(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0102928
(43) 공개일자 2021년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) *C12M 1/26* (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 47/04 (2013.01)
C12M 23/42 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7020939
(22) 출원일자(국제) 2019년12월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년07월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/065731
(87) 국제공개번호 WO 2020/123655
국제공개일자 2020년06월18일
(30) 우선권주장
62/778,078 2018년12월11일 미국(US)

(71) 출원인
론자 워커스빌 아이엔씨.
미합중국 21793 메릴랜드주, 워커스빌, 빅스 포드 로드 8830
(72) 발명자
맥아피, 에리카
미국, 텍사스 77584, 펄랜드, 에이피티. 2906, 새도우 크릭 피케이웨이 12400
쉬, 옐링
미국, 메릴랜드 20878, 게이더스버그, 홀마드 스트리트 103
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
황이남

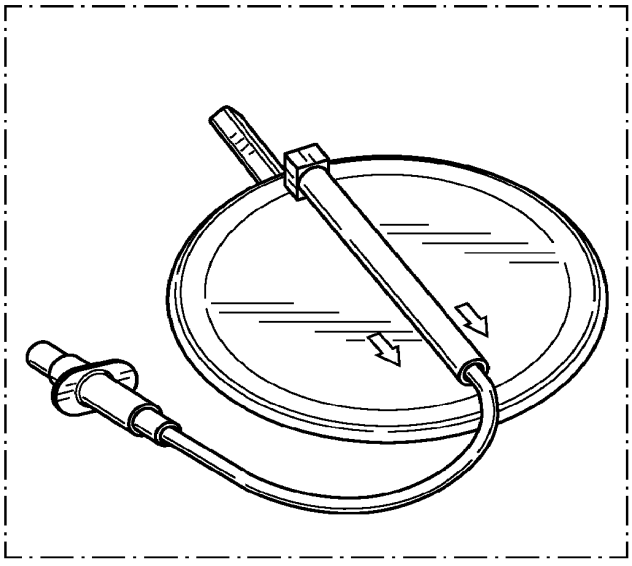
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 **자동화된 생물반응기에 사용하기 위한 세포 단리**

(57) 요 약

본 발명은 자동화 처리를 위해 표적 세포 집단을 포획하기 위한 세포 분리 필터를 포함하는 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트를 제공한다. 본 발명은 또한 카세트를 사용하고 상기 방법을 수행하기 위한 자동화된 세포 조작 시스템뿐만 아니라 표적 세포 집단을 분리하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도2b



(52) CPC특허분류
C12M 33/14 (2013.01)
C12M 41/48 (2013.01)
C12N 15/90 (2013.01)
(72) 발명자
반다페일, 사마타
미국, 메릴랜드 21770, 몬로비아, 비리디안 테라스 4297
아브라함, 이튼
미국 메릴랜드 20684, 포토맥, 코드 하버 엘엔. 7540

명 세 서

청구범위

청구항 1

자동화된 세포 조작 (engineering) 시스템에서 사용하기 위한 카세트로서,

(a) 세포 샘플 투입구 (cellular sample input);

(b) 상기 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 (fluidly connected) 세포 분리 필터;

(c) 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버; 및

(d) 상기 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구 (cellular sample output)를 포함하고,

여기서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터 다음에 원심분리기를 포함하지 않는, 카세트.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 세포 분리 필터는 세포 집단을 포획하는 매트릭스를 포함하는, 카세트.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 매트릭스는 표적 세포를 포획하는, 카세트.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 분리 필터 다음에 폐기물 수집 챔버를 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템을 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템 (back flush system), 및 임의로 상기 세포 분리 필터와 상기 세포 배양 챔버 사이에 위치한 표적 세포 집단 보유 챔버를 추가로 포함하는 카세트.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 유체 경로 (fluidics pathway)를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 유체 경로는 상기 세포 배양 챔버 내의 세포를 방해하지 않으면서 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 상기 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공하는, 카세트.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 챔버는 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버인, 카세트.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지로 사전-충전된, 카세트.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 역 플러시 배지는 항응고제를 포함하는, 카세트.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, pH 센서, 글루코스 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및/또는 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 샘플링 포트를 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 13

자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트로서,

(a) 세포 샘플 투입구;

(b) 상기 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터로서, 상기 세포 분리 필터는 면역 세포를 포획하는 매트릭스를 포함하는, 세포 분리 필터;

(c) 상기 면역 세포를 수용하도록 구성된 챔버 부피를 갖는 상기 면역 세포의 활성화, 형질도입 및/또는 확장을 수행하기 위한 세포 배양 챔버;

(d) 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템; 및

(e) 상기 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구를 포함하고,

여기서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터 다음에 원심 분리기를 포함하지 않는, 카세트.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템을 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 15

청구항 13 또는 14에 있어서, 상기 세포 배양 챔버에 연결된 하나 이상의 유체 경로를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 유체 경로는 상기 세포 배양 챔버 내의 면역 세포를 방해하지 않으면서 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 상기 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공하는, 카세트.

청구항 16

청구항 13 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 분리 필터 다음에 폐기물 수집 챔버를 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 17

청구항 13 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 분리 필터와 상기 세포 배양 챔버 사이에 위치한 면역 세포 보유 챔버를 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 18

청구항 13 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 챔버는 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버인, 카세트.

청구항 19

청구항 13 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지로 사전-충전되는, 카세트.

청구항 20

청구항 13 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유체 경로 중 하나 이상은 튜브 구성요소 (tubing component)를 통해 산소화를 허용하는 규소-기반 튜브 구성요소를 포함하는, 카세트.

청구항 21

자동화 처리를 위한 표적 세포 집단을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 상기 표적 세포 집단을 포함하는 세포 샘플을 자동화된 세포 조작 시스템의 카세트로 도입하는 단계;

(b) 세포 분리 필터를 통해 상기 세포 샘플을 통과시키는 단계;

(c) 상기 세포 분리 필터의 매트릭스 상에 상기 세포 샘플로부터 상기 표적 세포 집단을 포획하는 단계;

(d) 상기 세포 분리 필터를 역 플러싱 (back flushing)하는 단계; 및

(e) 상기 세포 분리 필터로부터 상기 표적 세포 집단을 전달하여 상기 표적 세포 집단이 자동화된 처리를 거칠 수 있도록 하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 전달 단계는 상기 표적 세포 집단을 표적 세포 집단 보유 챔버, 형질도입 시스템, 형질감염을 위한 시스템, 또는 세포 배양 챔버로 전달하여 상기 표적 세포 집단이 자동화 처리를 거칠 수 있도록 하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 형질도입 시스템은 전기천공 시스템인, 방법.

청구항 24

청구항 21 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 역 플러싱 전에 상기 세포 분리 필터 상에서 상기 포획된 세포 집단을 세척하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 25

청구항 21 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 샘플로부터의 원하지 않는 폐기물을 상기 세포 분리 필터를 통해 폐기물 수집 챔버로 통과시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 26

청구항 21 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 샘플을 상기 세포 분리 필터를 통해 통과하는 단계는 중력 여과를 통해 발생하는, 방법.

청구항 27

청구항 21 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 세포 분리 필터로부터 상기 표적 세포 집단을 전달한 후 원심 분리를 배제하는, 방법.

청구항 28

청구항 21 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자동화 처리 후에 상기 카세트로부터 상기 표적 세포 집단을 수집하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

자동화된 세포 조작 시스템으로서,

(a) 밀폐형 하우징 (enclosable housing);

(b) 상기 밀폐형 하우징 내에 포함된 카세트로서, 상기 카세트는:

i. 세포 샘플 투입구;

ii. 상기 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터;

iii. 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버; 및

iv. 상기 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구를 포함하고, 여기서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터 다음에 원심분리기를 포함하지 않는, 카세트; 및

(c) 사용자로부터 투입구를 수용하기 위한 사용자 인터페이스를 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 카세트의 상기 세포 분리 필터는 세포 집단을 포획하는 매트릭스를 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 매트릭스는 표적 세포를 포획하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 32

청구항 29 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터 다음에 폐기물 수집 챔버를 추가로 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 33

청구항 29 내지 32 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템을 추가로 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 34

청구항 29 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템 및 임의로 상기 세포 분리 필터와 상기 세포 배양 챔버 사이에 위치한 표적 세포 집단 보유 챔버를 추가로 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 35

청구항 29 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 하나 이상의 유체 경로를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 유체 경로는 상기 세포 배양 챔버 내의 세포를 방해하지 않으면서 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 상기 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 36

청구항 29 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트의 상기 세포 배양 챔버는 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버인, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 37

청구항 29 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트의 상기 세포 배양 챔버는 백 (bag) 또는 경질 챔버인, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 38

청구항 29 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지로 사전-충전되는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 역 플러시 배지는 항응고제를 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 40

청구항 29 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 pH 센서, 글루코스 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및/또는 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 추가로 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 41

청구항 29 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카세트는 하나 이상의 샘플링 포트를 추가로 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

청구항 42

청구항 29 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 컴퓨터 제어 시스템을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 사용자 인터페이스는 상기 컴퓨터 제어 시스템에 연결되어 상기 자동화된 세포 조작 시스템에 명령을 제공하는, 자동화된 세포 조작 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자동화 처리를 위한 표적 세포 집단을 포획하기 위한 세포 분리 필터를 포함하는 자동화된 세포 조작(engineering) 시스템에서 사용하기 위한 카세트를 제공한다. 본 발명은 또한 표적 세포 집단을 분리하는 방법 및 카세트를 사용하고 상기 방법을 수행할 수 있는 자동화된 세포 조작 시스템을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 첨단 세포 치료요법의 임상 채택을 가속화하는 것에 대한 기대가 늘어남에 따라, 이러한 치료요법이 전 세계 환자에게 도움이 될 것이라는 기본 제조 전략에 더 많은 관심이 쏠리고 있다. 세포 치료요법은 임상적으로 큰 가능성을 갖지만, 상환 (reimbursement)에 비해 높은 제조 비용은 상업화에 강력한 장애물을 제시한다. 따라서, 비용 효율성, 프로세스 효율성 및 제품 일관성에 대한 필요성은 많은 세포 치료요법 분야에서 자동화를 위한 노력을 주도하고 있다.

[0003] 다양한 프로세스의 자동화는 치료요법을 위한 세포 집단을 생성하는데 관여한다. 이는 이러한 중요한 치료요법을 광범위한 환자 집단으로 전환 (translation)하기 위해 세포 활성화, 형질도입 및 상용 제조 플랫폼으로의 확장의 통합을 포함한다.

[0004] 또한, 오염 및 기타 문제를 제한하기 위해 세포 집단이 외부 환경에 노출되는 횟수 또는 단계를 제한하는 것은 자동화된 세포 처리 플랫폼에서 매우 바람직하다. 세포 샘플이 자동화된 시스템에 직접 제공될 수 있는 프로세스가 필요한데, 여기서, 임의의 세포 단리 또는 세포 여과는 자동화된 시스템 내에서 수행되므로 세포가 환경에 노출될 때 총 단계 수는 잠재적으로 다양한 자동화된 프로세스 후에 단지 도입 및 수집으로 제한될 수 있다.

발명의 내용

[0005] 일부 구현예에서, 본원에는 세포 샘플 투입구 (cellular sample input), 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 (fluidly connected) 분리 필터, 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버, 및 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구 (cellular sample output)를 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트가 제공된다. 적합하게는, 상기 카세트는 세포 분리 필터 다음에 원심분리기를 포함하지 않는다.

[0006] 추가의 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트가 제공되는데, 이는 세포 샘플 투입구, 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터로서, 상기 세포 분리 필터는 면역 세포를 포획하는 매트릭스를 포함하는, 세포 분리 필터, 면역 세포를 수용하도록 구성된 챔버 부피를 갖는 면역 세포의 활성화, 형질도입 및/또는 확장을 수행하기 위한 세포 배양 챔버, 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템 (back flush system), 및 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구를 포함한다. 적합하게는, 카세트는 세포 분리 필터 다음에 원심분리기를 포함하지 않는다.

[0007] 추가의 구현예에서, 본원에는 자동화 처리를 위한 표적 세포 집단을 제조하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 표적 세포 집단을 포함하는 세포 샘플을 자동화된 세포 조작 시스템의 카세트로 도입하는 단계, 세포 분리 필터를 통해 세포 샘플을 통과시키는 단계, 세포 분리 필터의 매트릭스 상으로 세포 샘플로부터 표적 세포 집단을 포획하는 단계, 세포 분리 필터를 역 플러싱하는 단계, 및 세포 분리 필터로부터 표적 세포 집단을 전달하여 표적 세포 집단이 자동화 처리를 거칠 수 있도록 하는 단계를 포함한다.

[0008] 또한 본원에는 자동화된 세포 조작 시스템이 제공되는데, 이는 밀폐형 하우징 (enclosable housing), 밀폐형 하우징 내에 포함된 카세트로서, 상기 카세트는 세포 샘플 투입구, 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포

분리 필터, 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버, 및 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구를 포함하고, 여기서, 상기 카세트는 세포 분리 필터 다음에 원심분리기를 포함하지 않는, 카세트, 및 사용자로부터 투입구를 수용하기 위한 사용자 인터페이스를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본원의 구현예에 기재된 바와 같이 자동화된 세포 조작 시스템의 카세트로 수행될 수 있는 다양한 단계를 나타낸다.

도 2a는 본원의 구현예에 따른 예시적인 카세트를 나타낸다.

도 2b 및 2c는 본원의 구현예에 따른 예시적인 세포 분리 필터를 나타낸다.

도 3a 및 3b는 본원의 구현예에 따른 자동화된 세포 조작 시스템의 이미지를 나타낸다.

도 4는 본원의 구현예에 기재된 바와 같이 예시적인 세포 조작 시스템을 포함하는 실험실 공간을 나타낸다.

도 5는 본원의 구현예에 기재된 바와 같이 자동화된 세포 조작 시스템의 카세트에서 세포 분리 및 단리에 대한 흐름 경로 (flowpath)를 나타낸다.

도 6a는 전혈 세포 단리 피콜 (Ficoll) 및 세포 분리 여과 방법을 통한 백혈구 단리 후 공여자 1 세포 생존율 (%)의 비교를 나타낸다.

도 6b는 전혈 피콜 및 세포 분리 여과 처리 후 공여자 1 총 세포 수율의 비교를 나타낸다.

도 7a는 피콜 및 여과 방법을 통한 전혈 처리 후 배양 11일에 걸친 총 세포 수율을 나타낸다.

도 7b는 피콜 및 여과를 통한 전혈 처리 후 중복 (duplicate) T-25 플라스크 배양의 평균 배양 생존율 (%)을 나타낸다.

도 8a는 전혈 세포 단리 Ficoll 및 여과 방법을 통한 백혈구 단리 후 공여자 2 세포 생존율 (%)의 비교를 나타낸다.

도 8b는 전혈 피콜 및 여과 처리 후 공여자 2 총 세포 수율의 비교를 나타낸다.

도 9a는 피콜 및 여과 방법을 통한 백혈구 단리 후 류코팩 (Leukopak) 공여자 세포 생존율 (%)의 비교를 나타낸다.

도 9b는 전혈 피콜 및 여과 처리 후 류코팩 공여자 총 세포 수율의 비교를 나타낸다.

도 10은 FACS 분석을 위한 게이팅 전략을 나타낸다.

도 11은 여과된 공여자 1 및 피콜 단리된 전혈 수집 샘플로부터의 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ T-세포의 백분율을 나타낸다.

도 12는 여과된 공여자 2 및 피콜 단리된 전혈 수집 샘플로부터 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ T-세포의 백분율을 나타낸다.

도 13은 여과된 공여자 2 및 피콜 단리된 류코팩 수집 샘플로부터의 CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ T-세포의 백분율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본원에 나타내고 기재된 특정 구현은 예시이며 달리 어떠한 방식으로도 적용 범위를 제한하려는 의도가 아님이 이해되어야 한다.

[0011] 본원에 언급된 공개된 특허, 특허 출원, 웹사이트, 회사명 및 과학 문헌은 각각이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 이들의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원에 인용된 임의의 참조문헌과 이 명세서의 특정 교시 사이의 임의의 충돌은 후자에게 유리하게 해결되어야 한다. 마찬가지로, 당해 기술분야에서 이해되는 단어 또는 구의 정의와 본 명세서에 구체적으로 교시된 단어 또는 구의 정의 사이의 임의의 충돌은 후자에게 유리하게 해결되어야 한다.

[0012] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 또한, 내용을 달리 명확하게 지시하지 않는

한, 이들이 참조하는 용어의 복수 형태를 구체적으로 포함한다. 용어 "약 (about)"은 본원에 대략적으로 (approximately), 영역, 대략 (roughly) 또는 약 (around)을 의미하는 것으로 사용된다. 용어 "약"이 숫자 범위와 함께 사용되는 경우, 명시된 수치 값의 위와 아래에 있는 경계를 확장함으로써 해당 범위를 변형한다. 일반적으로, 용어 "약"은 본원에서 20%의 변동만큼 명시된 값의 위와 아래에 있는 수치 값을 변형하기 위해 사용된다.

[0013] 본원에 사용된 기술적 및 과학적 용어는 달리 정의되지 않는 한, 본 출원이 속하는 기술 분야의 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본원에는 당해 기술 분야의 숙련가에게 알려진 다양한 방법론 및 재료를 참조한다.

[0014] 구현예에서, 본원에는 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트가 제공된다. 도 1은 다양한 프로세스가 다양한 세포 샘플 및 집단의 생산을 허용하는 밀폐된 자동화 시스템에서 수행될 수 있는 예시적인 카세트 (102)를 나타낸다. 그러한 프로세스는 활성화, 형질도입, 확장, 농축, 및 수집/수확 단계를 포함할 수 있다.

[0015] 본원에 기재된 바와 같이, 카세트 및 방법은 활성화, 형질도입, 확장, 농축, 및 수확과 같은 단계를 수행하기 위한 지침을 이에 갖는 완전히 밀폐된 자동화된 세포 조작 시스템 (300) (도 3a, 3b 참조)에서 적합하게 사용되고 수행된다. 예를 들어, CAR T 세포를 포함하는 유전적으로 변형된 면역 세포의 자동화된 생산을 위한 세포 조작 시스템은 2018년 8월 31일에 출원된 미국 특허 출원 번호 제16/119,618호 (이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된)에 기재되어 있고, 여기서는 자동 세포 조작 시스템, COCOON 또는 COCOON 시스템으로도 불린다.

[0016] 예를 들어, 사용자는 세포 배양 및 시약 (예를 들어, 활성화 시약, 벡터, 세포 배양 배지, 영양분, 선택 시약 등)으로 사전-충전된 자동화된 세포 조작 시스템 및 세포 생산을 위한 파라미터 (예를 들어, 시작 세포의 수, 배지의 유형, 활성화 시약의 유형, 벡터의 유형, 세포의 수 또는 생산될 용량 등)를 제공할 수 있으며, 자동화된 세포 조작 시스템은 또한 사용자로부터 추가 투입구 없이 CAR T 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 생산하는 방법을 포함하여 다양한 자동화된 방법을 수행할 수 있다. 일부 구현예에서, 완전히 밀폐된 자동화된 세포 조작 시스템은 비-멸균 환경에 대한 세포 배양물의 노출을 감소시킴으로써 세포 배양물의 오염을 최소화한다. 추가의 구현예에서, 완전히 밀폐된 자동화된 세포 조작 시스템은 세포의 사용자 취급을 감소시킴으로써 세포 배양물의 오염을 최소화한다.

[0017] 본원에 기재된 바와 같이, 자동화된 세포 조작 시스템 (300)은 적합하게는 카세트 (102)를 포함한다. 따라서, 구현예에서, 본원에는 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트가 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, "카세트"는 본원에 기재된 방법의 다양한 요소를 수행하기 위한 하나 이상의 챔버를 포함하는 자동화된 세포 조작 시스템의 대체로 독립적이고 (self-contained) 제거 가능하고 교체 가능한 요소를 지칭하며, 적합하게는 또한 세포 배지, 활성화 시약, 세척 배지 등 중 하나 이상을 포함한다.

[0018] 도 2a는 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 예시적인 카세트 (102)를 나타낸다. 구현예에서, 카세트 (102)는 세포 샘플 투입구 (202)를 포함한다. 세포 샘플 투입구 (202)는 카세트 (102)로의 도입 또는 로딩 전에 세포 샘플이 배치될 수 있는 바이알 또는 챔버로서 도 2a에 나타낸다. 다른 구현예에서, 세포 샘플 투입구 (202)는 단순히 주사기 또는 세포-함유 백 (bag), 예컨대 혈액 백이 연결될 수 있는 멸균-잠금 튜브 (sterile-locking tubing) (예를 들어, 루어 (luer) 잠금 튜브 연결 등)일 수 있다.

[0019] 카세트 (102)는 카세트 내에 위치하고 세포 샘플 투입구 (202)에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터 (204)를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "유체적으로 연결된"은 카세트 (102)를 포함한 시스템의 하나 이상의 구성요소가 유체 (가스 및 액체 포함)가 새거나 부피 손실 없이 구성요소들 사이를 통과할 수 있도록 하는 적합한 요소를 통해 연결됨을 의미한다. 예시적인 유체 연결은 실리콘 또는 고무 튜브, 루어 잠금 연결 등과 같은 당업계에 알려진 다양한 튜브, 채널 및 연결을 포함한다. 유체적으로 연결되는 구성요소는 또한 유체 연결을 여전히 유지하면서 각 구성요소 사이에 추가 요소를 포함할 수 있음을 이해해야 한다. 즉, 유체 연결된 구성요소는 구성요소 사이를 통과하는 유체 또한 이러한 추가 요소를 통과할 수 있도록 추가 요소를 포함할 수 있지만, 반드시 그렇게 할 필요는 없다.

[0020] 카세트 (102)는 적합하게는 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버 (206)를 추가로 포함한다. 세포 배양 챔버 (206)의 특징 및 용도의 예가 본원에 기재되어 있다.

[0021] 구현예에서, 카세트 (102)는 세포 배양 챔버 (도 2a에서 카세트 (102) 내부 참조)에 연결된 하나 이상의 유체

경로를 추가로 포함한다. 또한, 카세트 (102)에는 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구 (208)가 포함된다. 본원에 기재된 바와 같이, 세포 샘플 배출구 (208)는 추가 처리, 저장 또는 환자의 잠재적인 사용을 위한 다양한 자동화된 절차에 따라 세포를 수확하는 데 사용된다. 유체 경로의 예는, 본원에 기재된 바와 같이 카세트의 요소에 영양분, 용액 등을 제공하는 다양한 튜브, 채널, 모세관, 미세유체 요소 등을 포함한다.

[0022] 본원에 기재된 바와 같이, 카세트 (102)는 세포 분리 필터 (204) 다음에 원심분리기를 명시적으로 배제한다. "세포 분리 필터 다음에"는 원심분리기가 세포 분리 필터의 하부스트림 또는 세포 분리 필터의 역 플러시의 하부스트림에 포함되지 않는 구현예를 포함한다. 본원에 기재된 다양한 세포 분리 필터 및 방법의 사용을 통해, 원심분리 절차를 통한 추가 세포 분리 및 원심분리기의 사용이 필요하지 않다고 판단되었다. 그러나, 구현예에서, 추가 여과 시스템, 예컨대 컬럼 여과, 접선 유동 여과 (tangential flow filtration), 및/또는 자기 여과 시스템이 사용될 수 있다.

[0023] 예시적인 구현예에서, 세포 분리 필터 (204)는 세포 집단, 적합하게는 표적 세포를 포획하는 매트릭스를 포함한다. 적합한 매트릭스 재료는 가스 플라즈마로 처리된 다양한 다공성 배지를 포함한다. 다공성 배지는 천연 또는 합성 섬유 또는 직조 재료, 또는 소결된 분말 재료일 수 있다. 예시적인 매트릭스 재료는, 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,701,267호, 제4,936,998호, 제4,880,548호, 제4,923,620호, 제4,925,572호, 및 제5,679,264호에 개시된 것들을 포함하며, 상기 특허 각각의 개시내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, "표적 세포 집단" 또는 "표적 세포"는 잔여 표적 세포 집단에 다른 세포 유형이 거의 없도록 파편 또는 기타 오염물을 포함한 더 큰 세포 집단으로부터 분리되어야 하는 원하는 세포 하위-집합을 지칭한다. 예시적인 표적 세포 집단은 면역 세포, 암 세포 등을 포함한다.

[0024] 예시적인 세포 분리 필터는 적합하게는 면역 세포의 포획을 허용하는데, 즉 매트릭스가 매트릭스 위 또는 이의 내에 면역 세포를 보유한다. 본원에 사용된 바와 같이, "면역 세포"는 호염기구, 호산구, 호중구, 백혈구 등을 포함하고, 세포, 예컨대 비만 세포, 수지상 세포, 자연 킬러 세포, B 세포, T 세포 등을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 카세트 및 세포 분리 필터는 적합하게는, 전혈 세포 샘플 또는 백혈구성분 채집술 샘플 (leukophoresis sample) (백혈구가 전혈로부터 분리된 샘플)을 포함한 세포 샘플로부터 면역 세포를 분리하기 위해 사용된다.

[0025] 도 2b 및 2c는 본원에 기재된 카세트 및 방법에 사용하기 위한 예시적인 세포 분리 필터를 나타낸다. 도 2b는 회수된 혈액에 대한 백혈구 필터 (Haemonetics, Braintree, MA)를 나타내고, 도 2c는 주사기 필터 (PALL ARCODISC®, PALL Laboratory, Port Washington, NY)를 나타낸다.

[0026] 추가의 구현예에서, 카세트 (102)는 적합하게는 세포 분리 필터 (204) 다음에 있고 분리 필터에 유체적으로 연결되는 폐기물 수집 챔버 (510) (도 2a에서 카세트 (102) 내에 포함됨)를 포함한다. 카세트의 흐름 경로 내의 폐기물 수집 챔버 (510)에 대한 예시적인 위치를 도 5에 나타낸다. 폐기물 수집 챔버 (510)는 적합하게는 세포 분리 필터를 통과하는 폐기물이 추가 처리 또는 폐기를 위해 유지될 수 있도록 다음 또는 하부스트림 (즉, 세포 분리 필터 후 유체적으로 연결됨)에 배치된다. 수집될 수 있는 폐기물은 적합하게는 여과되는 세포 샘플 내의 잠재적 오염물뿐만 아니라 혈액 성분뿐만 아니라 원치 않는 전체 또는 용해된 세포를 포함한다. 폐기물 챔버 (510)는 카세트 (102) 내의 고체 챔버 또는 백의 형태일 수 있거나, 카세트 외부의 백 또는 챔버일 수 있지만, 유체 경로, 예컨대 튜브 및 샘플링 포트를 통해 연결될 수 있다.

[0027] 구현예에서, 카세트 (102)는, 적합하게는 카세트 (102) 내에 (즉, 도 2a에 나타낸 구조 내에) 포함되고 분리 필터 (204)에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템 (512)을 포함한다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 세포 세척 시스템 (512)은 카세트 (102)의 다양한 투입구 포트 중 하나에 연결되어 분리 필터 (204)로의 직접적인 유체 경로를 허용할 수 있다. 구현예에서, 세포 세척 시스템 (512)은 적합하게는 세포 세척 배지를 포함하는 카세트 내에 포함된 컨테이너 (container) 또는 백이다. 세포 세척 배지는 적합하게는 표적 세포 집단과 분리 필터를 세척하는데 사용되며, 표적 세포 집단을 세포 분리 필터로부터 카세트의 또 다른 부분으로 전달하기 전에 표적 세포 집단으로부터 임의의 원하지 않는 폐기물 세포 또는 오염물을 제거한다. 세포 세척 시스템 (512)은 또한 카세트 (102) 외부에 포함될 수 있다. 추가의 구현예에서, 세포 세척 시스템 (512)은 표적 세포 집단 보유 챔버에 보유된 세포를 세척하는데 사용될 수 있다.

[0028] 추가의 구현예에서, 카세트 (102)는 역 플러시 시스템 (514) (카세트 (102) 내부에 적합하게 위치하기 때문에 도 2에는 보이지 않음)을 포함하지만, 카세트를 위한 흐름 경로의 요소로서 도 5에 나타낸다. 세포 세척 시스템 (512)과 같이, 역 플러시 시스템 (514)은 적합하게는 카세트 내에 포함된 컨테이너 또는 백이며, 카세트

(102)의 다양한 투입구 포트 중 하나에 연결되어 분리 필터 (204)로의 직접적인 유체 경로를 허용할 수 있다. 역 플러시 시스템 (514)은 또한 카세트 외부에 포함될 수 있다. 역 플러시 시스템 (514)은 적합하게는, 역 플러시 시스템 내에 포함된 역 플러시 배지가 필터로부터 본원에 기재된 바와 같은 보유 챔버 또는 세포 배양 챔버를 포함한 카세트의 또 다른 섹션으로 분리 필터에 의해 포획된 세포를 전달하기 위해 반대 방식으로 세포 분리 필터 (204) 내로 또는 그 위로 도입될 수 있는 방식으로 분리 필터 (204)에 유체적으로 연결된다.

[0029] 카세트 (102)는 또한 추가로, 세포 분리 필터와 세포 배양 챔버 사이에 위치한 표적 세포 집단 보유 챔버 (516) (카세트 (102) 내부에 위치하기 때문에 도 2에서 보이지 않음)를 임의로 포함할 수 있다. 도 5는 카세트를 위한 흐름 경로에서 표적 세포 집단 보유 챔버 (516)의 예시적인 위치를 나타낸다. 표적 세포 집단 보유 챔버 (516)는 적합하게는, 분리 필터 (204)에 포획된 다음, 역 플러시 시스템 (514)을 통해 역 플러시되어 포획된 세포를 표적 세포 집단 보유 챔버 (516)로 전달된 표적 세포 집단이 내부에 있는 카세트 내에 위치한 저장소 또는 적합한 챔버이다.

[0030] 본원에 기재된 바와 같이, 다양한 튜브 요소를 포함할 수 있는 유체 경로는 적합하게는 세포 배양 챔버 내의 세포를 방해하지 않으면서 세포 배양 챔버를 포함한 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 카세트의 다양한 부분으로의 영양분의 분배를 제공한다. 카세트 (102)는 또한 다양한 유체 경로를 통한 유동을 제어하기 위한 하나 이상의 밸브 (522)뿐만 아니라 본원에 기재된 바와 같이 카세트를 통해 유체를 구동하기 위한 하나 이상의 펌프 (520) 및 연동 펌프를 포함한 관련 튜브를 추가로 포함한다 (흐름 경로 내의 예시적인 위치에 대해 도 5 참조).

[0031] 예시적인 구현예에서, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 세포 배양 챔버 (206)는 쉽게 구부러지거나 가용성이 아닌 편평한 비-가요성 챔버 (즉, 플라스틱과 같은 실질적으로 비-가요성 재료로 제조됨)이다. 비-가요성 챔버의 사용은 세포가 실질적으로 방해받지 않은 상태로 유지되도록 한다. 도 2a에 나타낸 바와 같이, 세포 배양 챔버 (206)는 면역 세포 배양물이 세포 배양 챔버의 바닥을 가로질러 확산될 수 있도록 배향된다. 도 2a에 나타낸 바와 같이, 세포 배양 챔버 (206)는 적합하게는 바닥이나 테이블과 평행한 위치에 유지되어 방해받지 않은 상태로 세포 배양을 유지하여 세포 배양물이 세포 배양 챔버 바닥의 넓은 영역에 확산될 수 있도록 한다. 구현예에서, 세포 배양 챔버 (206)의 전체 두께 (즉, 챔버 높이)는 약 0.5 cm 내지 약 5 cm 정도로 낮다. 적합하게는, 세포 배양 챔버는 부피가 약 0.50 ml와 약 300 ml 사이, 보다 적합하게는 약 50 ml와 약 200 ml 사이이거나, 세포 배양 챔버는 부피가 약 180 ml이다. 낮은 챔버 높이 (5 cm 미만, 적합하게는 4 cm 미만, 3 cm 미만, 또는 2 cm 미만)의 사용은 세포에 근접한 효과적인 배지 및 가스 교환을 허용한다. 포트는 세포를 방해하지 않으면서 유체의 재순환을 통한 혼합을 허용하도록 구성된다. 더 큰 높이의 정적 용기 (vessel)는 농도 구배를 생성하여 세포 주변 영역이 산소와 신선한 영양분으로 제한되도록 할 수 있다. 제어된 유동 역학을 통해, 세포 방해없이 배지 교환이 수행될 수 있다. 세포 손실의 위험없이 추가 챔버 (세포가 존재하지 않음)에서 배지가 제거될 수 있다. 다른 구현예에서, 세포 배양 챔버 (206)는 백 또는 경질 챔버이다.

[0032] 본원에 기재된 바와 같이, 예시적인 구현예에서, 카세트는 이들의 임의의 조합을 포함한 세포 배양, 배양 배지, 세포 세척 배지, 역 플러시 배지, 활성화 시약, 및/또는 벡터 중 하나 이상으로 사전-충전된다. 추가의 구현예에서, 이러한 다양한 요소는 적합한 주입 포트 등을 통해 나중에 추가될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 역 플러시 배지는 적합하게는 항응고제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)을 함유하여 분리 필터로부터 전달된 표적 세포 집단의 응집을 감소시킨다.

[0033] 본원에 기재된 바와 같이, 구현예에서, 카세트는 적합하게는 pH 센서 (524), 글루코스 센서 (나타내지 않음), 산소 센서 (526), 이산화탄소 센서 (나타내지 않음), 락트산 센서/모니터 (나타내지 않음), 및/또는 광학 밀도 센서 (나타내지 않음) 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 흐름 경로 내의 예시적인 위치에 대해 도 5를 참조한다. 카세트는 또한 하나 이상의 샘플링 포트 및/또는 주입 포트를 포함할 수 있다. 그러한 샘플링 포트 (220) 및 주입 포트 (222)의 예는 도 2a에 도시되어 있으며, 도 5에 나타낸 흐름 경로의 예시적인 위치는 카트리지를 외부 장치, 예컨대 전기천공 장치 또는 추가 배지 공급원에 연결하기 위한 액세스 포트를 포함할 수 있다. 도 2a는 또한 세포 샘플 투입구 (202), 세포 배지 등을 승온시키는데 사용될 수 있는 시약 승온 백 (224) 및 이차 챔버 (230)의 위치를 나타낸다.

[0034] 구현예에서, 카세트 (102)는 적합하게는 세포 배양의 활성화, 형질도입, 형질감염 및/또는 확장을 수행하기에 적합한 고온 챔버뿐만 아니라 세포 배양 배지의 저장을 위해 적합하게는 냉장 영역 (226)을 포함할 수 있는 저온 챔버를 포함한다. 적합하게는, 고온 챔버는 열 장벽에 의해 저온 챔버와 분리된다. 본원에 사용된 바와 같이, "저온 챔버"는 냉장 온도에서 세포 배지 등을 유지하기 위해 적합하게는 실온 미만으로, 보다 적합하게는

약 4℃ 내지 약 8℃로 유지되는 챔버를 지칭한다. 저온 챔버는 약 1L, 약 2L, 약 3L, 약 4L, 또는 약 5L의 유체를 포함한 배지용 백 또는 기타 홀더를 포함할 수 있다. 추가 배지 백 또는 기타 유체 공급원은 카세트 외부에 연결하고 액세스 포트를 통해 카세트에 연결될 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, "고온 챔버"는 적합하게는 실온 초과로 유지되고, 보다 적합하게는 세포 증식 및 성장을 허용하는 온도, 즉 약 35 내지 40℃, 보다 적합하게는 약 37℃에서 유지되는 챔버를 지칭한다. 구현예에서, 고온 챔버는 적합하게는 세포 배양 챔버 (206) (또한 전체 증식 챔버 또는 세포 증식 챔버로 불림)를 포함한다.

[0036] 도 3a 및 3b는 카세트 (102)가 내부에 위치된 COCOON 자동화된 세포 조작 시스템 (300)을 나타낸다 (도 3b에서 개방된 자동화된 세포 조작 시스템의 커버). 또한, 바코드 판독기, 및 터치 패드 또는 기타 유사 장치에 의한 투입구를 사용하여 수신하는 기능을 포함할 수 있는 예시적인 사용자 인터페이스를 나타낸다.

[0037] 본원에 기재된 자동화된 세포 조작 시스템 및 카세트는 적합하게는 세 가지 관련 부피인 세포 배양 챔버 부피, 작업 부피, 및 총 부피를 갖는다. 적합하게는, 카세트에 사용되는 작업 부피는 프로세스 단계를 기준으로 180 mL 내지 460 mL의 범위이며, 약 500 mL, 약 600 mL, 약 700 mL, 약 800 mL, 약 900 mL 또는 약 1 L까지 증가될 수 있다. 구현예에서, 카세트는 $4*10^9$개 세포 - $10*10^9$개 세포를 쉽게 달성할 수 있다. 프로세스 동안 세포 농도는 $0.3*10^6$개 세포/ml 내지 대략적으로 $10*10^6$개 세포/ml로 다양하다. 세포는 세포 배양 챔버에 위치하지만, 본원에 기재된 바와 같이 배지는 추가 챔버 (예를 들어, 교차유동 저장소 및 종속 (satellite) 부피)를 통해 지속적으로 재순환되어 작업 부피를 증가시킨다.

[0038] 가스 교환 라인을 포함한 유체 경로는, 예를 들어, 실리콘과 같은 가스-투과성 재료로부터 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템은 세포 생산 방법 동안 실질적으로 비-항복성 (non-yielding) 챔버 전체에 산소를 재순환시킨다. 따라서, 일부 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템에서 세포 배양의 산소 수준은 가요성 가스-투과성 백에서 세포 배양의 산소 수준보다 높다. 증가된 산소 수준은 증가된 세포 성장 및 증식을 지원할 수 있기 때문에 더 높은 산소 수준은 세포 배양 확장 단계에서 중요할 수 있다.

[0039] 구현예에서, 본원에 기재된 방법 및 카트리지는 단일 턴키 (turnkey) 플랫폼에서 다중 단위 작업을 통합하는 COCOON 플랫폼 (Octane Biotech (Kingston, ON))을 사용한다. 다중 세포 프로토콜은 매우 특정 세포 처리 목표와 함께 제공된다. 효율적이고 효과적인 자동화 번역을 제공하기 위해, 기재된 방법은 모두 최종 세포 요법 생성물의 핵심 요건에 초점을 맞춘 다중 단위 작업을 결합하는 적용-특이적/스폰서-특이적 일회용 카세트 개념을 사용한다. 다중 자동화된 세포 조작 시스템 (300)은 개별 환자를 위한 큰 부피의 세포 또는 다중의 상이한 세포 샘플의 생산을 위한 대규모 다중-단위 작업으로 함께 통합될 수 있다 (도 4 참조).

[0040] 추가의 구현예에서, 본원에는 자동화된 세포 조작 시스템 (300)에서 사용하기 위한 카세트 (102)가 제공된다. 적합하게는, 카세트는 세포 샘플 투입구 (202), 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터 (204)를 포함하고, 상기 세포 분리 필터는 면역 세포를 포획하는 매트릭스를 포함한다. 카세트 (102)는 면역 세포를 수용하도록 구성된 챔버 부피를 갖는 면역 세포의 활성화, 형질도입, 형질감염 및/또는 확장을 수행하기 위한 세포 배양 챔버 (206)를 추가로 포함한다. 카세트 (102)는 또한 적합하게는 분리 필터에 유체적으로 연결된 역플러시 시스템 (514) 및 세포 수확을 위해 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구 (208)를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 적합하게는 카세트는 세포 분리 필터 (또는 세포 분리 필터 앞에) 다음에 원심분리기를 포함하지 않는다.

[0041] 추가의 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이, 카세트는 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템 (512)를 추가로 포함할 수 있다. 적합하게는, 세포 배양 챔버에 연결된 하나 이상의 유체 경로를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 유체 경로는 세포 배양 챔버 내의 면역 세포를 방해하지 않으면서 적합하게는 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공한다. 예시적인 구현예에서, 유체 경로는 튜브 구성요소를 통해 산소화를 허용하는 규소-기반 튜브 구성요소를 포함한다.

[0042] 구현예에서, 카세트는 또한, 적합하게는 분리 필터 (204) 다음에 폐기물 수집 챔버 (510)를 추가로 포함한다. 추가의 구현예에서, 카세트는 세포 분리 필터와 세포 배양 챔버 사이에 적합하게 위치한 면역 세포 보유 챔버 (516)를 포함할 수 있다.

[0043] 본원에 기재된 바와 같이, 구현예에서, 세포 배양 챔버 (206)는 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버이다.

[0044] 적합한 구현예에서, 카세트는 본원에 기재된 바와 같이 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지로 사전-충전된다.

[0045] 추가의 구현예에서, 본원에는 자동화 처리를 위한 표적 세포 집단을 제조하는 방법이 제공된다. 본원에 기재된 바와 같이, 상기 방법은 적합하게는 전혈 샘플을 포함한 세포의 샘플을 도입한 다음, 추가 처리, 적합하게는 본원에 기재된 것들과 같은 자동화된 세포 조작 시스템에서 추가의 자동화 처리를 위해 이 세포 샘플로부터 원하는 또는 표적 세포 집단을 분리하는 단계를 허용한다.

[0046] 예시적인 방법에서, 표적 세포 집단을 포함하는 세포 샘플은 자동화된 세포 조작 시스템 (300)의 카세트 (102)에 도입된다. 본원에 기재된 바와 같이, 예시적인 세포 샘플은 혈액 샘플 (전혈 포함), 조직 샘플, 체액 샘플 등을 포함한다.

[0047] 구현예에서, 방법을 수행하기 위한 카세트를 나타낸 도 2a 및 카세트 프로세스의 흐름 경로 또는 흐름도를 나타내는 도 5를 참조하여 기재된 바와 같이, 세포 샘플은 적합하게는 세포 샘플 투입구 (202)에 도입된다. 세포 샘플은, 예를 들어, 주사기, 컨테이너, 바이알, 혈액 백 등으로부터 도입될 수 있다.

[0048] 세포 샘플의 도입 후, 도 5에 나타낸 바와 같이, 구현예에서, 세포 샘플은 제어 밸브 (522) V3을 통과하고, 유체 경로 (일반적으로 540으로 표시됨)를 통과하면서 펌프 (520)에 의해 구동된다.

[0049] 이어서, 세포 샘플은 적합하게는 밸브 (V11)를 통과한 후 분리 필터 (204)를 통과한다. 본원에 기재된 바와 같이, 세포 분리 필터 (204)는 적합하게는 세포 샘플로부터의 표적 세포 집단을 포함한 원하는 세포 집단을 포획하기 위한 매트릭스를 포함한다.

[0050] 예시적인 구현예에서, 역 플러싱이 발생하며 이 동안 세포 분리 필터 (204)는 적합하게는 역 플러시 시스템 (512)으로부터 역 플러싱된다. 그러한 구현예에서, 역 플러시 배지는 역 플러시 시스템 (512)에 포함되고, 밸브 (V4)를 통과하고, 밸브 (V12) 및 밸브 (V1)를 통해 펌프 (520)를 통해 구동되어 세포 분리 필터를 역 플러싱한다. 이 역 플러싱은 세포 분리 필터의 매트릭스에 포획된 표적 세포 집단을 전달하여 표적 세포 집단을 필터로부터 제거하고 추가 자동화 처리를 거침을 포함하여 추가 처리될 수 있다. 적합하게는, 세포가 추가 자동화 처리 절차를 거치면서 표적 세포 집단의 응고를 제한하기 위해, 역 플러싱은 항응고제를 포함한 역 플러시 배지를 사용하여 발생한다.

[0051] 구현예에서, 세포 분리 필터의 매트릭스로부터 제거된 표적 세포 집단은, 예를 들어, 밸브 (V11)를 통과함으로써 표적 세포 집단 보유 챔버 (516)로 전달될 수 있다. 추가의 구현예에서, 세포 분리 필터의 매트릭스로부터 제거된 표적 세포 집단은 밸브 (V11) 및 (V9)를 통과한 후, 적합하게는 샘플 포트 (예를 들어, R5 또는 R6)를 통해 형질도입 시스템 (나타내지 않음), 형질감염 시스템 (즉, 비-바이러스 방법)으로 전달될 수 있다. 예시적인 형질도입 시스템은 당업계에 알려져 있고, 예시적인 형질감염 시스템은 전기천공 시스템 등을 포함하고, 카세트 (102) 내에 포함될 수 있거나, 카세트 (102) 외부에 있을 수 있다. 추가의 구현예에서, 세포 분리 필터의 매트릭스로부터 제거된 표적 세포 집단은, 예를 들어, 밸브 (V11)에 이어서 밸브 (V5) 또는 (V6)를 통과함으로써 세포 배양 챔버 (206)로 전달될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 세포 분리 필터 다음에 오는 이러한 다양한 요소들은 표적 세포 집단이 형질도입, 형질감염, 성장, 확장 등을 포함한 추가 자동화 처리를 거치도록 한다.

[0052] 추가의 구현예에서, 상기 방법은 역 플러싱 전에 세포 분리 필터 상에서 포획된 표적 세포 집단을 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 카세트 (102) 내에 포함된 백일 수 있고 세포 세척 배지를 포함하는 세포 세척 시스템 (512)은, 밸브 (V4) 및 (V11)를 통해 펌프 (520) 통해 세포 세척 배지를 통과하여 세포 분리 필터 (204) 상의 포획된 표적 세포 집단을 세척할 수 있다. 적합하게는, 표적 세포 집단은 세포 분리 필터의 매트릭스 상에 남아 있는 반면, 추가의 원하지 않는 폐기물은 밸브 (V1) 및 (V13)을 통해 세포 분리 필터로부터 폐기물 수집 챔버 (510)로 통과한다. 예시적인 구현예에서, 세포 샘플로부터 원하지 않는 폐기물은 또한 세포 분리 필터를 통과하여 밸브 (V1) 및 (V13)를 통해 폐기물 수집 챔버 (510)로 통과할 수 있다. 적합하게는, 추가 구현예는 세포 샘플로부터의 폐기물을 세포 분리 필터를 통해 역으로 재-통과시킴으로써, 예를 들어, 밸브 (V1), (V12) 및 (V11)를 통과하여 또 다른 여과 사이클을 완료함으로써 세포 샘플의 추가 여과를 허용한다. 세포 세척은 또한 세포 세척 배지를 표적 세포 보유 챔버 (516)로 전달함으로써 세포 세척 시스템 (512)을 통해 발생할 수 있고, 추가 처리 전에 챔버에 보유된 세포를 세척할 수 있다.

[0053] 예시적인 구현예에서, 적합한 세포 분리 필터 (204)를 통해 세포 샘플을 통과시키는 단계는 중력 여과를 통해 발생한다. 즉, 세포 분리 필터를 통해 세포 샘플을 구동하는 데 어떠한 펌핑 메커니즘도 사용되지 않는다. 그러

나, 추가의 구현예에서, 펌프 (520)는 세포 분리 필터를 통해 샘플을 구동하기 위해 세포 샘플에 양압 또는 음압을 생성하는 데 사용될 수 있다. 주사기 또는 기타 메커니즘을 사용하여 원하는 경우 추가 양압 또는 음압을 제공하여 세포 분리 필터를 통해 세포 샘플을 통과시킬 수도 있다.

[0054] 예시적인 구현예에서, 원하는 자동화 처리 후, 표적 세포 집단이 적합하게는 수집된다. 이 수집은 샘플 배출구 (208)를 통해 또는 다양한 샘플 포트 (220) 중 하나를 통해 발생할 수 있다.

[0055] 전체에 걸쳐 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 카세트 및 방법은 적합하게는 원심분리기 및 원심분리의 사용을 배제한다. 적합하게는, 상기 방법은 세포 분리 필터를 통한 포획 직후 또는 세포 분리 필터로부터의 역 플러시를 통해 전달이 발생하는지 여부에 관계없이 세포 분리 필터로부터 표적 세포 집단을 전달한 후 원심분리를 배제한다. 원심분리를 배제함으로써, 가혹한 원심분리 조건이 필요없이 간단한 여과를 통해 표적 세포 집단을 세포 샘플로부터 분리할 수 있다고 판단되었다. 이는 전혈 샘플로부터 표적 세포 집단을 제거하는 단계를 포함한다.

[0056] 그러나, 추가의 구현예에서, 자기 분리 프로세스는 표적 세포 집단으로부터 원하지 않는 세포와 파편을 추가로 제거하고 분리하는 데 사용될 수 있다. 그러한 구현예에서, 생체분자 (예를 들어, 항체, 항체 단편 등)가 결합된 자기 비드 또는 기타 구조는 표적 세포와 상호작용할 수 있다. 이어서, 필터, 컬럼, 유동 튜브 또는 자기장을 가진 채널 등의 사용을 포함한 다양한 자기 분리 방법을 사용하여 세포 샘플에 존재할 수 있는 원하지 않는 세포, 파편 등으로부터 표적 세포 집단을 분리할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포 집단은 튜브 또는 기타 구조를 통해 유동하고 자기장에 노출될 수 있어서, 표적 세포 집단은 자기장에 의해 유지 (retained)되거나 지속(held-up)되어 원하지 않는 세포와 파편이 튜브를 통과할 수 있다. 이어서, 자기장은 꺼져서 표적 세포 집단이 추가 유지 챔버 또는 추가 자동화 처리를 위해 카세트의 다른 영역(들)으로 통과할 수 있다.

[0057] 도 5에서 흐름 경로는 또한 세포 배양 챔버 (206)와, 카세트에 대한 추가 저장 능력을 제공하거나 자동화된 프로세스의 전체 부피를 증가시킬 수 있는 종속 부피 (550) 사이의 연결을 나타낸다. 또한, 다양한 센서 (예를 들어, pH 센서 (524), 용존 산소 센서 (526))뿐만 아니라 샘플링/샘플 포트 및 다양한 밸브 (우회 체크 밸브 (552) 포함)뿐만 아니라 구성 요소를 연결하는 실리콘-기반 튜브 구성요소를 적합하게 포함하는 하나 이상의 유체 경로 (540)의 예시적인 위치가 도 5에 도시되어 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 실리콘-기반 튜브 구성요소의 사용은 튜브 구성요소를 통한 산소화를 허용하여 가스 전달을 촉진하고 세포 배양을 위한 최적의 산소화를 허용한다. 또한, 카세트의 유동 경로에서 하나 이상의 소수성 필터 (554) 또는 친수성 필터 (556)의 사용을 도 5에 나타낸다.

[0058] 추가의 구현예에서, 본원에는 자동화된 세포 조작 시스템 (300)이 제공된다. 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 자동화된 세포 조작 시스템 (300)은 적합하게는 밀폐형 하우징 (302), 및 밀폐형 하우징 내에 포함된 카세트 (102)를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "밀폐형 하우징"은 개방되고 폐쇄될 수 있고 본원에 기재된 카세트 (102)가 다양한 구성요소, 예컨대 유체 공급 라인, 가스 공급 라인, 전원, 냉각 연결, 가열 연결 등과 함께 배치되고 통합될 수 있는 구조를 지칭한다. 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 밀폐형 하우징은 카세트의 삽입을 허용하도록 개방될 수 있고 (도 3b), 폐쇄되고 밀봉된 환경을 유지하도록 폐쇄되어 (도 3a) 본원에 기재된 다양한 자동화된 프로세스가 카세트를 이용하여 발생하도록 할 수 있다.

[0059] 본원에 기재된 바와 같이, 카세트 (102)는 적합하게는 세포 샘플 투입구 (206), 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터 (204), 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버 (206), 및 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구 (208)를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, (자동화된 세포 조작 시스템뿐만 아니라) 카세트는 세포 분리 필터 다음에 오는 원심분리기를 포함하지 않거나 임의의 구성에 적합하다.

[0060] 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 자동화된 세포 조작 시스템 (300)은 또한 사용자로부터 투입구를 수신하기 위한 사용자 인터페이스 (304)를 추가로 포함한다. 사용자 인터페이스 (304)는 터치 패드, 태블릿, 키보드, 컴퓨터 단말기, 또는 기타 적절한 인터페이스일 수 있으며, 이는 사용자가 자동화된 프로세스 및 흐름 경로를 제어하기 위해 자동화된 세포 조작 시스템에 원하는 제어 및 기준을 입력하도록 한다. 적합하게는, 사용자 인터페이스는 컴퓨터 제어 시스템에 연결되어 자동화된 세포 조작 시스템에 지침을 제공하고 자동화된 세포 조작 시스템의 전체 활동을 제어한다. 다양한 밸브를 개방하고 폐쇄할 때, 배지 또는 세포 집단을 제공할 때, 온도를 높이거나 낮출 때 등의 경우 그러한 지침을 포함할 수 있다.

[0061] 본원에 기재된 바와 같이, 구현예에서, 세포 분리 필터는 표적 세포 집단을 포획하는 매트릭스를 포함한다. 적

합하게는, 매트릭스는 면역 세포를 포획한다.

[0062] 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템에서 카세트는 분리 필터 다음에 폐기물 수집 챔버를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템이 또한 포함될 수 있다. 임의로 세포 분리 필터와 세포 배양 챔버 사이에 위치한 표적 세포 집단 보유 챔버뿐만 아니라 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템 또한 포함될 수 있다. 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템의 카세트는 하나 이상의 유체 경로를 추가로 포함하며, 여기서, 유체 경로는 세포 배양 챔버 내의 세포를 방해하지 않으면서 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공한다. 구현예에서, 세포 배양 챔버는 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버이다.

[0063] 자동화된 세포 조작 시스템의 구현예에서, 카세트는 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지 (적합하게는 항응고제 포함)로 사전-충전된다. 본원에 기재된 바와 같이, 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템의 카세트는 pH 센서, 글루코스 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및/또는 광학 밀도 센서 중 하나 이상, 그리고 적합한 구현예에서, 하나 이상의 샘플링 포트를 추가로 포함할 수 있다.

[0064] 세포 요법 생산에서 단위 작업의 자동화는 동종 (allogeneic) 및 자가 세포 치료요법 적용분야에 걸쳐 보편적인 이점에 대한 기회를 제공한다. 환자-특이적 자가 세포 생성물, 및 심지어 이들 치료요법의 최근의 임상적 성공으로 더 강조된 고유한 시나리오에서, 자동화의 이점은 소규모 배치 GMP 준수, 경제성, 환자 추적성 (traceability) 및 프로세스 편차의 조기 식별의 상당한 마이크로-로트 복잡성 (micro-lot complexity)으로 인해 특히 강력하다. 복잡한 제조 프로토콜의 연관된 출현은 마이크로-로트 세포 생산에서 자동화된 단위 작업의 말단 대 말단 통합 (end-to-end integration)의 가치가 중요한 연구 포인트가 되지 않았다는 사실에 관심을 끈다. 그러나, 이들의 임박한 승인 후 이러한 치료요법에 대한 예상되는 수요는 완전히 폐쇄된 말단 대 말단 시스템을 구현하면 체험 시간 (hands-on-time)과 및 차지하는 공간 (footprint)과 같은 제조 장애 (bottleneck)에 많은 필요한 해결책을 제공할 수 있음을 나타낸다.

[0065] 진보된 치료요법의 개발자는 임상 번역의 롤아웃의 초기에 자동화를 고려하고 임상 시험 프로토콜의 규모를 확장하는 것이 권장된다. 초기 자동화는 프로토콜 개발에 영향을 미칠 수 있고, 이후 단계에서 수동 프로세스로부터 자동화 된 프로세스로 전환하는 경우 필적하는 연구의 필요성을 피할 수 있고, 장기적인 상용화 경로를 더 잘 이해할 수 있다.

[0066] 예시적인 구현예에서, 본원에 기재된 자동화된 세포 조작 시스템은 복수의 챔버를 포함하고, 여기서, 본원에 기재된 다양한 방법의 각 단계는 자동화된 세포 조작 시스템의 복수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행되고, 활성화 시약, 벡터 및 세포 배양 배지 각각은 방법을 시작하기 전에 복수의 챔버의 상이한 챔버에 포함되고, 복수의 챔버 중 적어도 하나는 세포 성장을 위한 온도에서 (예를 들어, 약 37℃에서) 유지되고, 복수의 챔버 중 적어도 하나는 냉장 온도에서 (예를 들어, 약 4 내지 8℃에서) 유지된다.

[0067] 구현예에서, 본원에 기재된 자동화된 세포 조작 시스템은 온도 센서, pH 센서, 글루코스 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및/또는 광학 밀도 센서로 모니터링된다. 따라서, 일부 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템은 온도 센서, pH 센서, 글루코스 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및/또는 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 포함한다. 추가의 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템은 사전-정의된 배양 크기를 기반으로 온도, pH, 글루코스, 산소 수준, 이산화탄소 수준, 및/또는 세포 배양의 광학 밀도를 조정하도록 구성된다. 예를 들어, 자동화된 세포 조작 시스템이 세포 배양의 현재 산소 수준이 원하는 세포 배양 크기에 필요한 성장을 달성하기에는 너무 낮음을 감지하는 경우, 자동화된 세포 조작 시스템은, 예를 들어, 산소화된 세포 배양 배지를 도입하거나, 세포 배양 배지를 산소화된 세포 배양 배지로 대체하거나, 산소화 구성요소 (즉, 실리콘 튜브)를 통해 세포 배양 배지를 유동시킴으로써 세포 배양의 산소 수준을 자동으로 증가시킬 것이다. 또 다른 예에서, 자동화된 세포 조작 시스템이 세포 배양의 현재 온도가 너무 높고 세포가 너무 빠르게 성장하는 것을 감지하는 경우 (예를 들어, 가능한 세포 과밀 (overcrowding)은 바람직하지 않은 특성을 야기할 수 있음), 자동화된 세포 조작 시스템은 세포의 꾸준한 성장률 (또는 원하는 바와 같은 지수 성장률)을 유지하기 위해 세포 배양 온도를 자동으로 낮출 것이다. 여전히 추가의 구현예에서, 자동화된 세포 조작 시스템은 세포 성장률 및/또는 세포 계수 또는 기타 모니터링 요소, 예컨대 pH, 산소, 글루코스 등에 기반하여 세포 공급 (즉, 세포 배양에 신선한 배지 및/또는 영양분 제공)의 일정을 자동으로 조정한다. 자동화된 세포 조작 시스템은 저온 챔버 (예를 들어, 4℃ 또는 -20℃)에서 배지 (및 기타 시약, 예컨대 세척 용액 등)에 저장하고 승온된 배지를 세포 배양에 도입하기 전에 실온 챔버 또는 고온 챔버 (예를 들어, 각각 25℃ 또는 37℃)에서 배지를 승온시키도록 구성될 수 있다.

[0068] 추가의 예시적인 구현예

[0069] 구현예 1은 세포 샘플 투입구, 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 분리 필터, 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버, 및 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구를 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트로서, 상기 카세트는 세포 분리 필터 다음에 원심분리기를 포함하지 않는다.

[0070] 구현예 2는, 상기 세포 분리 필터가 세포 집단을 포획하는 매트릭스를 포함하는 구현예 1의 카세트를 포함한다.

[0071] 구현예 3은, 상기 매트릭스가 표적 세포를 포획하는 구현예 1의 카세트를 포함한다.

[0072] 구현예 4는, 상기 세포 분리 필터 다음에 폐기물 수집 챔버를 추가로 포함하는 구현예 1 내지 3의 카세트를 포함한다.

[0073] 구현예 5는, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템을 추가로 포함하는 구현예 1 내지 4의 카세트를 포함한다.

[0074] 구현예 6은, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템, 및 임의로 상기 세포 분리 필터와 상기 세포 배양 챔버 사이에 위치한 표적 세포 집단 보유 챔버를 추가로 포함하는 구현예 1 내지 5의 카세트를 포함한다.

[0075] 구현예 7은, 하나 이상의 유체 경로 (fluidics pathway)를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 유체 경로는 상기 세포 배양 챔버 내의 세포를 방해하지 않으면서 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 상기 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공하는 구현예 1 내지 6의 카세트를 포함한다.

[0076] 구현예 8은, 상기 세포 배양 챔버가 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버인, 구현예 1 내지 7의 카세트를 포함한다.

[0077] 구현예 9는, 상기 카세트가 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지로 사전-충전되는, 구현예 1 내지 8의 카세트를 포함한다.

[0078] 구현예 10은, 상기 역 플러시 배지가 항응고제를 포함하는 구현예 9의 카세트를 포함한다.

[0079] 구현예 11은, pH 센서, 글루코스 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및/또는 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 추가로 포함하는 구현예 1 내지 10의 카세트를 포함한다.

[0080] 구현예 12는 하나 이상의 샘플링 포트를 추가로 포함하는 구현예 1 내지 11의 카세트를 포함한다.

[0081] 구현예 13은, 세포 샘플 투입구, 상기 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터로서, 상기 세포 분리 필터는 면역 세포를 포획하는 매트릭스를 포함하는, 세포 분리 필터, 상기 면역 세포를 수용하도록 구성된 챔버 부피를 갖는 상기 면역 세포의 활성화, 형질도입 및/또는 확장을 수행하기 위한 세포 배양 챔버, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템, 및 상기 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구를 포함하는 자동화된 세포 조작 시스템에서 사용하기 위한 카세트로, 여기서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터 다음에 원심 분리기를 포함하지 않는다.

[0082] 구현예 14는, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템을 추가로 포함하는 구현예 13의 카세트를 포함한다.

[0083] 구현예 15는, 상기 세포 배양 챔버에 연결된 하나 이상의 유체 경로를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 유체 경로는 상기 세포 배양 챔버 내의 면역 세포를 방해하지 않으면서 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 상기 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공하는 구현예 13 내지 14의 카세트를 포함한다.

[0084] 구현예 16은, 상기 세포 분리 필터 다음에 폐기물 수집 챔버를 추가로 포함하는 구현예 13 내지 15의 카세트를 포함한다.

[0085] 구현예 17은, 상기 세포 분리 필터와 상기 세포 배양 챔버 사이에 위치한 면역 세포 보유 챔버를 추가로 포함하는 구현예 13 내지 16의 카세트를 포함한다.

[0086] 구현예 18은, 상기 세포 배양 챔버가 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버인 구현예 13 내지 17의 카세트를 포함한다.

[0087] 구현예 19는, 상기 카세트가 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지로 사전-충전된 구현예 13 내지 18의 카세트를 포함한다.

[0088] 구현예 20은, 상기 유체 경로 중 하나 이상이 튜브 구성요소를 통해 산소화를 허용하는 규소-기반 튜브 구성요소를 포함하는 구현예 13 내지 19의 카세트를 포함한다.

[0089] 구현예 21은, 자동화 처리를 위한 표적 세포 집단을 제조하는 방법인데, 상기 방법은 상기 표적 세포 집단을 포함하는 세포 샘플을 자동화된 세포 조작 시스템의 카세트로 도입하는 단계, 세포 분리 필터를 통해 상기 세포 샘플을 통과시키는 단계, 상기 세포 분리 필터의 매트릭스 상에 상기 세포 샘플로부터 상기 표적 세포 집단을 포획하는 단계, 상기 세포 분리 필터를 역 플러싱 (back flushing)하는 단계, 및 상기 세포 분리 필터로부터 상기 표적 세포 집단을 전달하여 상기 표적 세포 집단이 자동화된 처리를 거칠 수 있도록 하는 단계를 포함한다.

[0090] 구현예 22는, 상기 전달 단계가 상기 표적 세포 집단을 표적 세포 집단 보유 챔버, 형질도입 시스템, 형질감염을 위한 시스템, 또는 세포 배양 챔버로 전달하여 상기 표적 세포 집단이 자동화 처리를 거칠 수 있도록 하는 단계를 포함하는 구현예 21의 방법을 포함한다.

[0091] 구현예 23은, 상기 형질도입 시스템이 전기천공 시스템인 구현예 22의 방법을 포함한다.

[0092] 구현예 24는, 상기 역 플러싱 전에 상기 세포 분리 필터 상에서 상기 포획된 세포 집단을 세척하는 단계를 추가로 포함하는 구현예 21 내지 23의 방법을 포함한다.

[0093] 구현예 25는, 상기 세포 샘플로부터의 원하지 않는 폐기물을 상기 세포 분리 필터를 통해 폐기물 수집 챔버로 통과시키는 단계를 추가로 포함하는 구현예 21 내지 24의 방법을 포함하는 구현에 21 내지 25의 방법을 포함한다.

[0094] 구현예 26은, 상기 세포 샘플을 상기 세포 분리 필터를 통해 통과시키는 단계가 중력 여과를 통해 발생하는 구현예 21 내지 25의 방법을 포함한다.

[0095] 구현예 27은, 상기 방법이 상기 세포 분리 필터로부터 상기 표적 세포 집단을 전달한 후 원심 분리를 배제하는 구현예 21 내지 26의 방법을 포함한다.

[0096] 구현예 28은, 상기 자동화 처리 후에 상기 카세트로부터 상기 표적 세포 집단을 수집하는 단계를 추가로 포함하는 구현예 21 내지 26의 방법을 포함한다.

[0097] 구현예 29는, 밀폐형 하우징, 상기 밀폐형 하우징 내에 포함된 카세트로서, 상기 카세트는 세포 샘플 투입구, 상기 세포 샘플 투입구에 유체적으로 연결된 세포 분리 필터, 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 배양 챔버, 및 상기 세포 배양 챔버에 유체적으로 연결된 세포 샘플 배출구를 포함하고, 여기서, 상기 카세트는 상기 세포 분리 필터 다음에 원심분리기를 포함하지 않는, 카세트; 및 사용자로부터 투입구를 수용하기 위한 사용자 인터페이스를 포함하는, 자동화된 세포 조작 시스템이다.

[0098] 구현예 30은, 상기 카세트의 상기 세포 분리 필터가 세포 집단을 포획하는 매트릭스를 포함하는 구현예 29의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0099] 구현예 31은, 상기 매트릭스가 표적 세포를 포획하는 구현예 30의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0100] 구현예 32는, 상기 카세트가 상기 세포 분리 필터 다음에 폐기물 수집 챔버를 추가로 포함하는 구현예 29 내지 31의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0101] 구현예 33은, 상기 카세트가 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 세포 세척 시스템을 추가로 포함하는 구현예 29 내지 32의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0102] 구현예 34는, 상기 카세트가 상기 세포 분리 필터에 유체적으로 연결된 역 플러시 시스템 및 임의로 상기 세포 분리 필터와 상기 세포 배양 챔버 사이에 위치한 표적 세포 집단 보유 챔버를 추가로 포함하는, 구현예 29 내지 33의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0103] 구현예 35는, 상기 카세트가 하나 이상의 유체 경로를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 유체 경로는 상기 세포 배양 챔버 내의 세포를 방해하지 않으면서 재순환, 폐기물의 제거 및 균질한 가스 교환 및 상기 세포 배양 챔버로의 영양분의 분배를 제공하는 구현예 29 내지 34의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0104] 구현예 36은, 상기 카세트의 상기 세포 배양 챔버가 낮은 챔버 높이를 갖는 편평한 비-가요성 챔버인 구현예 29 내지 35의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0105] 구현예 37은, 상기 카세트의 상기 세포 배양 챔버가 백 (bag) 또는 경질 챔버인 구현예 29 내지 35의 자동화된

세포 조작 시스템을 포함한다.

[0106] 구현예 38은, 상기 카세트가 배양 배지, 세포 세척 배지, 및 역 플러시 배지로 사전-충전되는 구현예 29 내지 37의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0107] 구현예 39는, 상기 역 플러시 배지가 항응고제를 포함하는 구현예 38의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0108] 구현예 40은, 상기 카세트가 pH 센서, 글루코스 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및/또는 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 추가로 포함하는 구현예 29 내지 39의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0109] 구현예 41은, 상기 카세트가 하나 이상의 샘플링 포트를 추가로 포함하는 구현예 29 내지 40의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0110] 구현예 42는, 컴퓨터 제어 시스템을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 사용자 인터페이스는 상기 컴퓨터 제어 시스템에 연결되어 상기 자동화된 세포 조작 시스템에 명령을 제공하는 구현예 29 내지 41의 자동화된 세포 조작 시스템을 포함한다.

[0111] 실시예

[0112] 실시예 1 - 자동화된 세포 조작 시스템을 위한 세포 여과 설정

[0113] Octane Cocoon™ 시스템은 세포 치료요법 제품의 제조를 위한 밀폐되고 자동화된 말단 대 말단 세포 조작 시스템이다. Cocoon™은 세 가지 주요 구성요소로 구성된다: 기본 기기, 소프트웨어, 및 맞춤형 일회용 카세트. 시스템은 업스트림 및 다운스트림 세포 배양 프로세스 둘 다에 대해 자동화된 세포 단리, 확장, 농축 및 완충액 교환이 가능하다; 그러나, 원심분리 기능은 없다.

[0114] 부착에 의한 표적 세포 집단의 단리는 중간엽 줄기 세포 (MSC), 수지상 세포 및 단핵구를 포함한 대부분의 부착 세포 유형에 적용될 수 있다. 예를 들어, 인간 골수 MSC는 Cocoon™ 카세트 증식 챔버에서 부착에 의해 단리될 수 있다. 골수 조직, 오염된 적혈구 (RBC) 및 기타 부유 세포의 접종 1 내지 2일 후 폐기물로 배출되어 Cocoon™ 카세트 증식 챔버에서 부착 세포 유형이 남는다. 배지 교환은 MSC 확장을 촉진하도록 설계된 배지로 2 내지 3일마다 발생했다.

[0115] Cocoon™ 카세트에서 T-세포 배양은 전형적으로 공여자로부터 전혈 수집으로부터, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 정제된 집단을 필요로 한다. 초기 Cocoon™ 출발 물질에서 RBC 오염의 양을 또한 감소시키면서 백혈구를 얻기 위해 필요한 전처리 절차를 제거하기 위해, 전혈 여과를 평가하였다.

[0116] Pall Life Sciences사의 Arcadis WBC (백혈구) 주사기 필터 (카탈로그 번호 AP-4851) 및 회수된 혈액용 Haemonetics사의 백혈구 필터 (카탈로그 번호 RS-1) (도 2b 및 2c) 둘 다는 필터 배출구의 백혈구 업스트림에 백혈구를 포획하고 유지하는 섬유질 매트릭스와 배지를 포함하며, RBC 및 기타 오염 세포가 폐기물로 통과하도록 한다. 이어서, 포획된 백혈구는 필터로부터 역 세척되고 세포 배양 활성화를 위해 수집된다. Acrodisc WBC 주사기 필터 (Pall)는 최대 12 mL의 공여자 전혈 또는 백혈구성분 채집술 샘플 (백혈구성분 채집술 sample)을 처리할 수 있는 반면, 백혈구 필터 (Haemonetics)는 최대 450 mL의 공여자 전혈 또는 백혈구성분 채집술 샘플을 처리할 수 있다.

[0117] Cocoon™ 카세트의 유체 경로에서 이들 필터 또는 유사한 필터를 사용함으로써, 인간 T-세포는 Cocoon™ 시스템 내의 CAR-T 및 기타 세포 치료요법 제품에 대한 전혈 또는 류코팩 (Leukopak) 공여자 샘플로부터 단리될 수 있다. 본원에 기재된 제안된 프로세스 흐름 경로는 최종 사용자가 공여자 전혈 또는 백혈구성분 채집술 샘플을 멸균 상태로 Cocoon ™ 시스템에 직접 도입하도록 한다. 전혈 필터는 Cocoon™ 일회용 카세트 유체 경로에 통합되어 혼합 세포 집단으로부터 백혈구를 분리하고 Cocoon™ 증식 챔버에서 이들을 추가로 확장할 수 있다. 이어서, 최종 치료 제품은 자동으로 수확되어 필요에 따라 신선하게 사용하거나 냉동 보존할 수 있다.

[0118] 방법

[0119] 피콜 플라크 플러스 (Ficoll Plaque Plus) (Fisher)를 사용한 밀도 구배 단리

[0120] 100 mL와 450 mL 사이의 전혈 또는 백혈구성분 채집술 생성물을 얻었다. 이어서, 초기 공여자 샘플을 2개의 수집으로 나누었다: 첫 번째는 피콜 밀도 구배를 통해 처리하기 위한 것이고 두 번째는 세포 분리 필터를 통해 처리하기 위한 것이었다. 밀도 구배 단리를 위해, 초기 공여자 샘플의 절반은 인간 PBMC를 제조하기 위한 표준 절

차를 사용하여 처리되었다. 구체적으로, 공여자 샘플은 동일한 부피의 2 mM EDTA/1X DPBS (Lonza)에서 1:1로 희석되었다. 이어서, 희석된 샘플을 50 mL 원뿔형 튜브당 최대 45 mL의 총 부피에 대해 15 mL의 피콜 플라크 플러스 밀도 구배 용액 (GE Healthcare)에 30 mL 분획으로 조심스럽게 적층되었다 (layered). 이어서, 튜브를 실온에서 40분 동안 400 x g에서 원심분리하였다. 플라즈마의 상부 층은 PBMC를 포함하는 튜브의 버피 코트 층 위에 대략적으로 10 mL까지 제거되었다. PBMC를 수집하고 수집 부피의 3배로 2 mM EDTA/1X DPBS에서 세척하였다. 이어서, 수집된 세포를 Nucleocounter NC-200 (Chemometec)을 사용하여 중복 계수하고, 유세포 분석 (FACS) 분석을 통해 분석하고, 냉동 보존하였다.

[0121] Acrodisc 백혈구 주사기 필터 (Pall)를 사용한 전혈 여과

[0122] 초기 공여자 전혈 및 백혈구성분 채집술 샘플의 절반인 최대 50 mL는 제조업체의 지침에 따라 Acrodisc WBC 필터를 사용하여 6 mL 내지 12 mL 분획으로 처리되었다. 필터 입구를 10 mL 주사기에 부착하고 멸균 폐기물 컨테이너 위에 장착하였다. 6 mL 내지 12 mL의 희석되고 비희석된 전혈 및 류코팩 샘플을 주사기 하우징에 추가하였다. 이어서, 샘플을 중력을 통해 WBC 필터를 통해 여과하였다. 샘플을 완전히 여과하는 데 걸리는 시간을 기록하였다. 이어서, 필터를 5 mL PBS, pH 7.4로 2회 세척하였다. 세포를 수집하기 위해, WBC 필터를 주사기 하우징으로부터 조심스럽게 제거하고 필터의 입구 측에 부착된 깨끗한 150 mL 혈액 수집 백 (WalkMed), 10 mL의 PBS (Lonza)로 채워진 배지 백을 WBC 필터의 출구에 부착하였다. 이어서, 필터를 PBS로 역 세척하고 150 mL 혈액 수집 백 (WalkMed)에 수집하였다. 이어서, 수집된 세포 현탁액을 수집 부피의 3배로 2 mM EDTA/1X DPBS에서 세척하였다. 이어서, Nucleocounter NC-200 (Chemometec)을 사용하여 세포를 2회 계수하고, 유세포 분석 (FACS) 분석을 위해 샘플을 냉동 보존하였다. 동일한 조건에서 단리된 세포를 풀링하고 (pooled) 5% 인간 혈청 A/B가 보충된 6 mL의 X-VIVO 15 배지 (Lonza)에서 $1e^{7}$ 세포에서 중복 T-25 조직 플라스크 배양물에 접종하였다. 100% 배지 교환 및 세포 계수는 4, 6, 8, 및 11일에 모든 배양물에서 수행되었다.

[0123] 전혈 샘플의 전처리 희석

[0124] 공여자 1: 단일 공여자로부터의 148 mL의 전혈을 2개의 분획으로 나누었다. 하나의 74 mL 분획을 0.2 mM EDTA/1X DPBS (총 148 mL 희석된 전혈)에 1:1로 희석하고, 두 번째 74 mL 분획은 희석하지 않은 채로 두었다. 이어서, 비희석된 분획과 희석된 분획 둘 다는 2 x 74 mL의 희석된 전혈과 2 x 37 mL의 비희석된 전혈에서 2개의 추가 분획으로 분할되어 피콜 분리 구배 처리와 Pall Acrodisc WBC 세포 분리 여과 처리 둘 다에서 사용되었다. 피콜 분리를 위해 비희석된 전혈을 사용하는 것은 표준 실험실 관행이 아니며 프로세스 한계를 더 잘 이해하기 위해 이러한 평가에만 포함되었다. Pall Acrodisc WBC 여과 샘플 부피는 비희석된 3 mL, 희석 및 비희석된 6 mL, 희석 및 비희석된 12 mL, 희석된 24 mL였다.

[0125] 공여자 2: 290 mL의 희석된 전혈의 총 부피에 대해 133 mL의 전혈을 희석하지 않은 채로 두고 두 번째 145 mL 전혈 분획을 0.2 mM EDTA/1X DPBS에서 1:1로 희석하여 제2 공여자로부터 279 mL의 전혈을 분할하였다. 54 mL의 희석된 전혈은 피콜에 의해 3회 처리하였다. 이 공여자의 경우 피콜을 통해 처리된 비희석된 샘플은 없었다. 나머지 희석된 전혈 분획과 비희석된 전혈 분획은 Pall Acrodisc WBC 여과를 통해 6 mL 및 12 mL 부피로 처리되었다.

[0126] 희석 류코팩 샘플의 전처리

[0127] 공여자 1: 단일 공여자로부터의 127 mL의 백혈구성분 채집술 생성물은 비세척된 샘플 여과를 위해 28 mL로 나누고 나머지 99 mL를 400 mL의 5 mM EDTA-HBSS에 99 mL를 희석하고 원심 분리하고 상층액을 버리고 세포 펠릿을 200 mL의 5 mM EDTA-HBSS에 재현탁하여 세척하였다. 180 mL의 이러한 세척된 샘플을 피콜 분리 밀도 구배를 위해 사용하고 6 mL 및 12 mL Pall Acrodisc WBC 여과 처리를 위해 20 mL를 사용하였다.

[0128] 결과

[0129] 백혈구 분리 및 수집을 위한 처리 시간

[0130] 피콜 밀도 구배 단리를 위한 비희석된 전혈 분획과 희석된 전혈 분획 둘 다를 동시에 처리하였다. 30 mL의 비희석된 전혈 및 74 mL의 희석된 전혈 샘플에 대한 처리 시간은 튜브 적층 시간으로부터 백혈구/버피 코트 (buffy coat) 세척까지 대략적으로 4시간이었다. 임의의 샘플에도 적혈구 용해 단계가 포함되지 않았다.

[0131] Pall WBC 세포 분리 여과를 위해, 6 mL 내지 24 mL의 전혈 샘플에 대한 총 처리 시간은 처리된 부피와 전혈 희석에 따라 5분과 20분 사이의 범위였다 (표 1). 가장 빠른 처리 시간은 3 mL의 전혈을 2 mM EDTA/1X DPBS로 1:1로 희석하여 3분 이내에 중력을 통해 완전히 여과하고 총 처리 시간이 평균 8분±3분인 경우 관찰되었다 (여

과, 2회 세척, 및 역 플러시 수집). 평균적으로, 6 mL의 비희석된 전혈은 필터를 통과하는 데 10분±2분 그리고 총 처리 시간 19분±2분을 필요로 하였다 (여과, 2회 세척 및 역 플러시 수집). 1:1로 희석하였을 경우, 6 mL의 2 mM EDTA/1X DPBS (12 mL 총 부피) 중 6 mL의 비희석된 전혈은 중력을 통해 필터를 통과하는데 평균 7분±2분 그리고 총 처리 시간 13분±4분을 필요로 하였다. 12 mL의 비희석된 전혈에서 11 mL만이 18분 후 한명의 공여자에 대해 필터를 통해 통과하였고, 주사기 플런저는 남은 부피를 수동으로 밀어 필터를 통해 세척하는 것을 필요로 하였다. 이 공여자의 경우, 12 mL의 2 mM EDTA/1X PBS (24 mL 총 부피)에서 12 mL의 전혈을 1:1로 희석하여 16분 후 클로깅 (clogged)하고 이 때 ~11 mL만을 처리하였다. 남은 부피와 2회 후속 세척은 주사기 필터의 플런저를 사용하여 필터를 통해 수동으로 밀어 넣었다. 제2 공여자의 경우, 12 mL의 비희석된 전체 샘플 둘 다는 30분 후 미처리된 3 mL 및 5 mL로 클로깅하였다. 제2 공여자에 대해 12 mL의 비희석된 전혈 부피에 대해 수동 개입이 시도되지 않았고 1:1 희석도 수행되지 않았다. 10 mL의 비희석된 전혈 샘플 하나를 여과하고, 11분 후에 전체 부피의 중력 여과를 완료했고 총 처리 시간은 19분이었다.

[0132] 필터를 통한 중력을 통해 각 6 mL 및 12 mL 중 4 mL를 처리한 후 세척된 그리고 미세척된 류코팩 샘플은 Pall Acrodisc WBC 필터를 클로깅하였다 (표 2). 주사기 플런저를 사용하여 나머지 2 mL 내지 8 mL의 샘플을 처리하기 위해 수동 개입이 필요하였다. 포획된 세포를 수집하기 위한 프로세스 여과 흐름을 변경하는 평균 시간은 6 내지 7분이었다.

[0133] [표 1] 전혈 처리 시간 요약 표

공여자	샘플 조건	필터 통과 시간 (분)	2 x 5mL PBS 필터 세척 (분)	역 플러시 까지 시간 (분)	총 처리 시간 (분)
1	Pall, 비희석된, 6mL, 1a	8	9		17
1	Pall, 비희석된, 6mL, 1b	8	9		17
2	Pall, 비희석된, 6mL, 1a	9	11	1	21
2	Pall, 비희석된, 6mL, 1b	13	6	1	21
비희석된, 총 부피 6mL 평균 (분)		9.5	8.8	1.0	19.0
표준 편차 (분)		***2.4***	***2.1***	***0.0***	***2.3***
1	**Pall, 비희석된, 10mL**	11	8		19
1	Pall, 비희석된, 12mL	18	2		20
2	Pall, 비희석된, 12mL, 2a	30+	n/a	n/a	n/a
2	Pall, 비희석된, 12mL, 2b	30+	n/a	n/a	n/a
1	Pall, 희석된, 6mL, 1b	3	3		6
2	Pall, 희석된, 6mL, 1a	3	7	1	11
2	Pall, 희석된, 6mL, 1b	3	7	1	11
희석된 1:1, 총 부피 6mL 평균 (분)		2.8	5.0	1.0	8.3
표준 편차 (분)		***0.5***	***2.3***	***0.0***	***3.2***
1	Pall, 희석된, 12mL	6	3		9
2	Pall, 희석된, 12mL, 2a	5	8	1	14
2	Pall, 희석된, 12mL, 2b	9	7	1	17
희석된 1:1, 총 부피 12mL 평균 (분)		6.7	6.0	1.0	13.3
표준 편차 (분)		***2.1***	***2.6***	***0.0***	***4.0***
1	**Pall, 희석된, 24mL**	16+	2		18+

[0134]

[0135] [표 2] 류코팩 공여자 1 Pall Acrodisc WBC 여과 처리 시간

류코팩 샘플 조건	필터 통과 시간 (분)	총 처리 시간 (분)
Pall, 비세척된, 6mL	• 20 분에서 처리된 4mL • 관찰된 역압 • 40 분 이상에서 주사기 플런저를 사용하여 프로세스 완료	95
Pall, 비세척된, 12mL		98
Pall, 세척된, 6mL		70
Pall, 세척된, 12mL		73

[0136]

[0137] 처리 후 세포 수율 및 생존율

[0138] 전혈 공여자 1: 2개의 공여자 1 전혈 샘플은 표 3에 나타낸 데이터 분석으로부터 생략하였으나, 도 6a 및 6b에 나타낸다. 나머지 샘플들 중, 피콜 밀도 구배 분리를 통해 처리된 전혈 mL 당 $0.9x10^6$개 세포와 비교하여 Pall Acrodisc WBC 필터를 통해 처리된 전혈 mL 당 평균 $1x10^6$개 생존 가능한 세포를 수집하였다. 희석된 WBC 여과된 샘플과 비교하여 비희석된 Pall Acrodisc WBC 필터 샘플로부터 전혈 mL 당 27.3% 더 적은 생존 가능한 세포가 얻어졌다. 희석된 피콜 샘플과 비교할 경우 처리된 전혈 mL 당 8% 더 많은 생존 가능한 세포가 비희석된 피콜 샘플로부터 얻어졌다. 비희석된 피콜 샘플과 비교할 경우 Acrodisc WBC 필터를 통해 처리할 때 처리된 전혈 mL 당 15% 더 많은 생존 가능한 세포가 비희석된 전혈로부터 얻어졌다. 피콜 밀도 구배 방법과 비교하여 희석된 전혈을 Acrodisc WBC 여과를 통해 처리할 때 mL 당 38% 더 많은 생존 가능한 세포가 얻어졌다. 생존율은 91% 내지 94% 범위에 걸쳐 모든 샘플에서 유사하였다. 비희석된 혈액의 부피조차도 2개의 피콜 샘플에서 조심스럽게 적층되었다. 도 6a 및 6b는 세포 수율 및 생존율의 차이를 나타낸다.

[0139] [표 3] 전혈 공여자 1 처리 후 데이터 요약 표.

공여자 1 샘플 조건	프로세스 부피 (mL)	처리 후 수집된 총 세포 (세포)	초기 전혈 부피의 평균 세포/mL (세포/mL)	처리 후 평균 생존률 (%)
비희석된 Pall 여과	34	3.71×10^7	1.09×10^6	92.4% ± 0.4%
희석된 Pall 여과	48	3.33×10^7	1.39×10^6	92.5% ± 1.7%
비희석된 피콜 (Ficoll)	20	1.80×10^7	0.92×10^6	93.6%
희석된 피콜	49	2.11×10^7	0.86×10^6	91.1% ± 0.2%

[0140]

[0141] 여과된 및 피콜 프로세스 둘 다로부터 새롭게 단리된 1차 세포를 플라스크 당 $1e^7$ 생존 가능한 세포의 표적에서 T-25 조직 배양 플라스크에 접종하여 예상되는 Cocoon 접종 세포 밀도를 모방하였다. 희석된 전혈 12 mL 및 24 mL의 샘플에는 $1e^7$ 세포 밀도로 접종할 세포가 충분하지 않았다. 6일 째까지, 전혈 여과 단리 절차를 사용한 모든 배양물은 초기 총 세포 수보다 3 내지 4배 더 높았고, 희석된 전혈인 6 mL의 여과 샘플로부터 달성된 가장 높은 세포 수를 나타내었다 (도 7a). 피콜 밀도 구배 단리 후 접종된 배양물은 0 내지 11일 동안 배양 생존율을 대략적으로 98%로 유지했음에도 불구하고, 접종 일부터 수확까지 유의한 성장을 나타내지 않았다 (도 7b). 모든 배양물은 배양 첫 8일에 약 96%, 11일에 92% 초과로 생존율을 유지하였다.

[0142] 전혈 공여자 2: 비희석된 여과된 샘플에 대해 68.0%±6.2% 생존율을 가진 $3.11x10^5$개 및 희석된 여과된 샘플에 대해 72.7%±2.1% 생존율을 가진 $3.11x10^5$개와 비교하여, 평균적으로, 88.6%±0.9% 생존율을 가진 처리된 전혈 mL 당 $16.1x10^5$개 생존 가능한 세포는 피콜 분리 구배 방법을 통해 얻어졌다 (표 4, 도 8a, 및 도 8b). 희석된 WBC 여과된 샘플과 비교하여 비희석된 Pall Acrodisc WBC 필터 샘플을 사용하여 전혈 mL 당 53% 더 적은 생존 가능한 세포가 얻어진 반면, 공여자 1은 희석된 샘플과 비교하여 비희석된 샘플로부터 2% 더 적은 세포/mL를 산출하였다. 희석된 피콜 처리과 비교하여 Acrodisc WBC 필터를 통해 처리할 때 처리된 전혈 mL 당 91% 더 적은 생존 가능한 세포가 비희석된 전혈로부터 얻어졌다. 피콜 밀도 구배 방법과 비교하여 희석된 전혈이 Acrodisc

WBC 여과를 통해 처리될 때 mL 당 81%가 더 적은 생존 가능한 세포가 얻어졌다.

[0143] [표 4] 전혈 공여자 2 처리 후 데이터 요약 표.

공여자 2 샘플 조건	프로세스 부피 (mL)	처리 후 수집된 총 세포 (세포)	초기 전혈 부피의 평균 세포/mL (세포/mL)	처리 후 평균 생존률 (%)
비희석된 Pall 여과	12	1.74×10^6	1.45×10^5	68.0% ± 6.2%
희석된 Pall 여과	36	5.60×10^6	3.11×10^5	72.7% ± 2.1%
희석된 피콜	54	43.5×10^6	16.1×10^5	88.6% ± 0.9%

[0144]

[0145] 류코팩 공여자 1: 98.1%±0.6% 생존율에서 피콜 분리 구배 방법을 통해 처리된 백혈구성분 채집술 생성물 mL 당 평균적으로 32.9×10^6개 생존 가능한 세포가 얻어졌다. 대조적으로, 처리된 세척된 (1:1 희석된) 백혈구성분 채집술 생성물의 mL 당 8.02×10^6개 생존 가능한 세포 및 비세척된 생성물의 4.36×10^6개 생존 가능한 세포가 각각 95.8%±0.3% 생존율 및 98.4%±0.6% 생존율에서 여과 방법을 통해 수득되었다 (표 5, 도 9a 및 도 9b).

[0146] 세척된 WBC 여과된 샘플과 비교하여 비세척된 Pall Acrodisc WBC 필터 샘플을 사용하여 백혈구성분 채집술 생성물 mL 당 46% 더 적은 생존 가능한 세포가 얻어졌다. 희석된 피콜 처리와 비교하여 Acrodisc WBC 필터를 통해 처리할 때 비세척된 류코팩 샘플로부터 처리된 전혈 mL 당 87% 더 적은 생존 가능한 세포가 얻어졌다 (도 9b). 피콜 밀도 구배 방법과 비교하여 Acrodisc WBC 여과를 통해 세척된 백혈구성분 채집술 생성물을 처리할 때 mL 당 76% 더 적은 생존 가능한 세포가 얻어졌다.

[0147] [표 5] 류코팩 공여자 처리 후 데이터 요약 표

류코팩 샘플 조건	프로세스 부피 (mL)	처리 후 수집된 총 세포 (세포)	초기 전혈 부피의 평균 세포/mL (세포/mL)	처리 후 평균 생존률 (%)
비세척된 Pall 여과	18	7.85×10^7	4.36×10^6	98.4% ± 0.6%
세척된 Pall 여과	18	7.14×10^7	8.02×10^6	95.8% ± 0.3%
세척된 피콜	200	326×10^7	32.9×10^6	98.1% ± 0.6%

[0148]

[0149] CD3+ T-세포 집단의 FACS 분석

[0150] 현재 세포 치료요법은 Cocoon™ 시스템과 같은 자동화된 세포 조작 시스템을 위한 CAR-T 세포 치료요법 절차의 최적화에 초점을 맞추고 있다. 이를 염두에 두고, CD3+ T-세포의 백분율, CD3+CD4+ T-세포 대 CD3+CD8+ T-세포의 비율을 피콜 및 여과 방법에 의해 처리된 전혈과 류코팩 세포 수집 간에 비교하였다 (도 10).

[0151] 전혈 공여자 1: CD3+CD4 T-세포 (6% - 8%) 및 CD3+CD8+ T-세포 (4% - 10%)의 가장 낮은 백분율은 2개의 비희석된, Pall 여과된 6 mL 전혈 샘플 중 하나에서 그리고 2개의 12 mL 및 24 mL 희석된 Pall 여과된 전혈 샘플에서 관찰되었다 (도 11). 모든 다른 샘플의 경우, 대략적으로 22%±4%의 CD3+CD4+ T-세포 및 19%±3%의 CD3+CD8+ T-세포는 피콜 및 Pall 여과된 전혈 샘플 둘 다에서 포획되었다. 그러나, 모든 샘플은 각 조건 내에서 포획된 CD4+ 대 CD8+ T-세포의 비율을 대략 1:1로 유지하였다.

[0152] 전혈 공여자 2: 비희석된 6 mL 전혈 샘플로부터 수집된 분획은 대략적으로 30% 내지 38% CD3+CD4+ T-세포 및 9% 내지 12% CD3+CD8+ T-세포로 모든 다른 조건과 비교할 때 CD3+CD4+ T-세포 (23.6% 및 22%) 및 CD3+CD8+ T-세포의 가장 낮은 백분율 (8%, 및 7.5%)을 나타냈다 (도 12). 그러나, 모든 샘플은 CD3+CD4+ 세포 대 CD3+CD8+ 세포의 3:1 비율을 나타냈다. 2개의 전혈 공여자 간의 CD4+ 대 CD8+ 비율의 차이는 공여자 대 공여자의 변동성의

결과일 가능성이 높다.

[0153] 류코팩 공여자 샘플: 평균적으로, 피콜 단리 방법을 통해 처리된 전혈로부터의 세포 분획은 40%±2% CD3+CD4+ T-세포 및 22.8%±3% CD3+CD8+ T-세포를 포함하였다 (도 13). 이것은 비세척된 여과된 류코팩 샘플보다 대략적으로 15% 더 많은 CD3+CD4+ T-세포 및 5% 더 많은 CD3+CD8+ T-세포가 수집되었다. 피콜 단리는 또한 세척된 (1:1 희석된) Pall Acrodisc WBC 여과된 류코팩 샘플보다 21% 더 많은 CD3+CD4+ T-세포 및 13% 더 많은 CD3+CD8+ T-세포를 산출하였다. CD3+CD4+ 대 CD3+CD8+ 세포 비율이 1:1인 12 mL의 비세척된 여과된 류코팩 샘플을 제외하고, 모든 다른 피콜 및 여과된 샘플은 2:1 CD3+CD4+ 대 CD3+CD8+ 비율이 2:1이었다. CD4+, CD8+ 수율의 차이는 Pall Acrodisc WBC 필터를 통해 류코팩 샘플을 수동으로 여과하기 위해 주사기 플런저를 사용해야 하는 필요성에 의해 부정적인 영향을 받을 수 있는데, 이는 4 mL 이하의 류코팩 샘플이 중력만을 통해 여과되었기 때문이다.

[0154] 결론

[0155] 본원에 기재된 방법은 Cocoon 시스템을 통한 전혈 백혈구 단리를 위해 개별적으로 또는 직렬로 Pall Acrodisc 백혈구 주사기 필터와 같은 세포 여과 필터를 사용하는 방법을 기재하고 있다. 이러한 필터 사용을 Cocoon™ 카세트에 구현하기 위한 업데이트는 다음을 포함한다:

[0156] WBC 필터 당 6 mL 내지 12 mL의 처리 부피의 비희석된 또는 희석된 전혈 샘플.

[0157] 감소된 처리 시간을 위해 DPBS 또는 유사한 완충액에서 전혈을 잠재적으로 1:1로 희석시킴.

[0158] 중력 여과 가능성

[0159] Pall Acrodisc WBC 필터는 원심분리 없이 T-세포의 포획 및 확장을 가능하게 한다. 전혈 및 백혈구성분 채집술 생성물 프로세스 능력이 증가된 더 큰 필터도 유용하다. 특히, Haemonetics에 의해 회수된 혈액용 백혈구 필터를 사용하여 전혈 여과하였다.

[0160] 논의

[0161] 백혈구 포획 배지/매트릭스를 사용하여 특정화된 필터를 사용할 때 전혈로부터 Cocoon™ 인-라인 백혈구 단리를 수행할 수 있다. Cocoon™ 시스템에서 사용하기 위해, 적합한 Pall 또는 Haemonetics 맞춤형 필터를 생산할 수 있다.

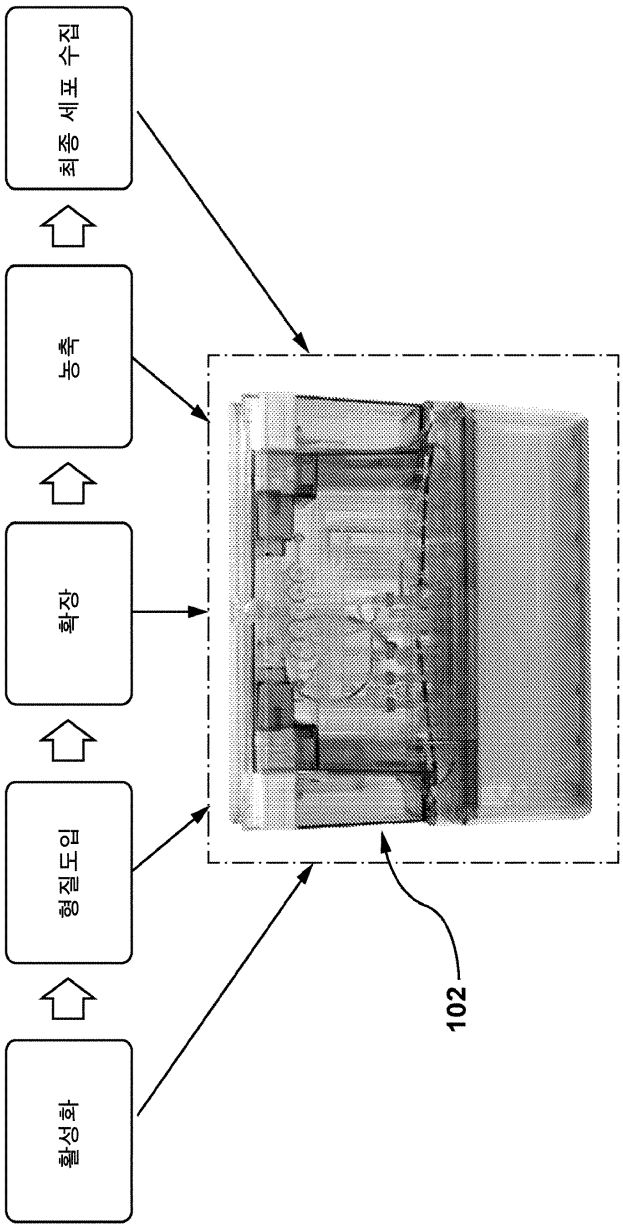
[0162] 본원에 기재된 방법 및 적용에 대한 다른 적합한 변형 및 적응이 임의의 구현예의 임의의 범위로부터 벗어나지 않고 이루어질 수 있다는 것은 관련 기술분야의 통상의 숙련가에게 명백할 것이다.

[0163] 특정 구현예가 본원에서 예시되고 기재되었지만, 청구범위는 기재되고 나타낸 부분의 특정 형태 또는 배열로 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 명세서에는 예시적인 구현예가 개시되어 있고, 특정 용어들이 사용되지만, 이들은 제한의 목적이 아니라 일반적이고 설명적인 의미로만 사용된다. 상기 교시에 비추어 구현예의 변형 및 변경이 가능하다. 따라서, 구현예는 구체적으로 기재된 것과 다르게 실시될 수 있음이 이해되어야 한다.

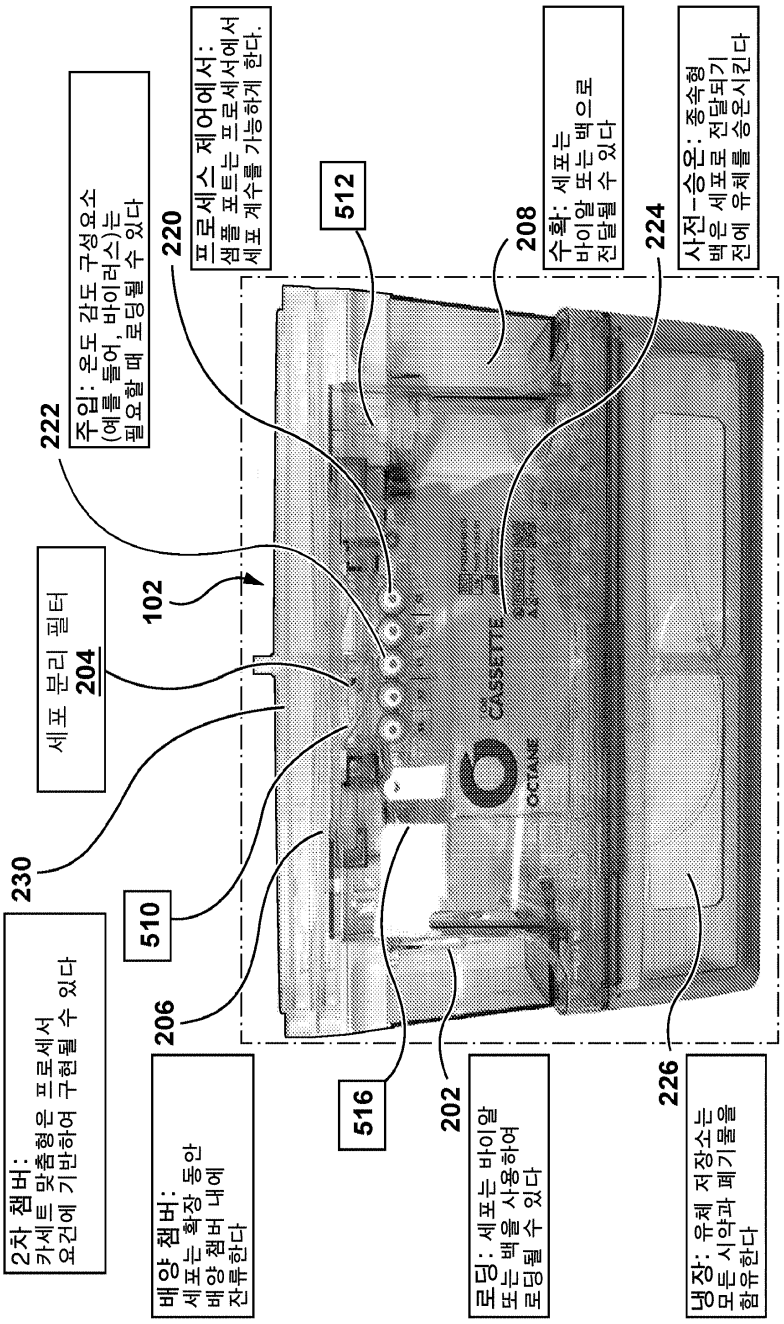
[0164] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면

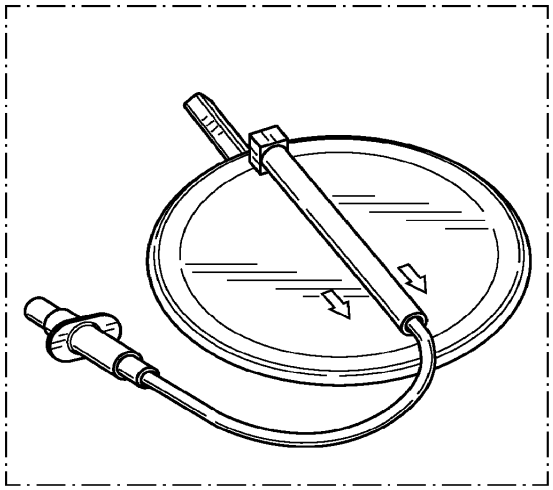
도면1



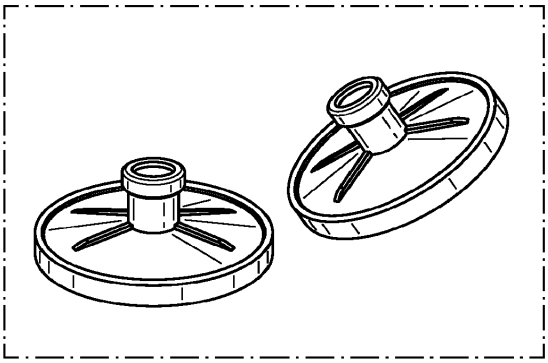
도면2a


2차 챔버:
카세트 맞춤형은 프로세서
요건에 기반하여 구현될 수 있다
230
세포 분리 필터
204
222
주입: 온도 감도 구성요소
(예를 들어, 바이러스)는
필요할 때 로딩될 수 있다
102
220
프로세스 제어에서:
샘플 포트는 프로세서에서
세포 계수를 가능하게 한다.
512
208
수확: 세포는
바이알 또는 백으로
전달될 수 있다
224
사전-승온: 종속형
백은 세포로 전달되기
전에 유체를 승온시킨다
510
206
배양 챔버:
세포는 확장 동안
배양 챔버 내에
잔류한다
516
202
로딩: 세포는 바이알
또는 백을 사용하여
로딩될 수 있다
226
냉장: 유체 저장소는
모든 시약과 폐기물을
함유한다

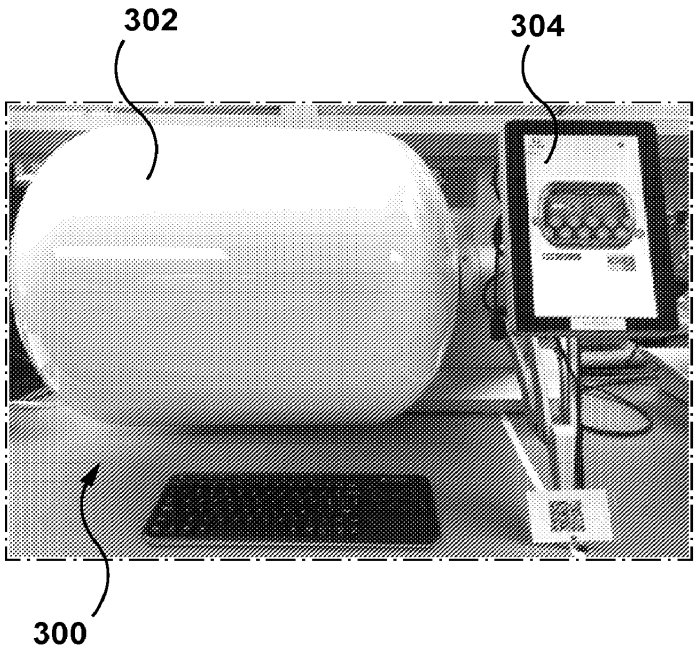
도면2b



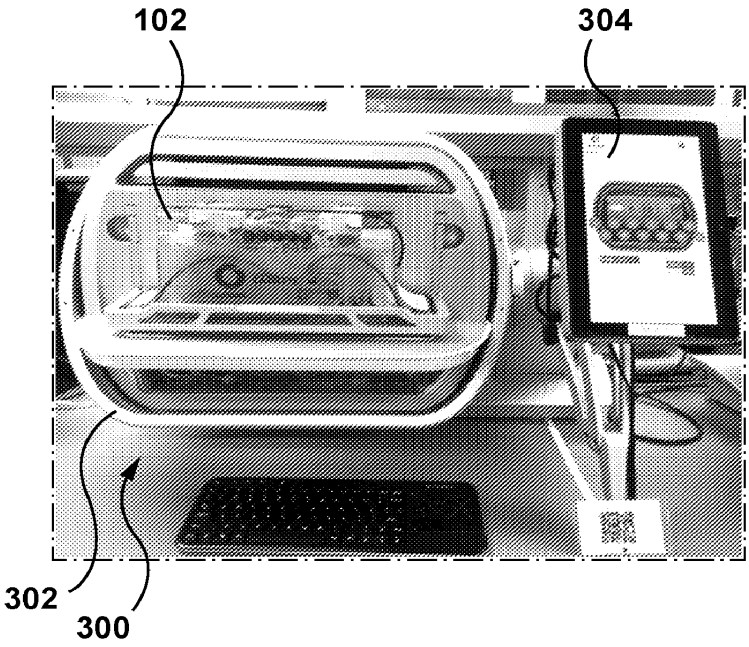
도면2c



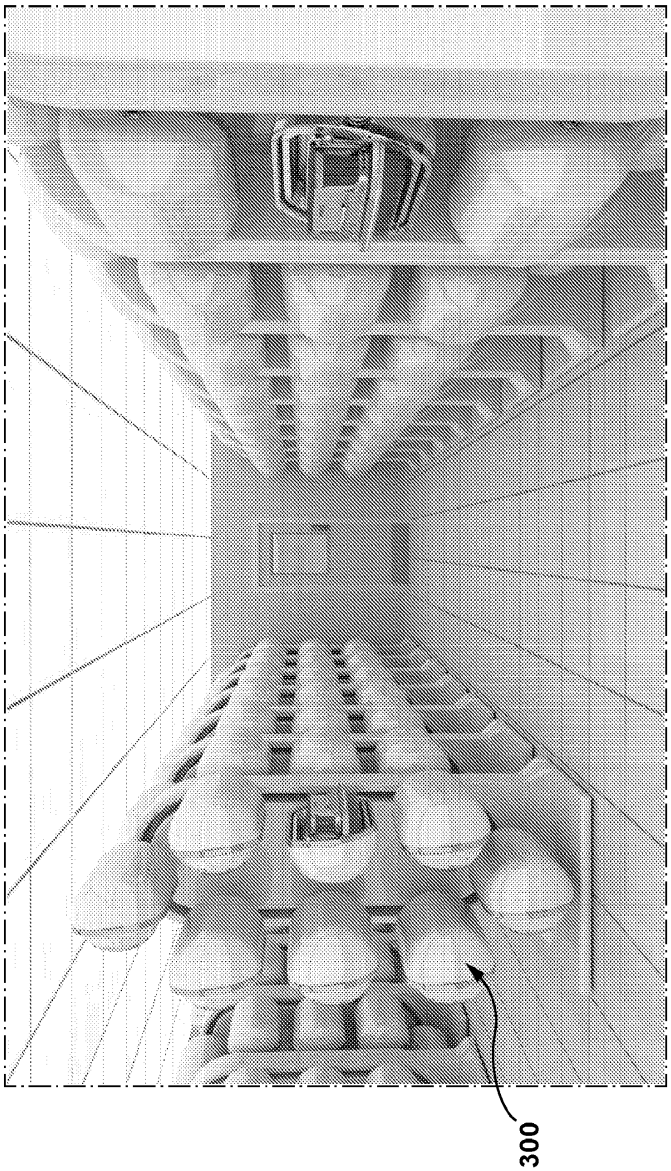
도면3a



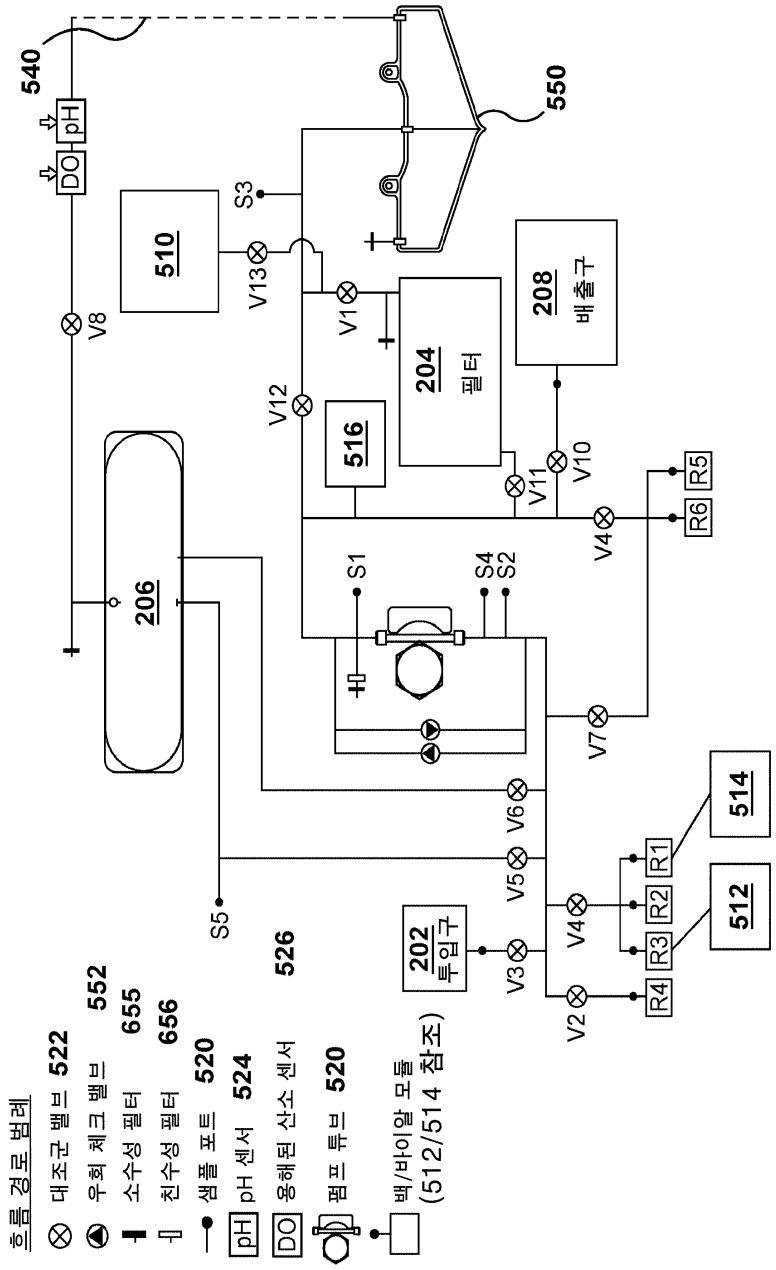
도면3b



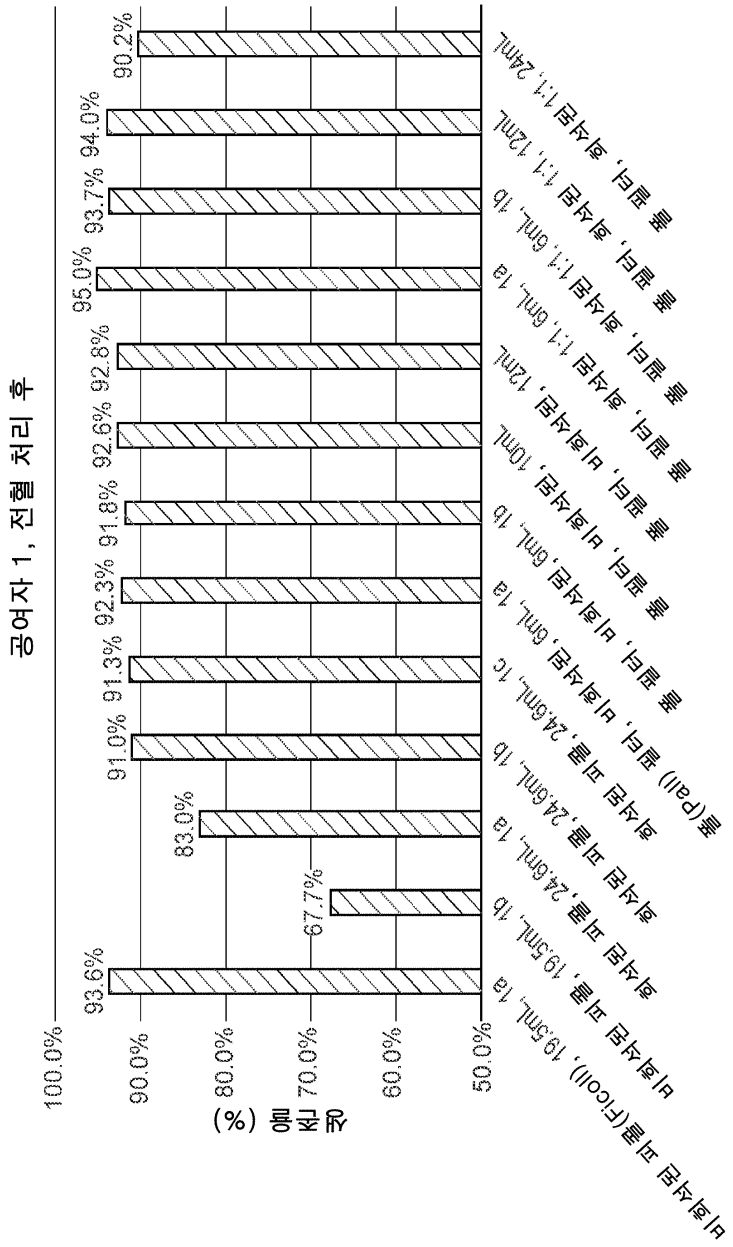
도면4



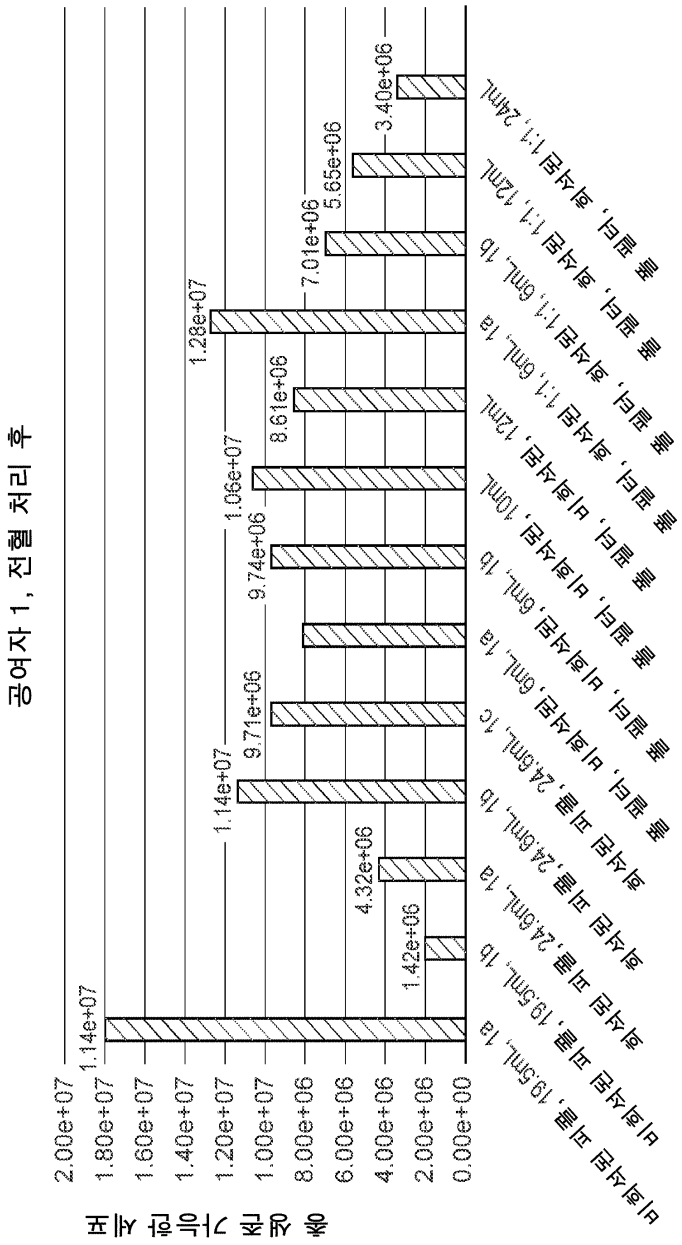
도면5


흐름 경로 범례
대조군 밸브 522
우회 체크 밸브 552
소수성 필터 655
친수성 필터 656
샘플 포트 520
pH 센서 524
용해된 산소 센서 526
펌프 튜브 520
백/바이알 모듈 (512/514 참조)
540
pH
DO
V8
510
S3
V13
V1
V12
516
204 필터
208 배출구
550
206
V11
V10
V4
R5
R6
S1
S4
S2
V7
V6
V5
V4
V3
V2
202 투입구
R1
R2
R3
R4
514
512
S5

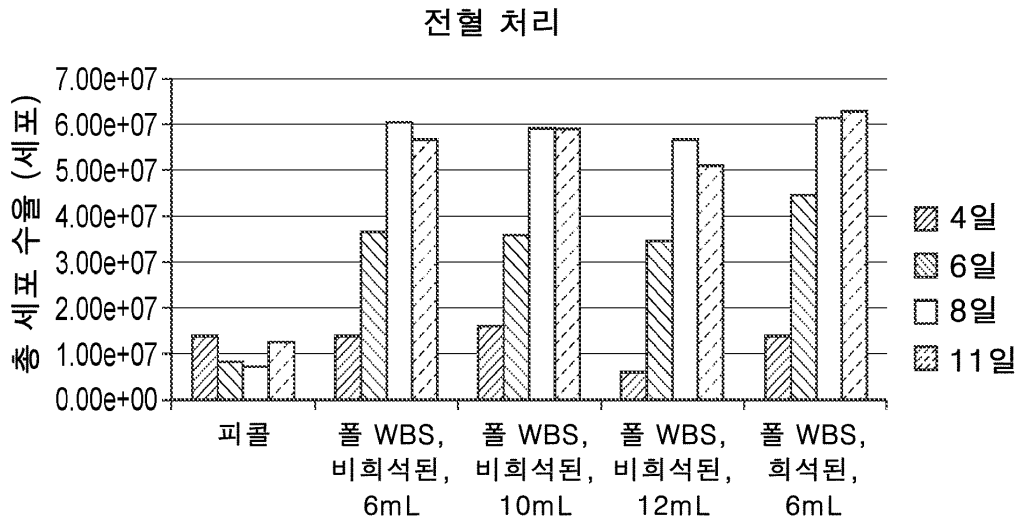
도면6a


공여자 1, 전혈 처리 후
생존율 (%)
100.0%
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
93.6%
67.7%
83.0%
91.0%
91.3%
92.3%
91.8%
92.6%
92.8%
95.0%
93.7%
94.0%
90.2%
비히사딘 과혈(Ficoll), 19.5mL, 1a
비히사딘 과혈, 19.5mL, 1b
히사딘 과혈, 24.6mL, 1a
히사딘 과혈, 24.6mL, 1b
히사딘 과혈, 24.6mL, 1c
비히사딘, 혈탁, 6mL, 1a
비히사딘, 혈탁, 6mL, 1b
비히사딘, 혈탁, 10mL
히사딘, 혈탁, 12mL
히사딘, 혈탁, 1:1, 6mL, 1a
히사딘, 혈탁, 1:1, 6mL, 1b
히사딘, 혈탁, 1:1, 12mL
히사딘, 혈탁, 1:1, 24mL

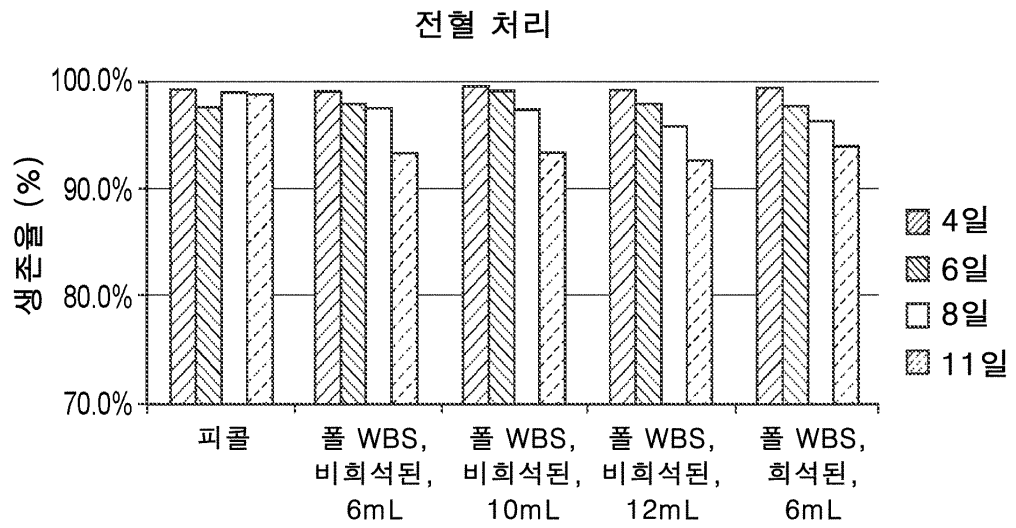
도면6b


공여자 1, 전혈 처리 후
총 생존 가능한 세포
2.00e+07
1.80e+07
1.60e+07
1.40e+07
1.20e+07
1.00e+07
8.00e+06
6.00e+06
4.00e+06
2.00e+06
0.00e+00
1.14e+07
1.42e+06
4.32e+06
1.14e+07
9.71e+06
9.74e+06
1.06e+07
8.61e+06
1.28e+07
7.01e+06
5.65e+06
3.40e+06
비히알루 피콜, 19.5mL, 1a
비히알루 피콜, 19.5mL, 1b
히알루 피콜, 24.6mL, 1a
히알루 피콜, 24.6mL, 1b
히알루 피콜, 24.6mL, 1c
비히알루, 6mL, 1a
비히알루, 6mL, 1b
비히알루, 10mL
비히알루, 12mL
히알루, 6mL, 1a
히알루, 6mL, 1b
히알루, 12mL
히알루, 24mL

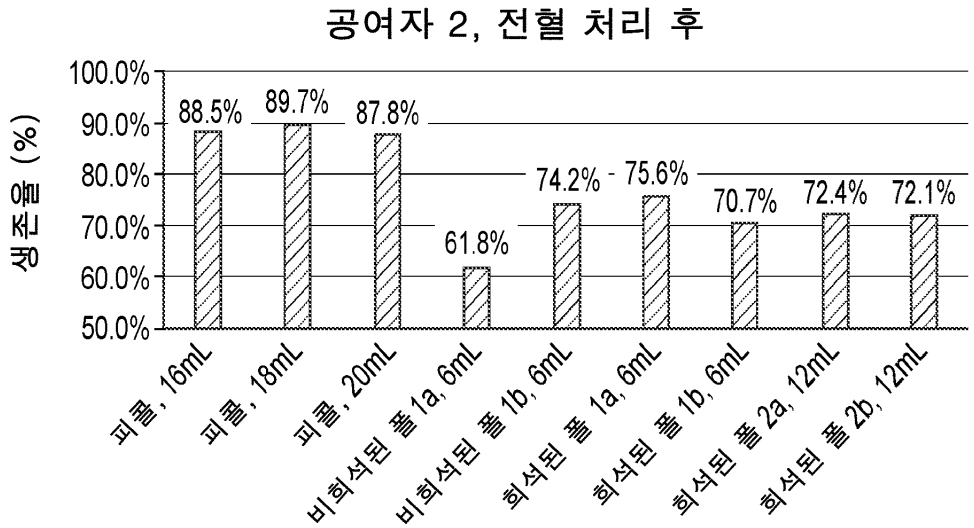
도면7a



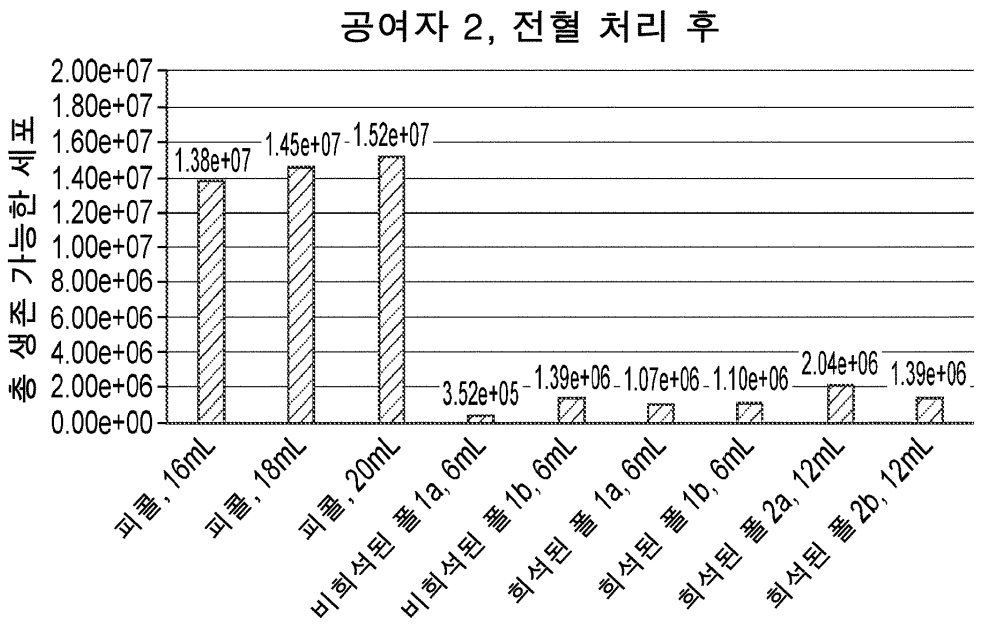
도면7b



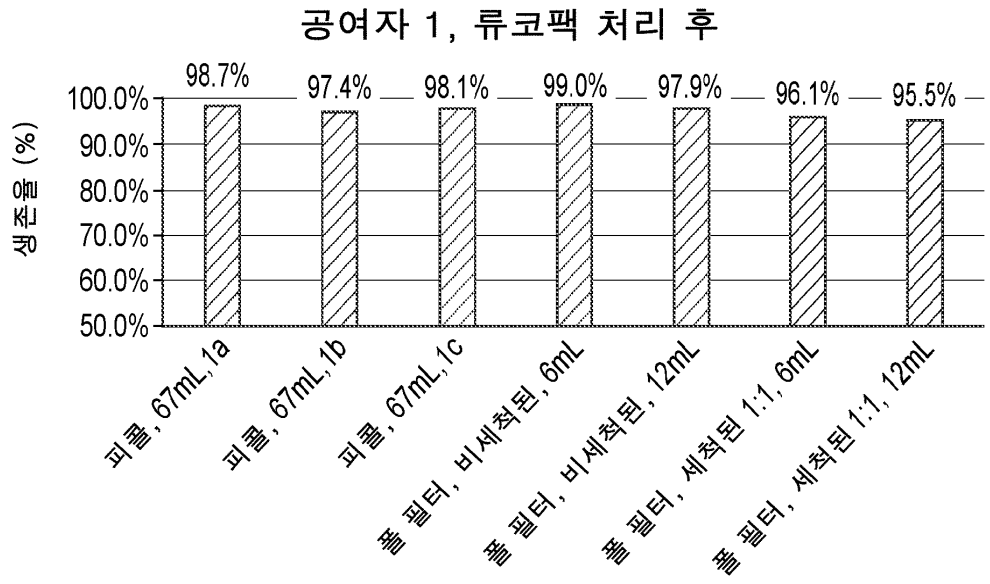
도면8a



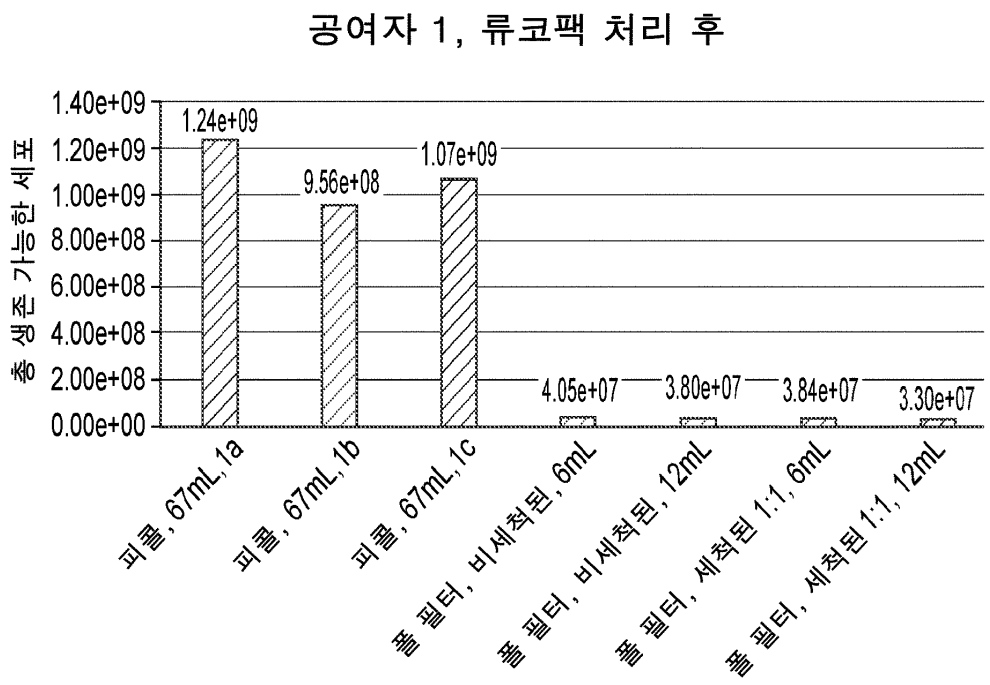
도면8b


공여자 2, 전혈 처리 후
총 생존 가능한 세포
2.00e+07
1.80e+07
1.60e+07
1.40e+07
1.20e+07
1.00e+07
8.00e+06
6.00e+06
4.00e+06
2.00e+06
0.00e+00
1.38e+07
1.45e+07
1.52e+07
3.52e+05
1.39e+06
1.07e+06
1.10e+06
2.04e+06
1.39e+06
피콜, 16mL
피콜, 18mL
피콜, 20mL
비희석된 폴 1a, 6mL
비희석된 폴 1b, 6mL
희석된 폴 1a, 6mL
희석된 폴 1b, 6mL
희석된 폴 2a, 12mL
희석된 폴 2b, 12mL

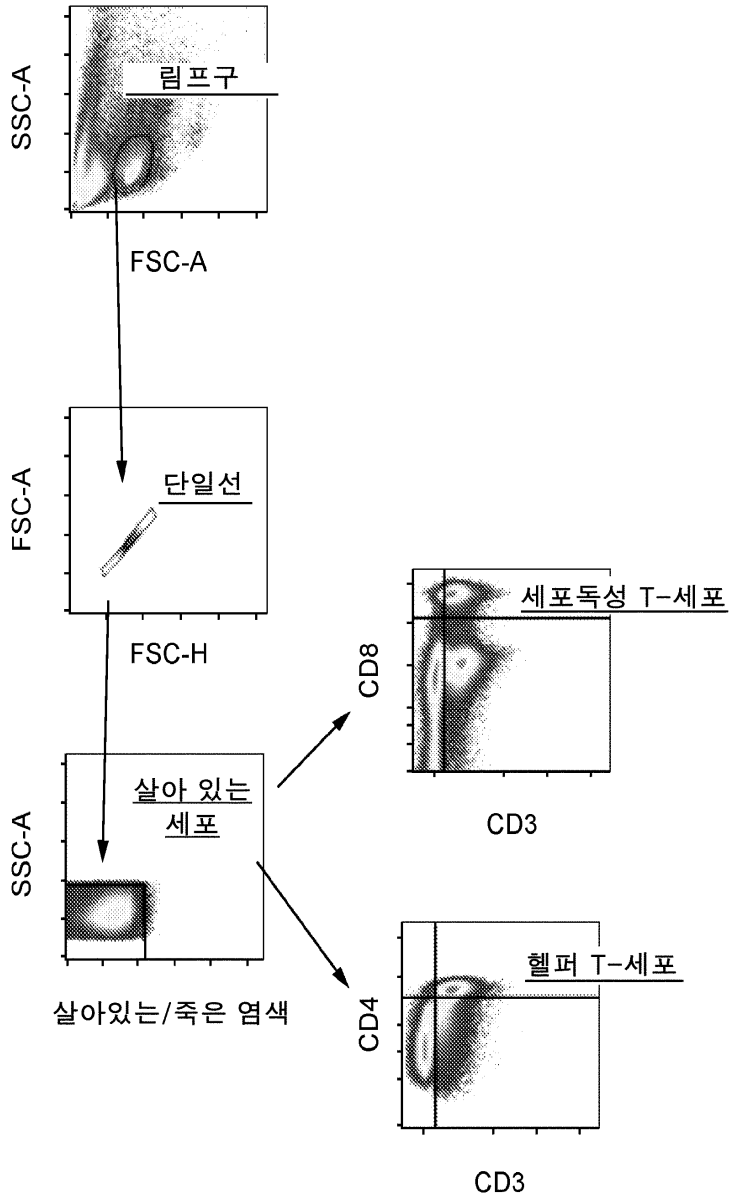
도면9a


공여자 1, 류코팩 처리 후
생존율 (%)
100.0%
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
98.7%
97.4%
98.1%
99.0%
97.9%
96.1%
95.5%
피콜, 67mL,1a
피콜, 67mL,1b
피콜, 67mL,1c
폴 필터, 비세척된, 6mL
폴 필터, 비세척된, 12mL
폴 필터, 세척된 1:1, 6mL
폴 필터, 세척된 1:1, 12mL

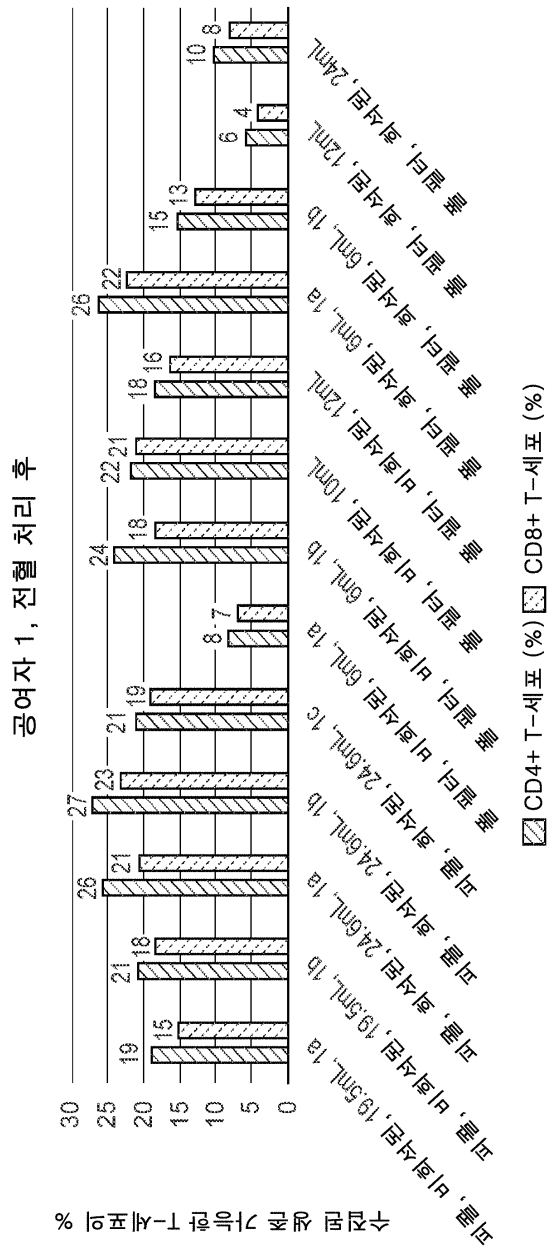
도면9b


공여자 1, 류코팩 처리 후
총 생존 가능한 세포
1.40e+09
1.20e+09
1.00e+09
8.00e+08
6.00e+08
4.00e+08
2.00e+08
0.00e+00
1.24e+09
9.56e+08
1.07e+09
4.05e+07
3.80e+07
3.84e+07
3.30e+07
피콜, 67mL, 1a
피콜, 67mL, 1b
피콜, 67mL, 1c
폴 필터, 비세척된, 6mL
폴 필터, 비세척된, 12mL
폴 필터, 세척된 1:1, 6mL
폴 필터, 세척된 1:1, 12mL

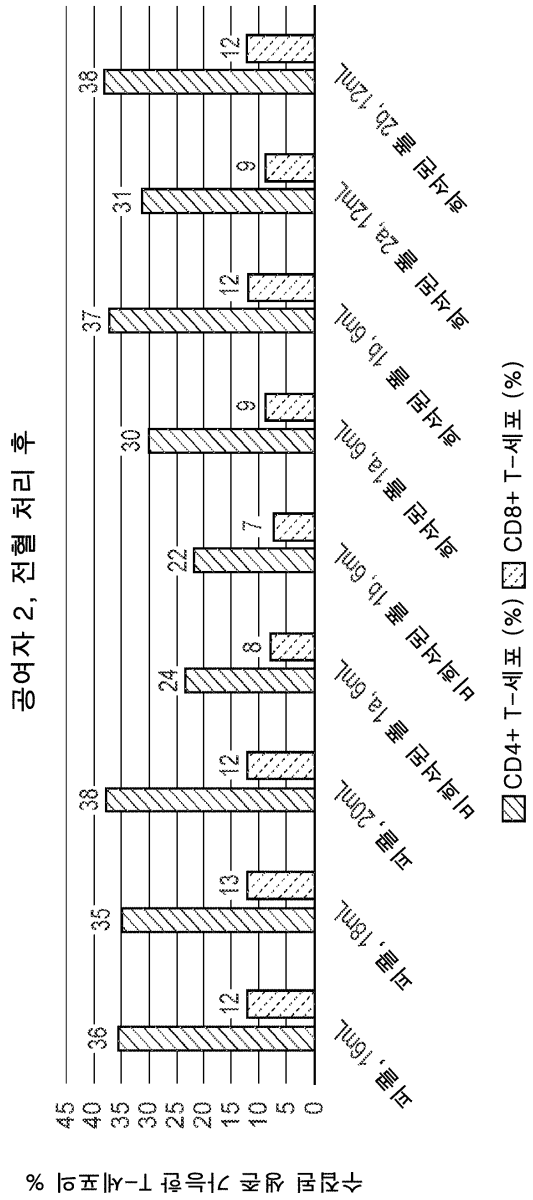
도면10


SSC-A
림프구
FSC-A
FSC-A
단일선
FSC-H
SSC-A
살아 있는
세포
살아있는/죽은 염색
CD8
세포독성 T-세포
CD3
CD4
헬퍼 T-세포
CD3

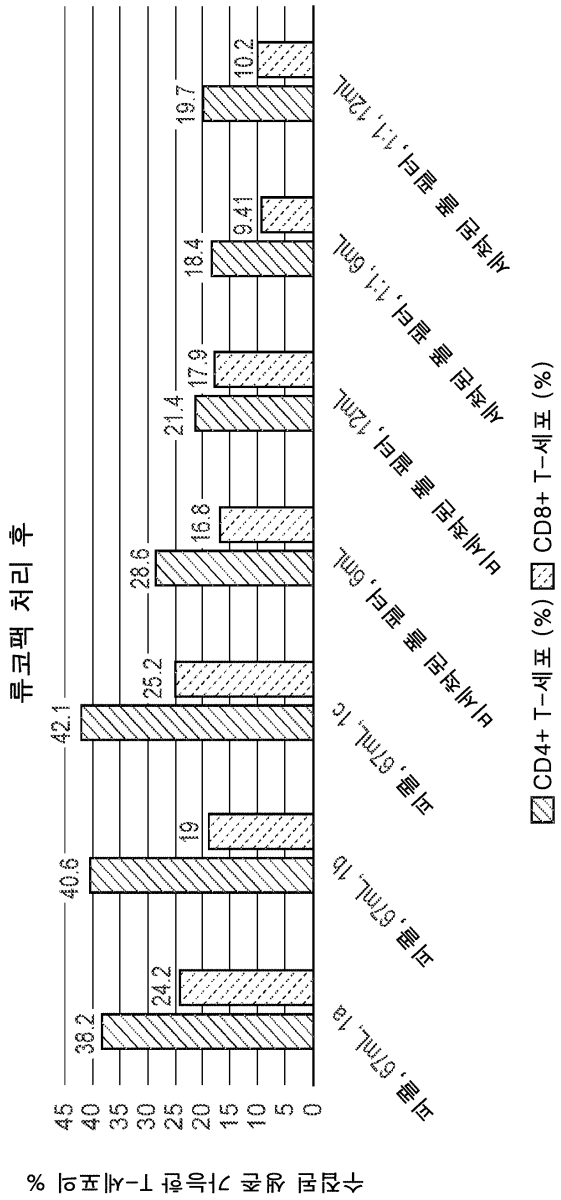
도면11


공여자 1, 전혈 처리 후
수집된 생존 가능한 T-세포의 %
CD4+ T-세포 (%) CD8+ T-세포 (%)
피콜, 비혀상된, 19.5mL, 1a
피콜, 비혀상된, 19.5mL, 1b
피콜, 희상된, 24.6mL, 1a
피콜, 희상된, 24.6mL, 1b
피콜, 희상된, 24.6mL, 1c
롤 컬터, 비혀상된, 6mL, 1a
롤 컬터, 비혀상된, 6mL, 1b
롤 컬터, 비혀상된, 12mL
롤 컬터, 희상된, 6mL, 1a
롤 컬터, 희상된, 6mL, 1b
롤 컬터, 희상된, 12mL
롤 컬터, 희상된, 24mL

도면12


공여자 2, 전혈 처리 후
수집된 생존 가능한 T-세포의 %
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
36
12
35
13
38
12
24
8
22
7
30
9
37
12
31
9
38
12
피콜, 16mL
피콜, 18mL
피콜, 20mL
비처리된 혈 1a, 6mL
비처리된 혈 1b, 6mL
처리된 혈 1a, 6mL
처리된 혈 1b, 6mL
처리된 혈 2a, 12mL
처리된 혈 2b, 12mL
CD4+ T-세포 (%)
CD8+ T-세포 (%)

도면13


류코팩 처리 후
수집된 생존 가능한 T-세포의 %
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
38.2
24.2
40.6
19
42.1
25.2
28.6
16.8
21.4
17.9
18.4
9.41
19.7
10.2
피콜, 67mL, 1a
피콜, 67mL, 1b
피콜, 67mL, 1c
비세척된 혈액, 6mL
비세척된 혈액, 12mL
세척된 혈액, 1:1, 6mL
세척된 혈액, 1:1, 12mL
CD4+ T-세포 (%)
CD8+ T-세포 (%)