



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113330106 A

(43) 申请公布日 2021.08.31

(21) 申请号 201980089612.3

(22) 申请日 2019.12.11

(30) 优先权数据

62/778,078 2018.12.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/065731 2019.12.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/123655 EN 2020.06.18

(71) 申请人 隆萨沃克斯维尔股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 E·麦卡菲 Y·施 S·班达帕里

E·亚伯拉罕

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240

代理人 金辉

(51) Int.Cl.

G12M 3/06 (2006.01)

G12N 5/0781 (2006.01)

G12N 5/0783 (2006.01)

G12N 5/0786 (2006.01)

G12N 5/0787 (2006.01)

G12N 5/0789 (2006.01)

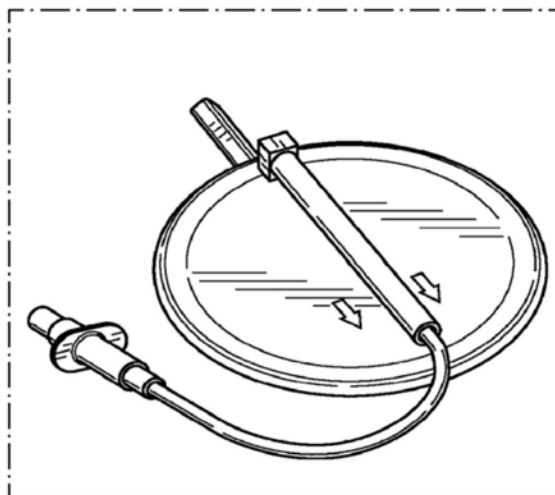
权利要求书3页 说明书20页 附图17页

(54) 发明名称

用于在自动化生物反应器中使用的细胞分离

(57) 摘要

本公开提供了用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包含用于捕获靶细胞群以进行自动化处理的细胞分离过滤器。本公开还提供了分离靶细胞群的方法,以及使用所述盒并且用于执行所述方法的自动化细胞工程系统。



1. 一种用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包括:
 - (a) 细胞样品输入;
 - (b) 细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入;
 - (c) 细胞培养室,所述细胞培养室流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及
 - (d) 细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室,其中所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。
2. 根据权利要求1所述的盒,其中所述细胞分离过滤器包含捕获细胞群的基质。
3. 根据权利要求2所述的盒,其中所述基质捕获靶细胞。
4. 根据权利要求1到3中任一项所述的盒,其进一步包括在所述细胞分离过滤器之后的废物收集室。
5. 根据权利要求1到4中任一项所述的盒,其进一步包括细胞清洗系统,所述细胞清洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器。
6. 根据权利要求1到5中任一项所述的盒,其进一步包括反向冲洗系统,所述反向冲洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器,以及任选地靶细胞群保持室,所述靶细胞群保持室位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。
7. 根据权利要求1到6中任一项所述的盒,其进一步包括一个或多个流体通路,其中所述流体通路提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物质向所述细胞培养室的分配,而不干扰所述细胞培养室内的细胞。
8. 根据权利要求1到7中任一项所述的盒,其中所述细胞培养室是扁平且非柔性的室,室高度低。
9. 根据权利要求1到8中任一项所述的盒,其中所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反向冲洗介质。
10. 根据权利要求9所述的盒,其中所述反向冲洗介质含有抗凝剂。
11. 根据权利要求1到10中任一项所述的盒,其进一步包括pH传感器、葡萄糖传感器、氧传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器中的一个或多个。
12. 根据权利要求1到11中任一项所述的盒,其进一步包括一个或多个采样端口。
13. 一种用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包括:
 - (a) 细胞样品输入;
 - (b) 细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入,所述细胞分离过滤器包含捕获免疫细胞的基质;
 - (c) 细胞培养室,所述细胞培养室用于进行所述免疫细胞的活化、转导和/或扩增,所述细胞培养室具有被配置成容纳所述免疫细胞的室容积;
 - (d) 反向冲洗系统,所述反向冲洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及
 - (e) 细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室,其中所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。
14. 根据权利要求13所述的盒,其进一步包括细胞清洗系统,所述细胞清洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器。
15. 根据权利要求13到14中任一项所述的盒,其进一步包括一个或多个流体通路,所述一个或多个流体通路连接到所述细胞培养室,其中所述流体通路提供再循环、废物去除和

均质气体交换以及营养物向所述细胞培养室的分配,而不干扰所述细胞培养室内的免疫细胞。

16. 根据权利要求13到15中任一项所述的盒,其进一步包括在所述细胞分离过滤器之后的废物收集室。

17. 根据权利要求13到16中任一项所述的盒,其进一步包括免疫细胞保持室,所述免疫细胞保持室位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。

18. 根据权利要求13到17中任一项所述的盒,其中所述细胞培养室是扁平且非柔性的室,室高度低。

19. 根据权利要求13到18中任一项所述的盒,其中所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反向冲洗介质。

20. 根据权利要求13到19中任一项所述的盒,其中所述流体通路中的一个或多个流体通路包括硅基管组件,所述硅基管组件允许通过所述管组件进行氧合。

21. 一种制备用于自动化处理的靶细胞群的方法,所述方法包括:

- (a) 将含有所述靶细胞群的细胞样品引入到自动化细胞工程系统的盒中;
- (b) 使所述细胞样品穿过细胞分离过滤器;
- (c) 从所述细胞样品中将所述靶细胞群捕获到所述细胞分离过滤器的基质上;
- (d) 对所述细胞分离过滤器进行反向冲洗;以及

(e) 从所述细胞分离过滤器中转移所述靶细胞群,使得所述靶细胞群能够经受自动化处理。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述转移包括将所述靶细胞群转移到靶细胞群保持室、转导系统、用于转染的系统或细胞培养室,使得所述靶细胞群能够经受自动化处理。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述转导系统是电穿孔系统。

24. 根据权利要求21到23中任一项所述的方法,其进一步包括在所述反向冲洗之前,在所述细胞分离过滤器上清洗所捕获的靶细胞群。

25. 根据权利要求21到24中任一项所述的方法,其进一步包括使来自所述细胞样品的不想要的废物穿过所述细胞分离过滤器并进入废物收集室中。

26. 根据权利要求21到25中任一项所述的方法,其中所述使所述细胞样品穿过所述细胞分离过滤器通过重力过滤发生。

27. 根据权利要求21到26中任一项所述的方法,其中所述方法不包括在从所述细胞分离过滤器转移所述靶细胞群之后进行离心。

28. 根据权利要求21到26中任一项所述的方法,其进一步包括在所述自动化处理之后从所述盒中收集所述靶细胞群。

29. 一种自动化细胞工程系统,其包括:

- (a) 可封闭壳体;
- (b) 包含在所述可封闭壳体内部的盒,所述盒包括:
 - i. 细胞样品输入;
 - ii. 细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入;
 - iii. 细胞培养室,所述细胞培养室流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及

iv. 细胞样品输出, 所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室, 其中所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机; 以及

(c) 用于从用户接收输入的用户接口。

30. 根据权利要求29所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒的所述细胞分离过滤器包含捕获细胞群的基质。

31. 根据权利要求30所述的自动化细胞工程系统, 其中所述基质捕获靶细胞。

32. 根据权利要求29到31中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒进一步包括在所述细胞分离过滤器之后的废物收集室。

33. 根据权利要求29到32中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒进一步包括细胞清洗系统, 所述细胞清洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器。

34. 根据权利要求29到33中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒进一步包括反向冲洗系统, 所述反向冲洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器, 以及任选地靶细胞群保持室, 所述靶细胞群保持室位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。

35. 根据权利要求29到34中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒进一步包括一个或多个流体通路, 其中所述流体通路提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物质向所述细胞培养室的分配, 而不干扰所述细胞培养室内的细胞。

36. 根据权利要求29到35中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒的所述细胞培养室是扁平且非柔性的室, 室高度低。

37. 根据权利要求29到35中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒的所述细胞培养室是袋或硬室。

38. 根据权利要求29到37中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反向冲洗介质。

39. 根据权利要求38所述的自动化细胞工程系统, 其中所述反向冲洗介质含有抗凝剂。

40. 根据权利要求29到39中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒进一步包括pH传感器、葡萄糖传感器、氧传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器中的一个或多个。

41. 根据权利要求29到40中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其中所述盒进一步包括一个或多个采样端口。

42. 根据权利要求29到41中任一项所述的自动化细胞工程系统, 其进一步包括计算机控制系统, 其中用户接口联接到所述计算机控制系统以向所述自动化细胞工程系统提供指令。

用于在自动化生物反应器中使用的细胞分离

技术领域

[0001] 本公开提供了用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包含用于捕获靶细胞群以进行自动化处理的细胞分离过滤器。本公开还提供了分离靶细胞群的方法,以及可以利用所述盒并且执行所述方法的自动化细胞工程系统。

背景技术

[0002] 由于预期建立对先进细胞疗法的加速临床采用,因此更多的注意力转向将使这些疗法惠及全世界患者的基础制造策略。虽然细胞疗法在临床上拥有广阔的前景,但相对于偿付的高制造成本是商业化的巨大障碍。因此,对成本效益、过程效率和产品一致性的需求正在推动众多细胞疗法领域中针对自动化的努力。

[0003] 生产用于疗法的细胞群涉及各种过程的自动化。这包含将细胞活化、转导和扩增整合到商业制造平台中,以将这些重要的疗法转化为面向广泛的患者群体。

[0004] 此外,高度期望在自动化细胞处理平台中限制细胞群暴露于外部环境的次数或步骤数以限制污染和其它问题。所需要的是一种可以将细胞样品直接提供给自动化系统的方法,其中在自动化系统内进行任何细胞分离或细胞过滤,并且因此在细胞暴露于环境时的步骤总数可以潜在地仅限于引入和在各种自动化过程之后进行收集。

发明内容

[0005] 在一些实施例中,本文提供了一种用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包括:细胞样品输入;细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入;细胞培养室,所述细胞培养室流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室。适当地,所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。

[0006] 在另外的实施例中,一种用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包括:细胞样品输入;细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入,所述细胞分离过滤器包含捕获免疫细胞的基质;细胞培养室,所述细胞培养室用于进行所述免疫细胞的活化、转导和/或扩增,所述细胞培养室具有被配置成容纳所述免疫细胞的室容积;反向冲洗系统,所述反向冲洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室。适当地,所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。

[0007] 在另外的实施例中,本文提供了一种制备用于自动化处理的靶细胞群的方法,所述方法包括:将含有所述靶细胞群的细胞样品引入到自动化细胞工程系统的盒中;使所述细胞样品穿过细胞分离过滤器;从所述细胞样品中将所述靶细胞群捕获到所述细胞分离过滤器的基质上;对所述细胞分离过滤器进行反向冲洗;以及从所述细胞分离过滤器中转移所述靶细胞群,使得所述靶细胞群可以经受自动化处理。

[0008] 本文还提供了一种自动化细胞工程系统,其包括可封闭壳体、包含在所述可封闭

壳体内部的盒以及用于从用户接收输入的用户接口,所述盒包括:细胞样品输入;细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入;细胞培养室,所述细胞培养室流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室,其中所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。

附图说明

[0009] 图1示出了可以用如本文的实施例中描述的自动化细胞工程系统的盒执行的各种步骤。

[0010] 图2A示出了根据本文的实施例的示例性盒。

[0011] 图2B和2C示出了根据本文的实施例的示例性细胞分离过滤器。

[0012] 图3A和3B示出了根据本文的实施例的自动化细胞工程系统的图像。

[0013] 图4示出了含有如本文实施例中描述的示例性细胞工程系统的实验室空间。

[0014] 图5示出了用于在如本文的实施例中描述的自动化细胞工程系统中进行细胞分离(separation)和分离(isolation)的流动路径。

[0015] 图6A示出了通过全血细胞分离菲柯尔(Ficoll)和细胞分离过滤方法分离白细胞后供体1细胞活力(%)的比较。

[0016] 图6B示出了全血菲柯尔和细胞分离过滤处理后供体1总细胞产率的比较。

[0017] 图7A示出了在通过菲柯尔和过滤方法处理全血后11天培养期间的总细胞产率。

[0018] 图7B示出了通过菲柯尔和过滤处理全血后一式两份T-25烧瓶培养物的平均培养物活力(%)。

[0019] 图8A示出了通过全血细胞分离菲柯尔和过滤方法分离白细胞后供体2细胞活力(%)的比较。

[0020] 图8B示出了全血菲柯尔和过滤处理后供体2总细胞产率的比较。

[0021] 图9A示出了通过菲柯尔和过滤方法分离白细胞后Leukopak供体细胞活力(%)的比较。

[0022] 图9B示出了全血菲柯尔和过滤处理后Leukopak供体总细胞产率的比较。

[0023] 图10示出了FACS分析的门控策略。

[0024] 图11示出了来自供体1过滤的和菲柯尔分离的全血收集样品的CD3+CD4+和CD3+CD8+T细胞的百分比。

[0025] 图12示出了来自供体2过滤的和菲柯尔分离的全血收集样品的CD3+CD4+和CD3+CD8+T细胞的百分比。

[0026] 图13示出了来自过滤的和菲柯尔分离的Leukopak收集样品的CD3+CD4+和CD3+CD8+T细胞的百分比。

具体实施方式

[0027] 应当理解,本文中示出和描述的特定实施方式是实例并且不旨在以任何方式在其它方面限制本申请的范围。

[0028] 本文所提及的公开专利、专利申请、网站、公司名称和科学文献在此以全文引用的方式并入,并入程度如同各自被确切地且单独地指出通过引用而并入。本文所引用的任何

参考文献与本说明书的具体教导之间的任何冲突应以有利于后者的方式解决。同样,本领域理解的词或词组的定义与本说明书中具体教导的词或词组的定义之间的任何冲突应以有利于后者的方式解决。

[0029] 如本说明书中所使用的,除非上下文另外明确说明,否则单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”具体地也涵盖其所指的术语的复数形式。本文所使用的术语“约”是指大约、在某一范围内、大致上或周围。当结合数值范围使用术语“约”时,所述术语通过扩展所阐述的数值以上和以下的界限来修改所述范围。术语“约”通常在本文中用于将数值在所述值以上和以下修改20%的变化。

[0030] 本文所使用的技术术语和科学术语具有本领域的技术人员对本申请所涉及的技术通常理解的含义,除非另有定义。本文中参考了本领域技术人员已知的各种方法和材料。

[0031] 在实施例中,本文提供了用于在自动化细胞工程系统中使用的盒。图1示出了示例性盒102,其中可以在允许生产各种细胞样品和细胞群的封闭式自动化系统中执行各种过程。此类过程可以包含活化、转导、扩展、浓缩和收集/采集步骤。

[0032] 如本文所描述的,所述盒和方法在全封闭式自动化细胞工程系统300(参见图3A、3B)中适当地被利用和执行,所述全封闭式自动化细胞工程系统上适当地具有用于执行如活化、转导、扩增、浓缩和采集等步骤的指令。在于2018年8月31日提交的美国专利申请第16/119,618号(其公开内容以全文引用的方式并入本文中)中描述了用于自动化生产例如基因修饰的免疫细胞(包含CAR T细胞)的细胞工程系统,并且所述细胞工程系统在本文中也被称为自动化细胞工程系统、COCOON或COCOON系统。

[0033] 例如,用户可以提供预填充有细胞培养物和试剂(例如,活化试剂、载体、细胞培养基、营养物、选择试剂等)和用于细胞生产的参数(例如,细胞的起始数量、培养基的类型、活化试剂的类型、载体的类型、细胞的数量或要生产的剂量等)的自动化细胞工程系统,所述自动化细胞工程系统能够执行各种自动化方法,包含在无需来自用户的进一步输入的情况下生产基因修饰的免疫细胞培养物(包含CAR T细胞)的方法。在一些实施例中,全封闭式自动化细胞工程系统通过减少细胞培养物对非无菌环境的暴露来最小化细胞培养物的污染。在另外的实施例中,全封闭式自动化细胞工程系统通过减少用户对细胞的处理来最小化细胞培养物的污染。

[0034] 如本文所描述的,自动化细胞工程系统300适当地包含盒102。因此,在实施例中,本文提供了用于在自动化细胞工程系统中使用的盒。如本文所使用的,“盒”是指自动化细胞工程系统的主要独立的、可移除且可替换的元件,所述盒包含用于执行本文所描述的方法的各种元件的一个或多个室,并且适当地还包含细胞培养基、活化试剂、清洗培养基等中的一种或多种。

[0035] 图2A示出了用于在自动化细胞工程系统中使用的示例性盒102。在实施例中,盒102包含细胞样品输入202。细胞样品输入202在图2A中示出为小瓶或室,在引入或装载到盒102中之前,可以将细胞样品放置在所述小瓶或室中。在其它实施例中,细胞样品输入202可以简单地是无菌锁定管(例如,鲁尔(luer)锁管连接等),注射器或如血袋等含有细胞的袋可以连接到所述无菌锁定管。

[0036] 盒102进一步包含细胞分离过滤器204,所述细胞分离过滤器位于所述盒内并且流体地连接到细胞样本输入202。如本文所使用的,“流体地连接”意指系统的一个或多个组件

(包含盒102)通过合适的元件连接,所述元件允许流体(包含气体和液体)在组件之间通过,而不会泄漏或损失体积。示例性流体连接包含本领域已知的各种管、通道和连接,如硅酮或橡胶管、鲁尔锁连接等。应当理解,流体地连接的组件还可以包含在所述组件中的每个组件之间的另外的元件,同时仍然维持流体连接。也就是说,流体地连接的组件可以包含另外的元件,使得在组件之间通过的流体也可以穿过这些另外的元件,但不要求这样做。

[0037] 盒102适当地进一步包含细胞培养室206,所述细胞培养室流体地连接到细胞分离过滤器。本文描述了细胞培养室206的特性和用途的实例。

[0038] 在实施例中,盒102进一步包含连接到细胞培养室的一个或多个流体通路(参见图2A中的盒102内部)。盒102中还包含流体地连接到细胞培养室的细胞样品输出208。如本文所描述的,细胞样品输出208用于按照各种自动化程序采集细胞以用于进一步处理、储存或在患者中的潜在用途。如本文所描述的,流体通路的实例包含向盒的元件提供营养物、溶液等的各种管、通道、毛细管、微流体元件等。

[0039] 如本文所描述的,盒102明确地在细胞分离过滤器204之后不包括离心机。“在细胞分离过滤器之后”包含其中在细胞分离过滤器的下游或从细胞分离过滤器反向冲洗的下游不包含离心机的实施例。已经确定,通过使用本文所描述的各种细胞分离过滤器和方法,不需要通过离心程序和使用离心机进行另外的细胞分离。然而,在实施例中,可以利用另外的过滤系统,如柱过滤、切向流过滤和/或磁过滤系统。

[0040] 在示例性实施例中,细胞分离过滤器204包含捕获细胞群,适当地靶细胞的基质。合适的基质材料包含已经用气体等离子体处理的各种多孔介质。多孔介质可以是天然或合成纤维或编织材料或烧结粉末材料。示例性基质材料包含例如在美国专利第4,701,267号、第4,936,998号、第4,880,548号、第4,923,620号、第4,925,572号和第5,679,264号中公开的基质材料,所述美国专利中的每个美国专利的公开内容以全文引用的方式并入本文中。如本文所使用的,“靶细胞群”或“靶细胞”是指要从更大的细胞群(包含从碎片或其它污染物)分离使得剩余的靶细胞群主要不含其它细胞类型的期望的细胞子集。示例性靶细胞群包含免疫细胞、癌细胞等。

[0041] 示例性细胞分离过滤器适当地包含允许捕获免疫细胞的基质,也就是说,所述基质将免疫细胞保留在基质上或基质内。如本文所使用的,“免疫细胞”包含嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、白细胞等,并且包含如肥大细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、B细胞、T细胞等细胞。如本文所描述的,盒和细胞分离过滤器适当地用于从细胞样品中分离免疫细胞,所述细胞样品包含全血细胞样品或白细胞去除术样品(其中白细胞与全血分离的样品)。

[0042] 图2B和2C示出了用于在本文所描述的盒和方法中使用的示例性细胞分离过滤器。图2B示出了用于回收的血液的白细胞过滤器(马萨诸塞州布伦特里美国血液技术公司(Haemonetics)),并且图2C示出了注射器过滤器(PALL ARCODISC®,纽约州华盛顿港颇尔实验室(PALL Laboratory))。

[0043] 在另外的实施例中,盒102适当地包含废物收集室510(包含在图2A中的盒102内),所述废物收集室在细胞分离过滤器204之后并且流体地连接到所述分离过滤器。图5中示出了废物收集室510在盒的流动路径内的示例性位置。废物收集室510适当地定位在后面或下游(即,在细胞分离过滤器之后流体地连接),使得穿过细胞分离过滤器的废物可以被保持

以供进一步处理或处置。可以适当地收集的废物包含不期望的细胞,无论是完整的还是裂解的,以及血液组分,以及正在被过滤的细胞样品内的可能的污染物。废物室510可以呈盒102内的固体室或袋的形式,或者可以是盒外部的袋或室,但通过流体路径(如管和采样端口)连接。

[0044] 在实施例中,盒102包含细胞清洗系统512,所述细胞清洗系统适当地包含在盒102内(即,在图2A所示的结构内)并且流体地连接到分离过滤器204。如图5所示,细胞清洗系统512可以连接到盒102的各种输入端口之一,以允许到分离过滤器204的直接流体路径。在实施例中,细胞清洗系统512是包含在盒内的适当地包含细胞清洗介质的容器或袋。在将靶细胞群从细胞分离过滤器转移到盒的另一部分之前,细胞清洗介质适当地用于清洁靶细胞群和分离过滤器并从靶细胞群中去除任何不期望的废细胞或污染物。细胞清洗系统512也可以包含在盒102的外部。在另外的实施例中,细胞清洗系统512可以用于清洗保持在靶细胞群保持室中的细胞。

[0045] 在另外的实施例中,盒102包含反向冲洗系统514(在图2中不可见,因为其适当地位于盒102内部),但在图5中示出为盒的流动路径的元件。像细胞清洗系统512那样,反向冲洗系统514适当地是包含在盒内的容器或袋,并且可以连接到盒102的各种输入端口中的一个或多个输入端口,以允许到分离过滤器204的直接流体路径。反向冲洗系统514也可以包含在盒的外部。反向冲洗系统514适当地流体地连接到分离过滤器204,其方式使得包含在反向冲洗系统内的反向冲洗介质可以以相反的方式被引入到细胞分离过滤器204中或上,以将由分离过滤器捕获的细胞从过滤器转移到盒的另一区段,包含如本文所描述的保持室或细胞培养室。

[0046] 盒102还可以进一步任选地包含位于细胞分离过滤器与细胞培养室之间的靶细胞群保持室516(在图2中不可见,因为其位于盒102内部)。图5示出了靶细胞群保持室516在盒的流动路径中的示例性位置。靶细胞群保持室516适当地是位于盒内的储器或合适的室,已经在分离过滤器204上将靶细胞群捕获到所述盒中,然后通过反向冲洗系统514进行反向冲洗以将所捕获的细胞转移到靶细胞群保持室516。

[0047] 如本文所描述的,可以包含各种管元件的流体通路适当地提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物向盒的各个部分(包含细胞培养室)的分配,而不干扰所述细胞培养室内的细胞。盒102还进一步包含用于驱动流体通过如本文所描述的盒的一个或多个泵520和相关管(包含蠕动泵)以及用于控制通过各种流体通路的流动的一个或多个阀522(参见图5中的流动路径内的示例性位置)。

[0048] 在示例性实施例中,如图2A所示,细胞培养室206是不容易弯曲或挠曲的扁平且非柔性的室(即,由如塑料等基本上非柔性的材料制成)。非柔性室的使用允许细胞维持在基本上不受干扰的状态。如图2A所示,细胞培养室206被定向成允许免疫细胞培养物扩散遍布细胞培养室的底部。如图2A所示,细胞培养室206适当地维持在与地面或桌子平行的位置,从而维持细胞培养物处于不受干扰的状态,允许细胞培养物扩散遍布细胞培养室底部的大面积。在实施例中,细胞培养室206的总厚度(即,室高度)较低,近似约0.5cm到约5cm。适当地,细胞培养室的容积介于约0.50ml与约300ml之间,更适当地介于约50ml与约200ml之间,或者细胞培养室的容积为约180ml。使用较低室高度(小于5cm,适当地小于4cm、小于3cm或小于2cm)允许在细胞附近进行有效的介质和气体交换。端口被配置成允许通过流体的再循

环进行混合而不干扰细胞。较大高度的静态器皿可以产生浓度梯度,从而使细胞附近区域的氧和新鲜营养物质受到限制。通过受控的流动动力学,可以在没有细胞干扰的情况下进行介质交换。可以从另外的室(不存在细胞)中去除介质而没有细胞损失的风险。在其它实施例中,细胞培养室206是袋或硬室。

[0049] 如本文所描述的,在示例性实施例中,盒预填充有细胞培养物、培养基、细胞清洗介质、反向冲洗介质、活化试剂和/或载体中的一种或多种,包含这些的任何组合。在另外的实施例中,这些不同要素可以稍后通过合适的注入端口等添加。在示例性实施例中,反向冲洗介质适当地含有抗凝剂,如乙二胺四乙酸(EDTA),以减少从分离过滤器转移的靶细胞群凝结。

[0050] 如本文所描述的,在实施例中,盒适当地进一步包含pH传感器524、葡萄糖传感器(未示出)、氧传感器526、二氧化碳传感器(未示出)、乳酸传感器/监测器(未示出)和/或光密度传感器(未示出)中的一个或多个。参见图5了解流动路径内的示例性位置。盒也可以包含一个或多个采样端口和/或注入端口。此类采样端口220和注入端口(222)的实例展示于图2A中,并且流动路径中的示例性位置示出于图5中,并且可以包含用于将盒连接到外部装置(如电穿孔单元或另外的介质源)的接入端口。图2A还示出了细胞样品输入202、可以用于温热细胞培养基等的试剂温热袋224和二级室230的位置。

[0051] 在实施例中,盒102适当地包含低温室以及高温室,所述低温室可以包含适当地用于储存细胞培养基的冷藏区226,所述高温室适当地用于进行细胞培养物的活化、转导、转染和/或扩增。适当地,高温室通过热屏障与低温室间隔开。如本文所使用的,“低温室”是指适当地维持在室温以下并且更适当地维持在约4°C到约8°C以将细胞培养基等维持在冷藏温度下的室。低温室可以包含用于介质的袋或其它保持器,包含约1L、约2L、约3L、约4L或约5L的流体。另外的介质袋或其它流体源可以在外部连接到盒,并且通过接入端口连接到盒。

[0052] 如本文所使用的,“高温室”是指适当地维持在室温以上,并且更适当地维持在允许细胞增殖和生长的温度(即,介于约35°C-40°C之间)并且更适当地约37°C的室。在实施例中,高温室适当地包含细胞培养室206(也被称为增殖室或细胞增殖室)。

[0053] 图3A-3B示出了COCOON自动化细胞工程系统300,其中盒102位于内部(在图3B中,自动化细胞工程系统的盖子打开)。还示出了示例性用户接口,所述示例性用户接口可以包含条形码阅读器以及通过触摸板或其它类似装置使用输入来接收的能力。

[0054] 本文所描述的自动化细胞工程系统和盒适当地具有三个相关容积:细胞培养室容积、工作容积和总容积。适当地,基于过程步骤,盒中使用的工作容积的范围为180mL到460mL,并且可以增加至约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL或约1L。在实施例中,盒可以容易地实现 4×10^9 个细胞- 10×10^9 个细胞。过程期间的细胞浓度在 0.3×10^6 个细胞/ml到大约 10×10^6 个细胞/ml之间变化。如本文所描述的,细胞位于细胞培养室中,但培养基连续地再循环通过另外的室(例如,错流储器和卫星容积)以增加工作容积。

[0055] 流体通路(包含气体交换管线)可以由透气材料(例如,硅酮)制成。在一些实施例中,在细胞生产方法期间,自动化细胞工程系统使氧气在整个基本上不屈服的室中再循环。因此,在一些实施例中,自动化细胞工程系统中的细胞培养物的氧气水平高于柔性透气袋中的细胞培养物的氧气水平。在细胞培养扩增步骤中,更高的氧气水平可能是重要的,因为增加的氧气水平可以支持增加的细胞生长和增殖。

[0056] 在实施例中,本文所描述的方法和盒利用COCOON平台(傲克生物技术公司(Octane Biotech)(金斯顿,安大略省)),所述平台将多个单元操作整合在单个统包平台中。向多个细胞方案提供了非常具体的细胞处理目标。为了提供高效且有效的自动化转译,所描述的方法利用结合多个单元操作的应用特定/赞助商特定一次性盒的概念,所有这些都集中在最终细胞疗法产品的核心要求上。多个自动化细胞工程系统300可以一起整合到大型多单元操作中,以为个体患者生产大量细胞或多个不同的细胞样品(参见图4)。

[0057] 在另外的实施例中,本文提供了用于在自动化细胞工程系统300中使用的盒102。适当地,所述盒包含细胞样品输入202、流体地连接到所述细胞样品输入的细胞分离过滤器204,所述细胞分离过滤器包含捕获免疫细胞的基质。盒102进一步包含细胞培养室206,所述细胞培养室用于进行所述免疫细胞的活化、转导、转染和/或扩增,所述细胞培养室具有被配置成容纳所述免疫细胞的室容积。盒102还适当地进一步包含流体地连接到分离过滤器的反向冲洗系统514以及流体地连接到细胞培养室以采集细胞的细胞样品输出208。如本文所描述的,适当地,所述盒在所述细胞分离过滤器之后(或所述细胞分离过滤器之前)不包含离心机。

[0058] 在另外的实施例中,如本文所描述的,所述盒可以进一步包含流体地连接到分离过滤器的细胞清洗系统512。适当地,所述盒可以进一步包含连接到所述细胞培养室的一个或多个流体通路,其中所述流体通路适当地提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物向所述细胞培养室的分配,而不干扰所述细胞培养室内的免疫细胞。在示例性实施例中,所述流体通路包括硅基管组件,所述硅基管组件允许通过所述管组件进行氧合。

[0059] 在实施例中,所述盒还进一步包含适当地在分离过滤器204之后的废物收集室510。在另外的实施例中,所述盒可以包含免疫细胞保持室516,所述免疫细胞保持室适当地位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。

[0060] 如本文所描述的,在实施例中,细胞培养室206是扁平且非柔性的室,室高度低。

[0061] 在合适的实施例中,如本文所描述的,所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反向冲洗介质。

[0062] 在另外的实施例中,本文提供了一种制备用于自动化处理的靶细胞群的方法。如本文所描述的,所述方法适当地允许引入细胞样品(包含全血样品),并且然后从此细胞样品中分离出期望的细胞群或靶细胞群以供进一步处理,适当地在自动化细胞工程系统(如本文所描述的那些自动化细胞工程系统)中进一步自动化处理。

[0063] 在示例性方法中,将含有靶细胞群的细胞样品引入到自动化细胞工程系统300的盒102中。如本文所描述的,示例性细胞样品包含血液样品(包含全血)、组织样品、体液样品等。

[0064] 在实施例中,如参考图2A所描述的,示出了用于执行所述方法的盒,并且图5示出了盒过程的流动路径或流程图,在细胞样品输入202处适当地引入细胞样品。例如可以从注射器、容器、小瓶、血袋等引入细胞样品。

[0065] 在引入细胞样品之后,如图5所示,在实施例中,细胞样品穿过控制阀(522)V3,并且穿过流体通路(一般标记为540),同时由泵520驱动。

[0066] 在穿过阀V11之后,细胞样品然后适当地穿过分离过滤器204。如本文所描述的,细胞分离过滤器204适当地包含用于捕获期望的细胞群(包含来自细胞样品的靶细胞群)的基

质。

[0067] 在示例性实施例中,发生反向冲洗,在此期间细胞分离过滤器204适当地从反向冲洗系统512被反向冲洗。在此类实施例中,反向冲洗介质包含在反向冲洗系统512中,穿过阀V4,并通过泵520驱动穿过阀V12和阀V1,以反向冲洗细胞分离过滤器。这种反向冲洗转移了在细胞分离过滤器的基质上捕获的靶细胞群,使得可以从过滤器中去除靶细胞群并使所述靶细胞群经受进一步处理,包含进一步自动化处理。适当地,使用含有抗凝剂的反向冲洗介质发生反向冲洗,以便在细胞经受进一步自动化处理程序时限制靶细胞群凝固。

[0068] 在实施例中,从细胞分离过滤器的基质中去除的靶细胞群可以被转移到靶细胞群保持室516,例如通过穿过阀V11。在另外的实施例中,从细胞分离过滤器的基质中去除的靶细胞群可以转移到转导系统(未示出)、转染系统(即,非病毒方法),适当地在穿过阀V11和V9后穿过样品端口(例如,R5或R6)。示例性转导系统是本领域已知的,并且示例性转染系统包含电穿孔系统等,并且可以包含在盒102内或者可以在盒102的外部。在另外的实施例中,从细胞分离过滤器的基质中去除的靶细胞群可以被转移到细胞培养室206,例如通过穿过阀V11并且然后穿过阀V5或V6。如本文所描述的,细胞分离过滤器之后的这些各种元件允许靶细胞群经受进一步自动化处理,包含转导、转染、生长、扩增等。

[0069] 在另外的实施例中,所述方法可以进一步包含在所述反向冲洗之前,在所述细胞分离过滤器上清洗所捕获的靶细胞群。例如,可以是包含在盒102内的袋并且包含细胞清洗介质的细胞清洗系统512可以通过泵520使细胞清洗介质穿过阀V4和V11以在细胞分离过滤器204上清洗所捕获的靶细胞群。适当地,靶细胞群保留在细胞分离过滤器的基质上,而另外的不想要的废物通过阀V1和V13从细胞分离过滤器通入到废物收集室510中。在示例性实施例中,来自细胞样品的不想要的废物也可以通过阀V1和V13穿过细胞分离过滤器并进入废物收集室510中。适当地,另外的实施例允许通过使来自细胞样品的废物重新穿过细胞分离过滤器(例如通过穿过阀V1、V12和V11)来进一步过滤细胞样品以完成另一个过滤循环。细胞清洗也可以通过细胞清洗系统512通过将细胞清洗介质转移到靶细胞保持室516并且在进一步处理之前清洗保持在所述室中的细胞发生。

[0070] 在示例性实施例中,使细胞样品穿过合适的细胞分离过滤器204通过重力过滤发生。也就是说,不使用泵送机构来驱动细胞样品穿过细胞分离过滤器。然而,在另外的实施例中,泵520可以用于在细胞样品上产生正压或负压,以驱动样品穿过细胞分离过滤器。如果期望,注射器或其它机构也可以用于提供另外的正压或负压,以使细胞样品穿过细胞分离过滤器。

[0071] 在示例性实施例中,在期望的自动化处理之后,适当地收集靶细胞群。这种收集可以通过样品输出208或通过各种样品端口220之一发生。

[0072] 如贯穿本文所描述的,本文所描述的盒和方法适当地不包括离心机和离心的使用。适当地,所述方法不包括在从所述细胞分离过滤器转移所述靶细胞群之后进行离心,无论所述转移直接在通过细胞分离过滤器捕获之后发生还是通过从细胞分离过滤器进行的反向冲洗发生。已经确定,通过排除离心,可以通过简单的过滤从细胞样品中分离靶细胞群,而无需苛刻的离心条件。这包含从全血样品中去除靶细胞群。

[0073] 然而,在另外的实施例中,可以利用磁分离过程从靶细胞群中进一步消除和分离不期望的细胞和碎片。在此类实施例中,已结合生物分子(例如,抗体、抗体片段等)的磁珠

或其它结构可以与靶细胞相互作用。然后可以使用各种磁分离方法(包含使用过滤器、柱、流管或具有磁场的通道等)将靶细胞群与可能在细胞样品中的不期望的细胞、碎片等分离。例如,靶细胞群可以流过管或其它结构并暴露于磁场,由此所述靶细胞群被磁场保留或滞留,从而允许不期望的细胞和碎片穿过所述管。然后可以关闭磁场,从而允许靶细胞群通入到另外的保留室或盒的其它一个或多个区域中以供进一步自动化处理。

[0074] 图5中的流动路径还示出了细胞培养室206与卫星容积550之间的连接,所述卫星容积可以为盒提供另外的储存能力或增加自动化过程的总容积。图5中还展示了各种传感器(例如,pH传感器524、溶解氧传感器526)以及采样/样品端口和各种阀(包含旁通止回阀552)以及一个或多个流体通路540(适当地包括连接所述组件的基于硅酮的管组件)的示例性定位。如本文所描述的,使用基于硅酮的管组件允许通过管组件进行氧合以促进气体转移和针对细胞培养物的最佳氧合。图5中还示出了在盒的流动路径中使用一个或多个疏水过滤器554或亲水过滤器556。

[0075] 在另外的实施例中,本文提供了自动化细胞工程系统300。如图3A和3B所示,自动化细胞工程系统300适当地包含可封闭壳体302以及包含在所述可封闭壳体内的盒102。如本文所使用的,“可封闭壳体”是指可以打开和关闭的结构,并且如本文所描述的,盒102可以放置在所述结构内并与各种组件(如流体供应管线、气体供应管线、电源、冷却连接件、加热连接件等)整合。如图3A和3B所示,可封闭壳体可以打开(图3B)以允许插入盒,并且关闭(图3A)以便维持封闭、密封的环境以允许利用所述盒进行本文所描述的各种自动化过程。

[0076] 如本文所描述的,盒102适当地包含细胞样品输入206、流体地连接到所述细胞样品输入的细胞分离过滤器204、流体地连接到所述细胞分离过滤器的细胞培养室206以及流体地连接到所述细胞培养室的细胞样品输出208。如本文所描述的,所述盒(以及自动化细胞工程系统)在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机或者适当地在任何配置中不包含离心机。

[0077] 如图3A-3B所示,自动化细胞工程系统300还进一步包含用于从用户接收输入的用户接口304。用户接口304可以是触摸板、平板计算机、键盘、计算机终端或其它合适的接口,其允许用户向自动化细胞工程系统输入期望的控制和标准以控制自动化过程和流动路径。适当地,所述用户接口联接到计算机控制系统以向自动化细胞工程系统提供指令,并且控制自动化细胞工程系统的总体活动。此类指令可以包含何时打开和关闭各种阀、何时提供培养基或细胞群、何时升高或降低温度等。

[0078] 如本文所描述的,在实施例中,所述细胞分离过滤器包含捕获靶细胞群的基质。适当地,所述基质捕获免疫细胞。

[0079] 在实施例中,自动化细胞工程系统中的盒进一步包括在分离过滤器之后的废物收集室。如本文所描述的,还可以包含流体地连接到分离过滤器的细胞清洗系统。还可以包含反向冲洗系统以及任选地靶细胞群保持室,所述反向冲洗系统流体地连接到所述分离过滤器,所述靶细胞群保持室位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。在实施例中,自动化细胞工程系统的盒进一步包含一个或多个流体通路,其中所述流体通路提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物质向所述细胞培养室的分配,而不干扰所述细胞培养室内的细胞。在实施例中,所述细胞培养室是扁平且非柔性的室,室高度低。

[0080] 在自动化细胞工程系统的实施例中,所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反

向冲洗介质(适当地包含抗凝剂)。如本文所描述的,在实施例,所述自动化细胞工程系统的所述盒可以进一步包含pH传感器、葡萄糖传感器、氧传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器中的一个或多个,并且在合适的实施例中,包含一个或多个采样端口。

[0081] 细胞疗法生产中的单元操作的自动化为同种异体细胞疗法应用和自体细胞疗法应用的普遍益处提供了机会。在患者特异性自体细胞产品的独特场景中,并且最近这些疗法的临床成功更强调的是,由于小批量GMP合规性、经济性、患者可追溯性和过程偏差的早期识别的显著微批次复杂性,自动化的优势特别引人注目。复杂制造方案的相关联的出现吸引对这样的事实注意,即微批次细胞生产中自动化单元操作的端到端整合的价值尚未成为重要研究点。然而,在这些疗法即将获得批准后对这些疗法的预期需求指示,实施全封闭式端到端系统可以为制造瓶颈(如手动操作时间和占地面积)提供更需要的解决方案。

[0082] 鼓励先进疗法的开发者在推出临床转译和扩大临床试验方案的早期考虑自动化。早期自动化可能影响方案开发,避免在后期在从手动过程切换到自动化过程时进行可比性研究的需要,并且提供对长期商业化路线的更好理解。

[0083] 在示例性实施例中,本文所描述的自动化细胞工程系统包括多个室,并且其中本文所描述的各种方法的步骤中的每个步骤在自动化细胞工程系统的所述多个室中的不同室中执行,在开始所述方法之前,活化试剂、载体和细胞培养基中的每一种都包含在所述多个室中的不同室中,并且其中所述多个室中的至少一个室维持在用于使细胞生长的温度(例如,在约37°C)下,并且所述多个室中的至少一个室维持在冷藏温度(例如,在约4°C-8°C)下。

[0084] 在实施例中,使用温度传感器、pH传感器、葡萄糖传感器、氧传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器监测本文所描述的自动化细胞工程系统。因此,在一些实施例中,自动化细胞工程系统包含温度传感器、pH传感器、葡萄糖传感器、氧传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器中的一个或多个。在另外的实施例中,自动化细胞工程系统被配置成基于预定义的培养物大小来调整细胞培养物的温度、pH、葡萄糖、氧气水平、二氧化碳水平和/或光密度。例如,如果自动化细胞工程系统检测到细胞培养物的当前氧气水平太低,无法实现期望的细胞培养物大小的必要生长,则自动化细胞工程系统将通过例如引入氧化的细胞培养基、通过用氧化的细胞培养基替换细胞培养基或通过使细胞培养基流过氧合组件(即,硅酮管)来自动增加细胞培养物的氧气水平。在另一个实例中,如果自动化细胞工程系统检测到细胞培养物的当前温度太高并且细胞生长太快(例如,细胞过度拥挤可能会导致不期望的特性),则自动化细胞工程系统将自动降低细胞培养物的温度,以维持细胞的稳定生长速率(或指数生长速率,根据需要)。在仍进一步的实施例中,自动化细胞工程系统基于细胞生长速率和/或细胞计数或其它监测因素(如pH、氧、葡萄糖等)自动调整细胞饲喂的时间表(即,为细胞培养物提供新鲜培养基和/或营养物)。自动化细胞工程系统可以被配置成在低温室(例如,4°C或-20°C)中储存培养基(和其它试剂,如清洗溶液等),并且在将经温热的培养基引入到细胞培养物中之前,在室温或高温室(例如,分别为25°C或37°C)中温热培养基。

另外的示例性实施例

[0085] 实施例1是一种用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包括:细胞样品输入;细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入;细胞培养室,

所述细胞培养室流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室,其中所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。

[0086] 实施例2包含根据实施例1所述的盒,其中所述细胞分离过滤器包含捕获细胞群的基质。

[0087] 实施例3包含根据实施例1所述的盒,其中所述基质捕获靶细胞。

[0088] 实施例4包含根据实施例1到3所述的盒,所述盒进一步包括在所述细胞分离过滤器之后的废物收集室。

[0089] 实施例5包含根据实施例1到4所述的盒,所述盒进一步包括细胞清洗系统,所述细胞清洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器。

[0090] 实施例6包含根据实施例1到5所述的盒,所述盒进一步包括反向冲洗系统,所述反向冲洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器,以及任选地靶细胞群保持室,所述靶细胞群保持室位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。

[0091] 实施例7包含根据实施例1到6所述的盒,所述盒进一步包括一个或多个流体通路,其中所述流体通路提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物向所述细胞培养室的分配,而不干扰所述细胞培养室内的细胞。

[0092] 实施例8包含根据实施例1到7所述的盒,其中所述细胞培养室是扁平且非柔性的室,室高度低。

[0093] 实施例9包含根据实施例1到8所述的盒,其中所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反向冲洗介质。

[0094] 实施例10包含根据实施例9所述的盒,其中所述反向冲洗介质含有抗凝剂。

[0095] 实施例11包含根据实施例1到10所述的盒,所述盒进一步包括pH传感器、葡萄糖传感器、氧传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器中的一个或多个。

[0096] 实施例12包含根据实施例1到11所述的盒,所述盒进一步包括一个或多个采样端口。

[0097] 实施例13是一种用于在自动化细胞工程系统中使用的盒,所述盒包括:细胞样品输入;细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入,所述细胞分离过滤器包含捕获免疫细胞的基质;细胞培养室,所述细胞培养室用于执行所述免疫细胞的活化、转导和/或扩增,所述细胞培养室具有被配置成容纳所述免疫细胞的室容积;反向冲洗系统,所述反向冲洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室,其中所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。

[0098] 实施例14包含根据实施例13所述的盒,所述盒进一步包括细胞清洗系统,所述细胞清洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器。

[0099]

[0100] 实施例15包含根据实施例13到14所述的盒,所述盒进一步包括一个或多个流体通路,所述一个或多个流体通路连接到所述细胞培养室,其中所述流体通路提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物向所述细胞培养室的分配,而不干扰所述细胞培养室内的免疫细胞。

[0101] 实施例16包含根据实施例13到15所述的盒,所述盒进一步包括在所述细胞分离过

滤器之后的废物收集室。

[0102] 实施例17包含根据实施例13到16所述的盒,所述盒进一步包括免疫细胞保持室,所述免疫细胞保持室位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。

[0103] 实施例18包含根据实施例13到17所述的盒,其中所述细胞培养室是扁平且非柔性的室,室高度低。

[0104] 实施例19包含根据实施例13到18所述的盒,其中所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反向冲洗介质。

[0105] 实施例20包含根据实施例13到19所述的盒,其中所述流体通路中的一个或多个流体通路包括硅基管组件,所述硅基管组件允许通过所述管组件进行氧合。

[0106] 实施例21是一种制备用于自动化处理的靶细胞群的方法,所述方法包括:将含有所述靶细胞群的细胞样品引入到自动化细胞工程系统的盒中;使所述细胞样品穿过细胞分离过滤器;从所述细胞样品中将所述靶细胞群捕获到所述细胞分离过滤器的基质上;对所述细胞分离过滤器进行反向冲洗;以及从所述细胞分离过滤器中转移所述靶细胞群,使得所述靶细胞群可以经受自动化处理。

[0107] 实施例22包含根据实施例21所述的方法,其中所述转移包括将所述靶细胞群转移到靶细胞群保持室、转导系统、用于转染的系统或细胞培养室,使得所述靶细胞群可以经受自动化处理。

[0108] 实施例23包含根据实施例22所述的方法,其中所述转导系统是电穿孔系统。

[0109] 实施例24包含根据实施例21到23所述的方法,所述方法进一步包括在所述反向冲洗之前,在所述细胞分离过滤器上清洗所捕获的靶细胞群。

[0110] 实施例25包含根据实施例21到24所述的方法,所述方法进一步包括使来自所述细胞样品的不想要的废物穿过所述细胞分离过滤器并进入废物收集室中。

[0111] 实施例26包含根据实施例21到25所述的方法,其中所述使所述细胞样品穿过所述细胞分离过滤器通过重力过滤发生。

[0112] 实施例27包含根据实施例21到26所述的方法,其中所述方法不包括在从所述细胞分离过滤器转移所述靶细胞群之后进行离心。

[0113] 实施例28包含根据实施例21到26所述的方法,所述方法进一步包括在所述自动化处理之后从所述盒中收集所述靶细胞群。

[0114] 实施例29是一种自动化细胞工程系统,其包括可封闭壳体、包含在所述可封闭壳体内的盒以及用于从用户接收输入的用户接口,所述盒包括:细胞样品输入;细胞分离过滤器,所述细胞分离过滤器流体地连接到所述细胞样品输入;细胞培养室,所述细胞培养室流体地连接到所述细胞分离过滤器;以及细胞样品输出,所述细胞样品输出流体地连接到所述细胞培养室,其中所述盒在所述细胞分离过滤器之后不包含离心机。

[0115] 实施例30包含根据实施例29所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒的所述细胞分离过滤器包含捕获细胞群的基质。

[0116] 实施例31包含根据实施例30所述的自动化细胞工程系统,其中所述基质捕获靶细胞。

[0117] 实施例32包含根据实施例29到31所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒进一步包括在所述细胞分离过滤器之后的废物收集室。

[0118] 实施例33包含根据实施例29到32所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒进一步包括细胞清洗系统,所述细胞清洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器。

[0119] 实施例34包含根据实施例29到33所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒进一步包括反向冲洗系统,所述反向冲洗系统流体地连接到所述细胞分离过滤器,以及任选地靶细胞群保持室,所述靶细胞群保持室位于所述细胞分离过滤器与所述细胞培养室之间。

[0120] 实施例35包含根据实施例29到34所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒进一步包括一个或多个流体通路,其中所述流体通路提供再循环、废物去除和均质气体交换以及营养物向所述细胞培养室的分配,而不干扰所述细胞培养室内的细胞。

[0121] 实施例36包含根据实施例29到35所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒的所述细胞培养室是扁平且非柔性的室,室高度低。

[0122] 实施例37包含根据实施例29到35所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒的所述细胞培养室是袋或硬室。

[0123] 实施例38包含根据实施例29到37所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒预填充有培养基、细胞清洗介质和反向冲洗介质。

[0124] 实施例39包含根据实施例38所述的自动化细胞工程系统,其中所述反向冲洗介质含有抗凝剂。

[0125] 实施例40包含根据实施例29到39所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒进一步包括pH传感器、葡萄糖传感器、氧传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器中的一个或多个。

[0126] 实施例41包含根据实施例29到40所述的自动化细胞工程系统,其中所述盒进一步包括一个或多个采样端口。

[0127] 实施例42包含根据实施例29到41所述的自动化细胞工程系统,所述自动化细胞工程系统进一步包括计算机控制系统,其中用户接口联接到所述计算机控制系统以向所述自动化细胞工程系统提供指令。

实例

实例1-为自动化细胞工程系统建立细胞过滤

[0128] 傲克Cocoon™系统是用于制造细胞疗法产品的封闭式自动化端到端细胞工程系统。Cocoon™包含三个主要组件:基础仪器、软件和可定制的一次性盒。所述系统能够执行针对上游细胞培养过程和下游细胞培养过程两者的自动化细胞分离、扩增、浓缩和缓冲液交换;然而,所述系统不具有离心功能。

[0129] 通过粘附分离靶细胞群可以应用于大多数贴壁细胞类型,包含间充质干细胞(MSC)、树突细胞和单核细胞。例如,可以通过在Cocoon™盒增殖室中粘附来分离人骨髓MSC。接种骨髓组织后1-2天,污染的红细胞(RBC)和其它悬浮细胞被耗尽成为废物,从而在Cocoon™盒增殖室中留下贴壁细胞类型。每2-3天使用被设计成用于促进MSC扩增的介质进行介质交换。

[0130] 在Cocoon™盒中培养T细胞需要经纯化的T细胞群或外周血单核细胞(PBMC)群,通常来自供体的全血收集。为了消除获得白细胞所需的预处理程序,同时还减少初始Cocoon™起始材料中的RBC污染量,对全血过滤进行评估。

[0131] 颇尔生命科学(Pall Life Sciences)的Arcadis WBC(白细胞)注射器过滤器(目

录号AP-4851) 和美国血液技术公司的用于回收血液的白细胞过滤器(目录号RS-1) (图2B-2C) 均含有纤维基质和介质, 所述纤维基质和介质捕获和保留过滤器出口上游的白细胞, 同时允许RBC和其它污染细胞穿过到达废物。然后将所捕获的白细胞从过滤器中反向冲洗并收集以用于细胞培养活动。Acrodisc WBC注射器过滤器(颇尔) 可以处理多达12mL的供体全血样品或白细胞去除术样品, 而白细胞过滤器(美国血液技术公司) 可以处理多达450mL的供体全血样品或白细胞去除术样品。

[0132] 通过在CocoonTM盒的流体通路中使用这些过滤器或类似物, 可以从全血样品或Leukopak供体样品中分离人T细胞以用于CAR-T和CocoonTM系统内的其它细胞疗法产品。本文所描述的提出的过程流动路径允许最终用户将供体全血样品或白细胞去除术样品无菌地且直接地引入到CocoonTM系统中。可以在CocoonTM一次性盒流体通路内整合全血过滤器, 以从混合细胞群中分离白细胞并且使其在CocoonTM增殖室中进一步扩增。然后可以根据需要自动采集并新鲜使用或冷藏保存最终治疗产物。

方法

使用菲柯尔Paque Plus(飞世尔公司(Fisher)) 进行密度梯度分离

[0133] 获得介于100mL与450mL之间的全血产物或白细胞去除术产物。然后将初始供体样品分成2个集合: 第一个集合通过菲柯尔密度梯度进行处理, 并且第二个集合通过细胞分离过滤器进行处理。对于密度梯度分离, 使用用于制造人PBMC的标准程序对初始供体样品的一半进行处理。具体地, 所述供体样品在等体积的2mM EDTA/1X DPBS(龙沙公司(Lonza)) 中以1:1稀释。然后将经稀释的样品以30mL级分小心地分层到15mL菲柯尔Paque Plus密度梯度溶液(通用电气医疗集团(GE Healthcare)) 上, 每个50mL锥形管的总体积高达45mL。在室温下以400x g使管离心持续40分钟。将血浆的顶层去除到含有PBMC的管的血沉棕黄层上方大约10mL处。收集PBMC并且在2mM EDTA/1X DPBS中以三倍于收集体积的体积进行清洗。然后使用Nucleocounter NC-200(Chemometec公司) 对所收集的细胞进行一式两份计数, 通过流式细胞术(FACS) 分析进行分析并冷藏保存。

使用Acrodisc白细胞注射器过滤器(颇尔) 进行全血过滤

[0134] 根据制造商的说明, 使用Acrodisc WBC过滤器将初始供体全血样品和白细胞去除术样品的一半(多达50mL) 处理成6mL-12mL级分。将过滤器入口附接到10mL注射器并安装在无菌废物容器上方。将6mL-12mL经稀释的和未经稀释的全血样品和leukopak样品两者添加到注射器壳体中。然后通过重力通过WBC过滤器过滤样品。记录完全过滤样品的时间。然后用5mL PBS(pH 7.4) 洗涤过滤器两次。为了收集细胞, 小心地从注射器壳体中去除WBC过滤器, 将干净的150mL血液收集袋(WalkMed) 附接到过滤器的入口侧, 并将装有10mL PBS(龙沙公司) 的培养基袋附接到WBC过滤器的出口。然后用PBS反向冲洗过滤器并收集在150mL血液收集袋(WalkMed) 中。然后在2mM EDTA/1X DPBS中以三倍于收集体积的体积对所收集的细胞悬浮液进行清洗。然后使用Nucleocounter NC-200(Chemometec公司) 对细胞进行一式两份计数, 并且冷藏保存样品以进行流式细胞术(FACS) 分析。然后汇集从相同条件分离的细胞, 并且在补充有5%人血清A/B的6mL X-VIVO 15培养基(龙沙公司) 中以1e7个细胞将从相同条件分离的所述细胞一式两份地接种在T-25组织烧瓶培养物中。在第4天、第6天、第8天和第11天对所有培养物执行100%介质交换和细胞计数。

全血样品的预处理稀释

[0135] 供体1:将来自单个供体的148mL全血分成2个级分。一份74mL级分在0.2mM EDTA/1X DPBS (共148mL经稀释的全血)中以1:1稀释,并且第二份74mL级分保持未稀释。然后将未经稀释的级分和经稀释的级分两者分成两个另外的级分,分别为2×74mL经稀释的全血和2×37mL未经稀释的全血,以用于菲柯尔分离梯度处理和颇尔Acrodisc WBC细胞分离过滤处理两者。使用未经稀释的全血进行菲柯尔分离不是标准的实验室实践,并且仅包含在本评估中以更好地理解过程限制。颇尔Acrodisc WBC过滤样品体积为3mL未经稀释、6mL经稀释和未经稀释、12mL经稀释和未经稀释以及24mL经稀释。

[0136] 供体2:通过使133mL的全血未稀释并且在0.2mM EDTA/1X DPBS中以1:1稀释第二份145mL的全血级分以获得总体积290mL的经稀释的全血来分配来自第二供体的279mL全血。通过菲柯尔一式三份地处理54mL经稀释的全血。对于此供体,没有通过菲柯尔处理的未经稀释的样品。通过颇尔Acrodisc WBC过滤对6mL和12mL体积的剩余的经稀释的和未经稀释的全血级分进行处理。

Leukopak样品稀释的预处理

[0137] 供体1:将来自单个供体的127mL白细胞去除术产物分成28mL以进行未经清洗的样品过滤和剩余的99mL以通过将99mL稀释于400mL的5mM EDTA-HBSS中、离心、丢弃上清液并将细胞沉淀物重新悬浮于200mL的5mM EDTA-HBSS中进行清洗。将180mL的此经清洗的样品用于菲柯尔分离密度梯度,并且将20mL用于6mL和12mL颇尔Acrodisc WBC过滤处理。

结果

白细胞分离和收集的处理时间

[0138] 同时处理用于菲柯尔密度梯度分离的未经稀释的和经稀释的全血级分两者。从管分层到清洗白细胞/血沉棕黄层,30mL未经稀释的全血样品和74mL经稀释的全血样品的处理时间为大约4小时。针对任何样品均不包含红细胞裂解步骤。

[0139] 对于颇尔WBC细胞分离过滤,6mL-24mL全血样品的总处理时间的范围介于5分钟到20分钟之间,取决于处理量和全血稀释度(表1)。当用2mM EDTA/1X DPBS以1:1稀释3mL全血时,观察到最快的处理时间,在3分钟内通过重力完全过滤,并且平均总处理时间(过滤、两次清洗和反向冲洗收集)为8分钟±3分钟。平均而言,6mL未经稀释的全血穿过过滤器需要10分钟±2分钟,并且需要19分钟±2分钟的总处理时间(过滤、两次清洗和反向冲洗收集)。当以1:1稀释时,6mL 2mM EDTA/1X DPBS中的6mL未经稀释的全血(总体积为12mL)通过重力穿过过滤器平均需要7分钟±2分钟,并且需要13分钟±4分钟的总处理时间。18分钟后,一个供体的12mL未经稀释的全血中仅11mL穿过过滤器,并且需要注射器柱塞手动推动剩余体积并通过过滤器进行清洗。对于此供体,在12mL的2mM EDTA/1X PBS中以1:1稀释的12mL全血(总体积为24mL)在16分钟后阻塞,仅处理约11mL。用注射器过滤器的柱塞手动推动剩余体积和随后的两次清洗穿过过滤器。对于第二供体,12mL未经稀释的完整样品两者在30分钟后被阻塞,其中3mL和5mL未被处理。未试图对第二供体12mL未经稀释的全血体积进行手动干预,也未执行1:1稀释。过滤一份10mL未经稀释的全血样品,并在11分钟后完成全体积的重力过滤,并且总处理时间为19分钟。

[0140] 在6mL和12mL样品中的4mL通过重力穿过过滤器处理后,经清洗和未经清洗的leukopak样品阻塞颇尔Acrodisc WBC过滤器(表2)。需要人工干预来使用注射器柱塞处理剩余的2mL-8mL样品。改变用于收集所捕获的细胞的过程过滤流量的平均时间为6-7分钟。

表1:全血处理时间汇总表

供体	样品条件	穿过过滤器的时间 (分钟)	2 × 5 mL PBS 过滤器清洗 (分钟)	反向冲洗 时间(分钟)	总处理时间 (分钟)
1	颇尔, 未经稀释的, 6 mL, 1a	8	9		17
1	颇尔, 未经稀释的, 6 mL, 1b	8	9		17
2	颇尔, 未经稀释的, 6 mL, 1a	9	11	1	21
2	颇尔, 未经稀释的, 6 mL, 1b	13	6	1	21
未经稀释的, 总体积 6 mL 平均(分钟)		9.5	8.8	1.0	19.0
标准偏差(分钟)		2.4	2.1	0.0	2.3
1	颇尔, 未经稀释的, 10 mL	11	8		19
1	颇尔, 未经稀释的, 12 mL	18	2		20
2	颇尔, 未经稀释的, 12 mL, 2a	30+	不适用	不适用	不适用
2	颇尔, 未经稀释的, 12 mL, 2b	30+	不适用	不适用	不适用
1	颇尔, 经稀释的, 6 mL, 1b	3	3		6
2	颇尔, 经稀释的, 6 mL, 1a	3	7	1	11
2	颇尔, 经稀释的, 6 mL, 1b	3	7	1	11
以 1:1 稀释, 总体积 6 mL 平均(分钟)		2.8	5.0	1.0	8.3
标准偏差(分钟)		0.5	2.3	0.0	3.2
1	颇尔, 经稀释的, 12 mL	6	3		9
2	颇尔, 经稀释的, 12 mL, 2a	5	8	1	14
2	颇尔, 经稀释的, 12 mL, 2b	9	7	1	17

以 1:1 稀释, 总体积 12 mL 平均 (分钟)		6.7	6.0	1.0	13.3
标准偏差 (分钟)		2.1	2.6	0.0	4.0
1	颇尔, 经稀释的, 24 mL	16+	2		18+

表2:Leukopak供体1颇尔Acrodisc WBC过滤处理时间

Leukopak 样品条件	穿过过滤器的时间 (分钟)	总处理时间 (分钟)
颇尔未经清洗, 6 mL	<ul style="list-style-type: none"> 以 20 分钟处理 4 mL。 观察到反向压力。 以 40+分钟使用注射器柱塞完成过程 	95
颇尔, 未经清洗的, 12 mL		98
颇尔, 经清洗的, 6 mL		70
颇尔, 经清洗的, 12 mL		73

处理后细胞产率和活力

[0141] 全血供体1:从表3所示出的数据分析中省略了两个供体1全血样品,但示出在图6A和6B中。在剩余样品中,与通过菲柯尔密度梯度分离处理的每mL全血 0.9×10^6 个细胞相比,通过颇尔Acrodisc WBC过滤器收集到每mL经处理的全血平均 1×10^6 个活细胞。与经稀释的WBC过滤样品相比,从未经稀释的颇尔Acrodisc WBC过滤样品中获得的每mL全血的活细胞少27.3%。当与经稀释的菲柯尔样品相比时,从未经稀释的菲柯尔样品中获得的每mL经处理的全血的活细胞多8%。与未经稀释的菲柯尔处理相比,当通过Acrodisc WBC过滤器处理时,从未经稀释的全血样品中获得的每mL经处理的全血的活细胞多15%。与菲柯尔密度梯度方法相比,当通过Acrodisc WBC过滤处理经稀释的全血时,所获得的每mL活细胞多38%。所有样品的活力相似,范围为91%到94%。在两个菲柯尔样品中,即使是大量未经稀释的血液也被小心地分层。图6A和6B示出了细胞产率和活力的差异。

表3:全血供体1处理后数据汇总表。

供体 1 样品条件	处理体积 (mL)	处理后收集的总细胞 (个细胞)	平均细胞/mL的初始全血量 (个细胞/mL)	处理后平均活力 (%)
未经稀释的, 颇尔过滤	34	3.71×10^7	1.09×10^6	92.4% \pm 0.4%
经稀释的, 颇尔过滤	48	3.33×10^7	1.39×10^6	92.5% \pm 1.7%
未经稀释的, 菲柯尔	20	1.80×10^7	0.92×10^6	93.6%
经稀释的, 菲柯尔	49	2.11×10^7	0.86×10^6	91.1% \pm 0.2%

[0142] 将来自经过滤的和菲柯尔过程的新鲜分离的原代细胞以每烧瓶 $1e^7$ 个活细胞的目的

标接种到T-25组织培养烧瓶中,以模拟预期的Cocoon接种细胞密度。经稀释的12mL和24mL全血样品中没有足够的细胞以 $1e^7$ 个细胞密度进行接种。到第6天,采用全血过滤分离程序的所有培养物比初始总细胞数高3-4倍,其中从经稀释的全血6mL过滤样品中获得最高细胞数(图7A)。菲柯尔密度梯度分离后接种的培养物示出从接种之日到采集之日没有显著增长,尽管在第0-11天维持大约98%的培养物活力(图7B)。所有培养物在培养的前8天维持约96%的活力,并且在第11天维持92%以上的活力。

[0143] 全血供体2:平均而言,与在活力为 $68.0\% \pm 6.2\%$ 的情况下未经稀释的过滤样品为 3.11×10^5 个活细胞并且在活力为 $72.7\% \pm 2.1\%$ 的情况下经稀释的过滤样品为 3.11×10^5 个活细胞相比,在活力为 $88.6\% \pm 0.9\%$ 的情况下,通过菲柯尔分离梯度方法获得每mL经处理的全血 16.1×10^5 个活细胞(表4、图8A和图8B)。与经稀释的WBC过滤器样品相比,使用未经稀释的颇尔Acrodisc WBC过滤样品获得的每mL全血的活细胞少53%,而与经稀释的样品相比,供体1从未经稀释的样品中产生的每mL细胞数少2%。与经稀释的菲柯尔处理相比,当通过Acrodisc WBC过滤器处理时,从未经稀释的全血样品中获得的每mL经处理的全血的活细胞少91%。与菲柯尔密度梯度方法相比,当通过Acrodisc WBC过滤处理经稀释的全血时,所获得的每mL活细胞少81%。

表4:全血供体2处理后数据汇总表。

供体 2 样品条件	处理体积 (mL)	处理后收集的总细胞 (个细胞)	平均细胞/mL的初始全血量 (个细胞/mL)	处理后平均活力 (%)
未经稀释的, 颇尔过滤	12	1.74×10^6	1.45×10^5	$68.0\% \pm 6.2\%$
经稀释的, 颇尔过滤	36	5.60×10^6	3.11×10^5	$72.7\% \pm 2.1\%$
经稀释的, 菲柯尔	54	43.5×10^6	16.1×10^5	$88.6\% \pm 0.9\%$

[0144] Leukopak供体1:平均而言,在活力为 $98.1\% \pm 0.6\%$ 下,通过菲柯尔分离梯度方法获得每mL白细胞去除术产物 32.9×10^6 个活细胞。相比之下,在活力分别为 $95.8\% \pm 0.3\%$ 和 $98.4\% \pm 0.6\%$ 下,通过过滤方法获得每mL经处理的、经清洗的(1:1稀释)白细胞去除术产物 8.02×10^6 个活细胞以及未经清洗的产物 4.36×10^6 个活细胞(表5、图9A和图9B)。

[0145] 与经清洗的WBC过滤样品相比,使用未经清洗的颇尔Acrodisc WBC过滤样品获得的每mL白细胞去除术产物的活细胞少46%。与经稀释的菲柯尔处理相比,当通过Acrodisc WBC过滤器处理时,从未经清洗的leukopak样品中获得的每mL经处理的全血的活细胞少87%(图9B)。与菲柯尔密度梯度方法相比,当通过Acrodisc WBC过滤处理经清洗的白细胞去除术产物时,所获得的每mL活细胞少76%。

表5:Leukopak供体处理后数据汇总表

Leukopak 样品条件	处理体积 (mL)	处理后收集的总细胞 (个细胞)	平均细胞/mL 的初始全血量 (个细胞/mL)	处理后平均活力 (%)
未经清洗的, 颇尔过滤	18	7.85×10^7	4.36×10^6	$98.4\% \pm 0.6\%$
经清洗的, 颇尔过滤	18	7.14×10^7	8.02×10^6	$95.8\% \pm 0.3\%$
经清洗的, 菲柯尔	200	326×10^7	32.9×10^6	$98.1\% \pm 0.6\%$

CD3+T细胞群的FACS分析

[0146] 当前的细胞疗法专注于优化用于自动化细胞工程系统(如Cocoon™系统)的CAR-T细胞疗法程序。考虑到这一点,比较全血与通过菲柯尔和过滤方法处理的Leukopak细胞收集之间CD3+T细胞的百分比、CD3+CD4+T细胞与CD3+CD8+T细胞的比率(图10)。

[0147] 全血供体1:在2个未经稀释的、颇尔过滤的6mL全血样品中的1个中以及在12mL和24mL经稀释的、颇尔过滤的全血样品两者中观察到CD3+CD4+T细胞(6%-8%)和CD3+CD8+T细胞(4%-10%)的最低百分比(图11)。对于所有其它样品,在菲柯尔和颇尔过滤的全血样品两者中捕获了大约 $22\% \pm 4\%$ 的CD3+CD4+T细胞和 $19\% \pm 3\%$ 的CD3+CD8+T细胞。然而,所有样品在每种条件下都维持了大致1:1的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率。

[0148] 全血供体2:当与大约30%-38%CD3+CD4+T细胞以及9%-12%CD3+CD8+T细胞的所有其它条件相比,来自未经稀释的6mL全血样品的所收集的级分呈现出最低百分比的CD3+CD4+T细胞(23.6%和22%)和CD3+CD8+T细胞(8%和7.5%)(图12)。然而,所有样品均示出3:1的CD3+CD4+细胞与CD3+CD8+细胞的比率。两个全血供体之间CD4+与CD8+比率的差异可能是供体到供体变异性的结果。

[0149] Leukopak供体样品:平均而言,来自通过菲柯尔分离方法处理的全血的细胞级分含有 $40\% \pm 2\%$ CD3+CD4+T细胞和 $22.8\% \pm 3\%$ CD3+CD8+T细胞(图13)。与未经清洗的过滤Leukopak样品相比,收集到大约多15%的CD3+CD4+T细胞和多5%的CD3+CD8+T细胞。与经清洗的(以1:1稀释)颇尔Acrodisc WBC过滤的Leukopak样品相比,菲柯尔分离还产生了多21%的CD3+CD4+T细胞和多13%的CD3+CD8+T细胞。除了CD3+CD4+细胞与CD3+CD8+细胞比率为1:1的12mL未经清洗的过滤的Leukopak样品之外,所有其它菲柯尔和经过滤的样品的CD3+CD4+与CD3+CD8+的比率为2:1。CD4+、CD8+产率的差异可能受到使用注射器柱塞通过颇尔Acrodisc WBC过滤器手动过滤Leukopak样品的必要性的负面影响,因为将仅通过重力过滤的Leukopak样品不超过4mL。

结论

[0150] 本文所描述的方法描述了单独或串联使用细胞过滤器(如颇尔Acrodisc白细胞注射器过滤器)通过Cocoon系统分离全血白细胞。在Cocoon™盒中实施这些过滤器的用途的更新包含:

[0151] 每个WBC过滤器6mL-12mL未经稀释的或经稀释的全血样品处理量。

[0152] 在DPBS或类似缓冲液中可能以1:1稀释全血以减少处理时间。

[0153] 重力过滤的可能性。

[0154] 颇尔Acrodisc WBC过滤器使得在没有离心的情况下捕获和扩增T细胞成为可能。具有增加的全血和白细胞去除术产物处理能力的更大过滤器也是有用的。具体地,使用美

国血液技术公司的用于回收血液的白细胞过滤器进行全血过滤。

讨论

[0155] 当使用专用过滤器与白细胞捕获介质/基质时,可以从全血进行Cocoon™在线白细胞分离。可以生产用于在Cocoon™系统中使用的适合的颇尔或美国血液技术公司定制过滤器。

[0156] 对相关领域普通技术人员而言将显而易见的是,在不脱离任何实施例的范围的情况下,可以对本文所描述的方法和应用作出适合的修改和调整。

[0157] 应当理解的是,虽然本文中已经展示和描述了某些实施例,但是权利要求不限于所描述和示出的部分的特定形式或布置。在本说明书中已经公开了说明性实施例,并且尽管采用了具体术语,但其仅用于一般性和描述性意义,而不是出于限制的目的。鉴于以上教导,对所述实施例的修改和变化都是可能的。因此,应当理解的是,可以以与具体描述的方式不同的方式实践所述实施例。

[0158] 本说明书中所提及的所有公开、专利以及专利申请通过引用并入本文中,其程度如同每个单独的公开、专利或专利申请被专门地且单独地指示通过引用并入。

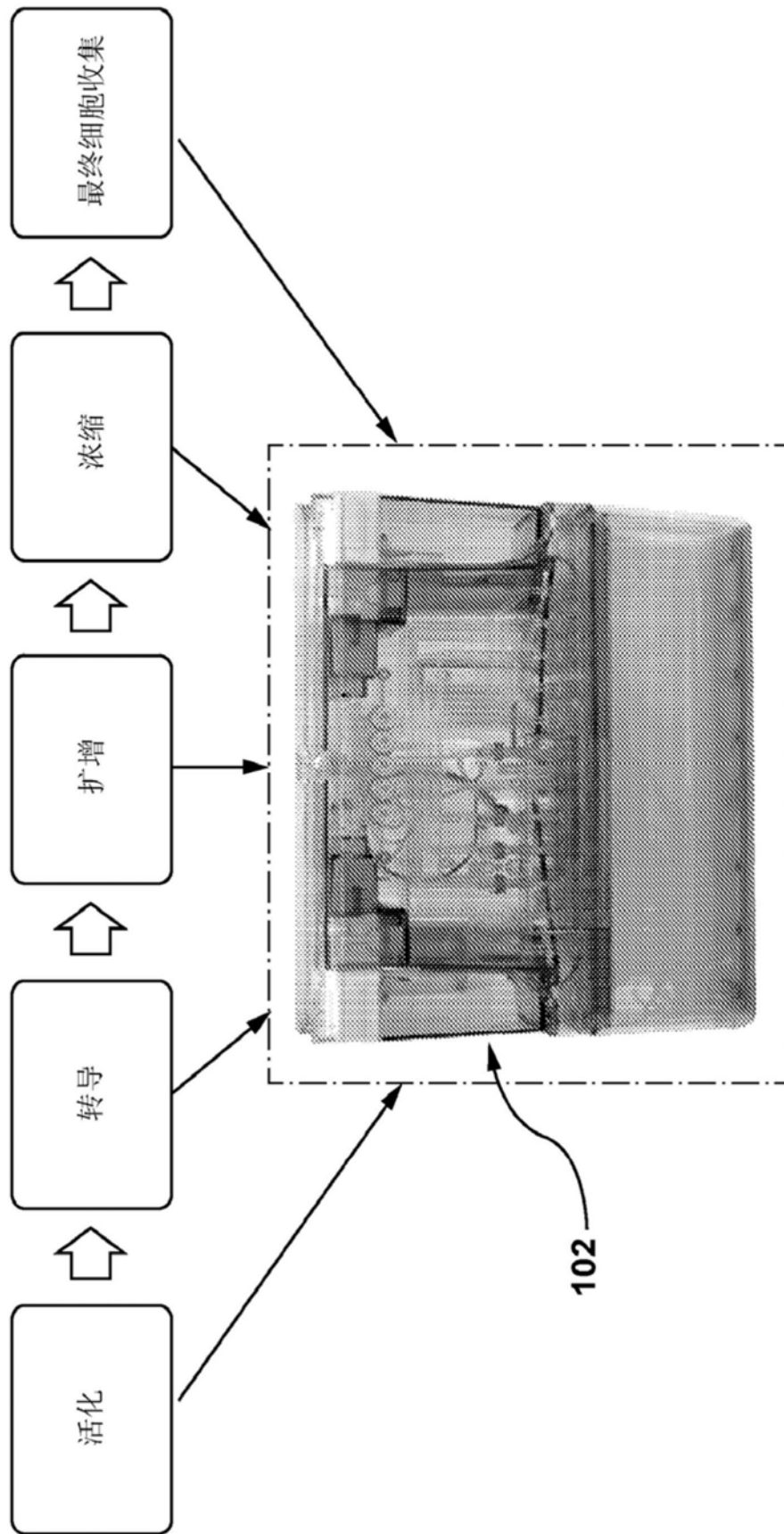


图1

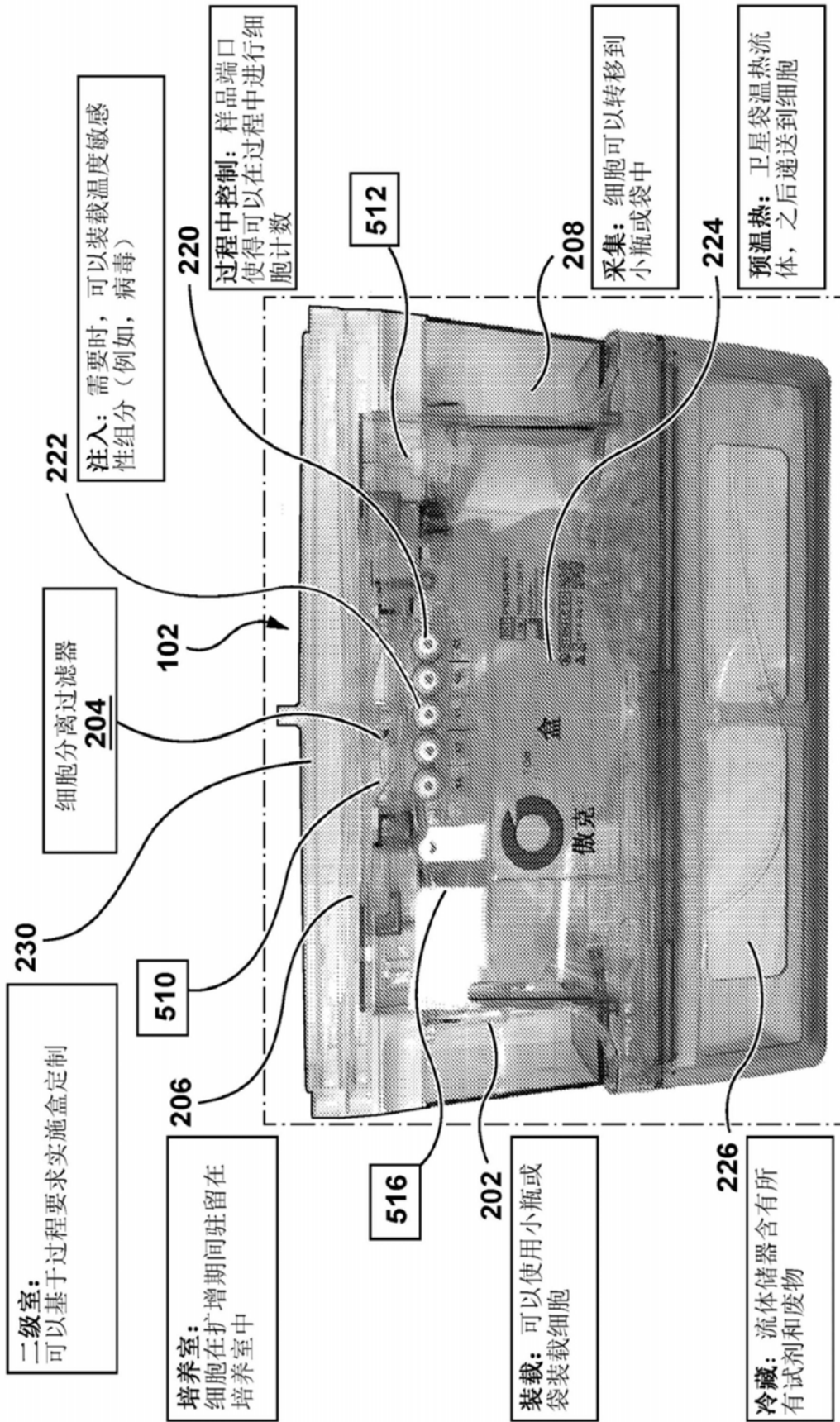


图2A

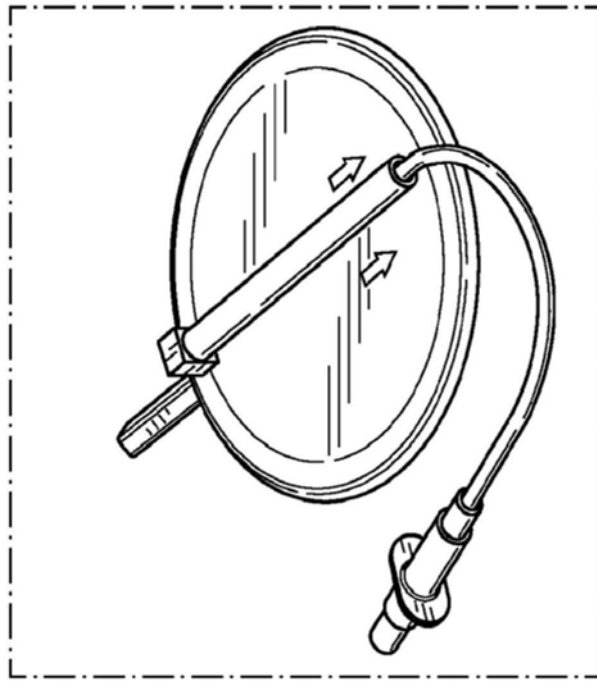


图2B

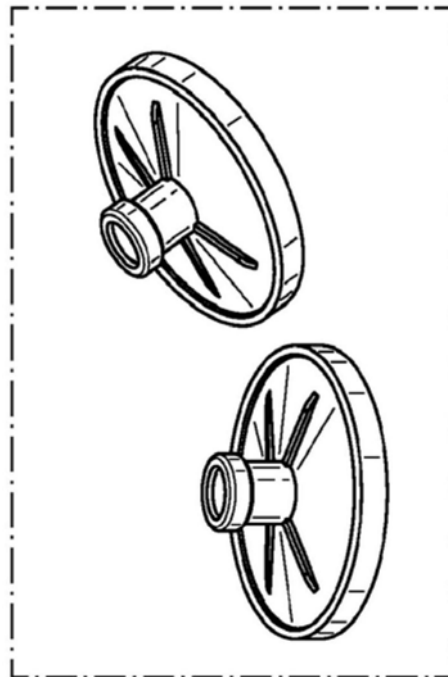


图2C

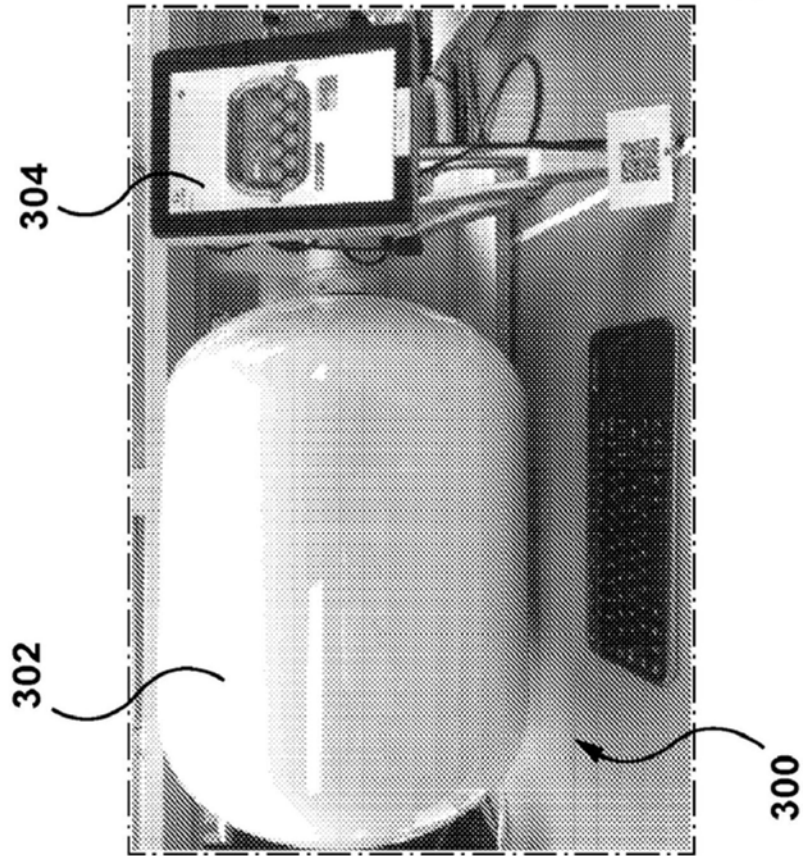


图3A

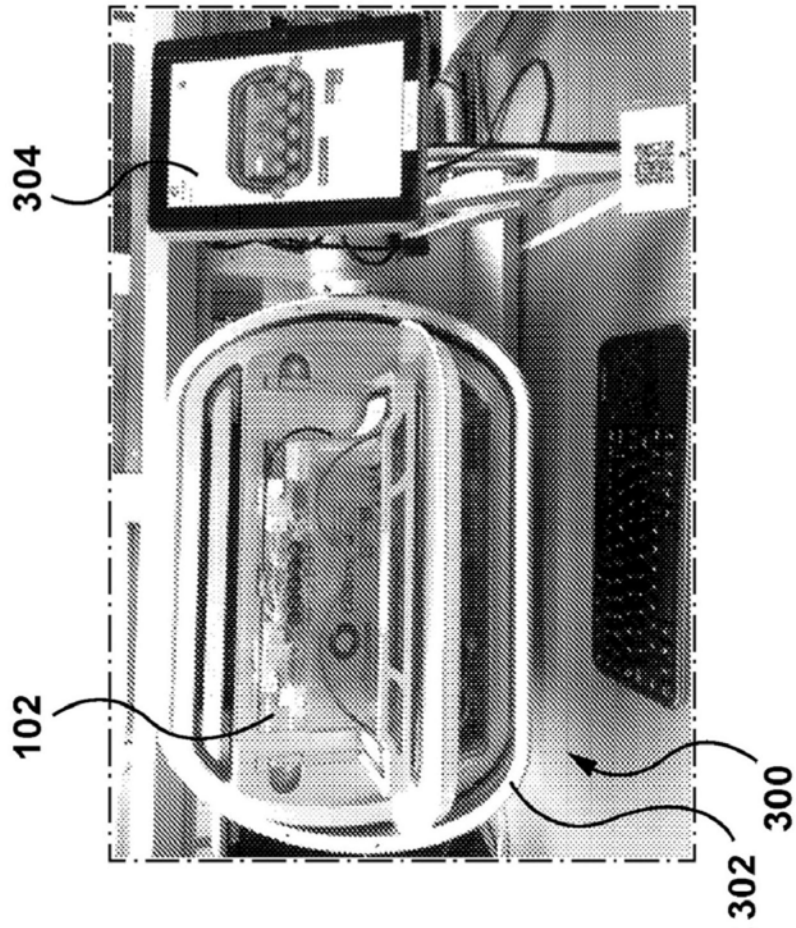


图3B

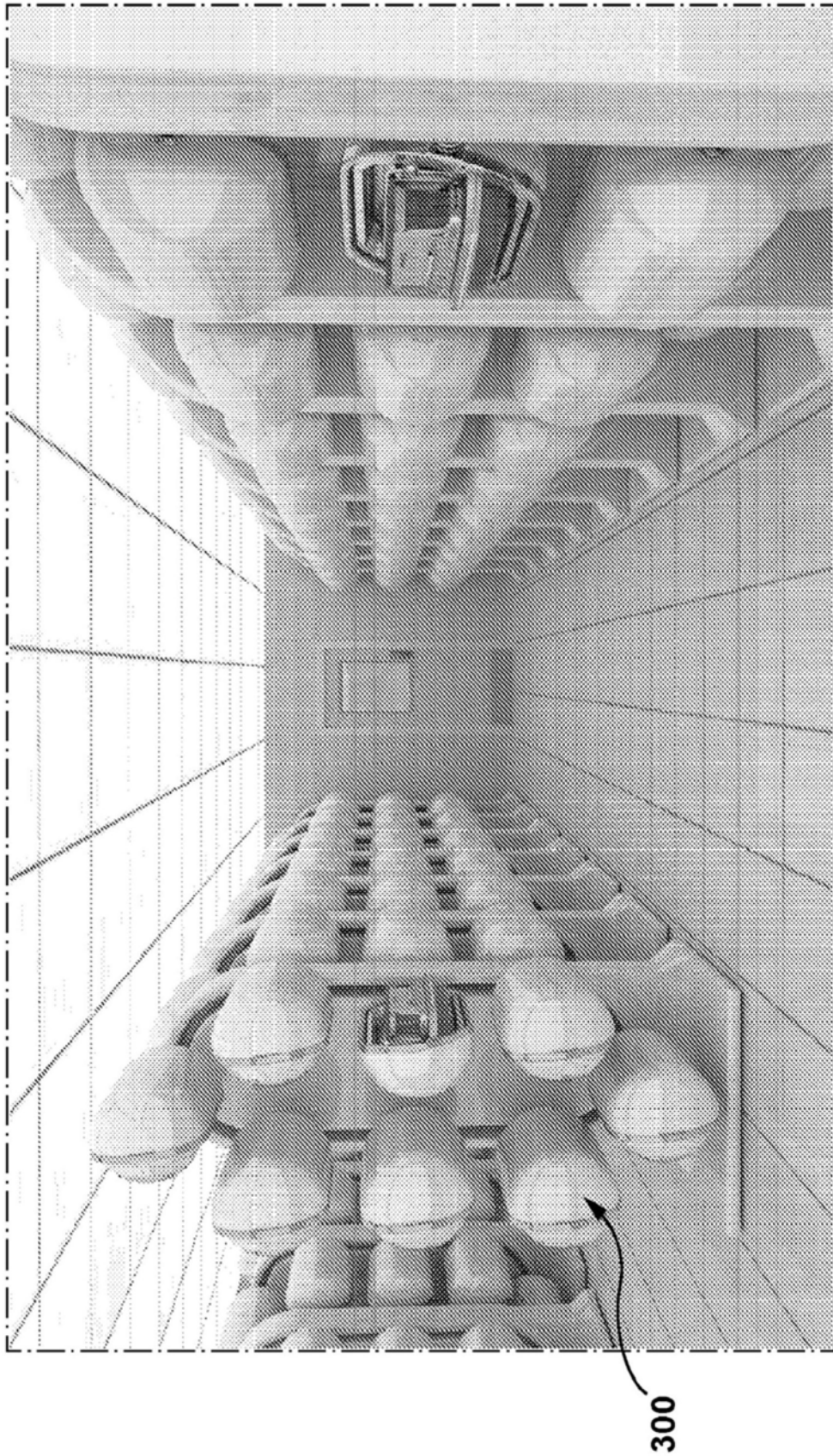


图4

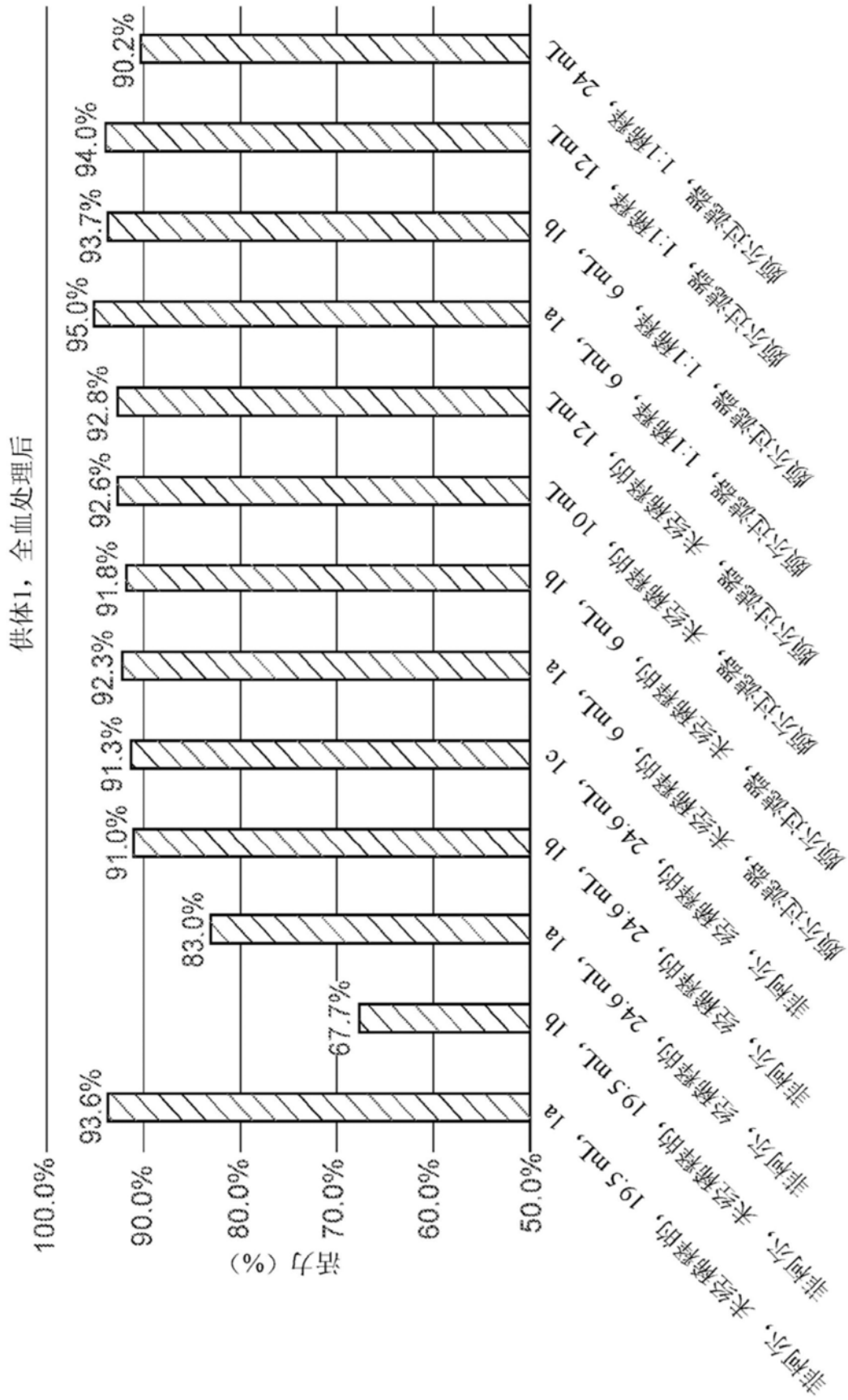


图6A

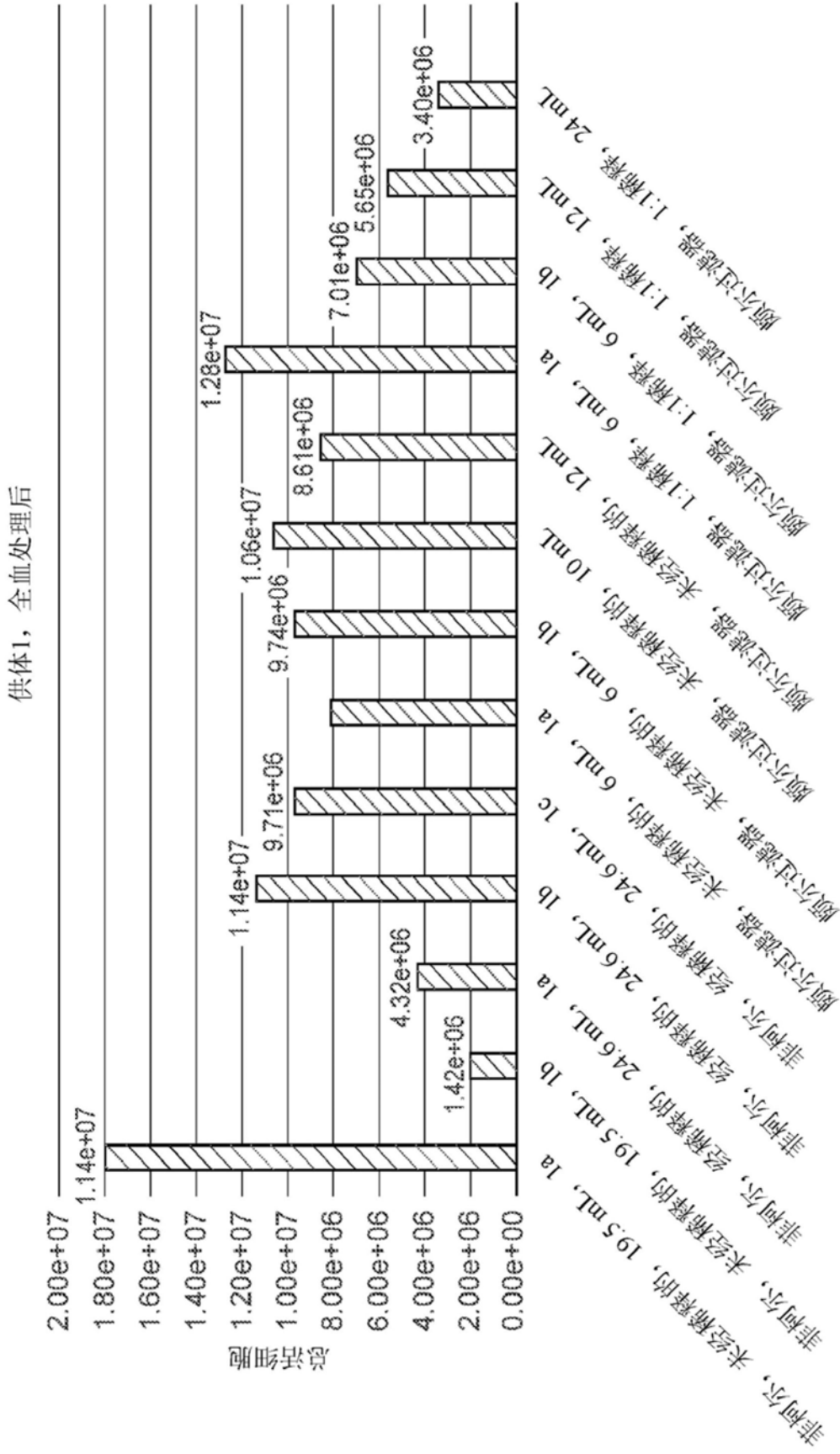


图6B

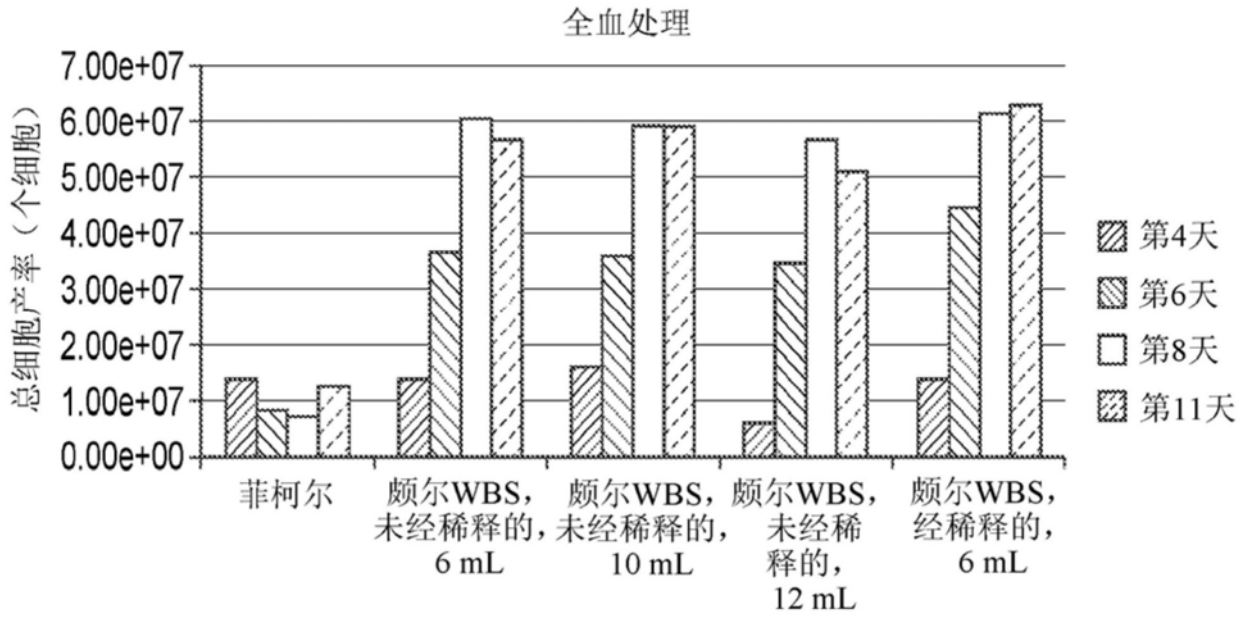


图7A

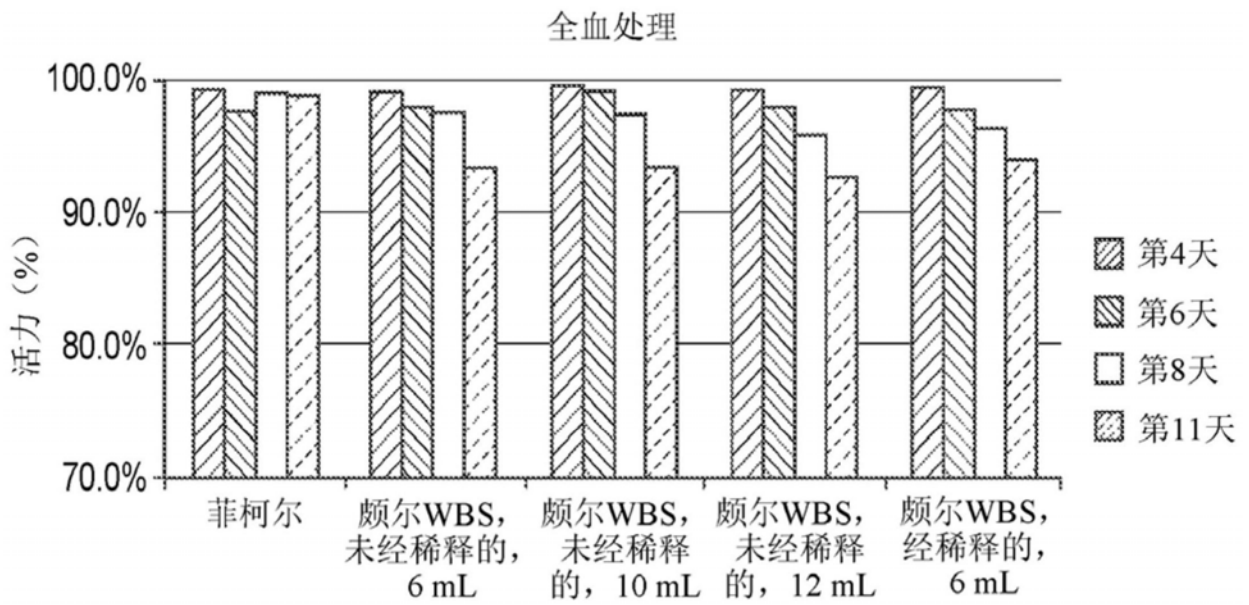


图7B

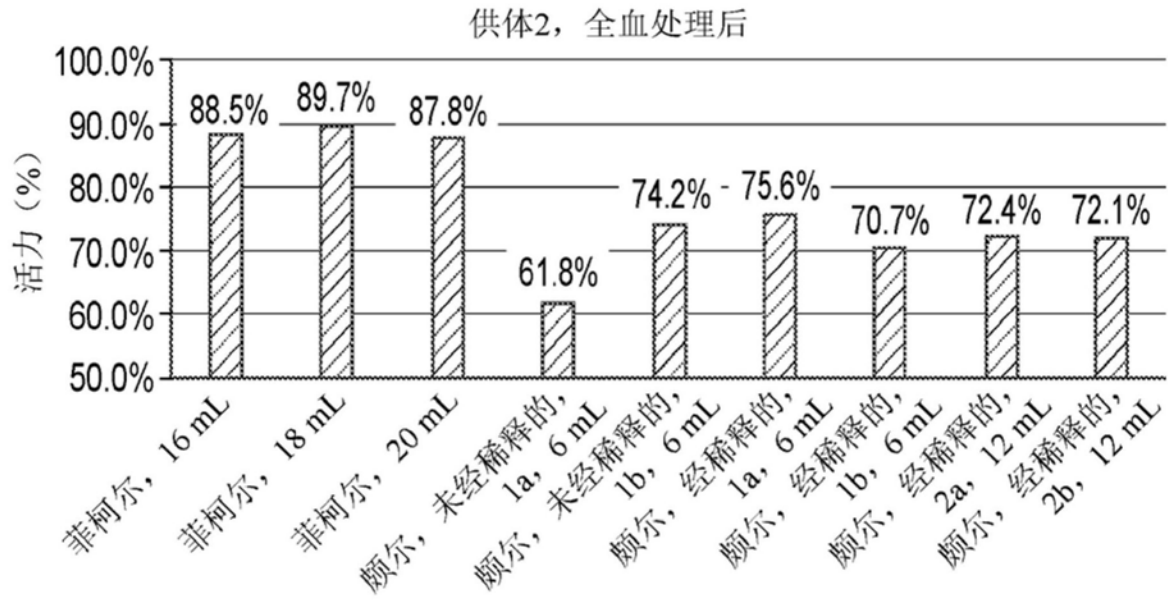


图8A

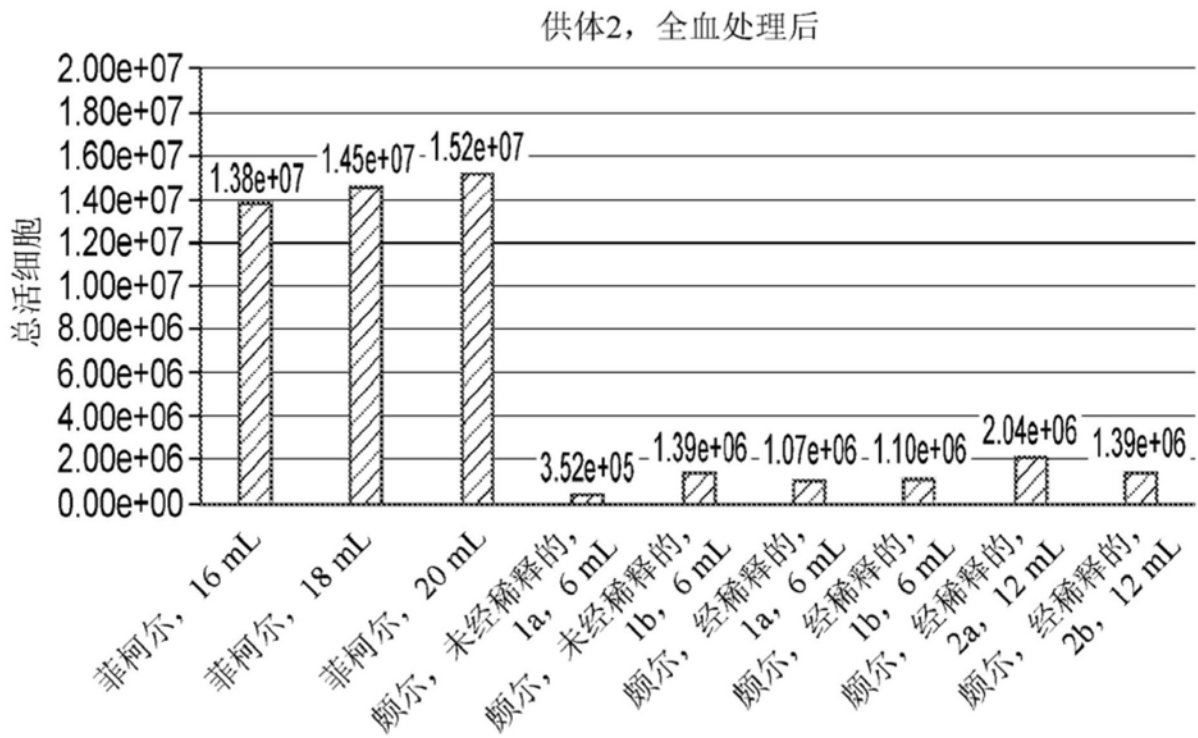


图8B

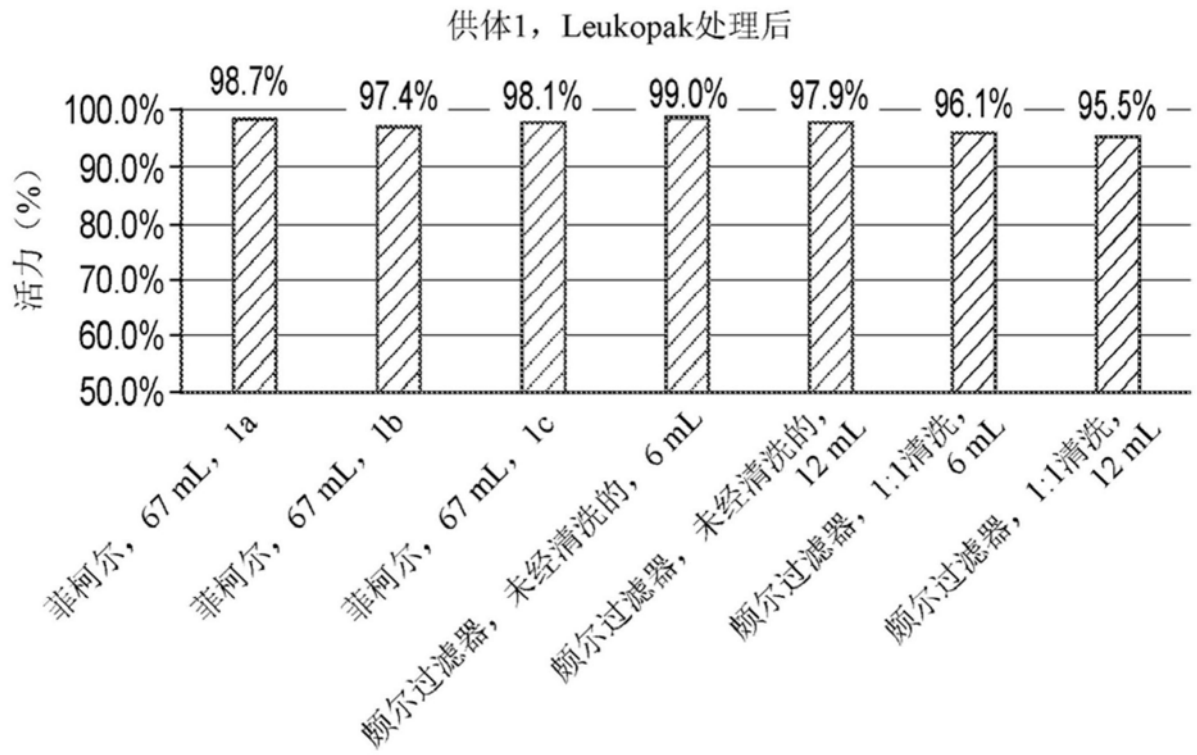


图9A

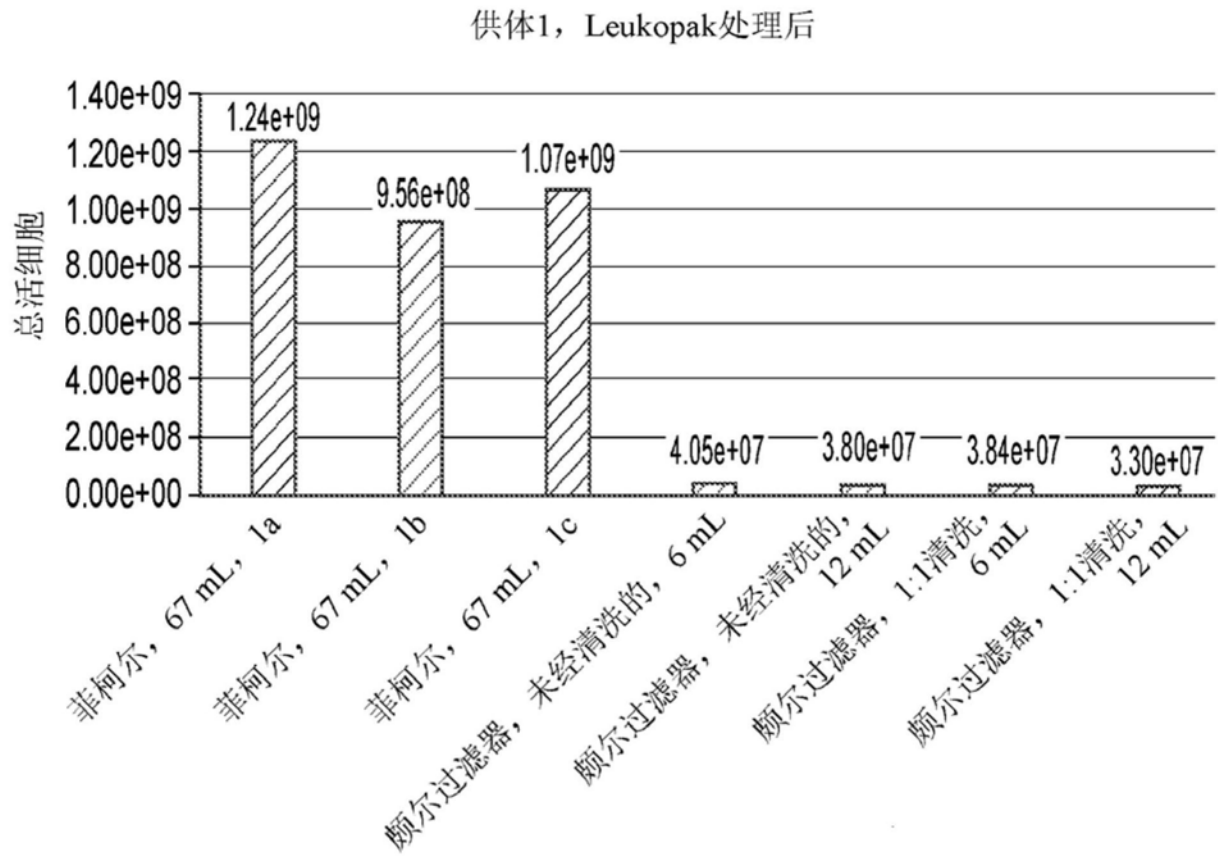


图9B

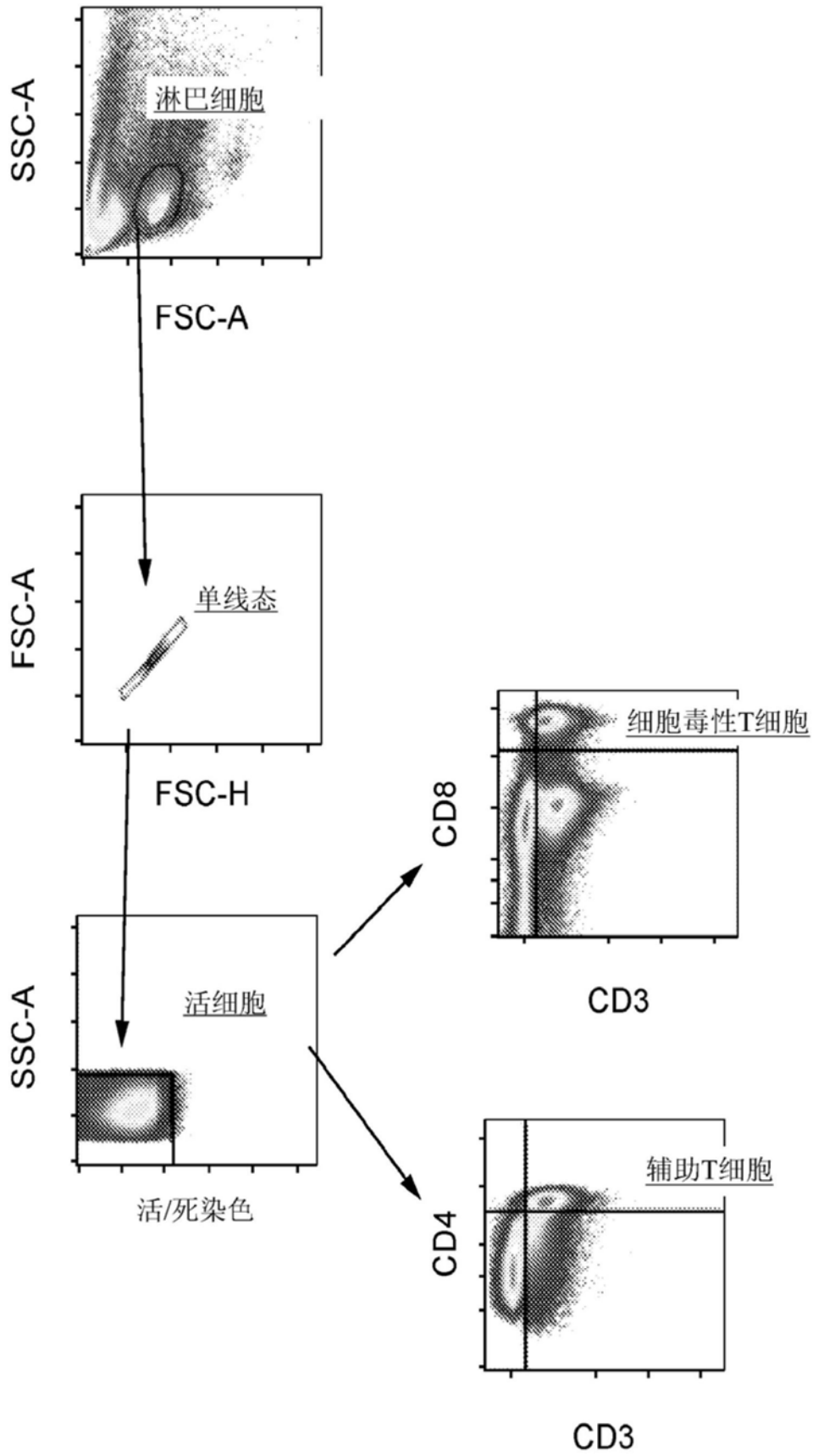


图10

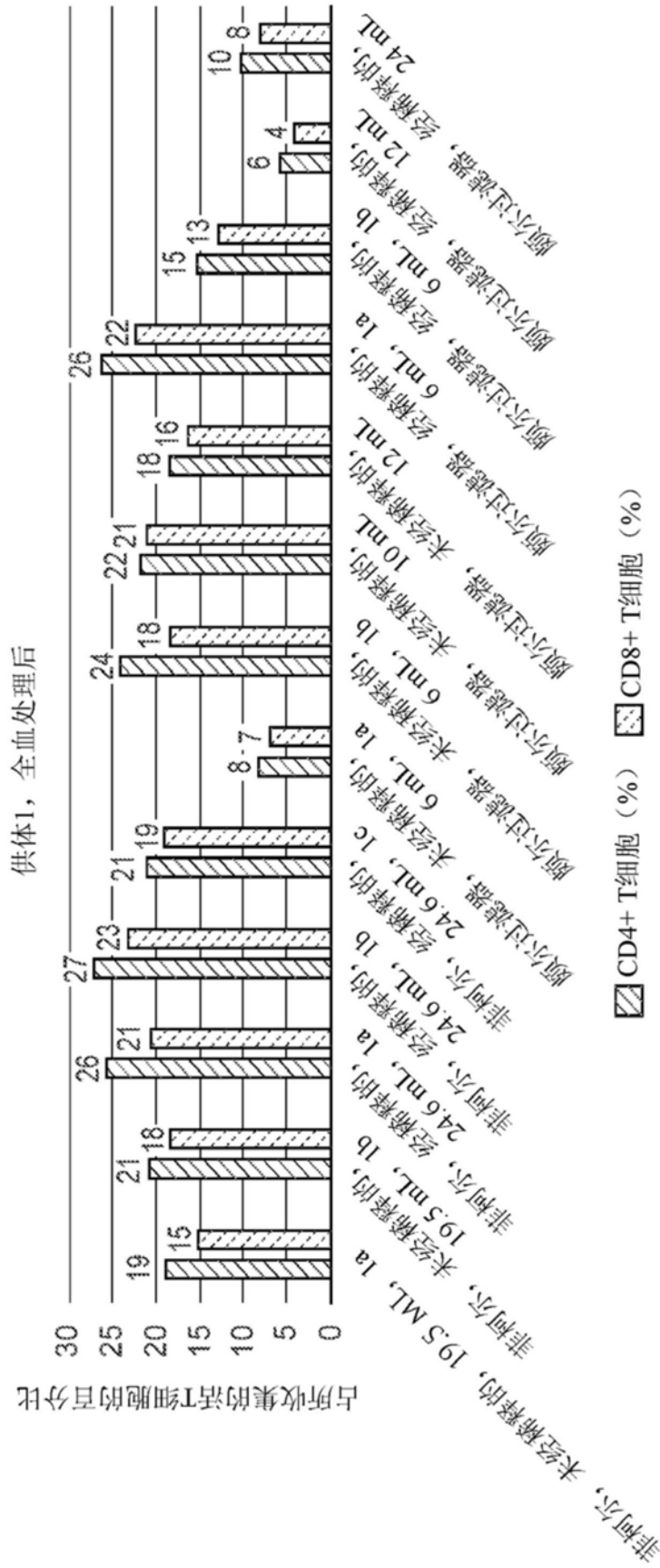


图11

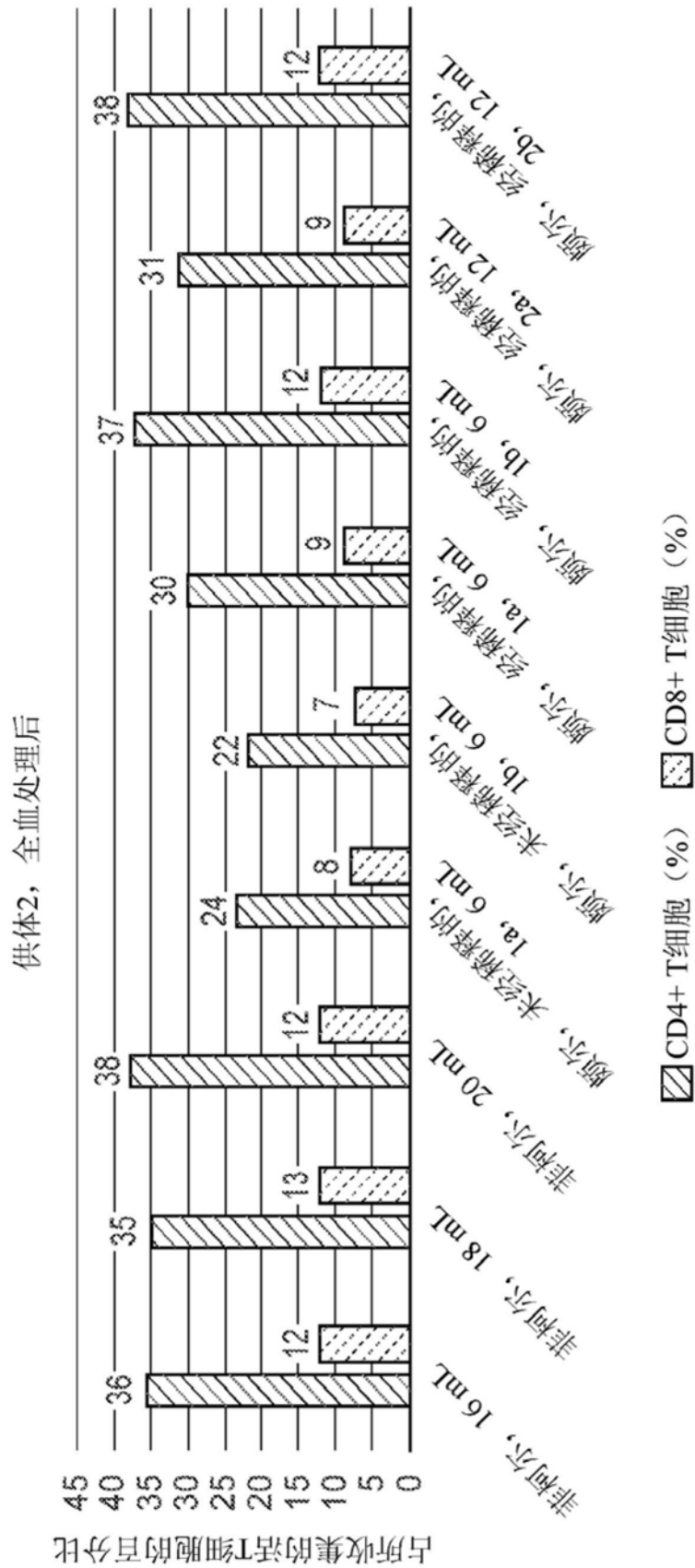


图12

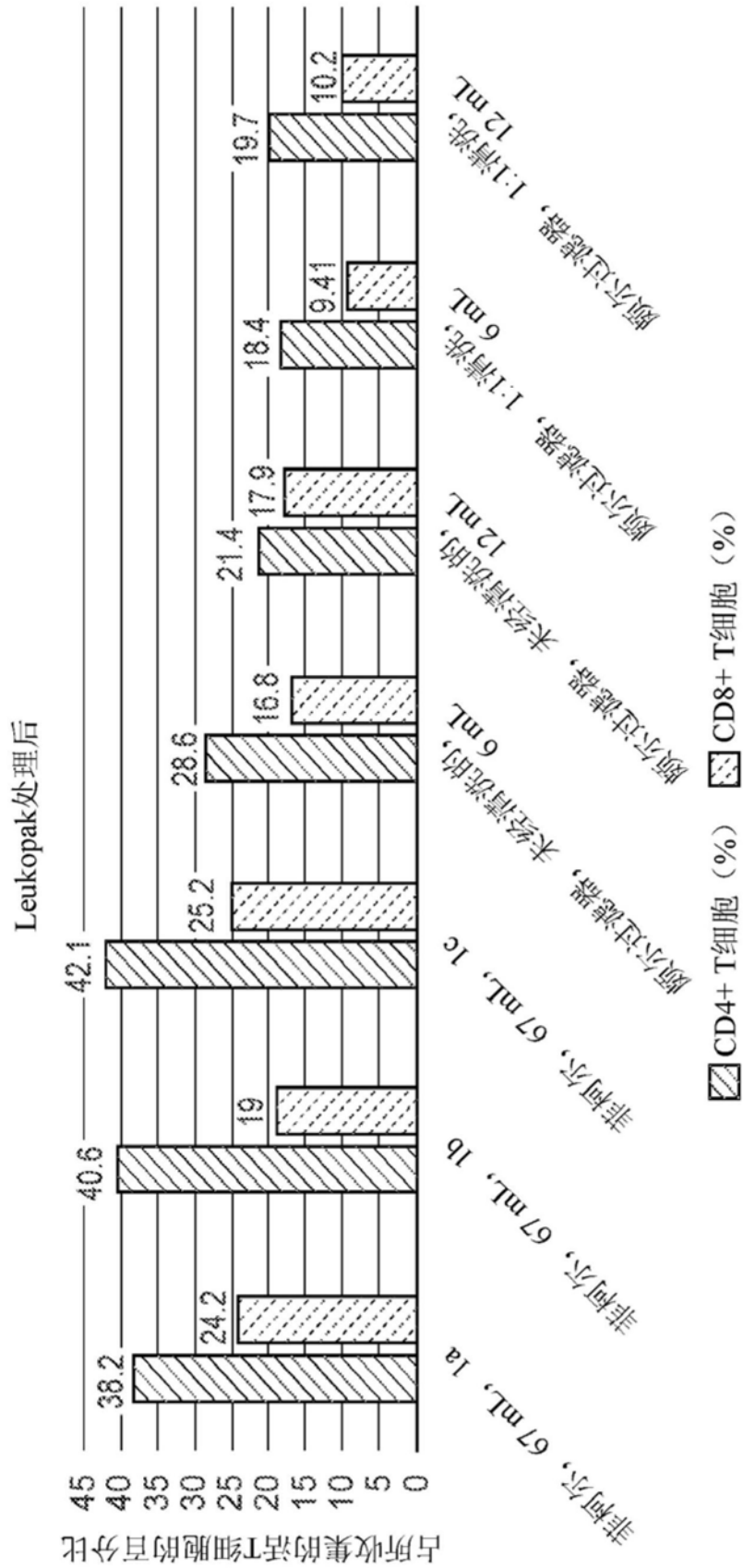


图13