



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월10일

(11) 등록번호 10-2587068

(24) 등록일자 2023년10월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) *A61M 5/148* (2006.01)
A61M 5/28 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 23/26 (2013.01)
A61M 5/148 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7036831
- (22) 출원일자(국제) 2016년05월20일
 심사청구일자 2021년05월14일
- (85) 번역문제출일자 2017년12월21일
- (65) 공개번호 10-2018-0011216
- (43) 공개일자 2018년01월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2016/051451
- (87) 국제공개번호 WO 2016/185221
 국제공개일자 2016년11월24일
- (30) 우선권주장
 1508752.1 2015년05월21일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2012040033 A*
 KR1020060109908 A*
 US05209372 A*
 US20070224676 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 오리바이오테크 엘티디
 영국 E14 9XL 런던 사우스퀘이 워터사이드 애드미
 랄스 웨이 보퍼트 코트 35
- (72) 발명자
 메이슨 크리스토퍼
 미국 02139 메사추세츠 캄브릿지 아파트 413 시드
 니 스트리트 23
 베라이트치 팔렌 싱
 영국 W13 8JE 런던 일링 해론스포드 32
- (74) 대리인
 특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 14 항

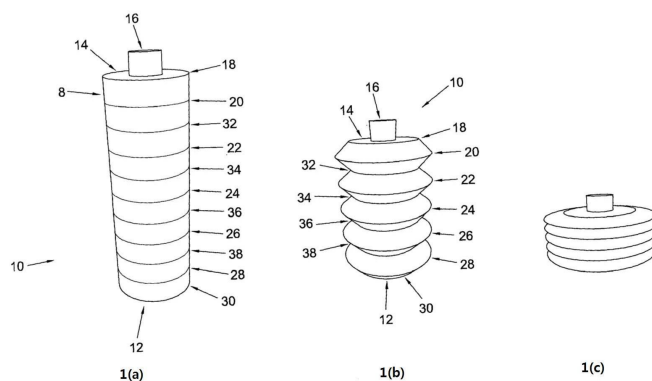
심사관 : 이진욱

(54) 발명의 명칭 세포 배양 장치, 시스템, 및 그의 사용방법

(57) 요약

본 발명은 기부 섹션, 상부 섹션과 평행으로 배열된 상부 섹션 및 상기 상부 섹션과 상기 기부 섹션 사이에 배열되고 용기의 내부 루멘을 한정하는 벽 요소를 갖고, 상기 용기의 벽 요소는 상기 상부 및 기부 섹션에 대해 압축 가능하고, 상기 용기의 상부 섹션은 선택적으로 밀봉가능한 유입구를 갖고, 상기 용기는 유연한 재료로 구성되는 (뒷면에 계속)

대표도



것인 세포 배양 용기에서 세포를 배양하는 방법으로서, 상기 세포 배양 용기에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 또한, 기부 섹션, 상부 섹션과 평행으로 배열된 상부 섹션 및 상기 상부 섹션과 기부 섹션 사이에 배열되고, 상기 용기의 내부 루멘을 정의하는 벽 요소를 갖는 세포 배양 용기로서, 상기 용기의 벽 요소는 상기 상부 및 기부 섹션에 대해 압축가능하고, 상기 용기의 상부 섹션은 선택적으로 밀봉가능한 유입구를 가지며, 상기 용기의 벽 요소는 유연한 재료로 이루어진 것인 세포 배양 용기가 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61M 5/282 (2013.01)

C12M 41/44 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

기부 섹션(base section), 상기 기부 섹션과 평행하게 배열된 상부 섹션(top section), 및 상기 상부 섹션과 상기 기부 섹션 사이에 배열되고, 용기의 내부 루멘(internal lumen)을 정의하는 벽 요소(wall element)를 갖고, 상기 용기의 벽 요소는 상기 상부 및 기부 섹션에서 대해 압축가능하고(compressible), 상기 상부 섹션은 선택적으로 밀봉가능한 유입구(sealable inlet)를 갖고, 상기 용기는 유연한 재료(material)로 구성되는 것인 세포 배양 용기에서 세포를 배양하는 방법으로서,

상기 세포 배양 용기 중 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계 및

하기 단계를 추가로 포함하고:

상기 세포의

- i) 유전적 변형;
- ii) 사이토카인 자극; 및
- iii) 확장(expansion),

각 단계는 상기 세포가 상기 용기의 내부 루멘을 떠나지 않은 채로 상기 용기의 내부 루멘 내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 방법은 하기 단계 중 하나 이상을 더 포함하는 것인 방법:

- (iv) 세포 선택; 및/또는
- (v) 세척; 및/또는
- (vi) 분리; 및/또는
- (vii) 세포의 동결보존.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 세포 배양 용기의 상기 벽 요소는 벽에 상기 기부 섹션과 평행하게 배열된 복수 개의 측면 경질 섹션(lateral rigid section)을 포함하고, 측면 경질 섹션의 각 쌍은 변형가능한 영역(deformable region)과 교대로 배치된(interleave)된 것인 세포 배양 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 세포 배양 용기의 상기 벽 요소는 경질 나선형 코일 영역(rigid helical coil region)을 포함하고, 상기 나선형 코일 영역의 양면에 변형가능한 영역이 제공된 것인 세포 배양 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 세포 배양 용기의 상기 루멘은 복수 개의 연결된 챔버(connected chamber)를 포함하고, 각 챔버는 측면 경질 섹션의 쌍으로부터 형성된 일련의 세그먼트(a series of segments)로 구성되는 것인 세포 배양 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 복수 개의 연결된 챔버 각각에 상기 복수 개의 챔버 각각의 양 단부에 해제가능한 폐쇄 수단(releasable closure means)이 제공되는 것인 세포 배양 방법.

청구항 7

청구항 3에 있어서, 상기 변형가능한 영역에 있는 루멘 내에 막 또는 필터가 위치하여 상기 루멘을 측면 경질 섹션의 쌍으로부터 형성된 복수 개의 세그먼트로 분할하는 것인 세포 배양 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 막 또는 필터는 하나 이상의 구멍(hole)에 의해 천공(perforate)되는 것인 세포 배양 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 막 또는 필터는 상기 루멘을 반-분할(semi-partition)하는 것인 세포 배양 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 막은 상기 벽 요소와 비-인접성(non-contiguous)인 것인 세포 배양 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 용기의 루멘은 상기 용기의 루멘 내에 동심원으로(concentrically) 배열된 복수 개의 내부 벽 요소를 갖는 것인 세포 배양 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 유연한 재료는 기체 투과성 재료(gas permeable material)인 것인 세포 배양 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 유연한 재료는 폴리에틸렌(선택적으로, 저-밀도 폴리에틸렌(LDPE)), 시스-1,4-폴리부타디엔, 폴리(에틸 메타크릴레이트)와 같은 메타크릴레이트(methacrylate), 폴리(에틸렌 테레프탈레이트)와 같은 프탈레이트(phthalate), 폴리(비닐리덴 클로라이드), 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트와 같은 셀룰로오스, 실리콘, 플루오로에틸렌폴리프로필렌, 폴리올레핀, 또는 에틸렌 비닐 아세테이트 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 세포 배양 방법.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 용기는 원형, 정사각형, 직사각형, 타원형 또는 삼각형 횡단면을 갖는 것인 세포 배양 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 세포를 배양, 조작(manipulate), 또는 저장하는 장치에 관한 것으로, 그러한 장치를 사용하는 시스템 및 그의 사용 방법을 포함한다. 본 발명은 그러한 장치를 이용하여 생물학적 시료를 수득하는 방법을 포함한다.

[0001]

배양 및 동결보존에서 세포를 확장하는 방법 및 세포를 개체에게 전달하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 세포의 배양 또는 처리(processing)는 통상적으로 세포를, 예를 들면, 세포를 배양할 때, 적절한 배양 배지 중 세포를 보유하는(hold) 장치의 사용을 필요로 한다. 공지된 장치는 진탕 플라스크(shaker flasks), 회전 병(roller bottle), T-플라스크(T-flask) 및 백을 포함한다. 그러한 병이나 플라스크가 널리 사용되나, 여러 단점을 갖는다. 문제점들 중 주요한 것은 계대배양(passaging)이나 후속 처리시 오염 없는 세포의 전달(transfer)에 대한 요구이다.
- [0003] 기존의 세포 배양 장치는 연속 세포 증식을 위해 배양 배지 및 산소의 재-공급을 요구한다. 기체 투과성 세포 배양 장치(gas permeable cell culture device)가 미국특허 제8415144호에 기재된다. 그러나, 그러한 장치도 장치의 내외부로의 배지 및/또는 세포의 전달을 필요로 한다.
- [0004] 의학 분야에서 사용되는 접을 수 있는 장치(collapsible device)가 공지되어 있다; 예를 들면, 혈액 수집기에 관한 미국특허 제4867172호, 또는 유체 수집을 위한 캐니스터 라이너(canister liner)에 관한 WO 2008/030597을 참조한다. 그러나, 그러한 장치는 세포 배양에서의 사용을 위해 제작되거나 제조되지 않는다.
- [0005] 의학에서 사용하기 위한 세포의 생산에서 핵심 제한 인자(limiting factor)는 오염 없이 세포를 처리하기 위한 완전 폐쇄 시스템(fully closed system)의 부재이다. 예를 들면, 세포의 배양 또는 후속 처리 동안, 배양 용기의 추가, 또는 세포의 제거시 오염의 위험이 있다. 운전 시스템(operating system)이 주로 수동이고 따라서, 운전이 비싸다. 또한, 수동 작업의 증가에 따라, 수동 오류의 위험이 증가되고, 따라서, 현재의 노동-집약적 프로세스는 임상-등급 치료제의 제조를 위해 요구되는 강건성(robustness)이 부족하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 따라서, 신선한 배양 장치로의 세포의 지속적인 계대(passaging)의 요건을 피하고, 세포의 용이한 유전적 변형을 가능하게 하고 후속 단계(예를 들면, 세척 등) 및/또는 임상적 이용에서 세포의 취급(handling)을 단순화하는 처리를 허용하는 세포 배양 장치에 대한 요구가 있다. 예를 들면, 주어진 배양물의 세포 집단이 증가되면서 세포를 더 큰 장치로 옮기지 않으면서 배양물 중 세포의 확장(scale-up)이 이루어질 수 있다면 유리할 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 제1 양태에 따르면, 기부 섹션(base section), 상부 섹션(top section)과 평행하게 배열된 상부 섹션, 및 상기 상부 섹션과 상기 기부 섹션 사이에 배열되고, 용기의 내부 루멘(internal lumen)을 정의하는 벽 요소(wall element)를 갖고, 상기 용기의 벽 요소는 상기 상부 및 기부 섹션에 대해 압축가능하고(compressible), 상기 용기의 상부 섹션은 선택적으로 밀봉가능한 유입구(sealable inlet)를 갖고, 상기 용기의 벽 요소는 유연한 재료로 구성되는 것인 세포 배양 용기(cell culture container)가 제공된다.
- [0008] 일 구체예에서, 상기 벽 요소는 상기 기부 섹션과 평행하게 배열된 벽에 복수 개의 측면 경질 섹션(lateral rigid section)을 포함하고, 측면 경질 섹션의 각 쌍은 변형가능한 영역(deformable region)과 교대로 배치된다(interleave). 또 다른 구체예에서, 상기 벽 요소는 나선 코일 영역(helical coil region)의 양면에 제공된 변형가능한 영역을 갖는, 경질 나선형 코일 영역(rigid helical coil region)을 포함한다.
- [0009] 또 다른 구체예에서, 상기 상부 섹션, 기부 섹션 및 벽 요소는 외부의 조정가능한 프레임(external adjustable frame) 내에 유지(hold)될 수 있는 백을 형성할 수 있거나 또는 상기 백은 상기 백의 재료(material) 내에 내부의 조정가능한 프레임을 포함한다.
- [0010] 본 발명의 용기는 조정가능하고 다수의 상이한 구조(configuration)를 취할 수 있다. 확장되거나 또는 부분적으로 확장된 상태에서부터 압축되거나, 또는 압축되거나 또는 부분적으로 압축된 상태에서부터 확장될 수 있다. 수동적으로 또는 능동적으로, 예를 들면, 수동으로 또는 작동 장치(actuating device)의 제어에 의해, 상이한 구조가 달성될 수 있다. 작동 장치는 원하는 대로 또는 필요에 따라 용기의 압축 또는 확장을 유발하기 위해 가역적 방식으로 운전될 수 있다.
- [0011] 용기는 완전히 펼쳐진 개방 배열(open arrangement)로부터, 부분적으로 압축되거나 또는 접힌(collapsed) 반-개

방(semi-open) 또는 반-폐쇄(semi-closed) 배열을 거쳐서, 완전히 접힌 또는 압축된 배열로 압축될 수 있다.

- [0012] 용기는 벽 요소가 변형가능한 경우 상부 및 기부 섹션에 대해 압축가능하다. 용기의 압축은 콘서티나(concertina) 또는 주름상자(bellows)의 압축과 유사하다. 상부 섹션 및 하부 섹션이 벽 요소의 변형에 의해 함께 더 가깝게 당겨진다. 변형은 용기의 유연한 재료에서 더 높은 유연성의 라인이나 영역을 따라 일어날 수 있다.
- [0013] 용기의 압축은 따라서 상부 섹션과 기부 섹션의 평면(plane)에 접선인 축을 따라 일어나는 것으로 기술될 수 있다. 따라서, 상부 섹션과 하부 섹션이 실질적으로 수평 위치로 배열된 경우(용기가 직립 구조(upright configuration)인 것으로 기술될 수 있는 경우), 용기의 압축은 세로 방향으로(vertical sense) 일어난다. 마찬가지로, 상부 섹션과 기부 섹션이 실질적으로 수직 위치로 배열된 경우(용기가 횡단물 또는 측부 구조(transverse or lateral configuration)인 것으로 기술될 수 있는 경우), 용기의 압축은 가로 방향으로(horizontal sense) 일어난다.
- [0014] 완전히 펼쳐진 또는 개방 배열에서, 용기는 세포의 배양을 위한 최대 가능한 용량을 갖는다. 완전히 접히거나 또는 압축된 배열에서, 용기는 용기의 저장 또는 수송에 더 적합하거나, 또는 세포의 세척 또는 펠렛화(pelleting)에 의한 세포의 처리에서 단계의 일부로서 더 적합한 최소 가능한 용량을 갖는다. 용기는 상부 섹션과 기부 섹션을 함께 보다 가깝게 가져오는 작동 장치(actuating device)에 의해 압축될 수 있다. 마찬가지로, 용기는 상부 섹션과 기부 섹션을 더 멀리 떨어지게 이동시키는 작동 장치에 의해 확장될 수 있다.
- [0015] 용기가 폐쇄 또는 반-폐쇄(semi-closed) 배열에서 확장되는 경우, 확장은 용기의 수동 확장에 의해 또는 상부 섹션과 기부 섹션을 더 떨어지게 이동시키는 것에 의해 용기를 확장하는 작동 장치 내에 용기를 유지시키는 것인 기계적 확장(mechanical expansion)에 의해 적절하게 제어될 수 있다. 용기는 또한 적절한 재료로부터 제조된 일부 구체예에서, 자가-확장(self-expansion)될 수 있다. 용기는 또한 액체 또는 기체와 같은 유체를 도입하는 것에 의해 확장될 수 있다. 마찬가지로, 용기는 또한 액체 또는 기체와 같은 유체를 제거하는 것에 의해 압축될 수 있다.
- [0016] 용기는 단일 챔버를 포함하는 단일 내부 루멘을 포함할 수 있거나, 또는 내부 루멘 내에 복수 개의 순차적으로 배열된 내부 챔버를 형성하기 위해 하나 이상의 폐쇄(closure) 수단에 의해 분리될 수 있다. 이러한 방식으로, 용기는 용기가 사용될 때, 순차적으로 및/또는 병행으로 상이한 프로세스가 일어날 수 있는 다수의 상이한 구역 또는 영역을 수용할 수 있다. 단일 폐쇄-용기 시스템 내의 복수 개의 챔버는 그들 자신의 챔버에서 복수 개의 세포 종류 각각의 동시 처리를 가능하게 하고, 혼합은 필요하면 및 필요한 경우에만 일어난다.
- [0017] 용기는 본 명세서에 기재된 바와 같이 용기에서 선택적인 개방 및 폐쇄에 의해 그러한 상이한 챔버를 제공하도록 조정될 수 있다. 용기가 복수 개의 측면 경질 섹션을 포함하는 경우, 개별적인 섹션의 움직임이 독립적으로 제어되어, 하나 또는 그 이상의 쌍의 섹션이 개방되고, 나머지는 폐쇄된 상태로 유지되게 할 수 있다.
- [0018] 각 쌍의 측면 경질 섹션은 용기 중 개별적인 세그먼트를 정의할 수 있다. 따라서, 용기는 하나 이상의 세그먼트로 이루어진 여러 영역을 포함할 수 있다. 상이한 세그먼트, 또는 여러 세그먼트를 정의하는 상이한 영역을 선택적으로 개방하거나 폐쇄하는 능력은 본 발명의 이 양태의 장점이다.
- [0019] 상부 섹션 및/또는 기부 섹션 및/또는 벽 요소는 유입구(inlet) 및/또는 유출구(outlet) 포트를 가질 수 있다.
- [0020] 이 방식으로, 본 발명의 용기는 상이한 세그먼트 또는 영역을 선택적으로 개방 및 폐쇄하는 것에 의해 세포가 장치를 통해 이동시키는 것에 의해 세포를 처리하기 위해 이용될 수 있다. 상이한 세그먼트 또는 영역을 선택적으로 개방 또는 폐쇄하는 작업(action)은 취해질 프로세스에 따라 부피 및 가용 표면적(available surface area)이 원하는 대로 증가 또는 감소될 수 있게 한다. 세그먼트 또는 영역의 개방 작업은 배양물 중 세포가 용기의 루멘 내에서 하나의 챔버로부터 또 다른 챔버로 이동하게 할 수 있거나, 또는 배양물 중 세포가 또한 (예를 들면, 원심분리 후에) 혼합되게 할 수 있다. 세그먼트의 상태, 즉, 개방 또는 폐쇄에 따라 세포는 임의의 방향으로 이동될 수 있다. 마찬가지로, 세그먼트 또는 영역을 폐쇄하는 작업이 세포의 이동 및/또는 혼합을 유발할 수 있다. 용기의 완전한 압축은 배양물 중 세포가 용기로부터 배출되게 할 수 있다. 세포 또는 액체의 공급원(source)에 부착되거나 인접한 경우, 폐쇄된 배열로부터 용기의 개방은 용기가 캐놀라를 통해 그러한 물질이나 액체를 수용하도록 적절하게 변형된 경우, 액체 또는 세포가 용기의 루멘 내로 유입될 수 있게 한다.
- [0021] 복수 개의 루멘이 또한 용기의 벽 주위의 적절한 위치(locus)에서 가열-밀봉(heat-sealing)의 작업에 의해 용기의 벽을 어닐링(anneal)하여 밀봉(seal)을 형성하는 것에 의해 형성될 수 있다. 그러한 밀봉은 저장 (즉, 동결 보존) 및/또는 수송 및/또는 폐기물(사용된 배지) 제거 및/또는 세포 선택을 위해 세포 또는 배지를 담은 용기

의 일부의 선택적 제거를 가능하게 한다.

- [0022] 본 발명의 일 구체예에서, 용기는 기부 섹션과 상부 섹션의 배향에 대해 수직인 용기의 축을 따라 용기의 루멘 내에 배치된 복수 개의 챔버를 포함할 수 있다. 복수 개의 챔버는 상이한 폭을 가질 수 있고, 즉, 챔버는 균일한 또는 불균일한(unevenly) 크기일 수 있다. 챔버는 각각 독립적으로 유체 소통관계(fluid communication)일 수 있거나, 또는 대안적으로 챔버는 각각 독립적으로 재-밀봉가능한(re-sealable) 유체 소통관계일 수 있다. 따라서, 하나 이상의 챔버는 선택적으로 하나 이상의 다른 챔버들과 단리될 수 있다. 단일 장치 내에 상이한 부피의 챔버를 갖는 것은 특정한 세포 또는 시약 밀도를 요구하는 다양한 작업들이 수행될 수 있게 한다. 예를 들면, 형질감염 및 전기천공은 모두 소용량(low volume) 중 세포의 고밀도를 요구하고; 접종(inoculation)은 대용량 중 세포의 저밀도를 요구한다. 마찬가지로, 효율적으로 작용하기 위해 특정한 농도에 있을 것이 요구되는 값비싼 시약의 경우, 보다 높은 세포 밀도를 갖는 보다 작은 용량의 챔버가 더 비용 효율적이다.
- [0023] 그러한 구체예에서, 세포의 집단이 본 발명의 용기의 상부 섹션을 통해 도입되고 제1 챔버에서 처리되고, 뒤이어, 제1 챔버의 선택적 폐쇄 및 제1 챔버의 폐쇄와 동시에(coterminus) 인접한 제2 챔버의 선택적 개방으로 이어져서, 세포가 후속 처리를 위해 제2 챔버 내로 이동하게 할 수 있다. 예를 들면, 제1 챔버가 상대적으로 작은 가용 용량(volume)을 갖는 경우, 제1 챔버가 세포를 형질감염시키기 위해 이용되고, 제2 챔버는 형질감염된 세포의 배양 및 확장을 위한 더 큰 용량을 가질 수 있고, 따라서, 필요한 경우, 추가적인 배양 배지가 공급될 수 있다. 따라서, 용기의 전체 크기(dimension)가 그에 따라 선택될 수 있는 경우, 더 많은 챔버가 적용될 처리 방법에 따라 필요한 만큼 형성될 수 있다.
- [0024] 용기는 전체적으로 동일한 유연한 재료로 구성될 수 있다. 그러나, 상부 섹션 및 기부 섹션은 벽 요소의 재료와 상이한 재료로 구성될 수 있다. 상부 섹션 및 기부 섹션에서 사용되는 재료는 벽 요소에서 사용되는 재료보다 덜 유연할 수 있고, 벽 요소는 사용시 압축되거나 또는 확장될 필요가 없기 때문이다. 재료는 경질 재료(rigid material)이어서, 이러한 섹션이 더 높은 구조적 강도(structural rigidity)를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 상부 섹션은 기부 섹션과 상이한 재료로 구성될 수 있다. 다른 구체예에서, 용기의 모든 부분은 동일한 유연한 재료로 구성될 수 있다.
- [0025] 금속이 용기 내의 전기천공 챔버를 생성하기 위해 요구되는 경우, 상부 섹션 및 기부 섹션은 스테인레스 스틸과 같은 금속으로 구성될 수 있고(도 12 참조), 대안적으로, 세포 배양, 처리 및 저장(예를 들면, 동결보존)에서 사용하기 위해 일반적으로 적절한 플라스틱 재료, 예를 들면, 폴리에틸렌(고밀도(high-density) 폴리에틸렌 또는 저밀도 폴리에틸렌, HDPE 또는 LDPE), 폴리비닐클로라이드(PVC), 폴리프로필렌(PP), 내충격성 폴리스티렌(high impact polystyrene)을 포함한 폴리스티렌(PS), 폴리아미드(PA), 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌(ABS), 폴리카르보네이트(PC), 폴리카르보네이트/아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌(PC/ABS) 등으로 구성될 수 있다.
- [0026] 유연한 재료는 기체 투과성 재료(gas permeable material)일 수 있다. 유연한 재료는 플라스틱 재료일 수 있다. 유연한 재료는 폴리에틸렌(선택적으로, 저밀도 폴리에틸렌(LDPE)), cis-1,4-폴리부타디엔, 메타크릴레이트, 예를 들면, 폴리(에틸 메타크릴레이트), 프탈레이트, 예를 들면, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리(비닐리덴 클로라이드), 셀룰로오스 아세테이트, 예를 들면, 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트, 실리콘, 플루오로에틸렌폴리프로필렌, 폴리올레핀, 또는 에틸렌 비닐 아세테이트 공중합체일 수 있다.
- [0027] 용기는 세포 치료법, 유전자 치료법 벡터 생산 및/또는 엑소좀(exosome) 생산에서의 용기의 사용을 포함한 세포 배양 및 세포의 처리를 위해 적합하다. 용기는 사용 전에 적절히 멸균될 수 있다(예를 들면, 감마선 조사 또는 기타 수단). 선택적으로, 장치의 내부 표면은 배양물 중 세포에 작용할 수 있고 및/또는 분화를 유도할 수 있는 생물학적 활성제로 코팅되거나 또는 이들을 포함할 수 있다.
- [0028] 기부 섹션은 유출구를 포함할 수 있고, 각 유출구 및 유입구는 커넥터(connector)로의 연결, 제2 접을 수 있는 세포 배양 장치(collapsible cell culture device)로의 연결을 위해 개조되거나 또는 조정가능한 또는 제거가능한 폐쇄 수단, 또는 제거가능한 미세다공성 필터(microporous filter)가 장착될 수 있다. 기부 섹션은 수집 영역(collection region)을 포함할 수 있다. 기부 섹션은 실질적으로 평탄하거나(수평적) 또는 기부 영역은 단면부가 각을 갖도록(angular) 구성될 수 있고, 예를 들면, 기부 섹션은 장치에서 침강(settling)을 통해 세포를 수집하는 수집 영역을 가질 수 있다.
- [0029] 용기가 복수 개의 측면 경질 섹션을 갖는 경우, 2 내지 3, 2 내지 4, 2 내지 5, 2 내지 6, 2 내지 7, 2 내지 8, 2 내지 9, 또는 2 내지 10개의 섹션 또는 그 이상일 수 있다. 측면 경질 섹션의 수는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상일 수 있다. 일부 구체예에서, 측면 경부 섹션의 수는 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90

또는 100, 또는 그 이상일 수 있다. 그러한 구체예에서 측면 경질 섹션의 최소 수는 2이고, 상부 섹션이 하나의 측면 경질 섹션을 포함하고, 기부 섹션이 하나의 측면 경질 섹션을 갖고, 그 사이에 하나의 변형가능한 영역이 끼워 넣어져 있다(interpose). 상기 측면 경질 섹션은 용기의 벽에 있는 변형가능한 영역 대비 재료의 강화된 섹션(reinforced section), 예를 들면, 와이어 프레임(wire frame)으로 구성될 수 있다.

[0030] 용기는 원형, 정사각형, 직사각형, 타원형, 또는 삼각형 단면을 가질 수 있다. 대안적으로, 용기는 다양한 단면의 상이한 섹션 또는 영역의 다수, 예를 들면, 가변성(증가 및/또는 감소하는) 직경을 갖는 일련의 원형 단면(a series of circular cross sections)을 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 세포 배양 용기는 세그먼트간 또는 섹션/챔버간 액체 흐름을 허용하면서, 상기 용기의 루멘 내에서 개별적인 세그먼트 또는 섹션/챔버 간에 부분적인 폐쇄(occlusion)를 허용하도록 개조될 수 있다.

[0032] 예를 들면, 용기의 루멘은 복수 개의 연결된 챔버를 포함할 수 있고, 각 챔버는 측면 경질 섹션의 쌍으로부터 형성된 일련의 세그먼트로 구성될 수 있다.

[0033] 복수 개의 연결된 챔버에 또한 상기 복수 개의 연결된 챔버의 양 말단에 해제가능한 폐쇄 수단(releasable closure means)이 제공될 수 있다. 폐쇄 수단은 클램프(clamp)일 수 있다. 다른 구체예에서, 챔버는 가열 밀봉기(heat sealer)를 이용하여 영구적으로 밀봉될 수 있거나, 또는 유사하게 원하는 위치에서 벽 요소의 용접을 유발하여 개별적인 챔버(섹션)이 용기로부터 제거될 수 있게 한다.

[0034] 본 발명의 세포 배양 용기에, 루멘을 측면 경질 섹션의 쌍으로부터 형성된 복수 개의 세그먼트로 분할하기 위해 변형가능한 영역에서 루멘 내에 위치한 막 또는 필터가 제공될 수 있다. 막 또는 필터는 하나 이상의 구멍에 의해 천공될 수 있다.

[0035] 막 또는 필터는 루멘의 가용 표면 단면적 영역의 최대 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 또는 100%까지 루멘을 반-분할(semi-partition)할 수 있다.

[0036] 막은 벽 요소와 인접하지 않고(non-contiguous)(즉, 막은 루멘을 완전히 분리하지 않음), 따라서, 내부 루멘 내에 배열된 일련의 배플(baffle)을 형성할 수 있다. 예를 들면, 배플 요소는 하나씩 거른(alternate) 측면 경질 섹션 또는 각각의 측면 경질 섹션에 배열될 수 있다.

[0037] 막 또는 필터의 재료는 벽 요소를 형성하는 재료와 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 막은 셀룰로오스, 예를 들면, 니트로셀룰로오스 막일 수 있다. 필터는 미세다공성(microporous) 필터일 수 있다. 막 또는 필터는 해제가능할 수 있다(releasable).

[0038] 본 발명의 세포 배양 용기는 챔버의 루멘 내에 동심원으로 배열된 복수 개의 내부 벽 요소를 가질 수 있다.

[0039] 이 구체예에서, 용기에 또한 감소되는 단면적을 가지나, 내부 루멘을 절대적으로 분할하지는 않는, 일련의 동심 내부 표면(concentric internal surface)이 제공된다. 그러한 구체예에서, 용기는 감소되는 단면적을 갖는, 동심원으로 배열된, 일련의 포개진(nested) 벽 요소를 포함한다. 그러나, 배양물 중 세포가 모든 가용 표면에 부착될 수 있도록 용기의 내부 루멘 주위 및 전체를 통한 액체 흐름이 가능하다. 배열은 반드시 원형일 필요는 없으며, 기타 규칙적인 기하학적 형태가 가능하다. 유일한 요건은 각각의 더 작은 포개진 표면(nested surface)이 용기의 벽 요소까지 선행하는 더 큰 포개진 표면 내에 맞춰져야 한다는 것이다.

[0040] 각각의 측면 경질 섹션은 변형가능한 영역과 동일하거나 상이한 단면적을 가질 수 있다. 이러한 방식으로, 용기는 증가하거나 또는 감소하는 용량(부피) 및 표면적을 갖는 일련의 상호연결된(interlinked) 챔버로 구성될 수 있다.

[0041] 기부 섹션은 실질적으로 평평한 수평 기부 영역(substantially planar, horizontal base region)을 갖는, 원추대(frusto-conical) 형태일 수 있다. 기부 섹션은 본 명세서에 기재된 세포의 투여 방법에서와 같이, 용기로부터 세포의 방출을 위한 전달 메카니즘과 맞물리도록 구성될 수 있다. 따라서, 유출구가 기부 섹션에 제공되어 그러한 방출이나 투여를 가능하게 할 수 있다. 유출구가 존재하는 경우, 루어 락 커넥터("Luer-LokTM")에 의해 적절하게 캐놀라를 수용하도록 개조된다. 유출구는 조정가능한 및/또는 제거가능한 폐쇄 수단에 의해 밀봉가능할 수 있다.

[0042] 상부 섹션은 원추대 형태일 수 있다. 상부의 유입구는 루어 락 커넥터에 의해 적절하게 캐놀라를 수용하도록 개조된다. 상부 섹션의 유입구는 조정가능한 및/또는 제거가능한 폐쇄 수단에 의해 밀봉가능할 수 있거나, 또는 유입구에 제거가능한 미세다공성 필터가 제공될 수 있다. 상부 섹션은 실질적으로 평평(수평)하거나 또는 단면

이 각지도록(angular) 구성될 수 있다.

- [0043] 각각의 유입구와 유출구는 필요한 경우 반대 방식으로 독립적으로 기능할 수 있다. 캐놀라에 대한 언급은 세포 또는 유체의 개체로의 전달에서 사용되거나, 또는 개체로부터 생물학적 물질 또는 액체의 시료를 수득하기 위해 사용되는 임의의 종류의 니들을 포함한다. 존재하는 경우, 캐놀라는 용기의 내부 루멘과 유체 소통관계에 있다.
- [0044] 본 발명의 이 양태는 배양물 중 세포와 세포 배양 배지를 포함하는 세포 배양 용기까지 확장된다. 세포를 포함하는 세포 배양 용기는 동결될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 이 양태에서, 세포는 본 발명의 세포 배양 용기에서 배양될 수 있다. 세포는 현탁 배양이거나 또는 기관(substrate)에 부착될 수 있다. 기관은 용기의 루멘에서 하나 이상의 내부 표면에 제거가능하게(removably) 부착될 수 있거나, 또는 미세입자(microparticle)에 제거가능하게 부착될 수 있다. 세포는 혼합 또는 원심분리되고, 뒤이어 신선한 배지 중 재-현탁된다. 접을 수 있는 세포 배양 용기의 유연한 재료는 기체, 예를 들면, 산소를 세포에 공급할 수 있도록 기체 투과성일 수 있다.
- [0046] 주어진 배양의 규모를 증가시키기 위해, 세포 배양 용기는 세포 배양 용기가 완전히 또는 부분적으로 접힌 것인 폐쇄 또는 반-폐쇄 배열로부터 세포 배양 용기가 펼쳐진 것인 개방 또는 반-개방 배열로 펼쳐질 수 있다.
- [0047] 전술로부터 알 수 있는 바와 같이, 세포 배양 용기는 다양한 배향(orientation) 및 배열을 가질 수 있다. 이는 본 명세서에 기재된 세포의 다-단계 처리 및 세포 배양의 규모 증가에 적합하다. 상기 용기는 단일 챔버, 또는 상이한 처리 단계들이 적절하게 순차적으로 수행되는 복수 개의 연결된 챔버를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 제2 양태에 따르면, 기부 섹션, 상부 섹션과 평행하게 배열된 상부 섹션, 및 상기 상부 섹션과 상기 기부 섹션 사이에 배열되고, 용기의 내부 루멘을 정의하는 벽 요소를 갖고, 상기 용기의 벽 요소는 상기 상부 및 기부 섹션에서 대해 수직적으로 압축가능하고(vertically compressible), 상기 상부 섹션은 선택적으로 밀봉 가능한 유입구를 갖고, 상기 용기는 유연한 재료로 구성되는 것인 세포배양 용기에서 세포를 배양하는 방법으로서, 상기 세포 배양 용기 중 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 상기 용기의 기타 특징 및 양태는 본 명세서에서 정의된 바와 같다.
- [0049] 상기 방법은 세포를 세척, 분리 및/또는 동결보존하는 하나 이상의 단계를 더 포함할 수 있다. 단계들은 임의의 순서로 일어날 수 있고 원하는 대로 반복될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 이 양태에서, 상기 방법은 세포의 펠렛을 형성하기 위해 세포 배양 용기를 원심분리하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있고, 상층액은 세포 배양 용기를 접는 것에 의해(용기를 개방 콘서티나를 폐쇄하는 방식으로 접는 것에 의해) 제거될 수 있고, 뒤이어, 적절하게 용기를 폐쇄된 콘서티나를 재-개방하는 방식으로 용기를 재-개방시키는 것에 의해 세포 펠렛의 재현탁이 수행될 수 있다. 접을 수 있는 세포 배양 용기 중 세포의 배양에 수송 또는 저장을 위한 동결(예를 들면 동결보존), 또는 선택적인 활성화 단계 또는 처리를 포함한, 추가적인 배양 및 개체로의 후속 투여가 수행될 수 있다.
- [0051] 세포의 배양은 프로모터와 같은 유전자 발현과 관련된 수반되는 조절 및 제어 요소들과 함께 목적 단백질 또는 RNA 서열을 코딩할 수 있는 핵산 서열, 선택적으로 벡터에 포함된 핵산 서열의 형태일 수 있는 이중가닥 핵산(유전 물질)을 세포 내로 도입하기 위한 세포의 형질감염(transfection) 단계를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 세포를 형질감염시키는 단계는 소량의 액체에서 w적절하게 일어날 수 있다. 그러한 방법에서, 존재하는 액체의 양은 용기의 유출구를 통한 과량 액체의 제거에 의해 감소될 수 있다.
- [0052] 용기가 용기의 루멘 내에 다수의 개별적인 별개의 챔버를 포함하는 경우, 형질감염 단계는 세포의 형질감염을 촉진하기 위해 감소된 용량의 액체를 수용하도록 배열된 챔버의 정해진 영역(designated region)에서 일어날 수 있다.
- [0053] 따라서, 상이한 처리 단계가 본 명세서에 기재된 바와 같이 용기 내 영역의 선택적 개방 및 폐쇄에 의해 형성될 수 있는, 용기 내의 상이한 챔버에서 일어나도록 배열될 수 있다.
- [0054] 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포, 적절하게, 동물 세포, 예를 들면, 포유동물 세포를 배양하기 위해 세포 배양 용기가 이용될 수 있다. 적절한 비-인간 세포(non-human cell)의 공급원의 예는 마우스, 랫트 및 기니아 피그와 같은 설치류, 양, 염소, 돼지, 소 및/또는 말 종으로부터 선택된 유계류 동물, 또는 인간이 아닌 영장류 종을 포함한다. 그러나, 세포는 박테리아, 효모, 균류(fungi), 또는 식물 세포 기원일 수 있다.
- [0055] 세포는 체세포 및 비-체세포(non-somatic cell)를 포함한 임의의 종류일 수 있다. 세포는 성체 동물, 태아, 또

는 배아의 발생의 임의의 단계로부터 유래된 줄기 세포일 수 있다. 세포는 유전적으로 변형된 세포, 예를 들면, 키메라 항원 수용체 T-세포(CART)일 수 있다. 세포는 기탁된 세포주, 예를 들면, 재조합 단백질을 제조하기 위한 유전적으로 변형된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 유래될 수 있다.

[0056] 예를 들면, 비-인간 기원의 세포를 포함한 배아 줄기(ES) 세포. 세포는 배양에서 증식하고 및/또는 단일클론 항체를 생산하도록 유발될 수 있는 암 또는 하이브리도마 세포, ES 세포주와 같은 기탁된 세포주로부터 유래될 수 있다. 세포는 또한 체세포의 핵이 탈핵 난모세포(enucleated oocyte) 내로 배치되는 것인 체세포 핵치환(somatic cell nuclear transfer)(SCNT)로부터 유래될 수 있다.

[0057] 세포는 다능성 줄기 세포, 예를 들면, 영장류 다능성 줄기(primate pluripotent stem: pPS) 세포, 예를 들면, 인간 배아 줄기(hES) 세포일 수 있다. 세포가 줄기 세포인 경우, 공급원은 중간엽 줄기 세포(탯줄 유래 줄기 세포 포함), 신경 줄기 세포, 또는 조혈 줄기 세포를 포함한, 신체의 임의의 조직으로부터 유래된 것일 수 있다. 또한 유도 다능성 줄기(induced pluripotent stem: iPS) 세포도 포함된다.

[0058] 본 발명의 제3 양태에 따르면, 개체에서 의학적 상태 또는 수의학적 상태(medical or veterinary condition)를 치료하는 방법으로서, 기부 섹션, 상부 섹션과 평행하게 배열된 상부 섹션, 및 상기 상부 섹션과 상기 기부 섹션 사이에 배열되고, 용기의 내부 루멘을 정의하는 벽 요소를 갖는 용기로부터 상기 개체에게 세포를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 용기의 벽 요소는 상기 상부 및 기부 섹션에서 대해 압축가능하고, 상기 용기의 기부 섹션에 상기 캐놀라가 제공되고, 상기 용기는 유연한 재료로 구성되는 것인 방법이 제공된다. 상기 용기의 기타 특징 및 양태가 본 명세서에서 정의될 수 있다. 일부 구체예에서, 용기의 상부 섹션에 선택적으로 밀봉가능한 유입구가 제공될 수 있다.

[0059] 의학적 상태 또는 수의학적 상태의 치료 방법은 그를 필요로 하는 개체에게 유전적으로 변형된 세포를 포함한, 세포의 투여에 의한 세포 치료법을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 의학적 상태 또는 수의학적 상태의 치료 방법은 그를 필요로 하는 개체에게, 엑소좀(exosome), 조건화 배지(conditioned media), 단일클론 항체 및 재조합 단백질을 포함한 세포에 의해 생산된 산물을 포함할 수 있다.

[0060] 미용 방법(cosmetic method)은 개체에게 세포의 투여에 의한 미용(심미적) 강화를 제공하는 치료의 비-치유(non-therapeutic) 방법을 포함할 수 있다.

[0061] 세포는 선택적으로 용기 중 세포의 선택적 세척 및 재-현탁을 포함하여, 투여 전에, 본 발명의 제1 양태에 따른 세포 배양 용기에서 배양될 수 있다.

[0062] 본 발명의 이 양태에서, 용기는 선택적으로 세포 배양 용기 중 세포의 동결보존 집단을 포함할 수 있고, 이들은 뒤이어 투여 전에 해동된다. 적절하게, 해동된 세포는 사용 전에 생리학적으로 허용가능한 매질(media)에 재현탁될 수 있다. 세포는 필요한 경우, 더 세척되고, 원심분리되며, 용기 중에 다시 재현탁된다. 생리학적으로 허용가능한 매질은 개체에게 투여될 최종 제형을 위해 요구되는 임의의 일반적으로 허용가능한 완충액, 아유반트 및/희석제일 수 있다. 예를 들면, 상기 매질은 적절히 pH 7.4인 인산염 완충 염수(PBS)일 수 있다.

[0063] 세포는 주사의 형태로 세포 배양 용기로부터 투여될 수 있다. 세포 배양 용기에 세포의 투여를 위한 캐놀라, 예를 들면, 루어 락 커넥터에 의해 캐놀라가 제공될 수 있다. 세포 배양 용기에 세포의 전달을 위한 액추에이터(actuator) 수단이 제공될 수 있다. 액추에이터 수단은 레버(lever) 또는 주사기 장치(syringe device)의 작용에서와 같이 기능할 수 있는 용기를 압축하기 위한 힘을 제공하는 임의의 수단을 포함할 수 있다. 액추에이터는 수동으로 운전되거나 또는 외래 전기 제어 시스템(external electrical control system)에 의해 제어될 수 있다. 따라서, 액추에이터 수단은 캐놀라를 통해 용기로부터 개체로의 세포의 방출(exit)을 유발하도록 세포 배양 용기의 접합(collapse)을 제어하도록 작용하는 소형화 메카니즘(compacting mechanism)으로 작용할 수 있다.

[0064] 세포는 또한 세포 배양 용기로부터의 주입에 의해 투여될 수 있고, 이때, 세포 배양 용기는 최대한 확장될 수 있다. 이 구체예에서, 세포는 적절하게 더 큰 용량의 배지에 현탁될 수 있다. 주입은 수동적으로 투여될 수 있고, 더 큰 제어가 요구되거나 필요한 경우, 외래 전력 시스템의 제어 하에 작동되는 양방향 선형 액추에이터(bidirectional linear actuator)(예를 들면, 시린지-드라이버-유사 장치(syringe-driver-like device))에 의해 투여될 수 있다.

[0065] 본 발명의 제4 양태에 따르면, 캐놀라를 개체에게 삽입하는 단계를 포함하는, 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 방법으로서, 상기 캐놀라는 기부 섹션, 상부 섹션과 평행하게 배열된 상부 섹션, 및 상기 상부 섹션과 상기 기부 섹션 사이에 배열되고, 용기의 내부 루멘을 정의하는 벽 요소를 갖는 용기 내에 배치되고, 상기 용기의 벽 요소는 상기 상부 및 기부 섹션에서 대해 수직적으로 압축가능하고, 상기 용기의 기부 섹션에 상기 캐놀라가

제공되고, 상기 용기는 유연한 재료로 구성되고, 상기 용기는 상기 용기를 확장시켜, 상기 개체로부터 상기 시료를 제거하는 액추에이터 수단에 작동가능하게 연결된 것인 방법이 제공된다. 상기 용기의 기타 특징 및 양태가 본 명세서에서 정의될 수 있다. 일부 구체예에서, 용기의 상부 섹션에 선택적으로 밀봉가능한 유입구가 제공될 수 있다.

[0066] 액추에이터 수단은 용기의 루멘 내로 시료의 진입(ingress)을 허용하기 위해 폐쇄 또는 반-폐쇄 배열로부터 용기를 개방할 수 있다. 액추에이터 수단은 레버 또는 주사기 또는 기타 생검 장치의 작용에서와 같이 용기를 확장할 수 있는 힘을 제공하는 기타 수단을 포함할 수 있다. 액추에이터는 수동으로 운전되거나 또는 외래 전기 제어 시스템에 의해 제어될 수 있다.

[0067] 상기 용기의 캐놀라는 혈관 또는 골수강 내로 삽입될 수 있다. 용기는 이러한 방식으로 편리하게 생검될 수 있는, 혈액, 골수, 땀줄, 지방 조직, 양수 등과 같은 대상으로부터 세포, 예를 들면, 줄기 세포를 수득하기 위해 이용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 제2 양태 및 그 이상의 양태의 바람직한 특징은 필요한 변경을 가한 것을 제외하고는 제1 양태의 경우와 동일하다(*mutatis mutandis*).

[0069] 따라서, 본 발명은 별개의 용기 또는 장치 간 세포 및/또는 배지의 이동 없이 원하는 대로 다수의 단위 프로세스들이 일어나서 오염의 위험도 피하는, 세포의 단일 챔버 처리(single chamber processing)를 제공한다. 이 시스템은 사용하기에 더 단순하고 또한 기존 방식의 복잡성을 피한다. 본 발명은 개선된 재현성 및 사용 용이성을 갖는, 세포의 보다 안전한 처리를 제공한다.

[0070] 본 발명은 또한 세포가 전체 과정 내내 동일한 용기에 존재할 수 있는, 환자로부터 세포의 추출(생검, 예를 들면, 혈액 또는 골수), 세포의 분리, 세포의 처리(사이토카인 자극 및/또는 유전적 변형 포함), 고체-액체 분리, 및 전달 장치로의 로딩을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0071] 본 발명이 예시의 목적으로만 존재하고, 청구된 발명에 대한 한정으로 해석되지 않을 하기의 실시예 및 도면을 참조하여 더 설명될 것이다. 또한 하기 도면에 대한 참조가 이루어진다:

도 1은 직립 배열(upright configuraiton)인 3개의 별개의 배열에서 본 발명의 세포 배양 용기의 일구체예의 사시도(perspective view)를 보여준다. 도 1(a)는 완전히 펼쳐진 용기를 보여주고; 도 1(b)는 부분적으로 접힌(collapsed)(부분적으로 펼쳐진) 용기를 보여주며; 도 1(c)는 완전히 폐쇄된(완전히 접힌) 용기를 보여준다.

도 2는 직립 배열인 본 발명의 세포 배양 용기의 평면도(plan view)의 도표를 보여준다. 도 2(a)는 부분적으로 펼쳐진 용기를 보여주고, 도 2(b)는 용기에서 세포를 혼합하기에, 예를 들면, 용기를 짜거나 또는 압축하는 것에 의해 혼합하기에 적합한 부분적으로 폐쇄된(접힌) 배열인 용기를 보여준다.

도 3은 용기의 선택된 세그먼트가 직립 배열에서 접힌("폐쇄된(closed)") 것인 본 발명의 세포 배양 용기의 평면도를 보여준다. 도 3(a)는 완전히 폐쇄된 용기의 하부 세그먼트(lower segment) 및 하부 단부(bottom end)를 보여주고; 도 3(b)는 완전히 폐쇄된 용기의 상부(top)에 있는 상부 세그먼트(upper segment)를 보여주며; 도 3(c)는 양 단부에서 완전히 펼쳐진 용기를 보여준다.

도 4는 용기 중 세포를 원심분리하는 단계, 상층액을 제거하는 단계, 신선한 배지에 세포를 재-현탁시키는 단계, 및 동결, 해동, 세포 배양, 사이토카인 자극(cytokine stimulation), 세척, 환자로의 투여와 같은 후속 하류 처리(downstream processing)를 포함하는, 본 발명의 세포 배양 용기를 이용하는 처리 계획(processing scheme)의 도식적 표현을 보여준다.

도 5는 본 발명의 세포 배양 용기가 환자에게 투여하기 위한 세포를 제조하기 위해 이용될 수 있는 방법의 도식적 형태의 보다 상세한 표현을 보여준다. 용기 중 세포들은 선택적 원심분리(도 4에 도시된 바와 같은) 후에 인시투(in situ)로 동결되고, 뒤이어 해동, 및 재-원심분리(세포 펠렛(pellet)의 형성), 완충액 중 재-현탁, 및 세포의 환자로의 주사 또는 주입(infusion)이 이루어질 수 있다. 투여의 주사 모드에서, 본 발명의 세포 배양 용기가 (제어된 속도 전달(controlled rate delivery)을 위해 도시된 바와 같이, 동력-구동될 수 있는) 압축 수단(compression means) 내로 삽입되고, 또한, 용기에 대한 압축 수단의 작용에 의해 환자로의 세포의 투여를 위한 루어 락 커넥터(Luer lock connector)와 같은 적절한 캐놀라(cannula)가 장착된다. 투여의 주입 모드에서, 용기는 그와 같은 절차를 위한 일반적으로 편리한 접근방식에 따라 주입을 위한 저장소(reservoir)로 이용된다.

도 6은 본 발명의 용기의 대안적인 구체예 및 용도를 보여주고, 도 6(a)는 "진탕 플라스크(shaker flask)"로 사용되는 세포 배양 용기를 보여주고; 도 6(b)는 "회전 병(roller bottle)"으로 사용되는 세포 배양 용기를 보여주고; 도 6(c)는 "T-플라스크(T-flask)"의 형태를 갖는 세포 배양 용기를 보여준다.

도 7은 본 발명의 용기의 대안적인 구조(configuration)를 보여주고, 도 7(a)는 경질 와이어(rigid wire)가 유연한 구조에 와이어 프레임을 제공하는 특정한 위치에 정리되도록(file) 표시된 유연한 재료로 구성된 원통형 용기의 측면도를 보여주고; 도 7(b)는 용기가 "콘서티나(concertina)"의 형태로 접을 수 있는 나선형 나사 영역(collapsible helical screw region)을 갖는 것인 또 다른 구체예를 보여주고; 도 7(c)는 상이한 형태를 갖는 본 발명의 다양한 용기의 평면도를 보여준다.

도 8은 측면도 및 평면 단면도(cross section view through the top)로 본 발명의 용기의 대안적 구체예를 보여준다. 용기는 중심 축으로부터 외부 벽까지 방사상으로 전개되는 복수 개의 동심원 내부 표면을 포함한다. 따라서, 복수 개의 내부 표면이 세포가 부착된 세포 배양(attached cell culture)에서 세포가 부착할 추가적인 위치로 작용한다. 배양 배지는 표면 주위로 자유롭게 흐르고 장치 내에서 순환될 수 있다.

도 9는 본 발명의 진탕된 용기에서 3일 회분 배양물(batch culture)을 보여준다. 도 9(a)의 세포 증식 및 도 9(b)의 생존력(viability)이 시간에 대해 도시(plot)되었다. 모든 세포 농도 및 생존력은 트리판 블루(trypan blue)를 이용하여 측정하였다. 각 데이터 포인트는 3회의 재현물(n=3)의 평균 값을 나타낸다. 오류 막대(error bar)는 1 표준편차 \pm 평균을 나타낸다.

도 10은 본 발명의 용기 중 세포의 원심분리 및 재-현탁을 보여준다. 도 10(a)는 원심분리 전 현탁액 중 세포의 총 수(in), 원심분리 및 신선한 배지 중 재현탁 후 세포의 총 수(out), 및 투명화된 상층액(clarified supernatant) 중 세포의 총 수를 보여 준다. 도 10(b)는 상응하는 생존력을 보여준다. 각 데이터 포인트는 3회의 재현물(n=3)의 평균 값을 나타낸다. 오류 막대는 1 표준편차 \pm 평균을 나타낸다.

도 11은 단일 용기 중 공통의 세포 처리 작업(common cell processing operation)의 완전한 서열을 보여준다. 도 11(a)에 도시된 바와 같이, 세포를 용기에 접종하고, 24시간 동안 배양하고, 원심분리에 의해 펠렛화시킨다. 펠렛을 동결 배지(freezing medium)에 재현탁시키고, -80°C 에서 24시간 동안 동결시킨다. 최종적으로, 동결된 세포 현탁액을 37°C 수조에서 해동시키고, 원심분리에 의해 펠렛화하고, 신선한 배지에 재현탁시켰다. 이 순서 중 어느 때도 세포는 용기로부터 제거되지 않았다. 콘서티나의 내부 및 외부로의 유일한 물질의 흐름은 원심분리 후 상층액의 제거 및 2회의 세척 단계 동안 펠렛의 재현탁을 위한 동결 배지/신선한 배지의 첨가였다. 도 11(b) 및 11(c)는 도 11(a)에서 번호 1 내지 4로 표시된 과정 동안 주요 포인트에서 측정된 총 살아있는 세포 수 및 생존력을 보여준다. 각 데이터 포인트는 3회의 재현물(n=3)의 평균 값을 나타낸다. 오류 막대는 1 표준편차 \pm 평균을 나타낸다.

도 12는 본 발명의 용기가 용기 내의 별개의 세그먼트의 선택적 개방 및 폐쇄에 의해 용기 내의 하나의 챔버로부터 또 다른 챔버로의 물질의 흐름을 위한 폐쇄 시스템(closed system)을 제공하는 방법의 도식적 표현을 보여준다.

도 13은 단일 폐쇄 용기 장치(single closed container device)에서 다-단계 프로세스의 도식적 표현을 보여주고, 상기 프로세스에서 용기는 4개의 별개의 챔버를 포함한다: 형질감염 챔버(transfection chamber); 활성화(activation) 챔버; 세포 배양(cell culture) 챔버; 및 동결보존(cryopreservation) 챔버.

도 14는 도식적 형태인 챔버의 무균 분리(sterile separation)를 보여준다.

도 15는 전기천공용 챔버를 제조하기 위한 금속으로 제조된 상부 및 하부를 보여준다. 상부 및 하부 표면에서 금속은 그 사이에 절연체(insulator)(플라스틱 벽)를 갖는 두 개의 전극(양극 및 음극)으로 작용한다. 따라서, 세포벽의 투과성을 증가시켜, 화학물질, 약물, 또는 DNA가 세포 내로 도입될 수 있게 하기 위해 전기장이 세포에 적용될 수 있다. 전기천공 후에, 챔버는 예를 들면, 세포 배양을 가능하게 하기 위해 확장될 수 있다.

도 16은 용기가 상부/하부에 평행하게 루멘을 따라 천공된 구조(perforated structure)(스택킹 디스크(stacking disk))에 의해 세그먼트화된 배열을 보여준다. 이 배열은 멀티-스택 세포 배양 장치와 유사하나, 스택된 디스크를 포함하는 챔버의 압축 및 확장에 의해 시약, 배지 및/또는 세포의 흐름을 가능하게 하는 천공된 디스크 사이에 유연한 벽을 갖는다. 천공(perforation)은 임의의 크기, 갯수, 또는 위치일 수 있다. 도 16은 (예를 들면, 증가된 세포 부착을 위해)표면적을 증가시킬 수 있거나, 또는 배플(baffle)로 작용하는 것에 의해 또는 예를 들

면, 세포를 펠렛화할 때, 효율적인 원심부리를 가능하게 하는 것에 의해 혼합을 증가시킬 수 있는 본 발명의 용기의 변형물을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 도면의 상세한 설명

[0073] 도 1은 기부 섹션 (12), 상부 섹션 (14) 및 벽 요소 (8)를 포함하는 본 발명의 접을 수 있는(collapsible) 세포 배양 용기(10)의 일 구체예를 보여준다. 벽 요소 (8)는 기부(12)와 평행하게 측면으로 배열된 환상 경질 섹션(annular rigid section) (18, 20, 22, 24, 26, 28, 30)를 포함한다. 상부 영역 (14)은 환상 경질 섹션 (18)을 포함하고, 기부 영역(12)을 환상 경질 섹션 (30)을 포함한다. 환상 경질 섹션 및 변형가능한 영역은 동일하거나 또는 상이한 직경을 가질 수 있다. 이 도면은 직립 배열(upright configuration)인 용기를 보여준다.

[0074] 중간 환상 경질 섹션 (18, 20, 22, 24, 26, 28, 30)의 각 인접 쌍은 변형가능한 영역 (32, 34, 36, 38)과 교대로 배치된다(interleave). 용기의 대칭의 수직축에 직각인 압축 하향력(compressive downward force)의 작용이 도 1(b)에 도시된 바와 같이 용기가 부분적으로 폐쇄된 배열로 접히게 하고, 그 후, 도 1(c)에 도시된 바와 같이, 완전히 폐쇄된 배열로 접히게 한다.

[0075] 용기는 제거가능한 폐쇄 수단(removable closure means) 또는 일시적 밀봉(temporaty seal)으로 기능할 수 있는, 도시된 바와 같은 유입구(16)를 갖는다. 도 1(a)에서, 용기는 완전히 펼쳐져서, 변형가능한 영역이 반드시 즉시 보일 수 있는 것은 아니다. 도 1(b)에서, 용기는 부분적으로 접히고, 이 때 변형가능한 영역은 장치가 "콘서트티나(concertina)" 형태를 형성하기 위해 접힌 구역으로 보일 수 있다. 도 1(c)에서, 용기는 완전히 접힌다.

[0076] 도 3은 본 발명의 용기 (50)의 추가적인 배열을 도시한다. 도시된 구체예는 도 1에 도시된 상부 영역 (14) 및 환상 경질 섹션(18)이 도 3에 도시된 용기에서 하나의 융합된 상부 영역(54, 58)을 형성하는 것인 도 1의 구체예 (10)의 변형이다. 환상 경부 섹션이 도 3에 섹션 (60, 62, 64, 66, 68, 및 70)으로 도시된다. 변형가능한 영역은 도 3에 섹션 (72, 74, 76, 78, 80)으로 도시된다. 용기는 기부 (52), 유입구 (56)를 갖는다. 도 3에 따른 용기는 2개의 챔버를 포함하는 것으로 도시된다: 챔버 1 및 챔버 2. 도 3(a)에서, 챔버 1은 개방되고, 챔버 2는 폐쇄된다. 도 3(b)에서, 챔버 1은 폐쇄되고, 챔버 2는 개방된다. 도 3(c)에서, 챔버 1과 챔버 2 모두 개방된다. 이러한 방식으로, 용기는 배지와 세포가 도시된 바와 같이(도 3(a)부터 도 3(b) 배열까지) 개방된 챔버로부터 폐쇄된 챔버까지 이동될 수 있거나; 또는 세포 배양의 규모가 두 개의 챔버를 모두 개방하는 것에 의해 증가될 수 있는 것인 다단계 공정을 가능하게 한다.

[0077] 도 1에 도시된 접을 수 있는 세포 배양 용기는 전체 원형 횡단면을 갖고 원통형에 기반한다. 본 발명의 이 양태의 용기는 전통적인 세포 배양 장치 대신에, 진탕 플라스크(shaker flask) 또는 회전병(roller bottle)으로 적절하게 사용될 수 있고, 예를 들면, 도 6(a) 및 6(b)를 참조한다. 도 6(c)는 T-플라스크의 형태를 취하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 표준 T-플라스크 대신에 사용될 수 있는 전체 직사각형의 횡단면을 갖는 본 발명의 용기의 대안적인 양태를 보여준다.

[0078] 도 7(a)는 본 발명의 용기가 특정한 위치에서 접도록 표시된 유연한 재료로부터 어떻게 형성될 수 있는지를 보다 상세하게 보여주고, 이 경우, 경질 와이어(rigid wire)가 일부 구체예에서 유연한 구조물(flexible construction)에 와이어 프레임을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 도 7(b)는 용기가 유연한 나선형 나선 영역(flexible helical screw region)에 의해 접힐 수 있는 것인 또 다른 구체예를 도시한다. 도 7(c)는 표시된 바와 같은 상이한 기하학적 형태에 기반한 다양한 상이한 횡단면을 갖는 본 발명의 용기의 평면도를 보여준다. 횡단면은 임의의 적절한 기하학적 형태, 예를 들면, 원형, 정사각형, 직사각형, 타원형, 또는 삼각형일 수 있다.

[0079] 도 8은 부착 세포 배양물(attached cell culture)을 위한 증가된 표면적을 제공하는 용기의 내부 루멘 내 일련의 동심원 포개기형 내부 표면(concentric nested internal surface)를 보여준다. 도 8(a)는 측면도(side view)를 보여주고, 도 8(b)는 용기의 평면 단면도(cross section through the container as viewed from the top)를 보여준다.

[0080] 도 12는 본 발명의 용기가 용기 내의 별개의 세그먼트의 선택적 개방 및 폐쇄에 의해 용기 내의 하나의 챔버로부터 또 다른 챔버로의 물질의 전달을 위한 폐쇄 시스템을 제공한다는 것을 보여준다. 제1 배열에서, "챔버 1"이 확장되고("개방"), "챔버 2"는 클램프(clamp)에 의해 압축("폐쇄" 또는 "챔버 1"로부터 접근가능하지 않음)된다. 클램프는 도시된 바와 같이, 해제될 수 있고, 뒤이어, "챔버 1"으로부터 "챔버 2"로 물질을 방출시키기 위해 "챔버 1"의 압축이 이어지고, 그 후, 챔버들 간의 연결이 클램프에 의해 폐쇄될 수 있다. 최종 배열에서,

"챔버 1"은 압축되고("폐쇄"), 및 "챔버 2"는 확장된다("개방").

[0081] 도 13은 단일 용기가 키메라 항원 수용체 T-세포(CAR-T)의 제조에서와 같은 다단계 프로세스를 운영하기 위해 어떻게 이용될 수 있는지를 보여준다. 용기는 표시된 바와 같이, 각각 상이한 횡단면 영역을 갖는 4개의 챔버를 갖는다. 용기는 챔버 내로 도입된 세포의 형질감염을 가능하게 하기 위해 펼쳐진("개방") 형질감염 챔버를 갖는 것으로 도시된다. 형질감염 과정이 완료된 후, 형질감염 챔버는 선택적으로 압축("폐쇄")되고, 활성화 챔버(activation chamber)가 확장된다("개방"). 뒤이어, 활성화 후에, 선택적으로 세포 배양 챔버(cell culture chamber)를 확장시키고("개방") 활성화 챔버를 압축시키는 것("폐쇄")에 의해 세포를 이동시킨다. 배양물 중 세포의 충분한 확장이 일어나면, 세포 배양 챔버의 선택적 압축 및 동결보존 챔버(cryopreservation chamber)의 선택적 확장에 의해 세포를 동결보존 챔버로 이동시킨다. 최종적으로, 동결보존 챔버와 세포 배양 챔버 사이에 있는 영역의 가열-밀봉(heat-seal)에 의해 동결보존 챔버를 제거한다. 그 후, 동결보존 챔버는 동결보존 및 보관을 위해 준비된다.

[0082] 도 14는 본 발명의 용기 내에 있는 챔버가, 예를 들면, 도 13에 따른 도표에 기재된 바와 같이, 동결보존 챔버의 제거에서 어떻게 무균 방식으로 분리될 수 있는지를 보여준다. 도 14는 2개의 챔버가 함께 결합된 본 발명의 용기를 보여준다. 통상적으로, 제거될 챔버는 용기 중 말단 챔버(terminal chamber), 즉, 처리가 개시되는 용기의 말단에 있는 챔버(근위(proximal) 챔버)로부터 먼 챔버일 것이다. 폐쇄된 양구 무균 배관(closed double ended sterile tubing)이 표시된 바와 같이 제공되고, 밀봉되고 분리될 연결부위(joint) 부위에 배열될 수 있다. 표준 GMP 가열 밀봉기(heat sealer) 장치가 배관을 밀봉하고 챔버를 용기로부터 분리하기 위해 이용될 수 있다. 분리된 동결보존 챔버(동결바이알(cryovial))가 그 후, 제거되고 제어 속도 냉동고(controlled rate freezer)에 보관될 수 있다.

[0083] 따라서, 본 발명은 기부 섹션, 상부 섹션 및 상기 상부 섹션과 상기 기부 사이에 배열되고 용기의 내부 루멘을 정의하는 벽 요소를 갖는 접을 수 있는 세포 배양 용기로서, 상기 용기의 벽 요소는 (i) 측면 경질 섹션(lateral rigid section)의 각 쌍이 변형가능한 영역과 교대로 배치되는 것인 상기 기부 섹션과 평행하게 배열된 벽에 있는 복수 개의 측면 경질 섹션, 또는 (ii) 나선형 코일 영역의 양면에 변형가능한 영역이 제공된, 경질 나선형 코일 영역을 포함하고, 상기 용기의 상부 섹션은 유입구(inlet)를 갖고, 상기 용기는 유연한 재료로 구성되는 것인 세포 배양 용기를 제공한다.

[0084] **실시예: 접을 수 있는 세포 용기 중 세포의 배양**

[0085] 치료적 응용을 위한 세포의 가공은 관련된 다수의 복잡한 단계들 때문에 복잡하고 노동 집약적이다. 이에, 본 발명자들은 세포가 단일 용기를 벗어나지 않으면서, 세포 치료제의 생산에 관여된 모든 단계들을 수행하기 위해 이용될 수 있는 새로운 플랫폼 기술을 발명하고 테스트하였다. 이 실험에서, 접을 수 있는 원통형 콘서티나 배열(collapsible cylindrical concertina arrangement)이 부피:표면적 비율에 대한 정교한 제어를 가능하게 하기 위해 사용되었다. 이 배열을 이용하여, 모두 세포가 단일 용기를 벗어나지 않으면서 순차적으로, 세포를 배양하고, 이들을 원심분리를 통해 세척하고, 동결 해동 사이클에 적용시킬 수 있었다.

[0086] 이러한 실험을 위해, 수의학 외과 기술에서 진공 배액 키트(vacuum drainage kit)로 통상적으로 이용되는, 기성품의 접힐 수 있는 플라스틱 콘서티나(off-the-shelf collapsible plastic concertina)를 사용하였다(Part number AD1BC, Adhesive Dispensing Ltd). 용기(vessel)는 부피가 30 ml였고, 폴리에틸렌 LDPE로 제조되었다. 콘서티나가 확장되었을 때, 장치는 현탁 세포의 확장을 위한 진탕 플라스크로 이용되었다. 동일한 콘서티나가 원심분리에 적용되어, 결과적으로 세포 펠렛의 형성을 가져왔다. 콘서티나를 접는 것에 의해, 상층액의 대부분을 용기로부터 짜낼 수 있었다.

[0087] **실시예 1: 콘서티나 장치 중 세포 배양**

[0088] Flp-In™-CHO 세포(Life Technologies)를 10 ml의 총 작업 부피(working volume) 중 3×10^5 세포/ml의 농도로 접종하였다. 이들을 140 rpm으로 운전되는 진탕 플랫폼(shaking platform) 상의 5% CO₂/37°C 인큐베이터에서 CDCHO 배지 (Life technologies)로 증식시켰다. 무균성(sterility)을 보장하기 위해, 용기의 상부에 0.22µm Millex GP 필터 (Millipore)를 부착시켰다. 3일 회분 배양물(batch culture)로부터 매일 시료채취하고 트리판 블루(trypan blue) 염색에 의해 정량하였다(도 9). 전체 순서 실험(도 11(a))을 위해, 세포를 추가적인 처리 전에 24시간 동안 증식시켰다.

[0089] **실시예 2: 콘서티나 장치의 원심분리 및 재현탁**

- [0090] 모든 원심분리 단계를 위해, 콘서티나를 원심분리기 버킷(centrifuge bucket)에서 1000 rpm으로 5분 동안 스피닝시켰다. 단순히 콘서티나를 뒤집고 압축시키는 것에 의해 상층액을 제거하였다. 상층액을 용기로부터 짜내어 세포 펠렛 및 통상 200-300 μ l의 잔여 액체를 남겼다. 재현탁을 위해, 10 ml의 신선한 배지 (또는 일부 경우, 동결보호제(cryoprotectant))를 첨가하기 전에, 콘서티나를 직립 위치로 복귀시켰다. 세포 펠렛을 꺼내고, 표준 볼텍스 벤치 믹서(standard vortex bench mixer)를 이용하여, 단일 세포 현탁액을 획득하였다. 원심분리 전에, 재현탁시, 및 제거된 상층액 중에서 세포 수 및 생존력에 대해 세포를 분석했다 (도 10).
- [0091] 실시예 3: 동결보존
- [0092] 세포를 10% (v/v) DMSO (Sigma, Poole, UK)가 보충된 정상 증식 배지(normal growth medium)에 재현탁시켰다. 장치를 직접 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 24시간 동안 배치하고, 그 후, 37 $^{\circ}$ C 수조에서 해동시켰다. 세포를 신선한 배지에 재현탁하기 전에, 전술된 바와 같이, 콘서티나를 원심분리시켜 동결보호제를 제거하였다. 원심분리 전 및 후에 세포 계수를 수행하였다 (도 11).
- [0093] 실시예 4: 세포 계수
- [0094] 위상차 현미경 하에서 개선된 Neubauer 혈구계수기(hemocytometer) 중 세포 계수에 의해 살아있는 세포 농도 및 생존력을 평가하였다. 100 μ l의 세포를 물 중 0.4%(w/v) 트리판 블루(Sigma, Poole, UK)로 1:1 희석시켰다. 슬라이드당 4개의 그리드(grid)로부터 세포를 계수하고, 세포 사망율을 10⁻⁴ ml의 단일 그리드 부피에 근거하여 계산하였다. 막 무결성(membrane integrity)에 근거하여 세포를 구별하기 위해 트리판 블루 배제(trypan blue exclusion)도 이용하였다. 따라서, 트리판 블루를 배제시킨 세포들은 살아있는 것으로 평가하고, 그렇지 않은 세포들은 죽은 것으로 평가하였다. 생존력(viability)은 전체 세포 집단의 살아있는 세포의 백분율로 표현하였다.
- [0095] 결과
- [0096] 도 9는 3일 동안 접을 수 있는 콘서티나 중 CHO 세포의 증식을 보여준다. 성장 곡선은 이러한 종류의 세포들에게 전형적인 것으로, 2일 차 후 지수 성장기에 들어가기 전 짧은 유도기(lag phase)를 보인다(도 9(a)). 3일 차에, 살아있는 세포 농도는 24.8 x 10⁵ 세포/ml에 도달했다. 3일 동안, 이는 세포 수의 8.2배 증가를 나타내고, 정상적인 진탕 플라스크에서 이러한 종류의 세포들에게 전형적이다. 회분 배양 내내, 생존력은 85%를 초과하게 유지되어, 시스템이 유의한 수준의 세포 사망을 유도하지 않는다는 것을 나타냈다(도 9(b)).
- [0097] 접을 수 있는 세포 배양 장치의 주요 장점 중 하나는 동일한 용기에서 세포를 세척하고 배양할 수 있는 능력이다. 이 능력을 입증하기 위해, 세포의 현탁액을 전통적인 원심분리용 튜브를 사용하는 표준 조건(1000 rpm, 5분)에서 콘서티나 하우징에서 원심분리시켰다. 검사시, 조밀한 펠렛(compact pellet)이 콘서티나의 기부부의 중심에 형성되었다. 상층액을 제거하는 최상의 방법은 용기를 뒤집고 완전히 압축될 때까지 콘서티나를 짜서, 액체를 아래에 있는 폐기물 용기로 뽑아내는 것이라는 것을 확인하였다. 이 작업 후에, 세포들은 신선한 배지를 첨가하고, 볼텍스 벤치 믹서를 이용하여 볼텍싱하는 것에 의해 용이하게 재현탁시킬 수 있었다. 도 10에 도시된 바와 같이, 방법은 매우 효율적이었다.
- [0098] 접종 전에, 총 673 x 10⁵ 개의 세포였고, 원심분리 및 재현탁 후에, 본 발명자들은 670 x 10⁵ 개의 세포를 회수했고, 이 둘 간에 통계적으로 유의성 있는 차이는 없는 것으로 확인했다. 이러한 결과는 이 접을 수 있는 장치가 세포 세척을 위해 매우 효율적이라는 것을 보여준다. 세포가 굴곡(ridge)에 남을 것이라는 초기의 우려가 있었으나, 그렇지 않았다. 생존력은 99%를 초과하는 상태로 남아서, 굴곡이 원심분리 과정 동안 세포 사망을 유도하지 않았다는 것을 나타냈다.
- [0099] 최종적으로, 본 발명의 장치는 순서대로 전통적인 세포 배양에서 이용되는 모든 단계들을 이용할 수 있다는 것이 입증되었다(도 11(a)). 이전과 같이, 세포가 예상한 바와 같이 증식되고, 세포 증식 1일 후에 90% 후반대(high 90s)의 생존력을 갖는 세포 수의 57% 증가가 있었다(도 11(b) 및 11(c)). 세포를 전술된 원심분리 방법을 이용하여 동결보존 배지에 재현탁시키고 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 직접 배치했다. 24시간 후에, 세포를 해동시키고 계수하여 살아있는 세포 수의 53% 감소를 밝혔다. 생존력도 69%까지 감소했다. 이러한 손실은 비제어 동결 기법(uncontrolled freezing technique)에 의해 예상되었었다. 속도 제어 동결(controlled rate freezing)이 포유 동물 세포의 동결보존 동안 생존력의 유지에 필수적인 것이고, 본 발명자들은 그러한 시스템이 접을 수 있는 용기에 적용되어, 보다 높은 살아있는 세포 수 및 생존력을 가져올 것으로 고려한다. 중요하게도, 신선한 배지 중 세포의 재현탁시 살아있는 세포 수 또는 생존력의 추가적인 감소가 없어서, 세척 과정이 신선하고 최근에 해동

된 세포 모두에 적용될 수 있다는 것을 보여주었다.

[0100] **결론**

[0101] 이 용기는 세포가 단일 용기를 벗어나지 않으면서, 순서대로 프로세스 단계의 전체 사슬을 위해 성공적으로 이용되었다. 진탕 플라스크로서 적용된 경우 세포는 예상한 대로 증식했고 동일한 장치가 세포의 원심분리 및 재현탁을 위해 효과적인 것으로 입증되었다. 동결 단계 동안 온도 조절의 부재에 의한 것일 수 있으나, 동결보존 단계 동안 일부 세포 사망이 관찰되었다. 이러한 실험은 단일 장치가 포유동물 세포의 배양 및 보존에 관련된 모든 단계에서 사용될 수 있다는 것을 보여준다.

부호의 설명

[0102] 8: 벽 요소

10, 50: 세포 배양 용기

12, 52: 기부 섹션

14, 54, 58: 상부 섹션

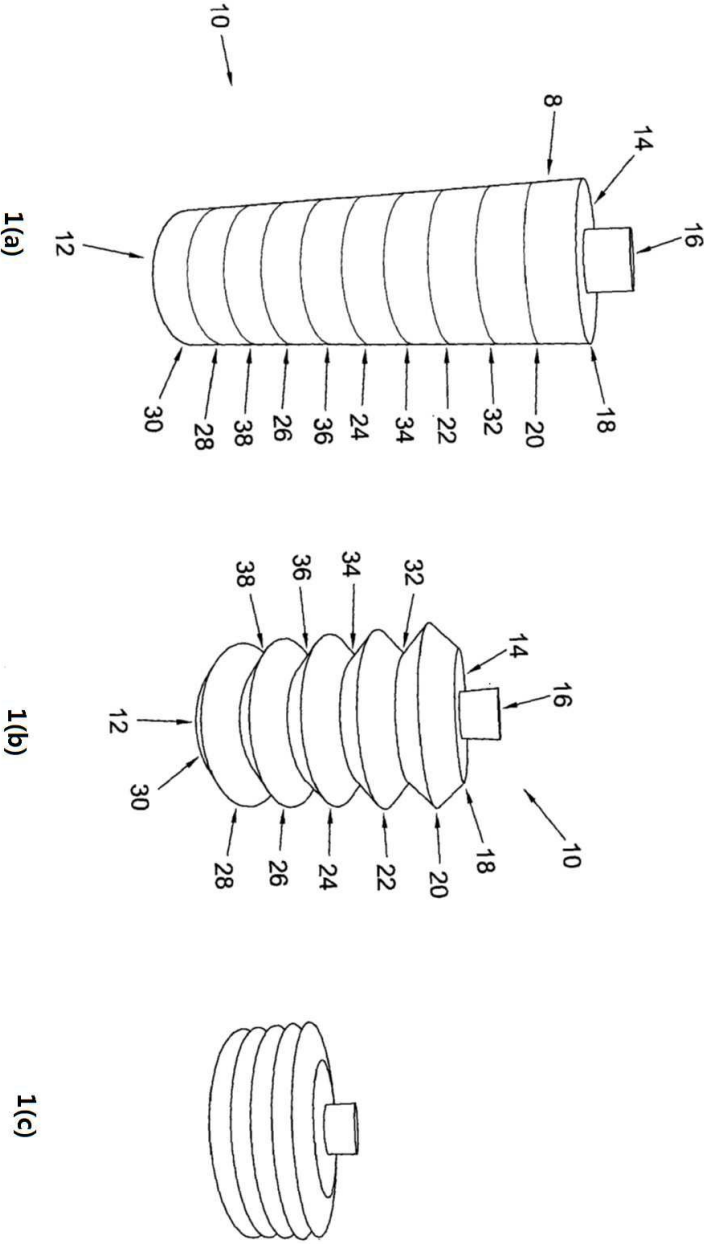
16, 56: 유입구

18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 60, 62, 64, 66, 68, 및 70: 측면 경질 섹션

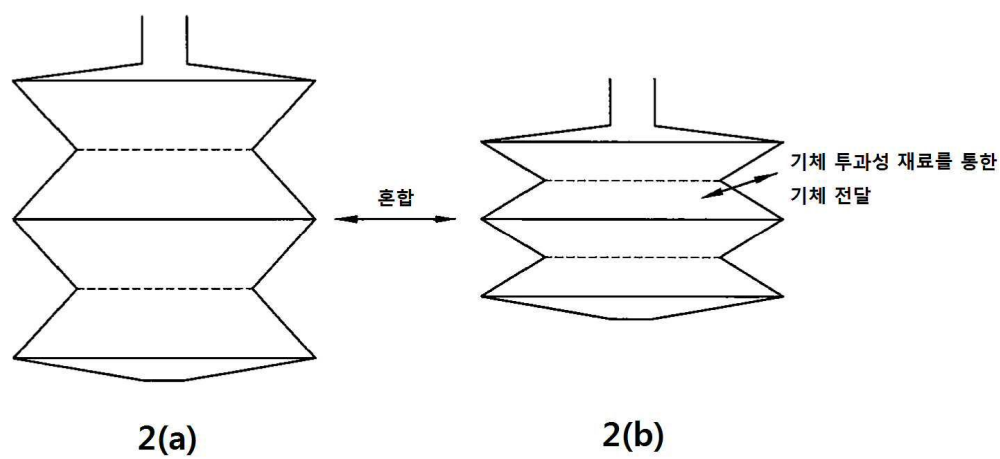
32, 34, 36, 38, 72, 74, 76, 78, 80: 변형가능한 영역(deformable region)

도면

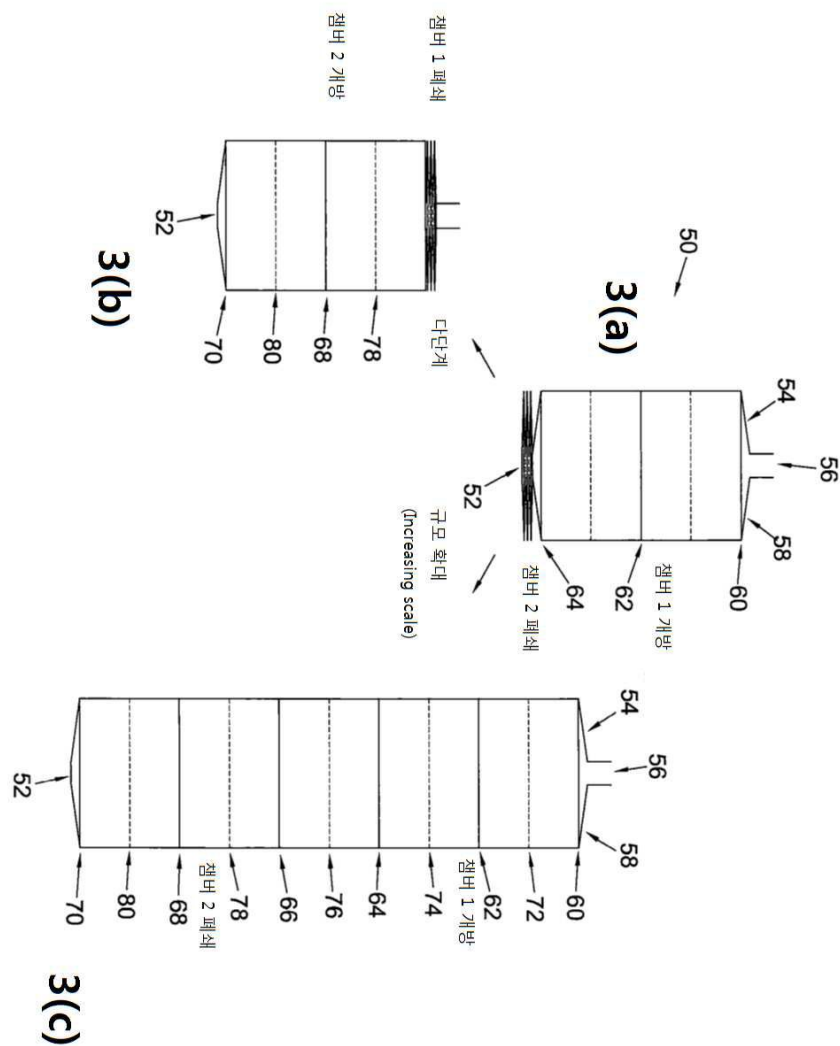
도면1



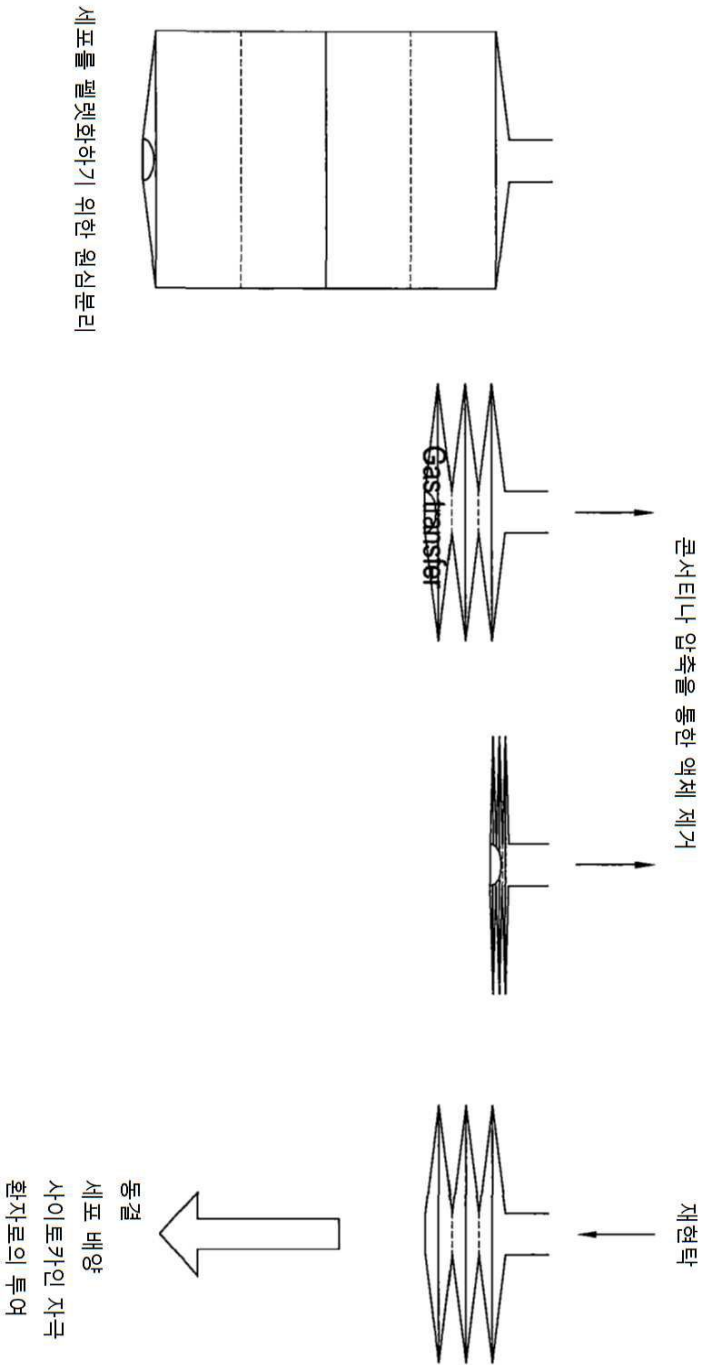
도면2



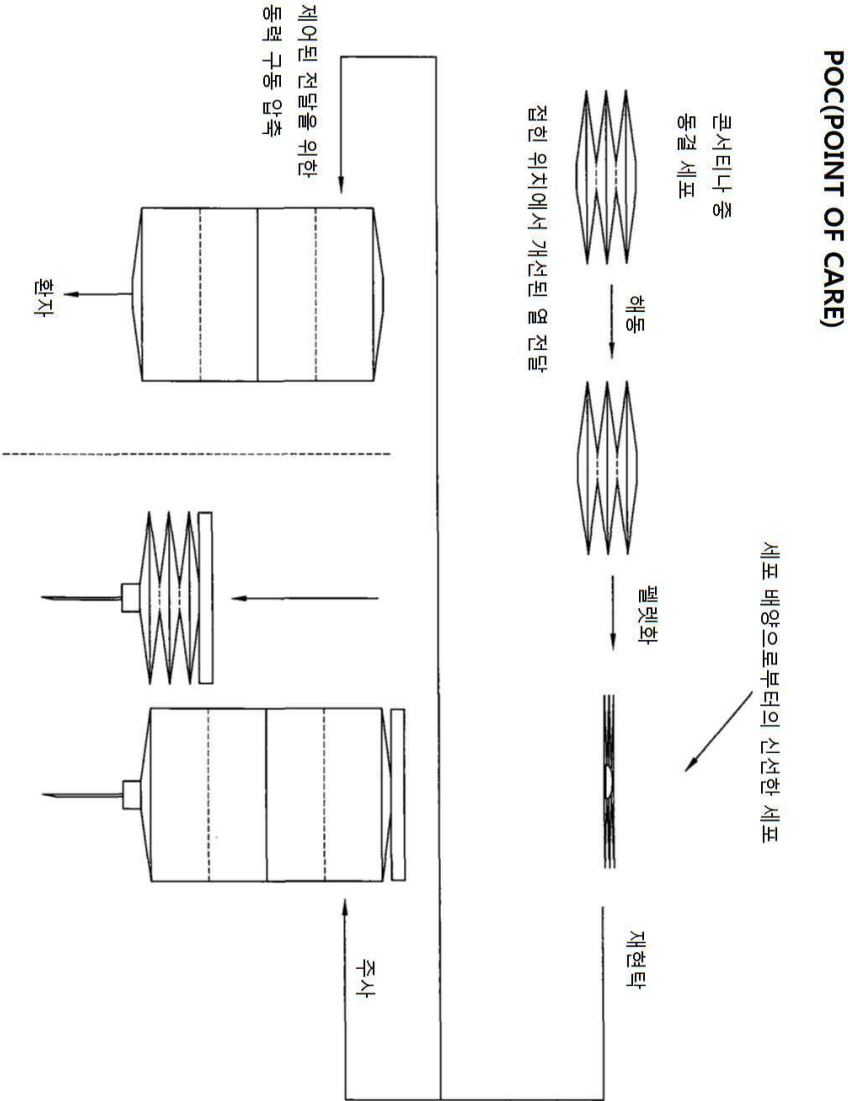
도면3



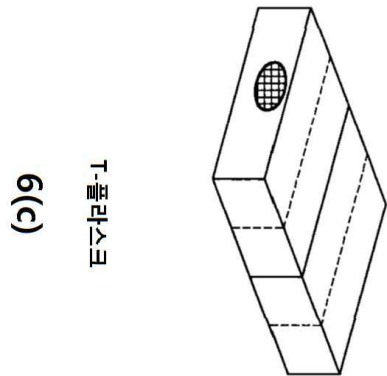
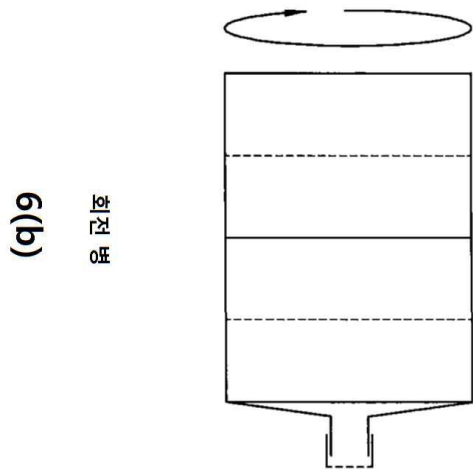
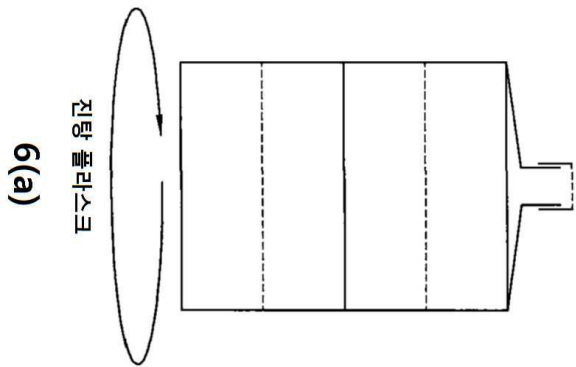
도면4



도면5

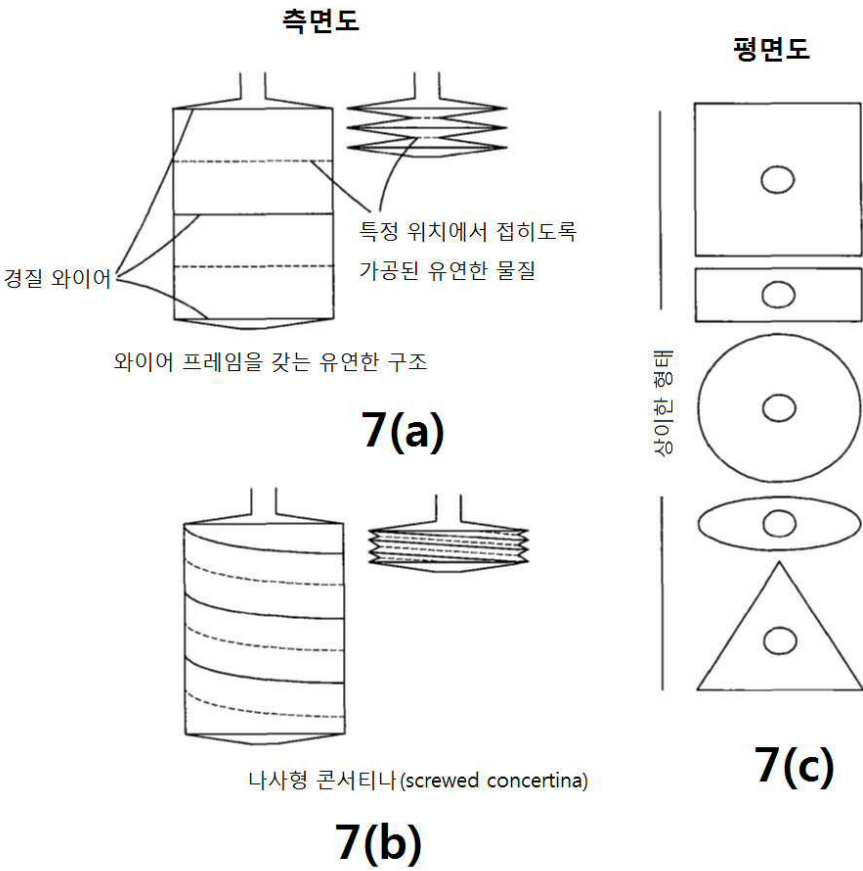


도면6

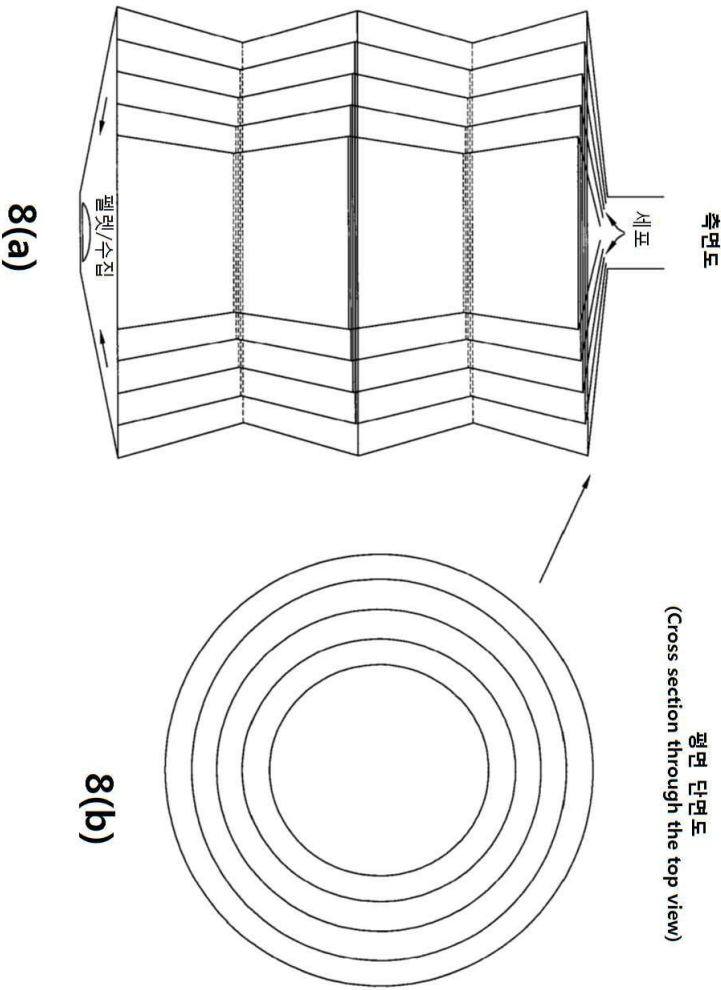


도면7

대안적 구성(Alternative Configurations)

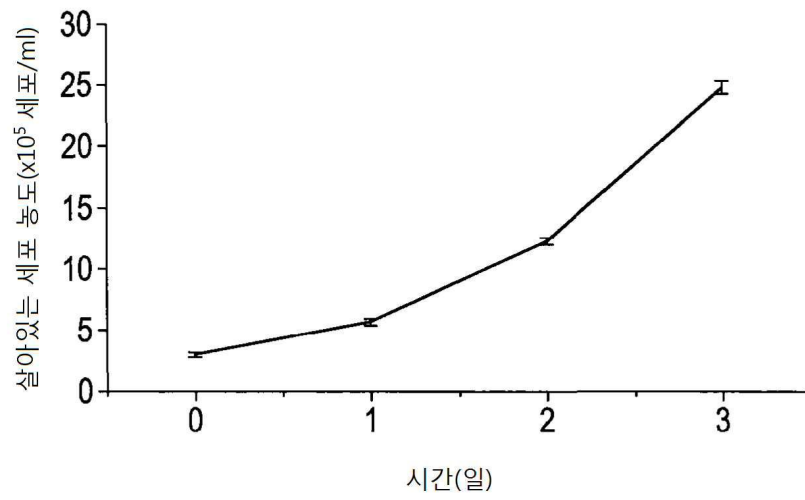


도면8

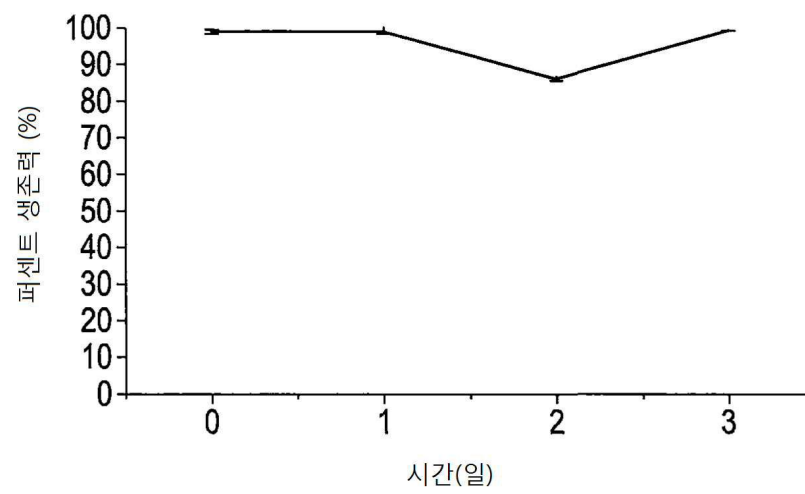


도면9

9(a)

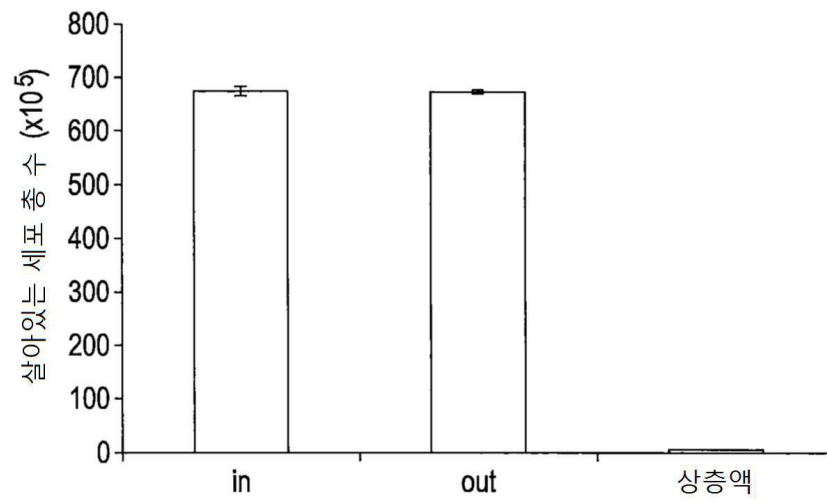


9(b)

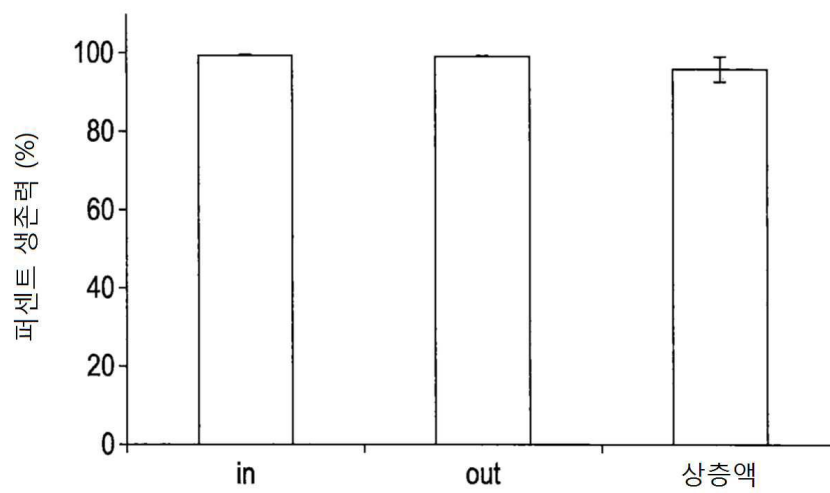


도면10

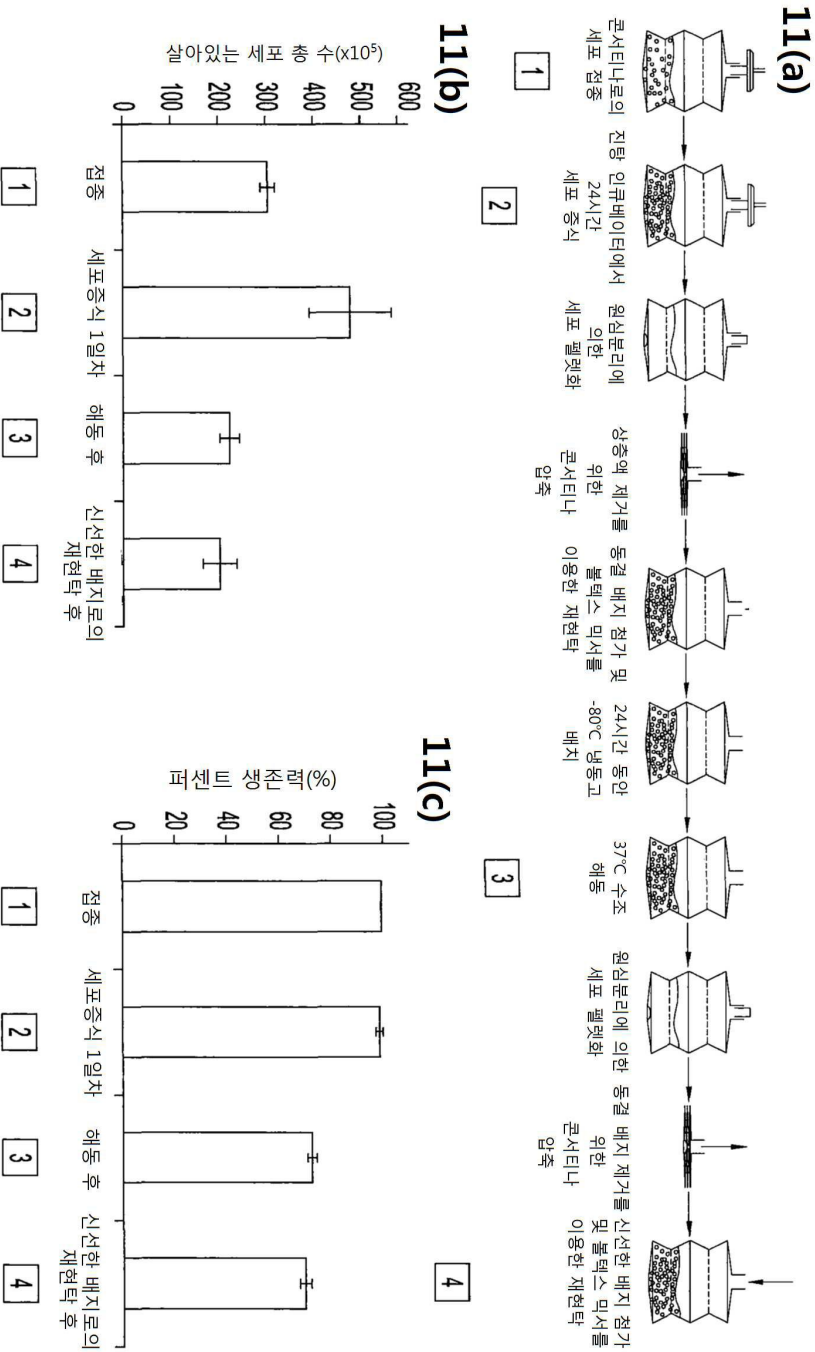
10(a)



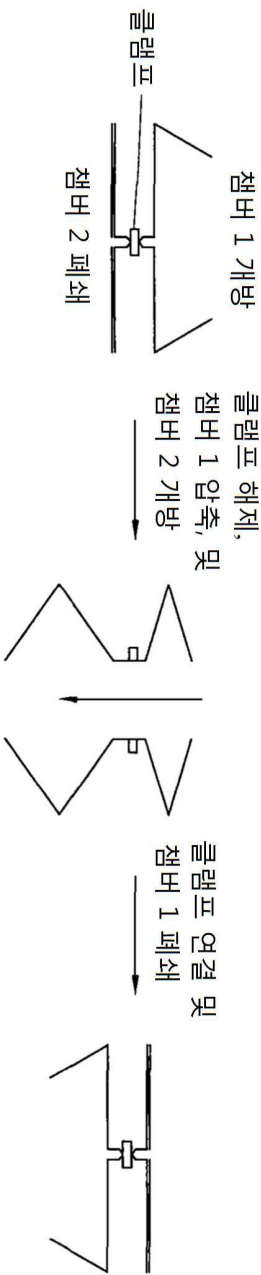
10(b)



도면11

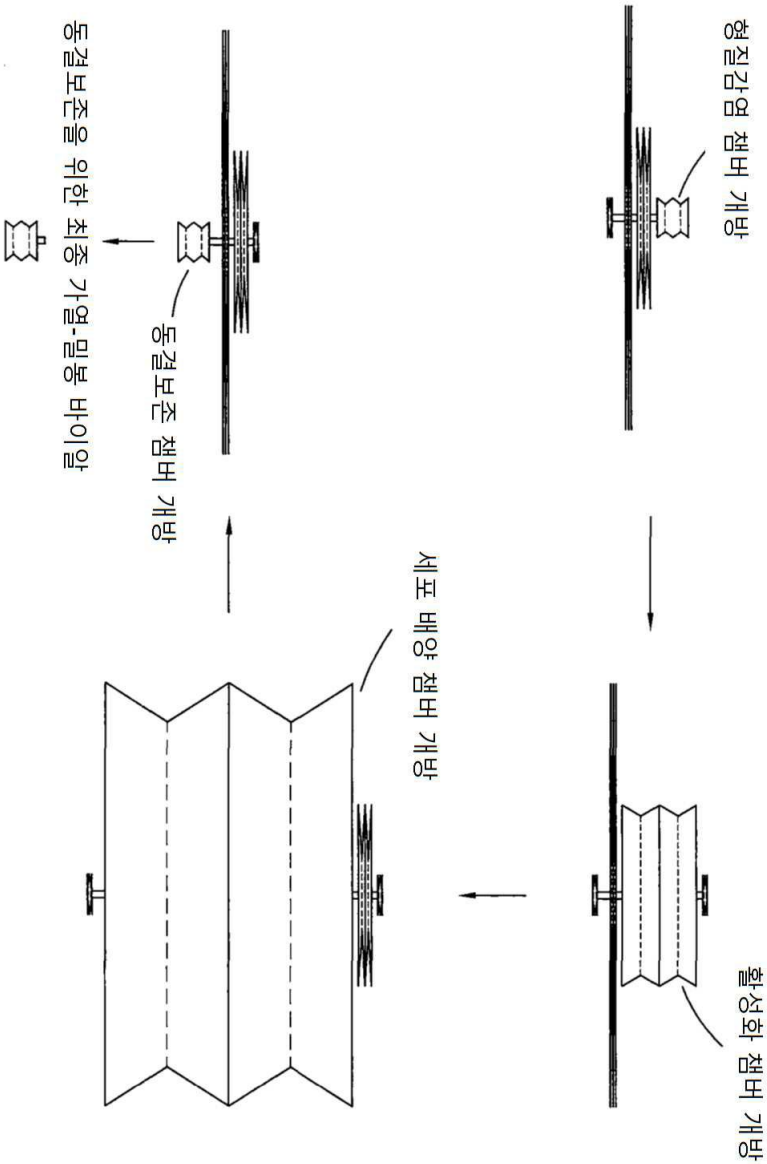


도면12



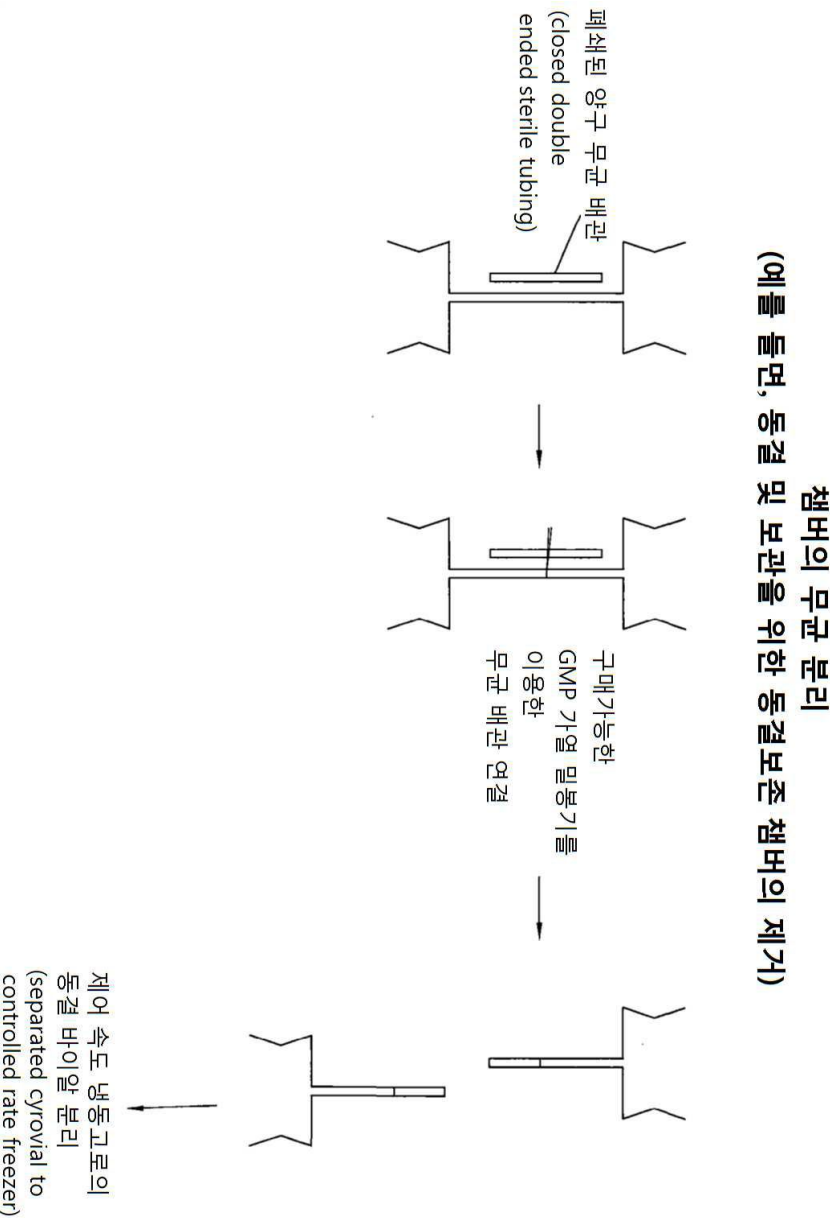
하나의 챔버로부터 다음 챔버로의 물질의 폐쇄 시스템 전달

단일 폐쇄 챔버 장치에서 다-단계 처리의 예(예를 들면, CAR-T 제조)



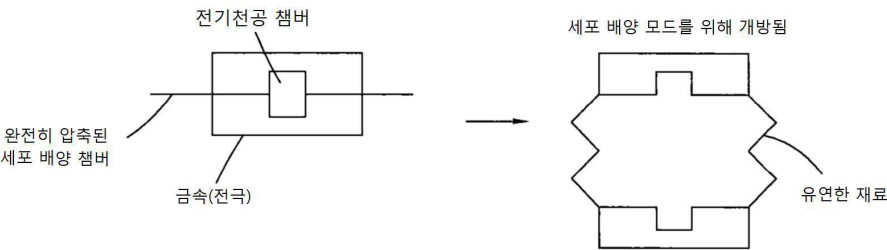
도면13

도면14



도면15

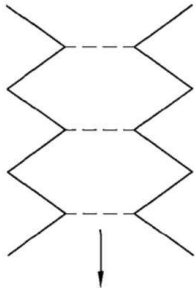
더 큰 세포 배양 용기를 형성하기 위해 확장될 수 있는,
전기전공 챔버를 형성하기 위한 금속 상부 및 하부 플레이트



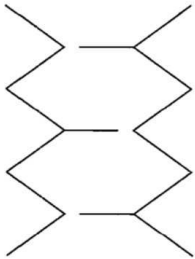
도면16

표면적 증가 및 내부 플레이트에 의한 혼합

천공 플레이트



배플



횡단면 옵션은 하기를 포함함

