生理学的に活性に保たれ、選択的に変異させられる全ての方法に関する。変異は、例えば、細胞の表現型、機能、数または分化状態の変化を生じてよい。本発明によるガス透過性膜における細胞培養は、

- a) 細胞分割、分化、または細胞増殖
 - b) シグナルトランスダクションカスケードの活性化
 - c) 細胞活性化状態および/または細胞機能の変化
 - d) 細胞の遺伝的変異
 - e) 細胞対細胞の接触を伴う、異なるまたは同じ細胞タイプの層の成長
- につながり得る。

【0010】

本発明による遠心分離チャンバでは、ガス透過性膜を支持構造に提供されている。したがって、ガス透過性膜は、細胞が培養される第1の面(“細胞側”)およびガスが供給される第2の面(“ガス側”)を有する。細胞を供給するために、ガスは膜のガス側から細胞側へ移動する。

【0011】

(ガス流れ方向で見て)第1のガス透過性膜は、チャンバのベースプレートまたは第1の支持構造上に提供されてよい。チャンバのガス流入用の少なくとも1つのポートは第1のガス透過性膜に接続されており、これは、第1のガス透過性膜とベースプレートとの間の体積、またはガス透過性膜と第1の支持構造との間の体積にガスを供給することができることを意味する。

【0012】

(ガス流れ方向で見て)第1のガス透過性膜は、チャンバのベースプレートまたは支持構造上に提供されてよい。チャンバのガス流入用の少なくとも1つのポートはガス透過性膜に接続されており、これは、ガス透過性膜とベースプレートとの間の体積、またはガス透過性膜と支持構造との間の体積にガスを供給することができることを意味する。

【0013】

図1は、例えば国際公開第2009/072006号または国際公開第2009/072003号に開示されているように、従来技術による標準的な遠心分離チャンバを示している。この遠心分離チャンバには、チャンバの軸における2つの流入/流出ポートが設けられており、これらのポートは、管を介して、チャンバおよび細胞培養用の層への開口に接続されている。細胞は、ガスおよび細胞培養媒体とともに、流入/流出ポートを介して、チャンバ全体における液体を通じた拡散によって、供給される。このようなシステムに

10

20

30

40

50

おける細胞へのガスの供給は、不十分および/または不均一である。なぜならば、層の周縁における細胞または流入/流出ポートに隣接する細胞には、回転軸に近い方に付着させられた細胞よりもより多く供給されるからである。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】従来技術による標準的な遠心分離チャンバを示している。

【図2】本発明による遠心分離チャンバを示している。

【図3】スタックの一例を示している。

【図4】スペーサエレメントと、層の間のガス引渡しのための開口とが設けられた膜を示している。

10

【図5】支持構造に取り付けられたガス透過性膜を示している。

【図6】複数のスペーサエレメントを備えたガス透過性膜を示している。

【図7a】ガスがチャンバを通るときにジグザグに通過させられる実施の形態を示している。

【図7b】ネックを有する2つの開口が層に設けられており、それらの両方が開放状態にある実施の形態を示している。

【図7c】4つの層を通るガス通路の拡大図を示している。

【図8】チャンネルを備えた2つの支持構造を示している。

【図9】開口およびデフレクタを備えた実施の形態を示している

【発明を実施するための形態】

20

【0015】

本発明の遠心分離チャンバの概略的説明

本発明によるチャンバは、回転軸に対して実質的に垂直に向けられた円形のベースプレートおよび円形のカバープレートと、ベースプレート、カバープレートおよび円筒体を液密および気密形式で互いに接着または溶接することができるようにベースプレートおよびカバープレートに対して実質的に垂直に向けられた円筒体または壁部を有する。これにより、ポット状の下側部分と、蓋の形式の上側部分とから成る閉鎖された遠心分離チャンバが形成される。

【0016】

図2は、例えば本発明による遠心分離チャンバを示している。チャンバは、細胞培養のための層のスタック(1)を有し、層は、支持構造上に提供されたガス透過性膜から成る。ガスは、膜とそれぞれの支持構造との間の全体積にわたって均一に分配され、ガス透過性膜を通じた拡散によって細胞を供給することができる。ガスは、第1の層の間の体積へ少なくとも1つのポート(2)を通じてチャンバに進入することができる。細胞によって消費されないガスは、カバープレートにおけるポート(3)を通じてチャンバから流出してもよい。スタックにおける層は、開口4および5によって接続されており、チャンバにガス流を通過させる。

30

【0017】

本発明による遠心分離チャンバは、細胞処理システムとしてまたは細胞処理システムにおいておよび/または本発明の方法としてまたは本発明の方法において使用することができる。例えば、本発明による細胞プロセッシングは、まず細胞の試料を細胞培養によって膨張させることによって行うことができる。結果として生じた細胞懸濁液は、その後、遠心分離によって2つ以上の部分に分離させられてもよい。分離プロセスは、1回以上の洗浄ステップを伴ってもよく、所望の標的細胞は、付加的な培養ステップにおいて膨張させられてもよい。

40

【0018】

別の態様では、本発明による細胞プロセッシングは、望ましくない細胞を除去する一回以上の洗浄ステップを含む第1の遠心分離ステップにおいて細胞試料細胞のための所望の目標の濃縮を伴う。このように濃縮された細胞部分は、所望のセルを含み、これらの所望のセルは、次いで、その後の細胞培養ステップによって膨張させることができる。

50

【 0 0 1 9 】

したがって、遠心分離チャンバは、白血球搬出法試料または同様のものなどの、血液または骨髄を起源とする細胞を処理するのに適している。

【 0 0 2 0 】

本発明の遠心分離チャンバの詳細な説明

ガス透過性膜

本発明によるガス透過性膜は、細胞培養用の層として機能する。本発明の遠心分離チャンバにおける細胞の供給は、膜を介するガス拡散によって達成される。

【 0 0 2 1 】

ガス透過性膜は、ポリスチレン、SILPURAN 6000/50またはSILPURAN 2450 (Wacker Chemie AG) などのシリコーン、ポリメチルペンテンまたはカーボンフィルムから製造されていてよく、チャンバの支持構造またはベースプレートに液密および気密形式で接着、溶接またはプレス成形されていてよい。

10

【 0 0 2 2 】

ガス透過性膜へのガスの均一の分配を高めるために、ガス透過性膜には、ガス側において複数のスペーサエレメントまたはチャンネルを設けることができる。透過性膜のスペーサエレメントまたはチャンネルは、膜の表面上におけるガスの分配を高めるために、膜と、膜の支持構造との間または膜とベースプレートとの間に十分な体積および/または規定された空間を保証する。

【 0 0 2 3 】

20

スペーサエレメントは、ドット、テクスチャまたはタペットの形式を有してもよく、0.1 ~ 0.5 mmの高さを有してもよい。チャンネルは、0.1 ~ 0.5 mm深さもしくは幅を有することができ、らせん状、迷宮もしくはラビリンス状のあらゆる幾何学的形状に配置することができる。図6は、例として、膜と支持構造(2)との間に体積(15)を提供するために複数のスペーサエレメント(14)を備えたガス透過性膜を示している。もちろん、スペーサエレメントのチャンネルは、ガス透過性膜と、支持構造またはベースプレートとの間に向けられており、細胞と接触していない。

【 0 0 2 4 】

ガス透過性膜は、好適には、光学的鏡検に適した光学的透明性、すなわち、ガラスと同等の曇り度および透光性を有する。ガス透過性膜の表面は、この目的のためにできるだけ平滑であるべきである。

30

【 0 0 2 5 】

スタックにおける層は開口によって接続されているので、膜にも開口が設けられている。図4は、スペーサエレメント(9)と、層間のガス引渡しのための開口(4, 5)とが設けられた膜(8)を示している。開口には、非戻り弁または所定のガス圧において解放する弁としてのベントが設けられていてよい。

【 0 0 2 6 】

支持構造

支持構造は、ガス透過性膜に遠心分離条件下で十分な機械的安定性を付与し、膜の下方に規定された体積を提供する。第1の支持構造は、ベースプレート上に配置されている。第1の支持構造に変えて、第1のガス透過性膜用の第1の支持体としてベースプレートが用いられてもよい。

40

【 0 0 2 7 】

回転軸における液体の流入および/または流出のためのポートに接続された開口を通じてチャンバからの液体の除去を許容するために、支持構造には、適切な位置においてオリフィスまたは開口が設けられている。チャンバの開口にデフレクタが設けられているならば、支持構造には、デフレクタのための開口またはオリフィスが設けられているか、またはデフレクタが支持構造に取り付けられている。

【 0 0 2 8 】

ガス透過性膜へのガスの均一の分配を高めるために、支持構造には、複数のスペーサエ

50

レメントまたはチャンネルを設けることができる。スペーサエレメントは、ドット、テクスチャまたはタペットの形式を有してもよく、0.1~0.5mmの高さを有してもよい。チャンネルは、0.1~0.5mm深さもしくは幅を有することができ、らせん状、迷宮もしくはラビリンス状のあらゆる幾何学的形状に配置することができる。図8は、例として、チャンネルを備えた2つの支持構造を示している。

【0029】

支持構造は、好適には、光学的鏡検に適した光学的透明性、すなわち、ガラスと同等の曇り度および透光性を有する。支持構造の表面は、この目的のためにできるだけ平滑であるべきである。

【0030】

スタックにおける層は開口によって接続されているので、支持構造にも開口が設けられている。図5は、支持構造(8)に取り付けられたガス透過性膜(7)を示しており、各ガス透過性膜には、層の間のガス引渡しのための開口(4)および(5)が設けられている。開口には、非戻り弁または所定のガス圧において解放する弁としてのベントが設けられていてよい。

【0031】

細胞培養のための層のスタック

本発明によるチャンバは、細胞培養のための層のスタックを有しており、各層は、支持構造上に提供されたガス透過性膜から成る。好適には、スタックは、2~20の層、最も好適には5~10の層を有する。層は、2~10mm、好適には2~5mmの互いに対する距離を有してもよい。図3は、このようなスタックの一例を示している。

【0032】

チャンバを通して、すなわち層の間に十分なガス流を提供するために、ガス透過性膜および支持構造には、ネックを有する開口を設けることができ、ネックは、次の層のネックに嵌合する。例えば、支持構造の開口のネックは、隣接するガス透過性膜の開口のネックよりも大きな直径を有してもよい。このようなネックは互いに積み重ねることができ、これにより、スタックにおける層を接続する気密チャンネルを提供する。図4および図5は、支持構造の開口と、異なる直径のネックを有するガス透過性膜とを示している。

【0033】

開放または閉鎖した状態において支持構造およびガス透過性膜における開口を提供することにより、複数の層の間でまたはスタックを通じてガスを所定の経路で方向付けることができる。本発明の別の実施の形態において、層(支持構造およびガス透過性膜から成る)には、ネックを有する2つの開口が設けられており、そのうちの一方は閉鎖状態に、他方は開放状態にある。閉鎖した開口が開放した開口の上側になるようにこのような層を積み重ねることにより、ガスは、チャンバを通るときにジグザグに通過させられる。図7aはこの実施の形態を示しており、この場合、ガス(点線で示されている)は、オリフィス3を介して第1の層に進入し、開口6によってチャンバから出るまで、開口4および5によって全ての層を通して案内される。図7cは、4つの層を通るガス通路の拡大図を示している。

【0034】

本発明の代替的な実施の形態において、層(支持構造およびガス透過性膜から成る)には、ネックを有する2つの開口が設けられており、それらの両方が開放状態にある。図7bはこの実施の形態を示しており、この場合、ガス(点線で示されている)は、オリフィス3を介して第1の層に進入し、開口4および5を通して案内される。この実施の形態では、チャンバは、開口6を閉鎖し(または開口6に適切なベントを提供し)、ポート3を介して新鮮なガスを供給することによって、一定のガス圧下にもたらずことができる。ガスは、細胞の消費にしたがってチャンバ/層を通して分配される。

【0035】

細胞培養のための層のスタックは、チャンバの回転軸に固定することができる。これにより、スタックは、チャンバ/回転軸と同じ回転速度を受ける。発明のこの実施の形態の

10

20

30

40

50

第1の態様では、細胞は、膜に付着し、チャンバの低い回転速度で層において培養することができる。より高い回転速度において、細胞は遠心力によって膜から除去され、細胞培養媒体中に懸濁させられる。懸濁させられた細胞は、それぞれの沈降速度にしたがってチャンバの遠心分離によって互いに分離することができる。

【0036】

発明のこの実施の形態の第2の態様において、スタックは、チャンバの回転軸に固定されているのではなく、チャンバの回転軸を中心として自由に回転することができる。発明のこの態様では、細胞媒体は、チャンバに対する層の回転によってチャンバ内に分配される。スタックは、アイドリングしたままではなく、ローラ発酵槽の動きと同様に低速で回転する。

10

【0037】

発明のこの実施の形態の第3の態様では、スタックは、チャンバの回転軸に密に固定されているのではなく、さらなる自由回転がブロックされるまで、約4分の1回転から2分の1回転だけ回転することができる。この態様では、チャンバは、その回転方向を頻繁に変化させてもよく、細胞媒体によって供給される細胞は、チャンバの移動によって分配される。より高い回転速度では、スタックの自由回転がブロックされ、細胞は、せん断力により表面から除去される。細胞培養媒体に分散させられた後、細胞は、それぞれの沈降速度にしたがって、チャンバの遠心力によって互いに分離させることができる。

【0038】

遠心分離チャンバ

20

チャンバは、2 cm ~ 20 cm、好適には8 cm ~ 15 cmの内径と、5 mm ~ 10 cm、好適には2 cm ~ 7 cmの内側高さとを有してもよい。チャンバの合計体積は、10 cm³ ~ 2000 cm³、好適には200 cm³ ~ 1000 cm³であることができる。

【0039】

本発明のチャンバは、円筒体と、ベースプレートと、カバープレートとから成り、図9に示されている（層のスタックは省略してある）。円筒体と、ベースプレートと、カバープレートとは、製造を単純化し、遠心分離プロセス中のあらゆる非平衡を減じるために、丸いまたは円形の物体であることができる。別の実施の形態では、少なくとも円筒体は、僅かにだ円形に成形されていてもよく、この場合、第1の寸法における直径は、第1の寸法に対して垂直に向けられた第2の寸法における直径よりも、0.5 ~ 10、好適には0.5 ~ 5%だけ大きい。例えば、円筒体は、第1の寸法によって120 mmの直径を、第1の寸法に対して垂直に向けられた第2の寸法では122 mmの直径を有していてもよい。

30

【0040】

ベースおよびカバーは、同じだ円形を有してもよく、または丸い/円形の物体であることもできる。デフレクタを備えた開口が、だ円形の円筒体のより大きな寸法に向けられていることが好ましい。この場合、細胞は、遠心力によって、円筒体壁部に沿って、円筒体のより大きな寸法の方に、すなわち開口の近くで移動させられる。

【0041】

チャンバおよび支持構造は、セラミック、ポリスチレン（PS）、ポリエチレン（PE）、ポリプロピレン（PP）、塩化ポリビニル、ポリカーボネート、ガラス、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、および/またはポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）および/または熱可塑性ポリウレタン（TPU）、シリコン、または上述の材料のうちの1つ以上を含む配合物などの、様々な材料から形成されていてよい。さらに、チャンバは、コラーゲン、キチン、アルギン酸塩、および/またはヒアルロン酸誘導体、ポリラクチド（PLA）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリグリコール酸（PGA）およびそれらの共重合体、を含むまたはから形成されていてよい。

40

【0042】

本発明による細胞プロセッシングは、細胞懸濁液を遠心分離によって2つ以上の部分に分

50

離することを含む。細胞部分を分離した後、望ましくない液体または細胞懸濁液は、ベースプレートおよび/またはカバープレートにおける開口を介して、および流入/流出ポートを通じてチャンバから除去される。細胞分離ステップは、選択的に、一回以上の洗浄ステップを含んでもよく、洗浄ステップでは、洗浄液が遠心分離によって細胞懸濁液から分離され、その後、開口およびチャンバの液体の流入/流出ポートを介して除去される。

【0043】

細胞懸濁液、栄養液および/または洗浄液の、遠心分離チャンバへの供給および遠心分離チャンバからの除去は、チャンバにおける適切な開口に接続された、液体の流入/流出のためのポートを介して可能である。

【0044】

チャンバの開口（例えば図9における（7）および（8））は、穴または配管入口として成形することができ、遠心分離チャンバにおけるそれらの位置は、特定の試料の分離のためにまたはチャンバへのまたはチャンバからの特定の流体の排出のために最もよく適しているように構成することができる。特定の試料の成分および試料における各成分の相対体積に応じて、開口は、特定の層の最も迅速な除去および/または検出を達成することができるような形式で位置決めすることができる。加えて、例えば標的細胞のサイズおよび/または最適化された体積流量を考慮して、開口のサイズを所望の層のために最適化することができる。

【0045】

円筒体が僅かにだ円形に成形されている場合、デフレクタを備えた開口が、だ円形の円筒体のより大きな寸法に向けられていることが好ましい。この場合、細胞は、遠心力によって、円筒体壁部に沿って、円筒体のより大きな寸法の方向に、すなわち開口の近くで移動させられる。

【0046】

別の実施の形態では、本発明によるチャンバは、チャンバのベースプレートまたはカバープレートに位置決めされた、試料分離の進行を制御するための手段を有する。試料分離の進行を制御するための手段は、好適には、遠心分離中に試料がチャンネルまたは間隙に進入することができ、これにより検出可能となるように、チャンバのベースプレートまたはカバープレートに配置されたチャンネルまたは間隙に位置決めされている。遠心力により、試料の様々な成分は、光によって、例えばカメラまたは光検出器を用いて検出可能な層を形成する。これにより、信号が生成され、この信号は、層形成または試料分離が完了したときを決定する。試料分離の進行を制御するための適切な手段は、引用により本明細書に組み込まれる国際公開第2009/072006号または国際公開第2009/072003号に開示されている。

【0047】

遠心分離チャンバは、細胞分離プロセス、細胞培養目的またはそこで成長した細胞のさらなる処理のために使用することができる。チャンバは、細胞の成長、分離、洗浄、細胞または様々な種類の細胞の濃縮、またはその他の、広範囲の細胞培養方法が行われることを可能にする。この目的のために、チャンバは、さらに、例えばガス、細胞培養媒体または同様のものためのさらに別の流入/流出開口を有してもよい。細胞培養条件は従来公知である。

【0048】

遠心分離条件を備えるまたは備えない本発明のチャンバによる細胞培養プロセスは、標的細胞の所望の数が達成されるまでまたは層の能力が消耗されるまで行われる。プロセスの継続時間は、所望の標的細胞に依存し、制限されない。典型的には、細胞培養のためのプロセスは1~24時間かかってよい。

【0049】

遠心分離は、好適には、10~2000×g、好適には100~500×gで行われる。好適な実施の形態では、試料が遠心分離されるのに適した温度を提供するためにチャンバを加熱および冷却することができる。この目的のために、加熱および/または冷却手段

10

20

30

40

50

をチャンバにまたはチャンバの周囲に配置することができる。

【0050】

高められた分離プロセスのためのデフレクタを備えたチャンバ

全体的な細胞処理プロセスは、チャンバの変更によって、特に、チャンバ内への液体の流入／流出ポートの開口にデフレクタを提供することによって、高めるまたは加速させることができる。

【0051】

本発明による遠心分離チャンバの別の実施の形態は、液体の流入／流出のための少なくとも1つのポートが、遠心分離チャンバ内への、ベースプレートおよび／またはカバープレートに配置された開口に接続されており、少なくとも1つの開口には、円筒体の内周の多くとも10分の1である、その基底における幅を有する少なくとも1つのデフレクタが設けられている。

10

【0052】

本発明の第1の実施の形態では、少なくとも1つのデフレクタは少なくとも1つの開口と円筒体との間に配置されている。ここに配置されていると、このデフレクタは、開口と円筒体との間の体積から開口を遮蔽し、この体積の排出の間に、チャンバの別の部分からの、すなわち開口とチャンバの円筒体との間の体積からの液体の望ましくない吸引を防止する。この実施の形態は、例として図9（層のスタックを省略してある）に開口（7）およびデフレクタ（6）によって示されている。この実施の形態では、チャンバには、ベースプレートおよびカバープレートにおいて2、4、6または8の開口が設けられていてよい。

20

【0053】

第2の実施の形態では、少なくとも1つのデフレクタは少なくとも1つの開口と円筒体の回転軸との間に配置されている。第1の実施の形態とは異なり、このデフレクタは、開口と円筒体壁部との間のチャンバの体積から開口を遮蔽し、チャンバの内部体積を排出するときにこの体積からの液体の吸引を防止する。この実施の形態は、例として図9（層のスタックを省略してある）に開口（8）およびデフレクタ（9）によって示されている。この実施の形態では、チャンバには、ベースプレートおよびカバープレートにおいて2、4、6または8の開口が設けられていてよい。

【0054】

本発明の第3の実施の形態では、チャンバは、本発明の第1および第2の実施の形態の両方の位置においてデフレクタを有し、すなわち、少なくとも1つのデフレクタが、少なくとも1つの開口と円筒体の間、ならびに第2の管の少なくとも1つの開口と円筒体の回転軸との間に配置されている。開口に対するデフレクタの位置および／または円筒体までの距離は、同じであるまたは異なることができる。図9（層のスタックを省略してある）は、開口（7、8）およびデフレクタ（6、9）を備えた本発明のこの実施の形態を示している。この実施の形態では、チャンバには、ベースプレートおよびカバープレートにおいて2、4、6または8の開口が設けられていてよい。

30

【0055】

本発明の第3の実施の形態では、チャンバの2つの開口は、チャンバの2つの異なる体積に、接続されているまたはアクセスを提供しており、チャンバ内に提供された液体を排出するために使用することができる。本発明のデフレクタの遮蔽効果により、排出中の層の再混合が減じられ、層を排出することによって得られる部分の純度がより高まるおよび／またはより高い排出速度が可能となる。

40

【0056】

本発明において利用されるデフレクタは、好適には、円筒体と実質的に平行である、すなわち、円筒体の曲率半径にしたがって湾曲させられている。デフレクタの形状は、矩形、三角形、半円形またはだ円形であることができる。好適な実施の形態では、デフレクタは、遠心分離中に細胞に、より低いせん断力を加えるために、管の開口に配置された広いベースと、より小さなピーク領域とを有する。デフレクタのエッジは、エッジにおける細

50

胞膜の切断または剥離による細胞損失を回避するために面取りされているべきである。最も好適には、デフレクタは半円形または半だ円形である。

【0057】

デフレクタのサイズは、例えば、回転軸寄りに配置されたチャンバの部分の排出が望まれるときに、チャンバの外側へ向かう方向でみて、開口の背後に配置されたチャンバの体積が液体を排出することによって、望ましくない体積流量を減じるために十分であるべきである。

【0058】

デフレクタのサイズは、チャンバの体積、遮蔽される体積、および意図される排出速度に依存する。例えば、遮蔽される体積が大きいほど、デフレクタは大きくなるべきである。その形状にかかわらず、デフレクタは、基底部分において（管の開口において）、円筒体の内径の10分の1～60分の1、好適には25分の1～40分の1の幅を有するべきである。例えば、10cmの内径を有する円筒体には、基底部分において（管の開口において）、1～2cmの幅を有するデフレクタが設けられている。

10

【0059】

デフレクタの高さは、好適には、基底部分における幅と同じ（100%）であるか、またはそれよりも小さい、例えば50～95%である。

【0060】

デフレクタの表面のサイズは、幅および高さにおける任意の範囲から計算するまたは見積もることができるが、通常は、 $0.1\text{ cm}^2 \sim 10\text{ cm}^2$ である。いずれの場合にも、デフレクタのサイズは、層への試料の分離を妨害すべきではないが、分離された層からの液体の望ましくない流れを減じる。

20

【0061】

本発明のチャンバは、同じ又は異なるサイズおよび/または高さおよび/または幅を有してもよい複数のデフレクタを含んでもよい。

【0062】

本発明のチャンバの開口にデフレクタが設けられているならば、ガス透過性膜および支持構造には、デフレクタおよび開口のためのオリフィスまたは開口が設けられている。

【0063】

本発明による遠心分離チャンバは、好適には、図9（層のスタックを省略してある）に示したように、回転シールを備え、かつ好適には2つの流体ラインまたは液体のための流入/流出ポート（10）を備えた、回転軸を有する。遠心分離チャンバは、さらに、カバープレート（11）と、円筒体（5）によって接合されたベースプレート（12）とを有する。ベースプレート（5）には管が設けられており、これらの管は、それぞれの流入/流出ポート（10）およびチャンバ内への開口（6, 8）に接続されている。開口（6, 8）にはデフレクタ（7, 9）が設けられている。

30

【0064】

図9（層のスタックを省略してある）に示された実施の形態では、チャンバのベースプレートおよびカバープレートには、ガスの流入（3）および/または流出（4）のための少なくとも1つのオリフィスが設けられている。

40

【0065】

ガスの流入および/または流出のためのオリフィスには無菌フィルタを設けることができる。チャンバは、ガスの流入および/または流出のための1、2または4のオリフィスを有していてもよい。

【0066】

本発明による遠心分離チャンバにデフレクタシールドが設けられているならば、細胞培養のための層は、好適には、円筒体の内径よりも少なくとも5%だけ小さな直径を有する。例えば、層の直径は、円筒体の内径は、80～90%であるべきである。

【0067】

官能性表面を備えたガス透過性膜

50

本発明の別の実施の形態では、ガス透過性膜には、官能性表面が設けられていてもよく、すなわち、化学的または物理的手段で処理されているまたは化学的または物理的な固定された生理活性化合物のコーティングを有する。

【0068】

本明細書において使用される“ガス透過性膜の官能性表面”という用語は、細胞に刺激を提供することができる全てのタイプの表面を含む。典型的には、官能性表面は、

- タンパク質、ペプチド、核酸；
 - 親水性ポリマのような細胞変更表面への細胞または生物活性化合物の付着を高めるスペーサ分子（官能性ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、官能性デキストラン）；
 - 生物活性化合物のキャリアとしての有機または向き粒子、特に、官能性ポリ乳酸、ポリビニルアルコールまたは官能性デキストランでコーティングされた磁性粒子；
 - 細胞付着を高める物質、例えば、ポリペプチド、リピド、ポリサッカリド；
 - ウイルスおよびレトロウイルスまたはその粒子
 - 抗原提示細胞、ある生理活性因子を発生する“副細胞”、またはある官能分子が形質移入された細胞株などの、標的細胞の変異のために使用することができる細胞；
 - ミトゲン、サイトカイン、刺激抗生物質またはレセプタリガンドによって提供される刺激；
 - 表面の親水特性によって提供される刺激；
- などの化学的または物理的な固定された生理活性化合物を含む。

10

20

【0069】

本発明の1つの態様では、ガス透過性膜は、細胞培養に適したまたは任意の細胞タイプのための好適な細胞培養条件を導入するために必要とされるあらゆる物質によって官能化されていてよい。

【0070】

ガス透過性膜は、例えば親水特性を高めるために、強塩基、酸素またはフッ素と酸素の混合物による化学的処理またはコロナまたはプラズマによる物理的処理によって官能化されていてよい。

【0071】

ガス透過性膜は、細胞変異表面における細胞の付着および/または増殖を高めるために官能化することができる。ガス透過性膜の官能化のための適切な物質は、糖タンパク質、ポリペプチド、グリコサミノグリカン、二糖、ビオチンバイディング分子またはタンパク質タグである。例えば、ガス透過性膜は、全てのコラーゲンタイプ（I～VII）を含む細胞外基質でコーティングされていてよい。

30

【0072】

さらに、ガス透過性膜は、親和性結合システムで官能化されていてよい。最も広く用いられる親和性結合システムの1つは、アビジン-ビオチンまたはストレプトアビジン-ビオチンシステムである。例えば、細胞変異表面は、ビオチン化抗体などのビオチン化分子の結合を促進するために、まずアビジンおよび/またはストレプトアビジン（またはそれらの誘導体）によってコーティングされてもよい。さらに、ストレプトアビジンおよび/またはアビジンによって官能化された別の分子の結合を促進するために、細胞変異表面をまずビオチン（またはその誘導体）によってコーティングすることが可能である。両方の態様は、細胞変異表面への第2の分子の高い親和性結合を生じる。ストレプトアビジンまたはアビジン-ビオチンの強い相互作用は、改質ストレプトアビジンまたはアビジンおよびDSB-X Biotin (Hirsch et al. 2002: "Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation". Analytical Biochemistry 308: 343-357; 米国特許出願公開第2008/0255004号)などのデスチオビオチンまたはその誘導体などの改質ビオチンの組合せを使用することによって著しく弱くすることができる。抗体などのタンパク質は、改質ビオチンによってビオチン化されてもよい。選択的に改質されたス

40

50

トレプトアビジンまたは細胞改質表面に結合されたアビジン分子に改質ビオチンを結合することによってこのタンパク質が固定されると、タンパク質は、自由ビオチンを付加することによってマイルドな条件において解放されてよい。

【0073】

さらに、細胞改質表面に適した親和性結合システムは、抗体、例えばビオチンに対する抗体またはタンパク質タグ、例えばHisopeptago、BCCPまたはMyc-tagを含む。

【0074】

ガス透過性膜は、さらに、任意の細胞タイプのために結合システムとしてもっとも良く機能する物質を特定するために、組合せ化学の方法によって合成された物質のライブラリによってコーティングされてよい。

【0075】

ある生理活性ポリマは、官能性ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリサッカリドまたはデキストランまたはそれらの誘導内などの、細胞の付着またはガス透過性膜における他の物質の結合を高めるスペーサ分子として使用されてよい。この結合システムは、特に、ポリカーボネート、ポリスチレンまたはポリエチレンなどの疎水性プラスチック材料から製造されたガス透過性膜の基本コーティングとして有効である。膜のガス透過性膜は、例えば米国特許第6977138号明細書に開示されている高反応性ポリマによってコーティングされてよい。

【0076】

ガス透過性膜は、細胞の付着および/または増殖を高める1つ以上の物質を含むことができる。特に有効であるのは、コラーゲンタイプ(I~VII)、フィブロネクチン、ゼラチン、ラミニン、エラスチン、ヒアルロン酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ポリ-d-リシン、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、抗体、ビオチンまたはタンパク質タグに対する抗体、Hisopeptag、BCCP、Myc-tag、カルモジュリン-タグ、FLAG-tag、HA-tag、His-tag、マルトース結合タンパク質-タグ、Nus-tag、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-タグ、緑色蛍光タンパク質タグ、チオレドキシン-タグ、S-タグ、Softag 1、Softag 3、Strep-tag、SBC-tag、Ty tag、certia、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリサッカリド、およびデキストランなどのタンパク質タグ、から成るグループから選択された1つ以上の物質である。

【0077】

発明の別の態様において、細胞改質は、細胞の活性化、増殖、脱分化および/または分化などの細胞改質を含む。したがって、ガス透過性膜の細胞改質表面は、細胞活性化、増殖、脱分化および細胞の分化などの細胞の細胞改質に適したあらゆる物質によって官能化されてよい。ガス透過性膜は、さらに、細胞活性化、細胞の増殖、脱分化および分化などの細胞の細胞改質に適した少なくとも1つの物質によって官能化された粒子によって官能化することができる。

【0078】

特に、本発明の方法および装置による細胞改質は、遺伝子発現、タンパク質発現、遺伝子、mRNAまたはタンパク質の翻訳後または転写後改質、タンパク質リン酸化、ヒストン改質、または細胞内信号カスケード(例えばCa²⁺インフラックス)を含む。

【0079】

さらに、細胞改質は、例えば、反発的または拮抗性抗体、サイトカイン、成長因子、活性化(非活性化)リガンド、薬理的に活性の物質、ミトゲン、DNAまたはRNA改質物質による細胞活性化を含んでもよい。

【0080】

細胞プロセッシングシステム

別の実施の形態では、本発明の遠心分離は、引用によりここに組み込まれる国際公開第2009/072006号、国際公開第2009/072003号または欧州特許ダイ0869838号明細書から公知のような試料プロセッシングシステムの一部であることができる。試料プロセッシングユニットは、遠心分離チャンバの流入/流出ポートに接続するこ

10

20

30

40

50

とができ、分離コラムホルダ、ポンプ、分離プロセスの間の液体の（中間）貯蔵のための複数の容器、および流体回路およびホルダに位置決めされた分離コラムを通る流体流れを少なくとも部分的に制御するように構成された複数の弁を含んでいてよい。

【0081】

本発明の遠心分離チャンバを用いた細胞培養

細胞培養は、細胞培養媒体およびガスによる供給を必要とする。細胞培養媒体は、チャンバの流入/流出ポートを介して一定の流れでまたはバッチ式流れで供給されるか、またはチャンバは、想定される細胞培養プロセスのために十分な細胞媒体によって一度で満たされる。適切な細胞媒体は、当業者に公知であり、以下の媒体、それぞれ選択的に例えば牛胎児血清、ヒト血清または血清代用品またはその他の栄養素またはサイトカインなどの細胞刺激薬によって補助された、すなわちDMEM、HBS S、DPBS、RPMI、Is coveの媒体、X-VIVO TMを含む。媒体は、例えば一次的ヒト細胞培養のための（例えば内皮細胞、肝細胞またはケラチノサイトのための）または幹細胞（例えば樹状細胞成熟、造血膨張、ケラチノサイト、間葉幹細胞またはT細胞膨張）のための上述の媒体または特別な媒体のような標準的な細胞媒体であることができる。媒体は、技術分野において公知のサプリメントまたは試薬、例えばアルブミンおよび輸送タンパク質、アミノ酸およびビタミン、抗生物質、付着因子、成長因子およびサイトカイン、ホルモンまたは可溶化剤を有してもよい。様々な媒体は、例えばLife TechnologiesまたはSigma-Aldrichから市販されている。

10

【0082】

適切であるならば細胞タイプまたは行われる改質ステップのために、遠心分離チャンバの温度およびガス組成を制御および調節することができる。この目的のために、本発明の装置に加熱および/または冷却手段を取り付けることができる。本発明の方法において、培養される細胞は、空気、O₂、N₂およびCO₂を利用して、ガス透過性膜を通じて拡散によって供給される。

20

【0083】

チャンバの使用

本発明によるチャンバを例えば以下のプロセスにおいて使用することができる：

- 細胞活性化、細胞増殖、細胞形質移入、分離または洗浄ステップに続くまたはその後の細胞染色などの細胞プロセッシング
- 人間の血液から赤血球および血漿を分離および排出することによる白血球の隔離
- 人間の血液から白血球を分離した後、細胞ラベリングすることにより、白血球のある部分母集団、例えば以下の表面マーカ、すなわちCD4、CD8、CD25、CD34および/またはCD133のうちの1つ以上を有する白血球を隔離する
- 人間の血液から赤血球および血漿を排出した後、細胞媒体および/または密度勾配添加物を用いた1回以上の洗浄ステップによって白血球を準備する
- 再生医療、末梢動脈、肝臓病または心筋幹細胞治療において使用するために、人間の血液から、以下の表面マーカ、すなわちCD4、CD8、CD25、CD34および/またはCD133のうちの1つ以上を有する細胞を隔離、濃縮または除去する。

30

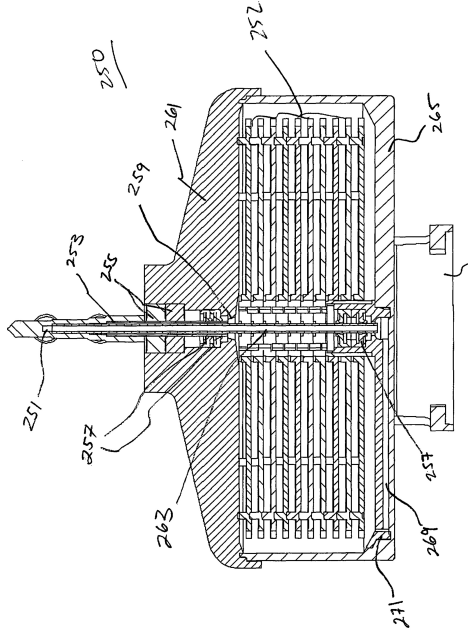
【符号の説明】

40

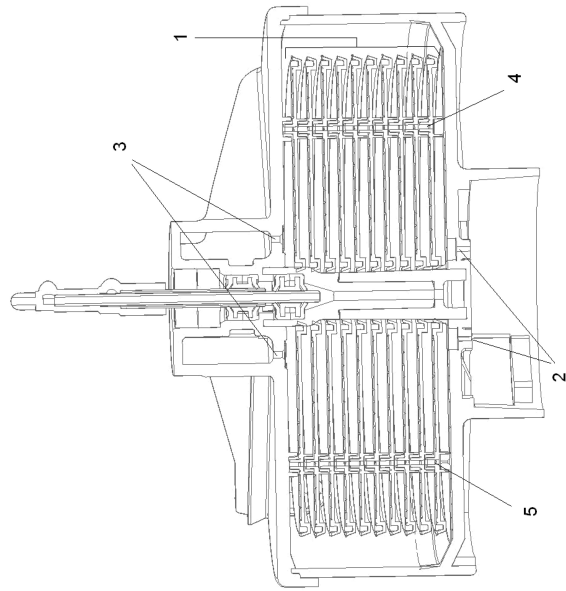
【0084】

1 スタック、 2 支持構造、 2, 3 ポート、 3, 4 オリフィス、 4, 5 開口、 5 ベースプレート、 6 開口、 7 ガス透過性膜、 8 支持構造、 8 膜、 7, 8 開口、 6, 9 デフレクタ、 9 スペーサエレメント、 10 流入/流出ポート、 11 カバープレート、 14 スペーサエレメント、 15 体積

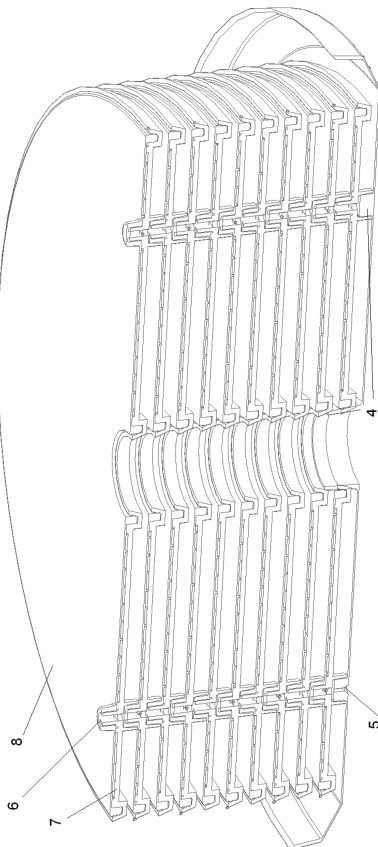
【図1】



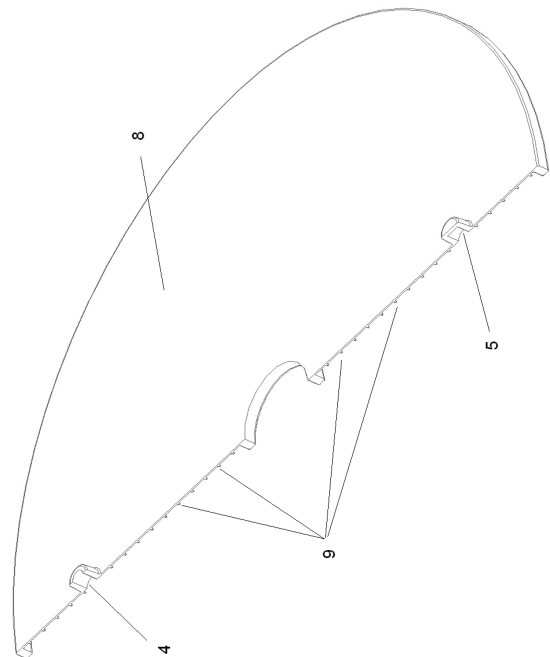
【図2】



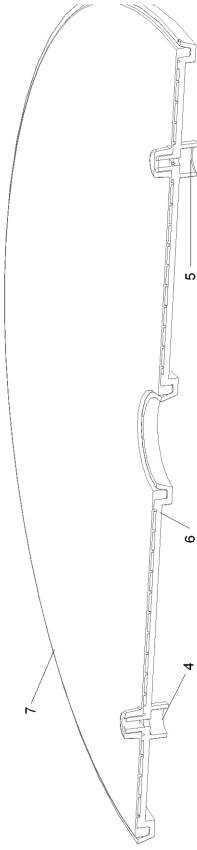
【図3】



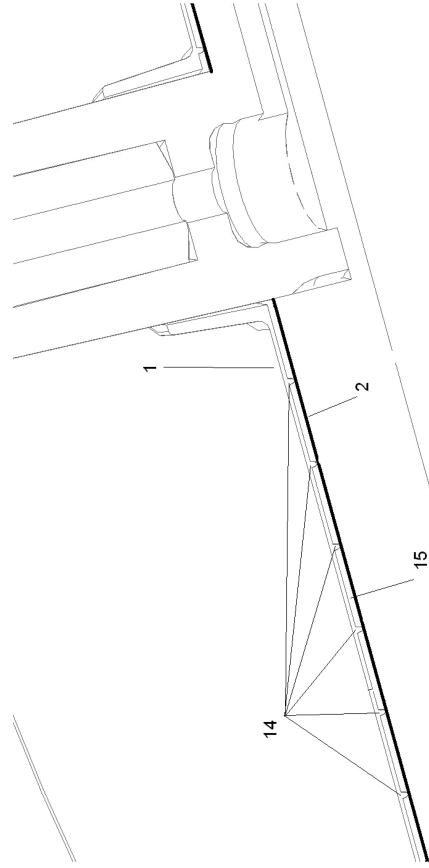
【図4】



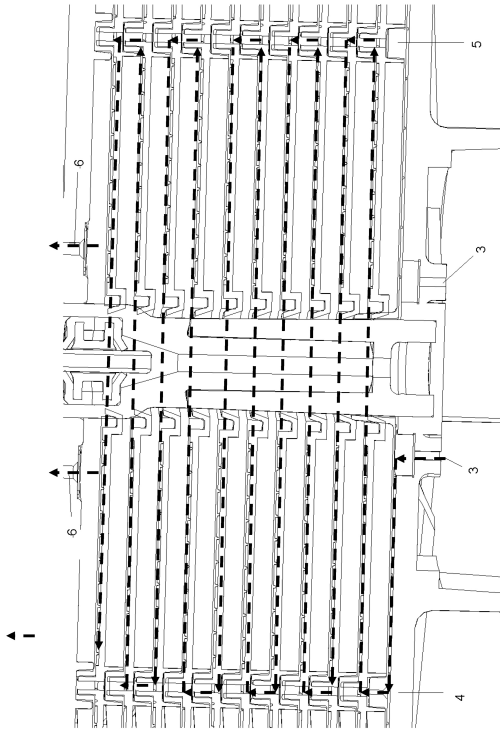
【図 5】



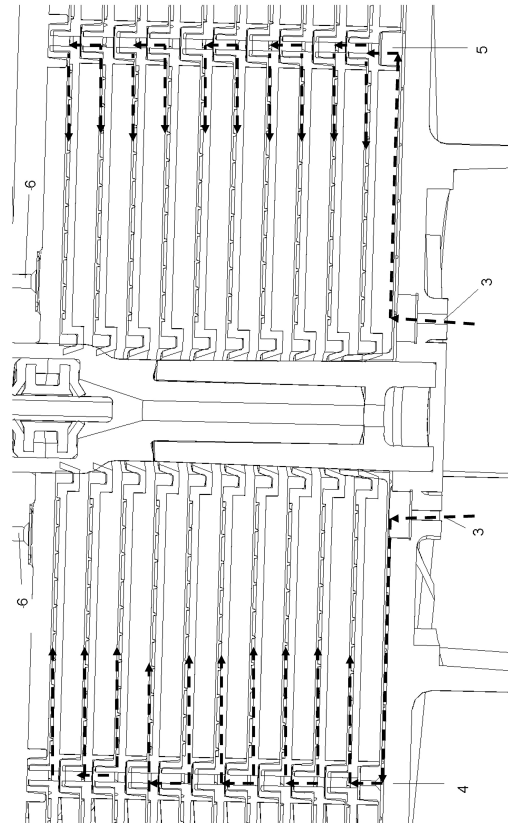
【図 6】



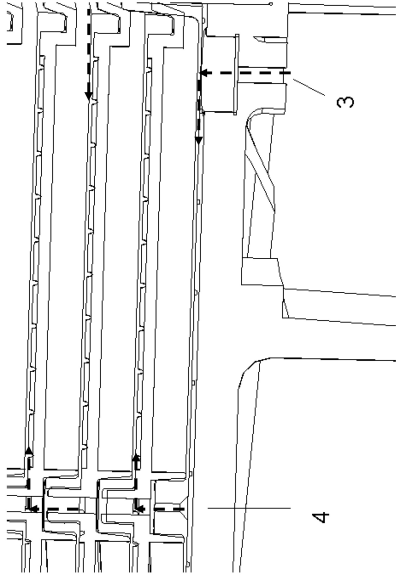
【図 7 a】



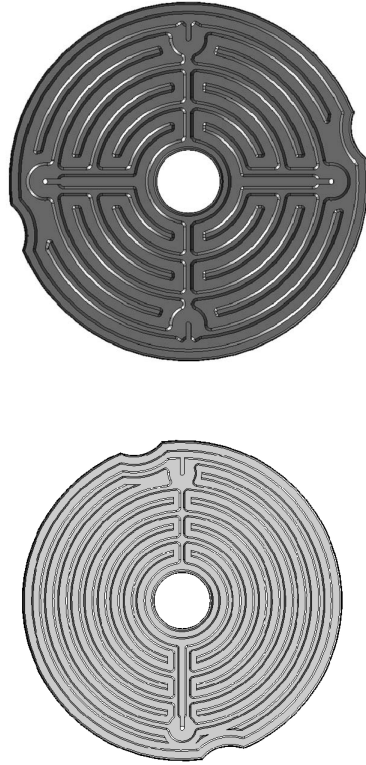
【図 7 b】



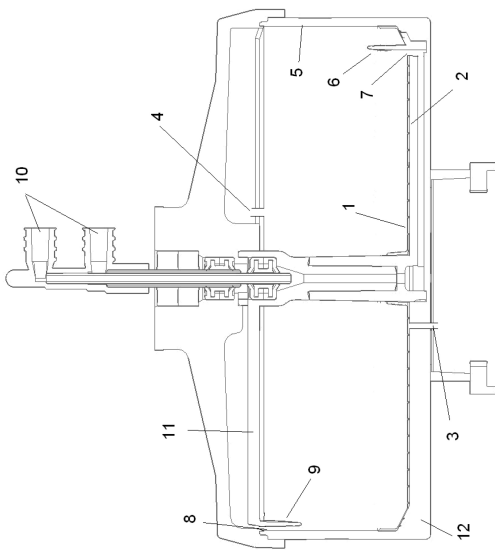
【図7c】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

- (74)代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
- (74)代理人 100099483
弁理士 久野 琢也
- (72)発明者 エイアド カバハ
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ・エーバート・シュトラッセ
6 8 ケア・オブ ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハ
フツング
- (72)発明者 シュテファン ミルテニー
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ・エーバート・シュトラッセ
6 8 ケア・オブ ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハ
フツング
- (72)発明者 ラルフ・ペーター ペーターズ
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ・エーバート・シュトラッセ
6 8 ケア・オブ ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハ
フツング

審査官 千葉 直紀

- (56)参考文献 特表2011-506057(JP, A)
特表2011-509686(JP, A)
特表平11-506616(JP, A)
米国特許出願公開第2013/0005022(US, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12M 1/00