

(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2014-509523

(P2014-509523A)

(43) 公表日 平成26年4月21日(2014.4.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 Z	4 B 0 3 3
C 1 2 M 1/42 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 13/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/42	
	C 1 2 N 13/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2014-502558 (P2014-502558)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月29日 (2012. 3. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月25日 (2013. 11. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/000182
 (87) 国際公開番号 W02013/048546
 (87) 国際公開日 平成25年4月4日 (2013. 4. 4)
 (31) 優先権主張番号 61/468, 573
 (32) 優先日 平成23年3月29日 (2011. 3. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513244052
 チャン, ヨンシン
 アメリカ合衆国 テキサス州 75007
 , キャロルトン, ハイ ヴィスタ ドライ
 ブ 3437
 (74) 代理人 110000659
 特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
 (72) 発明者 チャン, ヨンシン
 アメリカ合衆国 テキサス州 75007
 , キャロルトン, ハイ ヴィスタ ドライ
 ブ 3437
 (72) 発明者 ワン, イン
 アメリカ合衆国 テキサス州 75007
 , キャロルトン, ハイ ヴィスタ ドライ
 ブ 3437

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多機能バイオリクターシステム並びに細胞を選別および培養する方法

(57) 【要約】

本開示は、バイオリクターに関し、さらに具体的には、細胞を成長させ、分離するためのバイオリクターに関する。バイオリクターは、少なくとも1つの反応チャンパーと、調節可能な磁場と、多機能細胞補助システムを備えており、さらに、任意要素の保護灌流システムと、任意要素のコンピューターによる制御システムとを備えていてもよい。

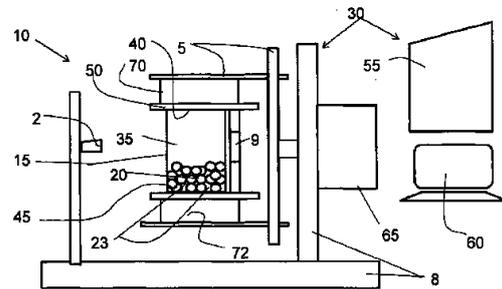


Fig. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞マーカーに基づいて細胞を分離し、細胞および人工組織を成長させるためのバイオリアクターシステムであって、

第 1 部分および第 2 部分を有する内側を含み、細胞マーカーによる細胞分離、細胞成長および人工組織の成長の反応のための空間を与える 1 つの反応チャンバーと、

前記チャンバーの内側に配置され、内側の第 1 部分と内側の第 2 部分の間を移動することができる、磁着性アジテーターと、

細胞マーカーによる細胞分離を補助し、チャンバーの特定の内側位置にアジテーターをとどまらせ、または反応チャンバーの反転にともなって内側の第 1 部分と内側の第 2 部分の間を移動させるように操作可能な、調節可能な磁場とを少なくとも備える、バイオリアクターシステム。

10

【請求項 2】

前記反応チャンバーの内側が、

細胞培地容器と流体が行き来できるように連結し、この容器から細胞培地を受け入れ、消し去ることができ、低コロイド浸透性溶液を含む、第 1 の区画（低浸透区域）と、

第 1 の区画に隣接し、さらに、細胞、アジテーター、試薬、バッファーおよび培地を受け入れ、消し去るための出入口になるように作られ、その内部にアジテーターが配置されている第 2 の区画（反応区画）と、

第 1 の区画と第 2 の区画の間に配置され、第 1 の区画から第 2 の区画へと細胞培地を選択的に流すことができるように作られた、第 1 の膜と、

第 2 の区画に隣接し、第 3 の区画が、バッファー容器からバッファーを受け入れることができるようにバッファー容器と流体が行き来できるように連結し、さらに、廃棄物が第 3 の容器から廃棄物容器へと流れることができるように廃棄物容器と流体が行き来できるように連結するように作られた、第 3 の区画（高浸透区画）と、

第 2 の区画と第 3 の区画との間に配置され、培地および廃棄物を第 2 の区画から第 3 の区画まで選択的に流すことができるように作られた、第 2 の膜と、

気体透過性材料で作られた反応チャンバーの側壁の少なくとも一部、pH を維持するための試薬を含む培地の 1 構成要素（例えば、HEPES）、またはチャンバーと接続した気体透過性システム、またはこれら 3 つの任意の組み合わせと、

30

バイオリアクターのカセットおよび任意のホルダーに配置された反応チャンバーの少なくとも一部とを備える、請求項 1 に記載のバイオリアクターシステム。

【請求項 3】

複数のピース、または複数の開口部を有する平面部材を備える磁着性アジテーターが、

(1) 全体的に剛性磁着性材料で作られ、裸である（コーティングされていない）か、または細胞の接続および細胞損傷の低減を含む任意の目的のために、不活性で剛性または硬質の材料でコーティングされるか、または

(2) 少なくとも部分的に、磁場の中に置かれると磁性を帯びるが、磁場が消えるか、または反応領域からはずされると、磁性ではなくなるか、または磁性が非常に弱くなるような磁着性材料で作られ、

40

(3) ピースについて、直径が 1 ミリメートルより大きく、請求項 1 および 2 の反応チャンバーの体積より小さい、請求項 1 に記載のバイオリアクターシステム。

【請求項 4】

前記磁着性アジテーターは、接着性の細胞培養物中で細胞を接着させ、成長させるため、また、細胞マーカーによる細胞分離中、磁着性材料で標識された抗体または他の生体分子と結合した細胞を接続するために細胞補助材として機能し、生体分子の反応および結合ならびに磁場によって制御された細胞の捕捉および放出を含む、請求項 3 に記載のバイオリアクターシステム。

【請求項 5】

前記磁着性アジテーターを用い、反応チャンバー内の任意の 2 つの部分の間を移動する

50

ことによって培地をゆっくりと機械攪拌し、(1)周囲にある磁場の引力、(2)アジテーターが反応チャンパー中の培地よりも密度が小さい場合には浮遊性、または(3)ビーズが反応チャンパー中の培地よりも密度が大きい場合には重力といった機構によって液体成長培地中に細胞を懸濁させたままにする、請求項3に記載のバイオリクターシステム。

【請求項6】

前記磁着性アジテーターを使用し、細胞成長のための「ニッチ」または微細環境を作り出し、ここで、ニッチは、請求項5に述べた機構によってそれぞれを動かした後に磁着性アジテーターが沈殿するにつれて、アジテーターの間に空間を含み、細胞成長を妨害し、幹細胞の非特異的な分化を減らし得る任意の過剰な混み合いまたは集塊を防ぐことができる、請求項1に記載のバイオリクター。

10

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

前記調節可能な磁場を、

(1)電流および/または電圧を変えることによって、または電磁石の位置および向き(配向)を変えることによって、磁場を調節する電磁石によって作ることができるか、

(2)永久磁石の位置および向きを変えることによって磁場を変えるような永久磁石によって作ることができるか、または

(3)上の(1)および(2)の組み合わせによって作ることができる、請求項1に記載のバイオリクター。

20

【請求項9】

細胞を分離し、細胞および人口組織を成長させるためのバイオリクターシステムであって、保護灌流システムを含み、保護灌流システムは、さらに、1つ以上の反応チャンパーと、区画の間に1つ以上の透析膜の壁と、浸透バッファーと、勾配のある浸透性バッファー容器と、浸透によってバッファーを循環させ、廃棄物を集める容器のための関連する動的デバイスとを備え、低浸透性区画から、透析膜を介して反応区画(または請求項2に記載されるような第2の区画)へと新しい培地を流すことができ、一方、廃棄物容器に捨てられる前に、反応区画からの古い培地が、透析膜を通して高浸透区画へと流れる、バイオリクターシステム。

30

【請求項10】

前記勾配のある浸透性バッファーは、高濃度の大きな分子、例えば、高コロイド浸透力を作り出すために、タンパク質およびPEG 8000を含む高コロイド浸透性バッファーを含み、また、大きな分子を少量しか含まないか、まったく含まない低コロイド浸透性バッファーを含む、請求項9に記載のバイオリクター。

【請求項11】

あらかじめ選択したプログラムを用い、または反応環境からの検出器およびセンサーによって得られるシグナルまたは情報に基づいて、バイオリクターの磁場、灌流、反応チャンパーの反転およびアジテーターの移動を自動的に調節することができる、コンピューターによるプログラムおよびフィードバックシステムを含む制御システムをさらに含む、請求項1および9に記載のバイオリクターシステム。

40

【請求項12】

細胞マーカーによる細胞分離のための細胞を調製することと、バイオリクター中で標的細胞を単離することと、選択していない細胞および古い培地を廃棄することと、細胞密度および細胞成長条件をリアルタイムで監視することと、細胞成長および直接的分化のための細胞培養条件をリアルタイムで調節し、最適化することと、細胞培養条件を調節して最適化するためのコンピューターによるシステムをプログラムし、適用することと、ニッチを用いるか、または用いずに、培養チャンパー内で細胞を培養することと、バイオリクター中の細胞を集めることと、を含む、細胞マーカーに基づいて細胞を分離し、細胞および人口組織を成長させる方法。

50

【請求項 13】

前記細胞マーカーに基づいて細胞を分離し、細胞を成長させることが、同じ反応チャンパー内で行われ、細胞マーカーによる細胞分離を、細胞培養の前、後および細胞培養中に行うことができる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

(削除)

【請求項 15】

(削除)

【請求項 16】

細胞密度をリアルタイムで監視することは、光学および/または生化学の原理を用いて行うことができる、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 17】

細胞を成長させることは、バイオリアクターが細胞を懸濁状態または静置状態で保持するか、または、懸濁状態と静置状態が交互に起きるプログラムで保持する場合、制御システムによって、また、反応チャンパー容器と細胞培養物のアジテーターによる機械攪拌を組み合わせることによって制御され、行われる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

前記細胞が、磁着性アジテーターの移動によって懸濁状態に保たれ、この移動が、重力および/または浮遊性によって補助されつつ、または補助されることなく、調節可能な磁場によって制御される、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 19】

調節可能な磁場によって制御された前記磁着性アジテーターを、反応チャンパー内側の任意の 2 つの部分の間を任意の方向に移動させることができ、この移動が、重力および/または浮遊性によって補助されつつ、または補助されることなく、調節可能な磁場によって制御されるが、垂直軸に沿った移動が好ましい、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ニッチが、磁着性アジテーターが物理的に静止しているとき、磁着性アジテーターの中に形成され、磁着性アジテーターを動かすことによってニッチを調整することができる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 21】

前記制御システムは、プログラム可能であり、バイオリアクターの機能のすべてまたは一部についてプログラムされた、請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 22】

細胞成長および直接的分化のために細胞培養条件をリアルタイムで調節し、最適化することは、細胞培養条件の検出器、コンピューターまたは同様のデバイスおよび対応するプログラム、フィードバックオペレーション制御システムを含むコンピューターによって制御された複合システムによって行われる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 23】

直接的分化のための細胞培養条件は、限定されないが、あらゆる種類の幹細胞を含め、分化能力を有するすべての細胞のためであり、前記直接的分化は、例えば、肝細胞およびその血管を同時に誘導するなど、2 つ以上の誘導方向について、生化学的方法および物理的方法によって同時に誘導することができる、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 24】

電流が反転したバイオリアクターが、限定されないが、造血幹細胞、間葉幹細胞、線維芽細胞、ハイブリドーマ細胞、リンパ球、樹状細胞、昆虫細胞、胚幹細胞、種々の組織細胞、癌細胞および細胞株、形質変換された細胞および細胞株を含むすべての細胞について理想的な細胞成長条件を与えることができる、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 25】

個々に使用することができ、または細胞培養、細胞分離およびこれらの技術から利益を受ける任意の分野における他の技術とともに使用することができる、請求項 9 の保護灌流

50

システムおよび請求項 25 のチャンバーの反転および溶液の機械攪拌を組み合わせたバイオリクターシステムおよびこれらの関連する方法。

【請求項 26】

細胞を分離し、細胞および人工組織を成長させるためのバイオリクターシステムであって、請求項 7 および 8 において調節可能な磁場によって制御されるか、または請求項 11 において制御システムによって制御される、反応チャンバーの反転およびアジテーターの機械攪拌を組み合わせることにによって、細胞およびアジテーターを懸濁状態で保持することができる反応チャンバーおよびアジテーターを備える、バイオリクターシステム。

【請求項 27】

細胞懸濁のために反応チャンバーの反転と細胞の機械攪拌の組み合わせを適用すると、細胞が、静置培養および動的培養両方について最良の成長条件にあるように、静置培養から始めた後、動的に培養し、反応区画内で細胞を均一に分布させることができる、請求項 1 および 25 に記載のバイオリクターシステム。

10

【請求項 28】

細胞および人工組織を成長させることは、低分子を含む灌流溶液が、低浸透区画から反応区画へ、さらに高浸透区画へと単一方向に膜を介して通り抜けるような保護灌流チャンパー中で行われ、この通り抜けが、コロイドの浸透勾配に対して起こるが、一般的な透析で起こるような異なる区画中の低分子の濃度勾配に沿っている必要はない、請求項 9 に記載のバイオリクターシステム。

【請求項 29】

保護灌流システムを、培地の枯渇および培地の添加のような迅速な培地交換、および細胞、ペプチドおよびタンパク質を失わない細胞の懸濁に使用することができる、請求項 9 に記載のバイオリクターシステム。

20

【請求項 30】

細胞マーカーに基づいて細胞を分離し、細胞および人工組織を成長させるための請求項 9 におけるような保護灌流システムおよび請求項 11 におけるような制御システムをさらに備える、請求項 1 に記載のバイオリクターシステム。

【請求項 31】

調節可能な磁場を、細胞マーカーによる細胞分離、細胞成長および人工組織の成長の間に、制御システムによって磁場の強度、方向または位置を変えることによって調節することができる、請求項 1 に記載のバイオリクター。

30

【請求項 32】

細胞マーカーによる細胞分離が、
特異的な磁着性抗体または他の生体分子を標的細胞に結合させることと、
磁着性アジテーターまたはチャンパー壁のいずれかによって、または磁着性アジテーターおよびチャンパー壁の両方によって磁氣的に標識された細胞を捕捉し、チャンパー壁が、請求項 8 の発生器（マグネットまたは電磁石）によって磁場が調節されるように作られていることと、

非標識細胞を捨てるか、または洗浄することと、

標的細胞を放出させることと、を含む、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 33】

細胞による細胞分離を、チャンパーの反応区画（請求項 2 に記載するような第 2 の区画）で行い、細胞の生物学的マーカーに特異的に結合する生体分子を用いた生物学的反応が、懸濁細胞を洗浄することを含む手順によって行われる、請求項 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養および細胞選別のための多機能バイオリクターに関する。

【背景技術】

【0002】

50

本出願は、一般的に、バイオリアクターに関し、さらに具体的には、細胞を成長させ、分離するバイオリアクターに関する。

【0003】

多くの種類の細胞、特に、造血幹細胞および免疫細胞は、培地中で有効に増殖させ、直接的に分化させ得る前に、元のサンプルから単離することが必要である。この単離手順は、細胞選別または細胞分離とも呼ばれる。以前、細胞選別および細胞培養は、それぞれ別個のシステムで行われており、この場合、まず標的細胞を単離し、次いで、培養容器に移す。この従来法は、用いるのが困難であり、細胞選別から細胞培養までに細胞が混入し、細胞が失われる危険性が高くなり、2つの完全に異なるデバイスおよびシステムが関与していた。新しいデザインを有する本願発明者の今回の発明によって、これら2つの異なる手順を1個の容器(チャンパー)で完了させることができ、そのため、混入および標的細胞の損失の危険性が最小限となり、操作効率が顕著に高まる。

10

【0004】

ある種の細胞は、培養物中の剪断応力に非常に弱い。例えば、剪断応力によって、非特異的な分化が起こり、幹細胞培養物中のアポトーシスが増加することがあり、幹細胞の増殖効率および直接的分化を顕著に低減させる。剪断応力が大きくなると、タンパク質発現中に非特異的なタンパク質が多く放出され、目的のタンパク質の培養物中での比率が小さくなり、そのため、タンパク質の精製が増大する。静置培養には、最小限の剪断応力はあるが、静置培養中の細胞は、通常は、培養容器の底部に存在し、細胞が高密度状態のとき、栄養が十分に行き渡らない細胞もあり、そのため、大規模な細胞増殖には適していない。ある種のバイオリアクター(例えば、NASAの回転壁式容器(RWV)バイオリアクター)は、剪断応力を減らすように設計された。しかし、これらのバイオリアクターは、細胞を連続的に移動させ、攪拌し、および/または機械攪拌することによって、細胞を懸濁状態に維持しなければならない。バイオリアクターの動きを止めると、細胞は底部のどこかに蓄積すると思われるが、均一には分布せず、ほとんどの細胞成長にとって有害である。したがって、これらのバイオリアクターでは剪断応力は小さいが、これらのバイオリアクターを動かしているとき、培養した細胞にこの小さな剪断応力が連続的にかかることになる。本願発明において、バイオリアクターが静置状態であるとき、培養チャンパーの底部または磁気ビーズの表面に細胞を均一に分布させることができる。したがって、本発明は、懸濁状態および静置状態の両方で細胞に最良の成長条件を与える。

20

30

【0005】

ある種のバイオリアクターは、マグネットインペラーによって培地を機械攪拌し、細胞を懸濁状態に保持するように制御された磁気要素(特定的には、ブレードまたはパン)を使用する。この種のバイオリアクターは、特定の細胞の培養要求のために剪断応力をわざと高める。用途の違いに加え、本発明のバイオリアクターは、磁気要素であるブレードまたはケーンを使用せず、本発明のマグネットビーズは、マグネットビーズが磁場の中に存在しない場合には、実際には磁気を帯びておらず、磁場に置かれたときにのみ磁力を得ることができる。本発明のマグネットビーズは、インペラーによって制御されていないが、ビーズの移動に影響を及ぼす磁場強度の変化によって制御される。適切な微細環境(またはニッチと呼ばれる)は、ある種の細胞(例えば、幹細胞)の成長にとって非常に重要である。ある種のデバイスは、ニッチを作成するために固体材料を使用するか、またはニッチを作成するためにゲル状の物質を使用する。これらのデバイスを用い、細胞培養後に、特定の手順を用いて細胞をニッチから洗い出す必要があるか、または、ニッチを形成する材料を酵素で溶融または消化し、標的細胞を放出させなければならない。本願発明において、ビーズ間の空間は、通常は、細胞成長のためのニッチに由来し、磁場強度を変えることによってビーズが持ち上げられれば、細胞を簡単に放出させることができる。他の細胞培養システムは、ウェル状の培養プレート(例えば、一般的な96ウェル状プレート)、微細チャンパー(Hung 2005)または微細なふるい(Zhang 2009)によってニッチを構築することを試みている。本発明のバイオリアクターは、ビーズの移動によって、成長させるのに培地の流れを増すことが必要な細胞にとって、動的な微細環境

40

50

が作られるため、ウェル状プレートよりも優れている。さらに、製造するときの課題が減り、使用後に滅菌することが簡単であり、ビーズの大きさを調整することによって、ニッチの大きさを簡単に修正することができるため、微細チャンバーおよび微細なふるいよりも優れている。

【0006】

多くの細胞培容器（チャンバー）は、例えば、一般的な細胞培養フラスコ、気体透過性の袋、回転壁式容器などのバイオリアクターで使用するために設計されてきた。これらの容器は、細胞を希釈することができ、培地を変えることができるような一般的な灌流システムとともに使用することができる。しかし、これらの容器を用いて培地を変えている間、サイトカイン、タンパク質および細胞成長のための他の高価な物質および細胞産物が培地から同時に除去される。また、一般的な透析プロセスの効率は、十分なほど高くない。本発明で設計された細胞培養チャンバーは、浸透チャンバーと培養チャンバーの両側とのコロイド浸透力の差を利用し、特定の大きさのサイトカイン、ペプチド、タンパク質および他の材料を失うことなく、透析膜を通して迅速に培地を交換することができる。この細胞培養チャンバーの設計によって、新しい灌流手法が与えられ、勾配浸透灌流システムと呼ばれるシステムが与えられる。

10

【0007】

ほとんどのバイオリアクターは、接着性細胞または懸濁細胞のいずれかを培養するように設計された。部分的に接着性の細胞の成長を補助するようなバイオリアクターは、まだ報告されていない。本発明のバイオリアクターは、懸濁細胞、接着性細胞および部分的に接着性の細胞を含め、ほとんどのあらゆる細胞に使用することができる。

20

【0008】

バイオリアクターの動きを制御するのにコンピューターを用いることが極めて一般的であり、多くのバイオリアクターは、プログラム処理可能である。本発明では、（１）磁場の強度および方向、（２）細胞培養チャンバーをひっくり返す周波数および速度、（３）上の（１）および（２）の結果としてのマグネットビーズの周波数および速度は、あらかじめ選択したプログラムおよび/または検出器から受け取ったデータに応答し、バイオリアクターにフィードバックを送り返すプログラムによって制御されることを強調しておく。

【0009】

バイオリアクター制御におけるコンピューターの利用と同様に、ある特定の光源（例えば、レーザープロジェクター）を用いるいくつかの細胞密度検出器が、細胞培養中の細胞濃度を監視するために設計されてきた。検出器またはセンサーから得られたデータを用い、培地を変えることが必要な場合に細胞を希釈することが必要かどうかを決定する。本発明のバイオリアクターにおいて、細胞密度検出器は、一般的な光源を使用し、そのデータを特定の用途で使用して、磁場の強度、細胞培養チャンバーをひっくり返す速度および周波数を調整し、さらに、マグネットビーズの移動速度および周波数を間接的に調整する。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

バイオリアクターは、典型的には、培養物内で細胞を成長させるために使用される。しかし、多くの種類の細胞は、培地中で有効に増殖させ、直接的に分化させ得る前に、元のサンプルから単離することが必要である。この単離手順は、細胞選別または細胞分離とも呼ばれる。典型的には、細胞選別および細胞培養は、別個のシステムで行われており、この場合、まず標的細胞を単離し、次いで、培養容器に移す。この従来法は、用いるのが困難であり、細胞選別から細胞培養までに細胞が混入し、細胞が失われる危険性が高くなり、２つの完全に異なるデバイスおよびシステムが関与している。

40

【0011】

さらに、多くのバイオリアクターは、バイオリアクターの内容物を混合するために、回転するインペラーなどを使用する。残念なことに、これにより、細胞を破壊しかねない剪断

50

応力が細胞に加わり、システムの効率を低下させ、廃棄産物（例えば、非特異的なタンパク質の発現など）の放出を生じる。さらに、ある種のバイオリアクターでは、細胞培養チャンバーの底部または細胞培養チャンバーの他の位置で細胞が凝集することがある。これらの細胞が培養チャンバー内で凝集することは、効果的な細胞成長の妨げとなる。したがって、細胞に与えられる剪断応力も最小限にしつつ、細胞を成長させ、分離することができる効率的なバイオリアクターの顕著な必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

一実施形態では、細胞を成長させ、分離するためのバイオリアクターシステムは、第1部分および第2部分を有する内側を含む細胞培養チャンバーと、培養チャンバーの内側に配置され、内側の第1部分と内側の第2部分の間を移動することが可能なアジテーターと、細胞培養チャンバーに連結し、内側の第1部分と内側の第2部分の間をアジテーターが移動するように操作可能な制御システムとを備える。

10

【0013】

別の実施形態では、細胞を成長させ、分離する方法は、第1部分および第2部分を有する内側を含むチャンバーを与えることと、内側の第1部分と内側の第2部分の間を移動することが可能なアジテーターを内側に配置することと、細胞培地をチャンバーの内側に運ぶことと、標的細胞をチャンバーの内側に移すことと、細胞と培地が混合するように、第1部分と第2部分との間をアジテーターを移動させることと、チャンバーの内側にあるかなりの量の標的細胞を維持しつつ、チャンバーの内側から廃棄物を除去することを含む。

20

【0014】

さらに別の実施形態では、細胞培養チャンバーの内側は、細胞培地容器と流体が行き来できるように連結し、容器から細胞培地を受け取ることができるように作られた第1の区画と、アジテーターが内部に配置された第2の区画と、第1の区画と第2の区画との間に配置され、細胞培地が第1の区画から第2の区画へと選択的に流れることができるように作られた第1の膜と、バッファー容器と流体が行き来できるように連結し、バッファー容器からバッファーを受け取ることができるように作られ、さらに、廃棄物容器との流体が行き来できるように連結し、廃棄物が第3の容器から廃棄物容器に流れることができるように作られた第3の区画と、第2の区画と第3の区画との間に配置され、第2の区画から第3の区画へと培地および廃棄物が選択的に流れることができるように作られた第2の膜とを備える。

30

【0015】

以下の記載と合わせて考えた場合に、図面は、保護されることを望む発明の主題の理解を助ける目的で提示されている。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、実例となるバイオリアクターを示す模式図である。

【図2】図2 a ~ 2 f は、一連のチャンバー内でのアジテーターの移動を示すバイオリアクターの一連の模式図を示す。

40

【図3】図3は、チャンバーの模式的な等軸測視図である。

【図4】図4は、チャンバーの模式的な側面図である。

【図5】図は、アジテーターの模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

図1を参照すると、細胞を成長させ、分離するためのバイオリアクターシステム10が示されている。システム10は、細胞培養チャンバー15と、アジテーター20と、制御システム30とを備える。

【0018】

細胞培養チャンバー15は、細胞培養チャンバー内に配置された細胞培地内で標的細胞

50

を受け入れ、成長させるための内側 35 と、第 1 末端 40 と、第 2 末端 45 とを備える。本明細書で使用する場合、「標的細胞」は、チャンパー 15 内に配置され、チャンパー 15 内で成長する細胞を指す。本開示には、標的細胞を成長させるという内容が与えられているが、このシステムを、化学物質または任意の他の適切な溶液または材料を混合するために使用してもよいことは理解されるだろう。さらに、第 1 末端 40 および第 2 末端 45 は、それぞれチャンパー 15 の上部および底部にあるものとして示されているが、末端 40、45 は、互いに任意の適切な配置に（例えば、水平な面に）あってもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。以下に記載するように、チャンパー 15 は、1 つ以上の内側区画を備えていてもよい。それに加え、当業者には明らかであろうが、チャンパー 15 は、剛性材料、可撓性材料、剛性材料と可撓性材料の組み合わせ、気体透過性材料または任意の他の適切な材料を含め、任意の適切な材料から作られていてもよい。チャンパー 15 は、さらに、チャンパーの内側 35 と 1 つ以上の容器との間を流体が行き来できるための 1 つ以上の出入口を備えていてもよい。実例となる容器としては、限定されないが、細胞培地容器、廃棄物容器、バッファ容器、CO₂ 容器、または任意の他の適切な容器が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0019】

ここで図 3 を参照すると、実例となる代替的なチャンパー 15 が示されている。この実施形態では、チャンパー 15 は、第 1 の区画 75 と、第 2 の区画 80 と、第 3 の区画 85 とを備えている。第 1 の区画 75 は、培地を第 1 の区画に加え、および / または第 1 の区画から取り出すことができるように、第 1 の区画と 1 つ以上の容器（例えば、細胞培地容器）との間を流体が行き来できるような連結を与えるための 1 つ以上の出入口 18 a、バッファを第 1 の区画に加え、および / または第 1 の区画から取り出すことができるようなバッファ容器、廃棄物を第 1 の区画 75 から取り出し得るような廃棄物容器、CO₂ を第 1 の区画に加え、および / または第 1 の区画から取り出すことができるような CO₂ 容器、または任意の他の適切な容器を備えていてもよい。第 1 の区画 75 と第 2 の区画 80 は、第 1 の膜 90 によって隔離されている。第 1 の膜 90 は、第 1 の区画 75 から第 2 の区画 80 へと培地を選択的に流すことができるように作られている。膜 90 は、貫通部、開口部または任意の他の適切な構造を含んでいてもよく、および / または第 1 の区画 75 から第 2 の区画 80 へと培地を流すことができるように他の様式で半透過性である。一実施形態では、膜 90 は、透析膜である。膜 90 は、限定されないが、セルロースおよびセロファンを含む任意の適切な材料から作られてもよい。

【0020】

第 2 の区画 80 は、アジテーターを内部に保持し、アジテーターが、図 1 に関連してすでに記載したように区画内を移動し得るような構成である。標的細胞は、典型的には、第 2 の区画 80 でも同様に成長し、保持される。第 2 の区画 80 は、1 つ以上の容器（例えば、第 1 の区画 75 に関して記載した種類の容器）の間を流体が行き来できるような連結を与えるための 1 つ以上の出入口 18 b を備えていてもよい。第 2 の区画 80 と第 3 の区画 85 は、第 2 の膜 95 によって隔離されていてもよい。第 2 の膜 95 は、第 2 の区画 75 から第 3 の区画 85 へと培地および / または廃棄物を選択的に流すことができるように作られている。膜 95 は、貫通部、開口部または任意の他の適切な構造を含んでいてもよく、および / または第 2 の区画 80 から第 3 の区画 85 へと培地および / または廃棄物を流すことができるように他の様式で半透過性である。一実施形態では、膜 95 は、透析膜である。膜 95 は、限定されないが、セルロースおよびセロファンを含む任意の適切な材料から作られてもよい。第 3 の区画 85 は、第 3 の区画 85 と、1 つ以上の容器（例えば、第 1 の区画 75 に関して記載した種類の容器）との間を流体が行き来できるような連結を与えるための 1 つ以上の出入口 18 c を備えていてもよい。さらに、少なくとも 1 つの実施形態において、チャンパーの外側の少なくとも一部が、気体透過性材料から作られていてもよい。チャンパーの外側の少なくとも一部が気体透過性材料から作られている場合、システムは、ある場合、ただしすべてが必須ではないが、チャンパーへの直接的な気体注入と、培地の pH を維持する構成要素を含まない。第 1 の区画 75 および第 3 の区画 8

5は、第2の区画80に対して任意の適切な位置に配置されていてもよく、本開示は、いかなる様式でも、第1の区画75と第3の区画80との間に配置された第2の区画80に限定されない。さらに、任意の適切な数の区画を使用してもよく、本開示は、3つの区画のみに限定されないことが理解されるだろう。

【0021】

一実施形態では、比較的少量の大きな分子および/または大きな極性の分子を含む適切な溶液を含む培地が第1の区画75に与えられ、細胞成長のための適切なコロイド浸透性を有する同じ培地または同様の培地が第2の区画80に与えられる。適切な培地は、標的細胞を成長させ、または維持するために用いられる任意の培地であってもよい。第1の区画75および/または第2の区画80の培地と比較して、もっと大きなコロイド浸透力を作り出し、維持するために、もっと濃度が高い大きな分子および/または大きな極性の分子を含むバッファーが第3の区画85に与えられる。第3の区画85のためにもっと大きなコロイド浸透力を作り出し、維持するために用いられる材料としては、限定されないが、PEG 80000、アルブミン、他のタンパク質または任意の他の適切な材料または溶液が挙げられる。膜90、95は、同じ透過性を有していてもよく、または異なる透過性を有していてもよく、培地および/または新しい細胞の成長から出た廃棄物が、第1のチャンバー75および/または第2のチャンバー80から浸透によって第3のチャンバー85へと流れてもよい構成になっている。制御システムは、それぞれの区画75、80、85内に一定容積が維持され、一定の浸透力が維持され、第2の区画80への新しい培地の供給が維持されるように、1つ以上の区画75、80、85からの培地、バッファーおよび/または廃棄物の灌流および排出を制御してもよい。それに加え、任意の適切な検出デバイス、機構または方法による制御システムは、標的細胞の成長に關与する任意の適切なパラメーター、例えば、限定されないが、標的細胞の数の変化、pH、CO₂、グルコース、カルシウム、カリウム、ナトリウム、温度、湿度または任意の他の適切な力を監視し、第2のチャンバー内のアジテーターの移動間隔、周波数および/または速度を調節し、および/または培地の量、培地の種類、バッファーの量、バッファーの種類、CO₂の量を調節し、または、チャンバー内の標的細胞の成長を向上させるか、または促進するように、制御システムの測定に基づく任意の適切な調節を行ってもよい。

10

20

【0022】

ここで図4を参照すると、別の事例となるチャンバー15が示されている。この実施形態では、チャンバーは、チャンバーの内側35と廃棄物容器との間を流体が行き来できるような連結を与えるための1つ以上の出入口100を備えていてもよい。チャンバー15は、さらに、チャンバーの内側35と細胞培地容器との間を流体が行き来できるような連結を与えるための1つ以上の出入口110を備えていてもよい。さらに、チャンバー15は、チャンバー内側35とバッファー容器との間を流体が行き来できるような連結を与えるための1つ以上の出入口110を備えていてもよい。さらに、チャンバーは、アジテーターをチャンバー内側35に受け入れるための1つ以上の出入口115をさらに備えていてもよい。一実施形態では、チャンバー15は、テフロン(登録商標)FEPから作られている。この具体的な実施形態は、標的細胞がアジテーターに接着するか、または他の様式で接続し、廃棄物がチャンバー内側35から流され、標的細胞がチャンバー内側35にとどまる場合に有用であろう。しかし、チャンバー15は、任意の適切な材料から作られていてもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。

30

40

【0023】

アジテーター20は、チャンバー内側35の中に配置され、チャンバーの第1末端40とチャンバーの第2末端45との間を移動することができる。または、アジテーター20は、チャンバー内側35の中で、任意の2つ以上の点の間、または2つ以上の部分の間を移動するような構成であってもよい。事例となる実施形態では、アジテーターは、複数のピース21を含む。ピース21を示す任意の事例となる実施形態が、任意の代替的なアジテーター構造を使用してもよく、それもまた本開示の範囲にあり、任意の具体的な事例となる実施形態が、アジテーターとしてピースを排他的に使用することに限定されないこと

50

が理解されるだろう。一実施形態では、ビーズ21は、磁着性材料、例えば、シリコンスチール、 Fe_3O_4 、または任意の他の適切な磁着性材料から作られる。本明細書で使用する場合、磁着性は、アジテーター（例えば、ビーズ）が、磁場にさらされると磁荷を保持するが、磁場からはずれると、または磁場がアジテーター近傍からはずれると、例えば、磁場発生器の電源を切ると、他の方法で磁荷を保持することはないことを意味する。磁着性材料は、典型的には、それぞれのビーズ21のコアを含む。次いで、磁着性コアを任意の適切な材料でコーティングしてもよい。一実施形態では、磁着性コアをポリスチレンでコーティングするが、磁着性コアを任意の適切な材料でコーティングしてもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。例えば、限定されないが、磁着性コアを任意の適切な熱可塑性ポリマーまたは熱硬化性ポリマーでコーティングしてもよい。ビーズ21は、磁着性材料から作られるものとして示されているが、ビーズが、磁着性または非磁着性の任意の適切な材料から作られてもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。さらに、ビーズ21が、それぞれ、チャンバー15内で細胞が成長するにつれて、標的細胞がビーズに接着するように任意の適切な材料でコーティングされてもよいことが理解されるだろう。さらに、標的細胞が接着するであろう特定の材料でコーティングされていないビーズも本開示の範囲に入ることが理解されるだろう。ある実施形態では、細胞培地内で浮遊するビーズ21を含むことが望ましいだろう。したがって、ビーズのコアは、空気だまりまたは気泡、軽い泡またはプラスチックまたはビーズ21が培地内で浮遊できるような任意の他の適切な材料を含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0024】

ビーズ21は、ビーズが積み重なったとき、1つ以上のニッチまたは微細環境がビーズ21の間にある空隙に形成されるか、または作られてもよいように作成されてもよい。ある実施形態では、これらのニッチは、ニッチ内でのさらなる標的細胞の成長を促進してもよい。一実施形態では、ビーズが実質的に球形の場合、それぞれのビーズ21の直径は、適切なニッチを作成するために1mm~10mmであってもよい。しかし、ビーズ21は、ビーズ21が積み重ねられるとき、1つ以上の適切なニッチが作られてもよいように、任意の適切な大きさおよび/または形状を有していてもよいことが理解されるだろう。さらに、少なくともいくつかのニッチが、チャンバー内側のいくつかのビーズと1つ以上の壁との間に作られてもよいことが理解されるだろう。

【0025】

代わりとなる実施形態では、図5に示されるように、アジテーター20aは、内部に複数の開口部22を有する平面部材21aであってもよい。平面部材21aの断面は、アジテーター20aがチャンバー内側35を移動し得るように、チャンバー15の断面形状と相補的であってもよい。開口部22は、アジテーター20aがチャンバー内側35の中を動くにつれて、アジテーター20aを通して培地が流れることができるものであってもよい。アジテーター20aは、磁着性材料または非磁着性材料から作られてもよく、浮遊性または非浮遊性であるように作られてもよく、および/またはビーズ20に関してすでに記載したようにコーティングされていてもよい。

【0026】

再び図1を参照すると、制御システム30は、システム10の操作を制御するためにコントローラー55およびコンピューター60のいずれかまたは両方を備えていてもよい。または、システム10を手動で動かしてもよい。制御システム30は、チャンバー15に脱着可能に接続するような構成である。制御システム30は、チャンバー15を受け入れるカセット50を備えていてもよいが、チャンバー15は、任意の適切な手段または構造（例えば、クリップ、フック、マグネット、フック-ループアセンブリ、フリクションフィットなど）によって制御システム50に接続していてもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。

【0027】

制御システム30は、さらに、光源2と、チャンバー15の中で細胞の数を検出し、チャンバー15の中の細胞数の変化などを検出し、その結果を制御システム30に報告する

ための細胞検出器 9 とを備えていてもよい。しかし、細胞の数または細胞の数の変化を監視する当該技術分野で既知の任意の検出器、機構または技術を使用してもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。さらに、任意の適切な検出器、機構または方法による制御システム 30 は、標的細胞の成長に関する任意の適切なパラメーター、例えば、限定されないが、標的細胞の数の変化、pH、CO₂、グルコース、カルシウム、カリウム、ナトリウム、温度、湿度または任意の他の適切な因子を監視し、チャンパー内のアジテーターの移動周波数および/または速度を調節し、および/または培地の量、培地の種類、バッファの量、バッファの種類、CO₂の量を調節し、または、チャンパー 15 内の標的細胞の成長を向上させるか、または促進するような任意の制御システムの測定に基づく任意の適切な調節を行ってもよい。

10

【0028】

制御システム 30 は、アジテーターがチャンパー 15 の内側 35 の中を移動するように操作可能である。このことは、さまざまな様式で達成されてもよい。実例となる実施形態では、制御システムは、第 1 の位置と第 2 の位置との間をチャンパー 15 が回転するように操作可能なモーター 65 を備えている。以下に記載するように、第 1 の位置と第 2 の位置は、ほぼ 180° 離れているが、第 1 のおよび第 2 の位置が、互いに任意の適切な角度関係を有していてもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。チャンパー 15 は、水平面で回転してもよく、垂直面で回転してもよく、または任意の適切な様式で回転し、ずれるか、すべるか、または他の様式で動き、チャンパー 15 の中をアジテーター 20 が移動してもよい。

20

【0029】

それに加え、制御システム 30 は、チャンパー 15 内のビーズ 21 が動き、標的細胞および培養培地を混合するようにビーズ 21 または他のアジテーター 20 を励起させるために第 1 の磁場発生器 70 および第 2 の磁場発生器 72 を備えていてもよい。実例となる実施形態では、それぞれの磁場発生器は、電源を入れると磁場が発生し、電源を切ると磁場の発生が止む電磁石である。電源を入れると、それぞれの磁場発生器は、アジテーター 20 (例えば、ビーズ 21) を電源が入った磁場発生器の方に引き寄せる。代わりとなる実施形態では、永久磁石を使用してもよく、この場合、制御システム 30 は、チャンパー 15 の近傍からマグネットをはずすか、または他の方法で、チャンパー 15 に入り込んだマグネットからの磁場を遮断するように操作することができる。実例となる実施形態が、チャンパー内でアジテーターを動かすためにチャンパーの回転および電磁石を使用する場合、チャンパーの回転を単独で使用してもよく、または電磁石を単独で使用してもよいことが理解されるだろう。さらに、チャンパー内でアジテーターを動かすための任意の技術を使用してもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。

30

【0030】

ここで図 2 a ~ 2 f を参照すると、システム 10 の操作が非限定的な例によって示されている。標的細胞および細胞培地がチャンパー 15 の内側 35 に運ばれる。この実施形態では、ビーズ 21 は、浮遊性であり、チャンパー 15 内の細胞培地の上部付近に浮いている。図 2 a において、第 1 の磁場発生器 70 の電源が入っており、ビーズ 21 は、チャンパー 15 の第 1 末端 40 付近に保持されている。次いで、チャンパー 15 を図 2 b に示すような位置まで約 180° 回転し、第 1 の磁場発生器 70 は、チャンパーの第 1 末端 40 付近にビーズ 21 を維持する。次いで、第 1 の磁場発生器 70 の電源を切ることによって、図 2 c に示すように、ビーズ 21 がチャンパー 15 の第 2 末端 45 に向かって浮き始める。ビーズ 21 が、標的細胞が接着するコーティングを含む実施形態では、片方の末端から他の末端へのビーズ 21 の移動によって、新しく成長した標的細胞が集まるだろう。廃棄物をチャンパー 15 から流しつつ、および/または新しい培地をチャンパー 15 に導入するとき、かなりの量の元々の標的細胞および新しく成長した標的細胞がチャンパー内にとどまるように、標的細胞をビーズ 21 に接着させてもよい。または、標的細胞に特異的な磁着性抗体をチャンパー 15 の内側に加えることによって、抗体が標的細胞に結合し、磁場がチャンパーに導入されるとき、抗体が結合した標的細胞は、磁着性ビーズ 21 およ

40

50

び / または磁場発生器に隣接するチャンパー壁に脱着可能に接続するだろう。この実施形態では、結合していない細胞および / または廃棄物がチャンパーから流されつつ、および / またはかなりの量の元々の標的細胞および新しく成長した標的細胞がチャンパー 15 内にとどまるように、新しい培地をチャンパーに導入している間、磁場発生器 70、72 のいずれかまたは両方の電源を入れたままでもよい。または、磁気試薬（例えば、Annexin V または他の適切な試薬）を使用し、ビーズに、システム 10 から流された損傷した細胞または死んだ細胞、健康な標的細胞に接続させてもよい。さらに、アジテーターを使用することなく、磁着性抗体および / または試薬をチャンパー 15 中で使用してもよく、それによって、チャンパーが流されるとき、標的細胞または損傷を受けた / 死んだ細胞がチャンパーに保持されていてもよいことが理解されるだろう。

10

【0031】

再び図を参照すると、ビーズ 21 がチャンパーの第 2 末端 45 付近にある場合、第 2 の磁場発生器 72 の電源を入れることによって、ビーズ 21 は、チャンパーの第 2 末端 45 付近に保持され（図 2 d）、チャンパーは、図 2 e に示す位置まで回転する。次いで、第 2 の磁場発生器 72 の電源を切ることによって、図 2 f に示すように、ビーズ 21 がチャンパーの第 1 末端 40 に向かって浮くだろう。当業者によって理解されるように、このプロセス中に種々の添加剤、培地、バッファー、CO₂などをチャンパーに任意の所与の点で選択的に加えてもよく、および / またはすでに記載したような制御システムによって行われる測定に基づいて、新しい細胞成長を促進または向上させるために、廃棄物を選択的に除去してもよい。

20

【0032】

代わりとなる実施形態では、チャンパーが回転することによってビーズがチャンパー内を移動するように、さらに磁場をかけることなく、非浮遊性ビーズを使用してもよい。ここで、チャンパーが回転することによる重力および遠心力を使用し、チャンパー 15 内の 2 つ以上の点の間をビーズが動く。さらに別の代替例では、ビーズがチャンパー内の 2 つ以上の点の間を移動するように、チャンパー 15 を回転させることなく、第 1 の磁場発生器 70 および第 2 の磁場発生器 72 の電源を交互に入れてもよい。上の例はビーズ 21 をアジテーターとして使用するが、限定されないが、図 5 のものを含め、適切なデバイスをアジテーターとして使用してもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。さらに、チャンパー内でアジテーターを移動させる任意の手段または技術を使用してもよく、それも本開示の範囲内にあることが理解されるだろう。

30

【0033】

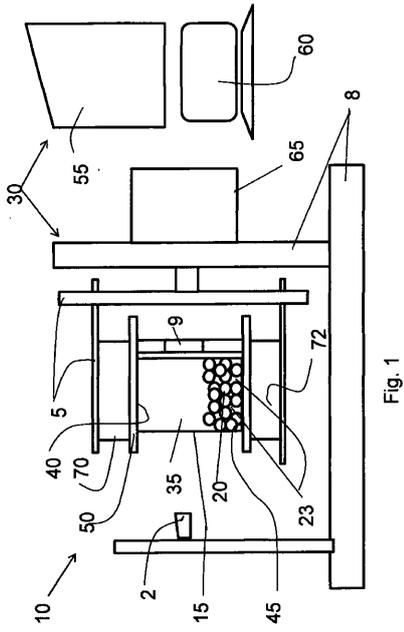
さらに、チャンパー 15 が気体透過性材料から作られるか、またはそれ以外の様式で気体透過性部分を含む場合、システムが、CO₂インキュベーターまたはCO₂室の中に配置されていてもよいことが理解されるだろう。CO₂インキュベーターまたはCO₂室がなく、またはチャンパーになんら気体透過性部分がない場合、試薬（例えば、HEPES）を使用してもよく、または、CO₂をCO₂容器からチャンパーに直接注入してもよい。

【0034】

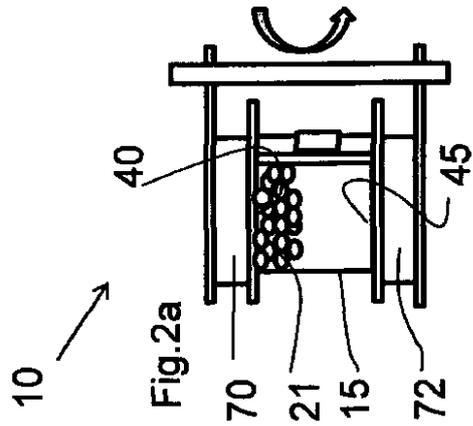
本発明およびその利点が特定の実例、非限定的な実施形態の観点で開示されてきたが、添付した特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲から逸脱することなく、種々の変更、置き換え、入れ替え、改変を行うことができることを理解すべきである。任意の一実施形態と合わせて記載された任意の特徴を他の実施形態にも適用することができることが理解されるだろう。

40

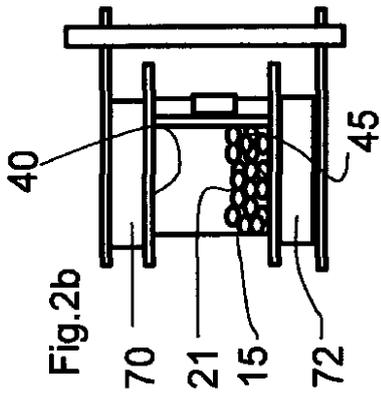
【 図 1 】



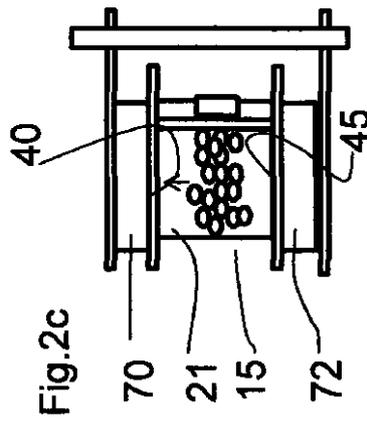
【 図 2 a 】



【 図 2 b 】



【 図 2 c 】



【 図 2 d 】

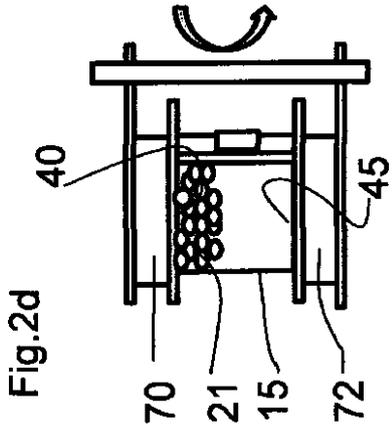


Fig.2d

【 図 2 e 】

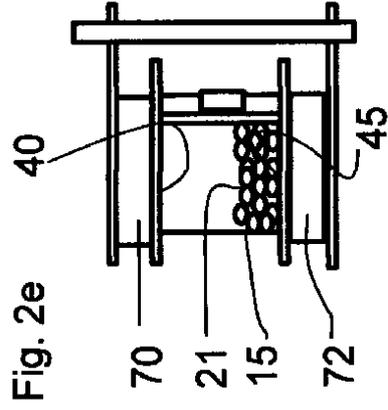


Fig. 2e

【 図 2 f 】

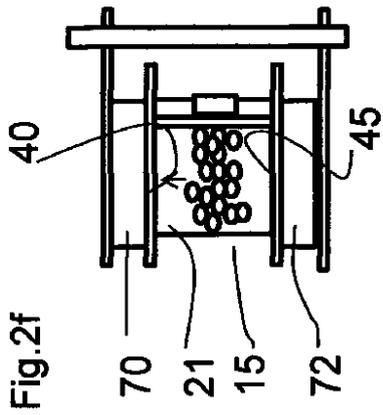


Fig.2f

【 図 3 】

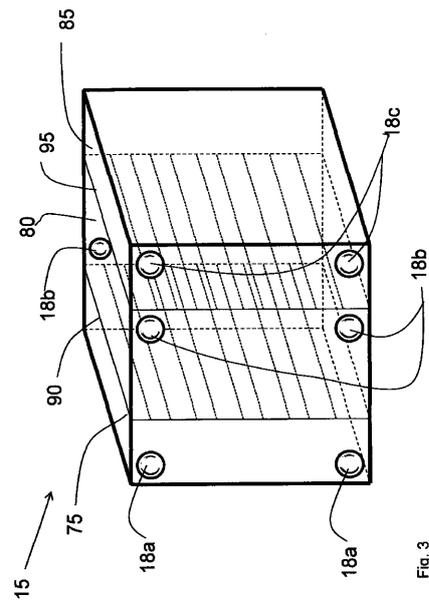


Fig. 3

【 図 4 】

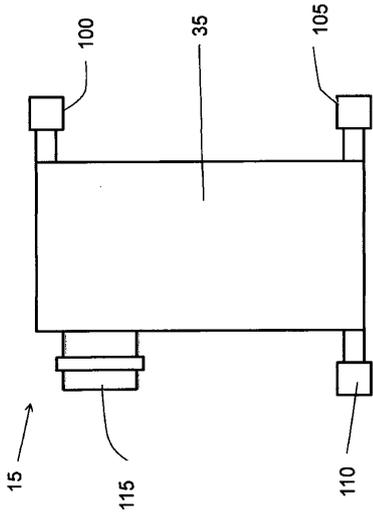


Fig. 4

【 図 5 】

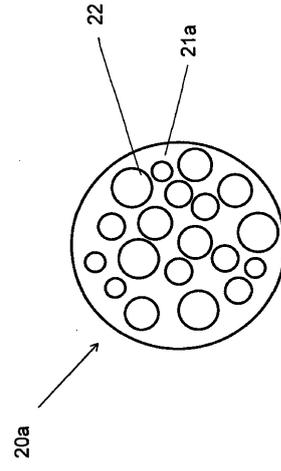


Fig.5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/00182
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12M 1/00 (2012.01) USPC - 435/289.1 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) IPC(8) - C12M 1/00 (2012.01) USPC - 435/289.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/289.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase; Google Scholar Search terms: bioreactor, magnet, magnetic, culture, media, medium, membrane, agitator, agitate, mix, stir, computer, sensor, detector, osmosis, osmotic, gradient, feedback, sort, sorting		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2005/0054101 A1 (FELDER et al.) 10 March 2005 (10.03.2005) para [0008]-[0010], [0015], [0018], [0025], [0031], [0038], [0050], [0055]-[0058], [0062], [0067], [0073], [0079], [0081]-[0082], [0091], [0112]	1, 3-6, 8, 11-13, 16-25 2, 9, 10
Y	US 2006/0019385 A1 (SMITH et al.) 26 January 2006 (26.01.2006) para [0007], [0043], [0049], [0059], [0098], [0101], [0158]	2, 9, 10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 9 October 2012 (09.10.2012)		Date of mailing of the international search report 26 OCT 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/00182

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: 7, 14, and 15
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, 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, R
O, RS, SE, SI, SK, SM, 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H
U, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

(72)発明者 チャン, モニカ

アメリカ合衆国 テキサス州 75007, キャロルトン, ハイ ヴィスタ ドライブ 3437

Fターム(参考) 4B029 AA02 BB01 BB11 CC01 CC02 DB19 DF10 DG08

4B033 NA11 NA16 NB62 NF06 NG05 NH06 NJ02

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X BC08 BC41 BC50 CA44 CA46