

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-526269

(P2019-526269A)

(43) 公表日 令和1年9月19日(2019.9.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/07	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2019-513829 (P2019-513829) (86) (22) 出願日 平成29年9月12日 (2017. 9. 12) (85) 翻訳文提出日 令和1年5月8日 (2019.5. 8) (86) 国際出願番号 PCT/US2017/051228 (87) 国際公開番号 W02018/049420 (87) 国際公開日 平成30年3月15日 (2018. 3. 15) (31) 優先権主張番号 62/393, 583 (32) 優先日 平成28年9月12日 (2016. 9. 12) (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(71) 出願人 516316897 ジュノー セラピューティクス インコー ポレイテッド アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン 州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 スイート 1 2 0 0 (74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志 (74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫 (74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝 (74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 灌流バイオリアクタバッグアセンブリ

(57) 【要約】

本開示は、バイオリアクタバッグが細胞の培養に使用され得る前に、バイオリアクタバッグに行う追加の接続および/または適合化の量を最小限に抑え、それにより汚染のリスクを低下させることができるバイオリアクタバッグアセンブリを対象とする。本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリは、細胞培地および/または細胞供給源を予めアセンブルされたチューブ構成に直ちに接合することができるように、予めアセンブルされた廃棄物バッグ接続および予めアセンブルされたチューブ構成を含み得る。

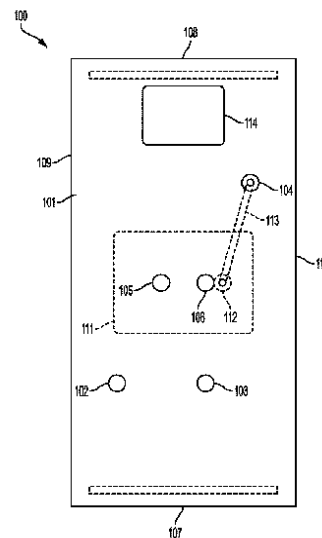


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む複数のポートを含む、上面と、

底面と、

前記灌流ポートに流体接続された灌流フィルタと

を含むバイオリアクタバッグ；ならびに

前記バイオリアクタバッグの前記灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグを含む、バイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 2】

10

前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の端部と、前記第1の端部と反対側の第2の端部とを有し、前記灌流ポートが前記第1の端部よりも前記第2の端部に近い、請求項1記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 3】

前記供給ポートおよび前記サンプリングポートが、前記第2の端部よりも前記第1の端部に近い、請求項1～2のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 4】

前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の側面と、前記第1の側面と反対側の第2の側面とを有し、前記供給ポートが前記第2の側面よりも前記第1の側面に近い、請求項1～3のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

20

【請求項 5】

前記サンプリングポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、請求項4記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 6】

前記灌流ポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、請求項4～5のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 7】

前記灌流フィルタが前記バイオリアクタバッグの内側にある、請求項1～6のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 8】

30

前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 9】

前記供給チューブ構成がポリ塩化ビニル（PVC）チューブを含む、請求項8記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 10】

前記供給チューブ構成が2つの入口を有するように、前記供給チューブ構成がY字型コネクタを含む、請求項8～9のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 11】

40

前記サンプリングポートに流体接続されたサンプリングチューブ構成をさらに含む、請求項1～10のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 12】

前記サンプリングチューブ構成がPVCチューブを含む、請求項11記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 13】

前記廃棄物バッグが、廃棄物チューブ構成を介して前記灌流ポートに流体接続されている、請求項1～12のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 14】

前記廃棄物チューブ構成がPVCチューブを含む、請求項13記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

50

【請求項 15】

前記複数のポートがガス入口ポートとガス出口ポートとをさらに含む、請求項1～14のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 16】

前記バイオリアクタバッグの前記上面が、前記第1の端部と前記第2の端部との間の中間にある中心を有し、前記ガス入口ポートおよび前記ガス出口ポートが、前記第1の端部または前記第2の端部よりも前記中心に近い、請求項15記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 17】

前記複数のポートが、前記供給ポート、前記サンプリングポート、前記灌流ポート、前記ガス入口ポート、および前記ガス出口ポートからなる、請求項15～16のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

10

【請求項 18】

前記ガス入口ポートに流体接続された入口フィルタを含むガス入口チューブ構成と、前記ガス出口ポートに流体接続された排気フィルタを含むガス出口チューブ構成とをさらに含む、請求項15～17のいずれか一項記載のバイオリアクタバッグアセンブリ。

【請求項 19】

バイオリアクタロッカー；ならびに

供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む複数のポートを含む、上面と、

20

底面と、

前記灌流ポートに流体接続された灌流フィルタと、

バイオリアクタバッグの前記灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグと

を含む、前記バイオリアクタロッカーに支持されたバイオリアクタバッグを含むバイオリアクタシステム。

【請求項 20】

前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成をさらに含む、請求項19記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 21】

前記供給チューブ構成が第1および第2の入口を有するように、前記供給チューブ構成がY字型コネクタを含む、請求項20記載のバイオリアクタシステム。

30

【請求項 22】

細胞培地供給源が、前記供給チューブ構成の各入口に流体接続されている、請求項21記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 23】

各入口がPVCを含み、前記細胞培地供給源が前記入口の前記PVCに接合されている、請求項22記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 24】

細胞供給源が前記第1の入口に流体接続され、細胞培地供給源が前記第2の入口に流体接続される、請求項21記載のバイオリアクタシステム。

40

【請求項 25】

各入口がPVCを含み、前記細胞供給源が前記第1の入口の前記PVCに接合され、前記細胞培地供給源が前記第2の入口の前記PVCに接合されている、請求項24記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 26】

前記灌流フィルタが前記バイオリアクタバッグの内側にある、請求項19～25のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 27】

前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の端部と、前記第1の端部と反対側の第2の端部とを有し、前記灌流ポートが前記第1の端部よりも前記第2の端部に近い、請求項19

50

～26のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 28】

前記供給ポートおよび前記サンプリングポートが、前記第2の端部よりも前記第1の端部に近い、請求項27記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 29】

前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の側面と、前記第1の側面と反対側の第2の側面とを有し、前記供給ポートが前記第2の側面よりも前記第1の側面に近い、請求項19～28のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 30】

前記サンプリングポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、請求項29記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 31】

前記灌流ポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、請求項29～30のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 32】

前記灌流フィルタが前記バイオリアクタバッグの内側にある、請求項19～31のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 33】

前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成をさらに含む、請求項19～32のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 34】

前記供給チューブ構成がポリ塩化ビニル（PVC）チューブを含む、請求項33記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 35】

前記供給チューブ構成が2つの入口を有するように、前記供給チューブ構成がY字型コネクタを含む、請求項33～34のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 36】

前記サンプリングポートに流体接続されたサンプリングチューブ構成をさらに含む、請求項19～35のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 37】

前記サンプリングチューブ構成がPVCチューブを含む、請求項36記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 38】

前記廃棄物バッグが、廃棄物チューブ構成を介して前記灌流ポートに流体接続されている、請求項19～37のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 39】

前記廃棄物チューブ構成がPVCチューブを含む、請求項38記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 40】

前記複数のポートがガス入口ポートとガス出口ポートとをさらに含む、請求項19～39のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 41】

前記バイオリアクタバッグの前記上面が、前記第1の端部と前記第2の端部との間の中間にある中心を有し、前記ガス入口ポートおよび前記ガス出口ポートが、前記第1の端部または前記第2の端部よりも前記中心に近い、請求項40記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 42】

前記複数のポートが、前記供給ポート、前記サンプリングポート、前記灌流ポート、前記ガス入口ポート、および前記ガス出口ポートからなる、請求項40～41のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項 43】

10

20

30

40

50

前記ガス入口ポートに流体接続された入口フィルタを含むガス入口チューブ構成と、前記ガス出口ポートに流体接続された排気フィルタを含むガス出口チューブ構成とをさらに含む、請求項40～42のいずれか一項記載のバイオリアクタシステム。

【請求項44】

供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む複数のポートを含む、上面と、底面と、前記灌流ポートに流体接続された灌流フィルタとを含む、バイオリアクタバッグ、

前記バイオリアクタバッグの前記灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグ、を含むバイオリアクタバッグアセンブリのバイオリアクタバッグを準備する工程；ならびに

細胞培地を前記供給ポートを通して前記バイオリアクタバッグに供給する工程；
細胞を前記供給ポートを通して前記バイオリアクタバッグに供給する工程；
バイオリアクタロッカーから提供される揺動を使用しながら前記バイオリアクタバッグ中の前記細胞を培養する工程；
廃濾液を前記灌流ポートを通して前記廃棄物バッグに移送する工程；ならびに
前記培養した細胞を収集する工程
を含む、バイオリアクタシステムを使用する方法。

【請求項45】

前記バイオリアクタバッグアセンブリが、前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成を含み、前記供給チューブ構成が、前記供給チューブ構成が第1の入口および第2の入口を有するようにY字型コネクタを含む、請求項44記載の方法。

【請求項46】

前記細胞培地が、細胞培地供給源を前記第1の入口に接合することによって添加される、請求項45記載の方法。

【請求項47】

前記細胞が、細胞供給源を前記第1の入口に接合することによって添加される、請求項45記載の方法。

【請求項48】

前記細胞培地が、細胞培地供給源を前記第1の入口に接合することによって添加され、前記細胞が、細胞供給源を前記第2の入口に接合することによって添加される、請求項45記載の方法。

【請求項49】

前記複数のポートがガス入口ポートとガス出口ポートとをさらに含む、請求項44～48のいずれか一項記載の方法。

【請求項50】

前記ガス入口ポートを通して細胞培養用ガスを前記バイオリアクタバッグに供給する工程をさらに含む、請求項49記載の方法。

【請求項51】

前記ガス出口ポートを通る排気として前記バイオリアクタバッグから前記ガスの一部を除去する工程をさらに含む、請求項50記載の方法。

【請求項52】

収集バッグを前記第1または前記第2の入口に接合すること、および前記供給チューブ構成の前記流れの方向を逆にすることによって、前記培養した細胞が収集される、請求項45記載の方法。

【請求項53】

前記複数のポートがガス入口ポートを含み、前記方法が前記ガス入口ポートを通して前記バイオリアクタバッグをガスで膨張させる工程をさらに含む、請求項44～52のいずれか一項記載の方法。

【請求項54】

前記サンプリングポートを通して前記培養した細胞のサンプルを回収する工程をさらに

10

20

30

40

50

含む、請求項44～53のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、2016年9月12日に出願された米国特許出願公開第62/393,583号に対する優先権を主張する。

【0002】

開示の分野

本開示は、いくつかの局面で、灌流バイオリアクタバッグアセンブリを含むバイオリアクタバッグアセンブリに関する。より具体的には、本開示は、特定の局面において、使用前に操作者によって行われる必要がある接続の量およびバイオリアクタバッグの汚染の危険性を最小限に抑える、すぐに使用できるバイオリアクタバッグアセンブリに関する。

10

【背景技術】

【0003】

背景

細胞の培養のための製造方法における伝統的なステンレス鋼システムおよび配管は、場合によってバイオリアクタロッカーによりロックされる使い捨てバイオリアクタバッグに、多くの用途で置き換えられてきた。しかし、利用可能なバイオリアクタロッカーには様々な種類があり、各バイオリアクタロッカーシステムは、複数の接続を伴う様々な構成要素を任意で含むことができる。これらの構成要素は、例えば任意で蓋付きのロックングプラットフォーム、細胞バッグなどの細胞用容器を含む1つまたは複数の様々な容器、投入容器、ポンプモジュール、ガスモジュール、および廃棄物容器/バッグを含むことができる。さらに、このような構成要素は、1つまたは複数のこのような構成要素を互いに接続する、ならびに/または流体供給接続部ならびに電源コードおよびデータケーブルに接続する、複数の流体ラインを含むことができる。様々なバイオリアクタロッカーは互いに異なるので、バイオリアクタロッカーは多くの場合、各ロッカーシステムに特有の異なる独自のバイオリアクタバッグを利用する。

20

【発明の概要】

【0004】

30

概要

様々なバイオリアクタ装置にわたって使用することができる、灌流バイオリアクタバッグアセンブリなどのバイオリアクタバッグアセンブリが提供される。いくつかの局面では、細胞培地および/または細胞供給源を予めアセンブルされたチューブ構成に直ちに接合することができるように、予めアセンブルされた廃棄物バッグ接続および予めアセンブルされたチューブ構成を伴う、すぐに使用できるバイオリアクタバッグアセンブリを提供する。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、バイオリアクタバッグを細胞の培養に使用する前に、バイオリアクタバッグへの追加の接続および/または適合化を行う量を最小限に抑えることができる。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグアセンブリは、操作に必要な構成要素の量を最小限に抑えることができ、それによってバイオリアクタバッグアセンブリの完全性に関するリスクを最小限にする。そのように、いくつかの局面におけるバイオリアクタバッグアセンブリは、汚染および/または製品の損失のリスクを減らすことができる。さらに、接続、適合化、および/または構成要素を最小限に抑えることによって、バイオリアクタバッグを様々なバイオリアクタロッカーに適合させることができる。

40

【0005】

いくつかの態様は、バイオリアクタバッグおよび廃棄物バッグを含むバイオリアクタバッグアセンブリを含む。任意の態様において、バイオリアクタバッグは、複数のポートを有する底面および上面を含むことができ、複数のポートは、供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含むことができる。任意の態様において、バイオリアクタバッ

50

グは、灌流ポートに流体接続された灌流フィルタを含み得る。任意の態様において、廃棄物バッグはバイオリアクタバッグの灌流ポートに流体接続することができる。任意の態様において、バイオリアクタバッグの上面が、第1の端部と、第1の端部と反対側の第2の端部とを有し、灌流ポートが第1の端部よりも第2の端部に近い。任意の態様において、供給ポートおよびサンプリングポートは、第2の端部よりも第1の端部に近い。任意の態様において、バイオリアクタバッグの上面は、第1の側面と、第1の側面と反対側の第2の側面とを有し、供給ポートが第2の側面よりも第1の側面に近い。任意の態様では、サンプリングポートは第1の側面よりも第2の側面に近い。任意の態様では、灌流ポートは第1の側面よりも第2の側面に近い。任意の態様において、灌流フィルタはバイオリアクタバッグの内側にある。任意の態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、供給ポートに流体接続された供給チューブ構成を含み得る。任意の態様において、供給チューブ構成はポリ塩化ビニル（PVC）チューブを含む。任意の態様において、供給チューブ構成が2つの入口を有するように、供給チューブ構成はY字型コネクタを含む。任意の態様では、バイオリアクタバッグアセンブリは、サンプリングポートに流体接続されたサンプリングチューブ構成を含み得る。任意の態様では、サンプリングチューブ構成はPVCチューブを含むことができる。任意の態様において、廃棄物バッグは、廃棄物チューブ構成を介して、灌流ポートに流体接続することができる。任意の態様では、廃棄物チューブ構成はPVCチューブを含む。任意の態様において、複数のポートはガス入口ポートとガス出口ポートとを含み得る。任意の態様において、バイオリアクタバッグの上面は、第1の端部と第2の端部との間の中間にある中心を有し、ガス入口ポートおよびガス出口ポートは、第1の端部または第2の端部よりも中心に近い。任意の態様において、複数のポートは供給ポート、サンプリングポート、灌流ポート、ガス入口ポート、およびガス出口ポートのみを含む。任意の態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、ガス入口ポートに流体接続された入口フィルタを含むガス入口チューブ構成と、ガス出口ポートに流体接続された排気フィルタを含むガス出口チューブ構成とを含み得る。

【0006】

いくつかの態様は、バイオリアクタロッカー、バイオリアクタロッカーに支持されたバイオリアクタバッグ、およびバイオリアクタバッグに流体接続された廃棄物バッグを含むバイオリアクタシステムを含む。任意の態様では、バイオリアクタバッグは、複数のポートを含む底面および上面を含み、複数のポートは、供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む。任意の態様では、灌流フィルタは、灌流ポートに流体接続することができる。任意の態様において、廃棄物バッグはバイオリアクタバッグの灌流ポートに流体接続することができる。任意の態様では、バイオリアクタシステムは、供給ポートに流体接続された供給チューブ構成を含み得る。任意の態様では、供給チューブ構成は、供給チューブ構成が第1および第2の入口を有するようにY字型コネクタを含むことができる。任意の態様において、細胞培地供給源は、供給チューブ構成の各入口に流体接続されている。任意の態様において、各入口はPVCを含むことができ、細胞培地供給源は入口のPVCに接合することができる。任意の態様において、細胞供給源は第1の入口に流体接続され、細胞培地供給源は第2の入口に流体接続されている。任意の態様において、各入口はPVCを含むことができ、細胞供給源は第1の入口のPVCに接合することができる、細胞培地供給源は第2の入口のPVCに接合することができる。任意の態様において、灌流フィルタはバイオリアクタバッグの内側にあり得る。任意の態様において、バイオリアクタバッグの上面が、第1の端部と、第1の端部と反対側の第2の端部とを有し、灌流ポートが第1の端部よりも第2の端部に近い。任意の態様において、供給ポートおよびサンプリングポートは、第1の端部よりも第2の端部の近くにあり得る。任意の態様において、供給ポートおよびサンプリングポートは、第2の端部よりも第1の端部の近くにあり得る。任意の態様において、バイオリアクタバッグの上面は、第1の側面と、第1の側面と反対側の第2の側面とを有し、供給ポートが第2の側面よりも第1の側面に近い。任意の態様では、サンプリングポートは第1の側面よりも第2の側面に近く、灌流ポートは第1の側面よりも第2の側面に近い。任意の態様において、バイオリアクタシステムは、サンプリングポートに流体接続されたサン

10

20

30

40

50

プリングチューブ構成を含み得る。任意の態様において、サンプリングチューブ構成はPVCチューブを含む。任意の態様において、廃棄物バッグは、廃棄物チューブ構成を介して灌流ポートに流体接続されている。任意の態様では、廃棄物チューブ構成はPVCチューブを含む。任意の態様において、複数のポートはガス入口ポートとガス出口ポートとを含み得る。任意の態様において、バイオリアクタバッグの上面は、第1の端部と第2の端部との間の中間にある中心を有し、ガス入口ポートおよびガス出口ポートは、第1の端部または第2の端部よりも中心に近い。任意の態様において、複数のポートは、供給ポート、サンプリングポート、灌流ポート、ガス入口ポート、およびガス出口ポートのみを含む。任意の態様において、バイオリアクタシステムは、ガス入口ポートに流体接続された入口フィルタを含むガス入口チューブ構成と、ガス出口ポートに流体接続された排気フィルタを含むガス出口チューブ構成とを含み得る。

10

【0007】

いくつかの態様は、バイオリアクタバッグアセンブリのバイオリアクタバッグをバイオリアクタロッカーに配置する工程、バイオリアクタバッグの供給ポートを通して細胞培地をバイオリアクタバッグに供給する工程、細胞を供給ポートを通してバイオリアクタバッグに供給する工程、バイオリアクタロッカーから提供される揺動を使用しながらバイオリアクタバッグの細胞を培養する工程、廃濾液をバイオリアクタバッグの灌流ポートを通して廃棄物バッグに移送する工程、および培養した細胞を収集する工程を含む、バイオリアクタシステムの使用方法を含む。任意の態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、複数のポートを含む上面を含むバイオリアクタバッグを含み、複数のポートは、供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む。任意の態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、灌流ポートに流体接続された灌流フィルタを含む。任意の態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、バイオリアクタバッグの灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグを含む。任意の態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、供給ポートに流体接続された供給チューブ構成を含み、供給チューブ構成は、供給チューブ構成が第1の入口および第2の入口を有するようにY字型コネクタを含む。任意の態様において、細胞培地は、細胞培地供給源を第1の入口に接合することによって添加される。任意の態様において、細胞は細胞供給源を第1の入口に接合することによって添加される。任意の態様において、細胞培地は細胞培地供給源を第1の入口に接合することによって添加され、細胞は細胞供給源を第2の入口に接合することによって添加される。任意の態様において、複数のポートはガス入口ポートとガス出口ポートとを含む。任意の態様において、方法は、細胞培養用ガスをガス入口ポートを通してバイオリアクタバッグに供給することを含む。任意の態様において、方法は、ガス出口ポートを通る排気としてバイオリアクタバッグからガスの一部を除去することを含む。任意の態様において、収集バッグを供給チューブの第1または第2の入口に接合すること、および供給チューブ構成の流れの方向を逆にするによって、培養した細胞は収集される。任意の態様において、方法は、ガス入口ポートを通してバイオリアクタバッグをガスで少なくとも部分的に膨張させることを含む。任意の態様において、方法は、サンプリングポートを通して、培養した細胞のサンプルを回収することを含む。

20

30

【0008】

さらなる利点は、以下の詳細な説明から当業者に容易に明らかとなる。本明細書における例および説明は、本質的に例示的なものとみなされるべきであり、限定的なものとはみなされるべきではない。

40

【0009】

例示的な態様を、添付の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグの上面図の例を示す。

【図2A】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのための供給チューブ構成の第1の例を図示している。

50

【図 2 B】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのための供給チューブ構成の第2の例を図示している。

【図 3 A】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのためのサンプリングチューブ構成の第1の例を図示している。

【図 3 B】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのためのサンプリングチューブ構成の第2の例を図示している。

【図 4 A】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのための廃棄物チューブ構成の第1の例を図示している。

【図 4 B】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのための廃棄物チューブ構成の第2の例を図示している。

【図 5】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのためのガス出口チューブ構成の例を図示している。

【図 6】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのためのガス入口チューブ構成の例を示す。

【図 7】本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのためのサンプリング構成の例を図示している。

【発明を実施するための形態】

【0011】

図面において、別段に言及しない限り、同様の参照番号は同様の構成要素に対応する。

【0012】

詳細な説明

1. バイオリアクタバッグ

いくつかの態様では、例示的なバイオリアクタバッグは、他の構成要素の中でもとりわけ、様々なポート、ディップチューブ、フラップ、およびポンプチューブを含む。いくつかの態様では、これらの構成要素は、すべての必要な構成要素が予め取り付けられた状態で、密封されたパッケージで送達されなかった。例えば、いくつかの態様において、廃棄物バッグおよび/または供給ポートは、バイオリアクタバッグに取り付けられて送達されなくてもよく、使用現場で操作者が取り付けることを必要とする。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグを細胞の培養に使用する前に、バイオリアクタバッグに追加の接続および/または適合化を行わなければならない。例えば、灌流ポートは廃棄物バッグに接続されてもよく、使用者は、実験の実施を進める前に細胞供給源および/または培地供給源をバイオリアクタバッグに接続する方法を決定する必要がある場合がある。いくつかの態様において、これらの構成要素、接続、および適合化のそれぞれは、バイオリアクタバッグおよび関連する構成要素の汚染ポイントであり得る。したがって、無菌の細胞インキュベーション環境を確保するために、使用者が、実験の実施の前に完成したアセンブリを滅菌しなければ、汚染による、産物を潜在的に損失するリスクがあり得る。

【0013】

本明細書に記載されるバイオリアクタバッグアセンブリは、例えば、細胞培地および/または細胞供給源がすぐにPVCチューブに接合されることができるよう、予めアセンブルされた廃棄物バッグ接続および予めアセンブルされたPVCチューブを、すぐに使用できる滅菌アセンブリに設けることによって、上記のリスクの1つまたは複数を低減し得る。以下に詳細に記載されるように、バイオリアクタバッグアセンブリは、操作に必要とされる構成要素の量を最小限にし、したがってバイオリアクタシステムにおける様々な潜在的な故障箇所を最小限にし、バイオリアクタバッグの完全性に対するリスクを最小限に抑えることができる。さらに、接続、適合化、および/または構成要素を最小限に抑えることによって、バイオリアクタバッグを様々なバイオリアクタロッカーに適合させることができる。

【0014】

本明細書に記載のバイオリアクタバッグアセンブリは、ヒト、動物、昆虫、および植物細胞の培養物などの細胞を培養するために使用することができる。いくつかの態様では、

10

20

30

40

50

本明細書に記載のバイオリアクタバッグアセンブリは、バイオリアクタシステムにおける灌流操作において使用される。いくつかの態様では、本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリは、臨床的細胞療法およびT細胞の用途に使用できる。図1は、バイオリアクタバッグ100の上面図の例を示している。バイオリアクタバッグ100は上面101を有することができる。上面は複数のポートを含むことができる。いくつかの態様では、複数のポートの少なくとも1つは、上面とは反対側のバイオリアクタバッグの底面に配置してもよい。複数のポートは、供給ポート、サンプリングポート、灌流ポート、ガス入口ポート、DOプローブポート、pHプローブポート、および/またはガス出口ポートを含み得る。いくつかの態様において、複数のポートは、DOプローブポートおよび/またはpHプローブポートを含まない。いくつかの態様では、上面のポートは、供給ポート、サンプリングポート、灌流ポート、ガス入口ポート、およびガス出口ポートのみを含む。バイオリアクタバッグ100の上面101は供給ポート102を含む。供給ポートを使用して、バイオリアクタバッグに様々な供給成分を添加することができる。例えば、供給ポートは、細胞供給源から細胞をバイオリアクタバッグに添加するため、および/または細胞培地を細胞培地供給源からバイオリアクタバッグに添加するために使用することができる。細胞培地は、細胞の培養中に細胞用の栄養素を含むことができる。いくつかの態様において、細胞培地は、供給ポートを通してバイオリアクタバッグに継続的に添加できる。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグは、供給ポートを通して細胞培地および細胞で部分的に充填できる。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグは、細胞培地を予め充填させても、細胞を予め充填させてもよい。

10

20

【0015】

上面101はサンプリングポート103も含む。サンプリングポートを使用して、バイオリアクタバッグから細胞および/または他の材料のサンプルを取り出すことができる。例えば、培養中、使用者が細胞の一部を様々な特性について試験したいと思う場合がある。それに応じて、使用者は細胞サンプルを得るためにバイオリアクタバッグのサンプリングポートを使用することができる。

【0016】

バイオリアクタバッグはまた、第1の端部と、第1の端部と反対側の第2の端部とを含み得る。さらに、バイオリアクタバッグは、第1の側面と、第1の側面と反対側の第2の側面とを含むことができる。例えば、バイオリアクタバッグ100の上面101は、第1の端部107、第2の端部108、第1の側面109、および第2の側面110を含む。いくつかの態様では、側面は端部よりも長くてもよい。例えば、いくつかの態様において、側面は558mmの長さであり得、端部は275mmの長さであり得る。いくつかの態様では、使用時に第1の端部はバッグの前側となり得、使用時に第2の端部はバッグの後ろ側となり得る。バッグの上面の中心は、第1の端部と第2の端部との間の中間にあり得る。供給ポートおよび/またはサンプリングポートは、第2の端部よりも第1の端部の近くにあり得る。他の態様では、供給ポートおよび/またはサンプリングポートは、第1の端部よりも第2の端部の近くにあり得る。いくつかの態様では、供給ポートおよび/またはサンプリングポートは中心よりも第1の端部に近くてもよい。いくつかの態様では、供給ポートおよび/またはサンプリングポートは中心よりも第2の端部に近くてもよい。いくつかの態様において、供給ポートおよび/またはサンプリングポートは、第1の端部または第2の端部よりも中心に近くてもよい。いくつかの態様では、供給ポートは、第2の側面よりも第1の側面の近くにあり得る。いくつかの態様では、供給ポートは、第1の側面よりも第2の側面の近くにあり得る。加えて、サンプリングポートは、第1の側面よりも第2の側面に近くてもよい。他の態様では、サンプリングポートは、第2の側面よりも第1の側面の近くにあり得る。

30

40

【0017】

バイオリアクタバッグは、図1に示しているように灌流ポート104を含み得る。バイオリアクタバッグから細胞廃棄物を除去するために灌流ポートを使用することができる。例えば、細胞をバイオリアクタ内で培養しているとき、細胞が毒性の代謝副産物を産生する可能性がある。適宜、これらの有毒な副産物を、灌流ポートを通して除去することができる。

50

。バイオリアクタバッグはまた、灌流ポートに流体接続された灌流フィルタを含み得る。灌流フィルタは、細胞の損失を最小限に抑えて、またはまったく損失せずに、流体をバイオリアクタバッグから除去することを可能にできる。したがって、フィルタは、細胞がそれを通して通過することができないような空隙率を有することができる。いくつかの態様では、灌流フィルタは、それがバイオリアクタバッグの流体表面を自由に動くことができるように構成することができる。いくつかの態様では、灌流フィルタは1.2ミクロン（孔径）の膜を含む。濾液チューブは、灌流ポートと濾液ポートとの間の接続部であり得る。したがって、廃濾液は、バイオリアクタバッグから最初にフィルタを通して濾液チューブに、次に灌流ポートから外に出ることができる。いくつかの態様では、廃濾液はバイオリアクタバッグから継続的に除去される。図1は、バイオリアクタバッグ100の内側のフィルタ111、フィルタ11の濾液ポート112、および濾液ポート112と灌流ポート104とを接続する濾液チューブ113を含む。フィルタ111、濾液ポート112、および濾液チューブ113の点線は、これらの物品が上面101ではなくバイオリアクタバッグ100の内側にあることを意味する。濾液チューブは、フィルタがバイオリアクタバッグの流体表面を自由に動くことを可能にする可撓性のチューブであり得る。いくつかの態様では、灌流ポートは、図1に示すようにバイオリアクタバッグの第1の端部よりも第2の端部に近い。他の態様では、灌流ポートはバイオリアクタバッグの第2の端部よりも第1の端部に近い。いくつかの態様では、灌流ポートは中心よりも第1の端部に近い。いくつかの態様では、灌流ポートは中心よりも第2の端部に近い。いくつかの態様では、灌流ポートは第1または第2の端部よりも中心に近い。さらに、灌流ポートは、第1の側面よりも第2の側面に近くてもよい。他の態様では、灌流ポートは、第2の側面よりも第1の側面の近くにあり得る。

10

20

30

40

50

【0018】

バイオリアクタバッグの上面はまた、ガス入口ポートおよびガス出口ポートを含み得る。例えば、図1は上面111にガス出口ポート105とガス入口ポート106を含む。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグは、ガス入口ポートを通して膨張させることができ、いくつかの態様では部分的に膨張させることができる。いくつかの態様において、ガス供給源からのガス（例えば、CO₂、酸素、窒素、空気、またはそれらの混合物）は、ガス入口ポートを通して入ってバイオリアクタバッグを膨張させることができる。バッグを膨張させる以外に、ガスは細胞の培養に使用することができる。例えば、ガスは細胞の代謝に必要とされ得る。バイオリアクタバッグからの排ガス（例えば、呼吸ガス）は、ガス出口ポートを通してバイオリアクタバッグを出ることができる。いくつかの態様では、ガス入口ポートおよび/またはガス出口ポートは、第1の端部または第2の端部よりも中心に近い。いくつかの態様では、ガス入口ポートおよび/またはガス出口ポートは中心よりも第1の端部に近い。いくつかの態様では、ガス入口ポートおよび/またはガス出口ポートは中心よりも第2の端部に近い。いくつかの態様では、ガス入口ポートは第2の側面よりも第1の側面に近い。いくつかの態様では、ガス入口ポートは第1の側面よりも第2の側面に近い。いくつかの態様では、ガス出口ポートは第1の側面よりも第2の側面に近い。いくつかの態様では、ガス出口ポートは第2の側面よりも第1の側面に近い。

【0019】

バイオリアクタバッグの複数のポートのうちの少なくとも1つは、ディップチューブを有することができる。いくつかの態様では、ポートはディップチューブを含まない。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグは、バイオリアクタバッグの端部および/または側面の少なくとも一方にフラップ（すなわち、余分なプラスチック）を含むことができる。いくつかの態様において、これらのフラップの1つまたは複数は、バイオリアクタバッグおよび関連する構成要素の製造中に取り除かれる。他の態様において、バイオリアクタバッグは、バッグの端部および/または側面にフラップを含まない。1つまたは複数のフラップの除去、またはバッグ上のフラップの欠如は、バイオリアクタバッグが様々な異なるバイオリアクタロッカーに適合することを可能にし得る。

【0020】

バイオリアクタバッグの上面は製品ラベルも含むことができる。例えば、図1は上面101

に製品ラベル114を含む。バイオリアクタバッグはまた、底面（図示せず）を含み得る。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグの底面は、上記の複数のポートのうちの少なくとも1つを含み得る。他の態様において、底面は滑らかであり得る。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグはバイオリアクタロッカーに配置される。バイオリアクタロッカーは、バイオリアクタバッグをロッキングまたは揺動させることができ、それによってバッグ内の細胞の移動（例えば、通気および混合）をもたらして細胞培養を促進する。バイオリアクタのロッキングまたは揺動はまた、気液間表面からの効率的なガス交換をもたらし得る。本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリと適合するロッキング運動プラットフォームを有するバイオリアクタの例としては、GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20|50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems、およびPall XRS Bioreactor Systemsが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0021】

本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリは、使い捨ての単回使用のバイオリアクタバッグアセンブリであり得る。バイオリアクタバッグは、ポリマー材料（例えば、ポリエチレン）などの可撓性材料から作製することができる。ポリマー材料はプラスチックフィルムまたはラミネートであり得る。さらに、可撓性材料は、無機酸化物および/または金属を含み得る。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグは、S80フィルム材料から作製され得る。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグはガスバリア層を有する。ガスバリア層材料はEVOHを含むことができる。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグは産物接触層を有することができる。産物接触層の材料は線状低密度ポリエチレン（LLDPE）などのポリエチレンを含むことができる。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグは、Sartorius Flexsafe RM Perfusion Bagと同じ材料で作ることができる。バイオリアクタバッグは、1~200L（例えば、1、2、10、20、50、100、または200L）の総容積を有することができる。バイオリアクタバッグは、100mL~100L（例えば、0.1~0.5L、0.2~1L、1~5L、2~10L、5~25L、10~50L、または20~100L）の培養物体積を有することができる。

20

【0022】

バイオリアクタバッグアセンブリはまた、供給ポートに流体接続された供給チューブ構成を含み得る。供給チューブ構成は、バイオリアクタバッグの供給ポートに様々な供給成分（例えば、細胞および/または培地）を供給することができる。図2A~Bは、本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのための供給ポート202に流体接続された供給チューブ構成215の例を図示している。供給チューブ構成は、Y字型コネクタ216を含むことができる。供給チューブ構成が2つの入口を有するようにY字型コネクタを使用することができる。したがって、細胞培地供給源は、供給チューブ構成の1つの入口または各入口に流体接続することができる。いくつかの態様では、細胞供給源は、供給チューブ構成の1つの入口または各入口に流体接続することができる。他の態様では、細胞供給源を一方の入口に接続することができ、また培地供給源を他方の入口に接続することができる。いくつかの態様では、Y字型コネクタはPVCチューブに適している場合がある。供給チューブ構成におけるチューブの長さは、供給源（例えば、細胞供給源および/または培地供給源）に到達するのに十分な長さがあるようにすることができる。例えば、供給源はIVボールに接続されてもよく、供給チューブ構成が供給源に到達することができるように十分なチューブの長さがあるべきである。

30

40

【0023】

供給チューブ構成はまた供給入口チューブを含むことができる。例えば、図2A~Bは、供給入口チューブ217を含む。供給入口チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル（PVC）チューブであり得る。いくつかの態様では、供給入口チューブはPVCチューブである。いくつかの態様では、供給入口チューブは0.118×0.164 PVCチューブである。いくつかの態様において、供給入口チューブは、Tygon（登録商標）0.118×0.164のチューブである。いくつかの態様では、供給入口チューブは、追加の要素を供給入口チューブに接合することができるようなものである。例えば、細胞供給源および/または細

50

胞培地供給源は、細胞および/または細胞培地が供給ポートを通してバイオリアクタバッグに供給され得るように、供給入口チューブに接合され得る。いくつかの態様では、供給入口チューブは、Terumo TSCD-II接合装置の仕様を満たすことができる。いくつかの態様では、供給入口チューブは、標準のPVC採血タイプのチューブと適合性があり得る。いくつかの態様では、供給入口チューブは、ID:2.9~3.1mm/OD:3.9~4.5mmを有する。いくつかの態様では、供給入口チューブは、ID:3mm/OD:4.17mmを有する。供給入口チューブの一方または両方の部分は、長さが約350~550mm、400~500mm、425~475mm、または460mmであり得る。供給チューブ構成はまた、プラグ218を含み得る。プラグは、PVCチューブ用のプラグにすることができる。いくつかの態様では、プラグは圧入プラグ3/32である。供給チューブ構成はまた、供給入口チューブに入口クランプを含むことができる。図2A~Bはクランプ220を示す。いくつかの態様では、入口クランプはピンチクランプおよび/またはスライドクランプである。いくつかの態様では、入口クランプはPVCチューブに適している。

10

【0024】

供給チューブ構成はまた、ポストY字型コネクタチューブを含むことができる。図2A~2Bは、ポストY字型コネクタチューブ219を含む。ポストY字型コネクタチューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル(PVC)チューブであり得る。いくつかの態様では、ポストY字型コネクタチューブはPVCチューブである。いくつかの態様において、ポストY字型コネクタチューブは、0.118×0.164 PVCチューブである。いくつかの態様において、ポストY字型コネクタチューブは、Tygon(登録商標)0.118×0.164のチューブである。いくつかの態様では、ポストY字型コネクタチューブは、追加の要素をポストY字型コネクタチューブに接合することができるようなものである。例えば、細胞供給源および/または細胞培地供給源は、細胞および/または細胞培地が供給ポートを介してバイオリアクタバッグに供給され得るように、ポストY字型コネクタチューブに接合され得る。いくつかの態様では、ポストY字型コネクタチューブは、Terumo TSCD-II接合装置の仕様を満たすことができる。いくつかの態様では、ポストY字型コネクタチューブは、標準のPVC採血タイプのチューブと適合性があり得る。いくつかの態様において、ポストY字型コネクタチューブは、ID:2.9~3.1mm/OD:3.9~4.5mmを有する。いくつかの態様では、ポストY字型コネクタチューブは、ID:3mm/OD:4.17mmを有する。ポストY字型コネクタチューブは、長さが約200~400mm、250~350mm、275~325mm、または300mmであり得る。

20

30

【0025】

供給チューブ構成はまた、レデューサ221として図2A~Bに示しているようなレデューサを含むことができる。レデューサは古典的な一連のバープ(barb)である場合もある。いくつかの態様では、レデューサは1/8×5/32のレデューサである。いくつかの態様では、レデューサはValue Plastics #3040-6005である。

【0026】

供給チューブ構成は、図2A~2Bにポストレデューサチューブ222として示すようにポストレデューサチューブを含むことができる。ポストレデューサチューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル(PVC)チューブであり得る。いくつかの態様において、ポストレデューサチューブはシリコンチューブである。いくつかの態様において、ポストレデューサチューブは、1/8×1/4のシリコンチューブである。ポストレデューサチューブは、長さが約1000~1500mm、1250~1450mm、1350~1400mm、または1380mmであり得る。供給チューブ構成は、ポストレデューサチューブにクランプを含むことができる。図2A~Bは、ポストレデューサクランプ223を示す。ポストレデューサクランプは、ピンチクランプまたはスライドクランプであり得る。いくつかの態様では、ポストレデューサクランプはシリコンチューブに適している。

40

【0027】

供給チューブ構成のチューブの一部分は、供給入口チューブに接続された流体が供給ポートを通してバイオリアクタバッグに移送させることができるように、1つまたは複数のポンプに接続させることができる。いくつかの態様では、供給チューブ構成のシリコン

50

チューブがポンプに接続されている。いくつかの態様では、ポストレデュサチューブはポンプに接続されている。いくつかの態様において、重力は、供給ポートを通してバイオリアクタバッグに移送すべき、供給入口チューブに接続された流体への力を付与することができる。

【0028】

供給チューブ構成で使用されるコネクタは、バープコネクタ (barbed connector) および/またはルアーロックコネクタであり得る。いくつかの態様では、バープコネクタのみが使用される。いくつかの態様では、供給チューブ構成の接続部の少なくとも一部は、それらに接続部を固定するためのケーブルタイまたは他のタイを有することができる。他の態様では、ケーブルタイ224を含んだ図2Bに示しているように、ケーブルタイは、供給チューブ構成のあらゆる接続部にあり得る。さらに、供給チューブ構成のすべての接続部は流体接続することができる。

【0029】

いくつかの態様では、供給チューブ構成はまた、培養した細胞を採取するために使用され得る。例えば、収集バッグは、供給入口チューブおよび/またはポストY字型コネクタチューブに接合することができる。いくつかの態様において、収集バッグは、供給入口チューブのPVCチューブおよび/またはポストY字型コネクタチューブのPVCチューブに接合される。細胞を採取するために、供給チューブ構成の流れを逆にすることができる。重力は、バイオリアクタバッグから収集バッグへの細胞の流れを推進するのに十分な力を付与することができる。他の態様では、ポンプを使用して、上記のようにバイオリアクタバッグから収集バッグへの細胞の流れを推進することができる。

【0030】

バイオリアクタバッグアセンブリはまた、サンプリングポートに流体接続されたサンプリングチューブ構成を含み得る。サンプリングチューブ構成は、細胞および/または他の材料のサンプルをバイオリアクタバッグから取り出すために使用され得る。例えば、培養中に、使用者は様々な特性についていくつかの細胞を試験したいと思う場合がある。したがって、使用者は、細胞サンプルを得るためにバイオリアクタバッグのサンプリングポートに流体接続されたサンプリングチューブ構成を使用することができる。

【0031】

図3A~Bは、本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリのためのサンプリングポート303に流体接続されたサンプリングチューブ構成325の例を図示している。サンプリングチューブ構成はサンプリング入口チューブを含み得る。例えば、図3A~Bはサンプリング入口チューブ326を含む。サンプリング入口チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル (PVC) チューブであり得る。いくつかの態様では、サンプリング入口チューブはPVCチューブである。いくつかの態様では、サンプリング入口チューブはTygon (登録商標) 0.118×0.164のチューブである。いくつかの態様では、サンプリング入口チューブは、追加の要素をサンプリング入口チューブに接合することができるようなものである。例えば、サンプリングポートおよびサンプリングチューブ構造を通してサンプル細胞を取り出すことができるように、サンプリング構造をサンプリング入口チューブに接合することができる。図7は、本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリに接合することができるサンプリング構成780の例を示す。サンプリング構成は、チューブ (781)、一方向逆止弁 (782)、およびマイクロクレブ再使用可能サンプリングポート (783) を含み得る。サンプリング構成のチューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル (PVC) のチューブであり得る。いくつかの態様において、チューブはPVCチューブである。いくつかの態様において、チューブはTygon (登録商標) 0.118×0.164のチューブである。いくつかの態様では、チューブはTerumo TSCD-II 接合装置の仕様を満たすことができる。いくつかの態様では、チューブは標準のPVC採血型チューブと適合性があり得る。いくつかの態様において、チューブは、ID:2.9~3.1mm/OD:3.9~4.5mmを有する。

いくつかの態様において、チューブは、ID:3mm/OD:4.17mmを有する。マイクロクレープの再使用可能なサンプリングポートと反対側のチューブの端部(784)は密封することができる。サンプリング構成は、サンプリングを可能にするためにバイオリアクタバッグアセンブリのサンプリング入口チューブに接合することができる。サンプリング構成は、長さが約20~40mm、25~35mm、または30mmであり得る。サンプリング構成はまた、約1~5mL、2~3mL、または2.2mLの容積を有することができる。サンプリング構成の接続部の少なくとも一部は、漏れを防ぐために接着させることができる。いくつかの態様では、サンプリング構成のすべての接続部は漏れを防ぐために接着されている。マイクロクレープの再使用可能なサンプリングポートは、マイクロクレープのサンプリングポートが誤って外されるのを防ぐために接着させることができる。マイクロクレープの再使用可能なサンプリングポートは、バイオリアクタバッグからサンプルを取り出すためにサンプリングシリンジに接続することができる。一方向逆止弁は、サンプリング中の偶発的な逆流を防ぎ、培養物を汚染から保護することができる。したがって、使用者は、サンプリングシリンジから培養バッグ内にいかなる材料も押し戻すことができない可能性がある。さらに、バイオリアクタバッグがバイオリアクタロッカーに平らに置かれたときに、培養バッグのヘッドスペースからガスを引くことによって、ラインをサンプルとサンプルの間でフラッシングすることができる。

10

【0032】

いくつかの態様では、サンプリング入口チューブは、Terumo TSCD-II接合装置の仕様を満たすことができる。いくつかの態様では、サンプリング入口チューブは、標準のPVC採血型チューブと適合性があり得る。いくつかの態様において、サンプリング入口チューブは、ID:2.9~3.1mm/OD:3.9~4.5mmを有する。いくつかの態様では、サンプリング入口チューブは、ID:3mm/OD:4.17mmを有する。サンプリング入口チューブは、長さが約200~400mm、250~350mm、275~325mm、または300mmであり得る。サンプリングチューブ構成はまた、プラグ318を含み得る。プラグは、PVCチューブ用プラグにすることができる。いくつかの態様では、プラグは圧入プラグ3/32である。

20

【0033】

サンプリングチューブ構成はまた、レデューサ321として図3A~Bに示しているようなレデューサを含み得る。レデューサは古典的な一連のバンプである場合もある。いくつかの態様では、レデューサは1/8×5/32のレデューサである。いくつかの態様では、レデューサはValue Plastics #3040-6005である。

30

【0034】

サンプリングチューブ構成は、ポストレデューササンプリングチューブ327として図3A~Bに示されるようなポストレデューササンプリングチューブを含み得る。ポストレデューササンプリングチューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル(PVC)チューブであり得る。いくつかの態様では、ポストレデューササンプリングチューブはシリコンチューブである。いくつかの態様では、ポストレデューササンプリングチューブは、1/8×1/4シリコンチューブである。ポストレデューササンプリングチューブは、長さが約10~100mm、25~75mm、40~60mm、または50mmであり得る。サンプリングチューブ構成は、ポストレデューササンプリングチューブにクランプを含むことができる。図3A~Bは、ポストレデューササンプリングクランプ323を示す。ポストレデューササンプリングクランプは、ピンクランプまたはスライドクランプであり得る。いくつかの態様では、ポストレデューササンプリングクランプはシリコンチューブに適している。

40

【0035】

サンプリングチューブ構造のチューブの一部は、サンプル流体がサンプリングポートから取り出され得るように、ポンプまたは複数のポンプに接続され得る。いくつかの態様では、サンプリングチューブ構成のシリコンチューブはポンプに接続されている。いくつかの態様では、ポストレデューササンプリングチューブはポンプに接続されている。いくつかの態様において、重力は、サンプル流体がサンプリングポートから取り出されるための力を付与し得る。

50

【 0 0 3 6 】

サンプリングチューブ構成に使用されるコネクタは、バンプコネクタおよび/またはルアーロックコネクタであり得る。いくつかの態様では、バンプコネクタのみが使用される。いくつかの態様では、サンプリングチューブ構成の接続部の少なくとも一部は、それらに接続部を固定するためのケーブルタイ、または他のタイを有することができる。他の態様では、ケーブルタイ324を含む図3Bに示すように、ケーブルタイをサンプリングチューブ構成のあらゆる接続部に設けることができる。さらに、供給チューブ構成のすべての接続部は流体接続することができる。

【 0 0 3 7 】

バイオリアクタバッグアセンブリはまた、バイオリアクタバッグの灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグを含み得る。廃棄物バッグは、バイオリアクタバッグから取り出された細胞廃棄物を貯蔵することができる。したがって、廃濾液は、バイオリアクタバッグから灌流ポートを出て、次いで廃棄物バッグに保存され得る。

【 0 0 3 8 】

図4A~Bは、本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリの廃棄物バッグ429と灌流ポート404とを流体接続する廃棄物チューブ構成428の例を図示している。したがってバイオリアクタバッグの廃棄物は、フィルタ411を通り、濾液ポート412を出て濾液チューブ413を通り、灌流ポート404を出て、次に廃棄物バッグ429の中へ進むことができる。廃棄物チューブ構成におけるチューブの長さは、廃棄物バッグがバイオリアクタバッグと同一または異なるバイオリアクタテーブル、またはコンソールのプラットフォームに存在するのに十分な長さがあるようなものであり得る。例えば、廃棄物バッグはバイオリアクタロッカーの下シェルフまたはプラットフォーム（バイオリアクタバッグを有する）にあってもよく、廃棄物チューブ構成がシェルフまたはプラットフォームに達することができるように十分なチューブの長さにするべきである。廃棄物バッグは、1~200L（例えば、1、2、10、20、50、100、または200L）の総容積を有することができる。いくつかの態様において、廃棄物バッグは10Lのバッグである。廃棄物バッグは廃棄物ポートを有することができる。いくつかの態様において、廃棄物ポートは、図4Bに廃棄物ポート430として示されるように、廃棄物バッグの上面にある。廃棄物バッグの上面に廃棄物ポートを有することにより、廃棄物バッグをバイオリアクタバッグの下シェルフまたはプラットフォームに置き、廃棄物バッグ由来のバイオリアクタバッグからのチューブを、チューブを曲げる必要なしに垂直に整列させることができる。廃棄物バッグはまた、第1の端部と、第1の端部と反対側の第2の端部とを有することができる。さらに、廃棄物バッグは、第1の側面と、第1の側面の反対側の第2の側面とを有することができる。例えば、廃棄物バッグ429は、図4Bに示すように、第1の端部431、第2の端部432、第1の側面433、および第2の側面434を含むことができる。いくつかの態様では、廃棄物バッグの側面は端部よりも長くてもよい。例えば、側面は長さ500mmであり得、端部は長さ380mmであり得る。いくつかの態様では、使用時に第1の端部は廃棄物バッグの前側となり得、使用時に第2の端部は廃棄物バッグの後側となり得る。いくつかの態様では、廃棄物ポートは廃棄物バッグの第1の端部にある。廃棄物バッグの上面の中心は、第1の端部と第2の端部との間の中間にあり得る。廃棄物ポートは、第2の端部よりも第1の端部の近くにあり得る。他の態様では、廃棄物ポートは、第1の端部よりも第2の端部の近くにあり得る。いくつかの態様では、廃棄物ポートは中心よりも第1の端部に近くてもよい。いくつかの態様では、廃棄物ポートは中心よりも第2の端部に近くてもよい。いくつかの態様では、廃棄物ポートは、第1または第2の端部よりも中心に近くてもよい。いくつかの態様では、廃棄物ポートは、第2の側面よりも第1の側面の近くにあり得る。いくつかの態様では、廃棄物ポートは、第1の側面よりも第2の側面の近くにあり得る。

【 0 0 3 9 】

廃棄物チューブ構成は、廃棄物バッグ入口チューブを含み得る。例えば、図4A~Bは、廃棄物バッグ入口チューブ435を含む。廃棄物バッグ入口チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル（PVC）チューブであり得る。いくつかの態様では、廃棄

10

20

30

40

50

物バッグ入口チューブはPVCチューブである。いくつかの態様では、廃棄物バッグ入口チューブはシリコンチューブである。いくつかの態様において、廃棄物バッグ入口チューブは、 0.118×0.164 のPVCチューブである。いくつかの態様では、廃棄物バッグ入口チューブはTygon（登録商標） 0.118×0.164 のチューブである。いくつかの態様において、廃棄物バッグ入口チューブは、 $1/8 \times 1/4$ シリコンチューブである。いくつかの態様では、廃棄物バッグ入口チューブは、追加の廃棄物バッグなどの追加の要素を廃棄物バッグ入口チューブに接合することができるようなものである。いくつかの態様では、廃棄物バッグ入口チューブは、Terumo TSCD-II接合装置の仕様を満たすことができる。いくつかの態様では、廃棄物バッグ入口チューブは、標準のPVC採血タイプのチューブと適合性があり得る。いくつかの態様では、廃棄物バッグ入口チューブは、ID:2.9~3.1mm/OD:3.9~4.5mmを有する。いくつかの態様では、廃棄物バッグ入口チューブは、ID:3mm/OD:4.17mmを有する。廃棄物バッグ入口チューブは、長さが約10~200mm、25~300mm、25~75mm、または50mmであり得る。

10

【0040】

廃棄物チューブ構成はまた、レデューサ421として図4A~図4Bに示されるようなレデューサを含むことができる。廃棄物チューブ構成はまた、レデューサ436として図4Bに示されるように、第2のレデューサを含み得る。レデューサは古典的な一連のバンプである場合もある。いくつかの態様において、上記レデューサは、 $1/8 \times 5/32$ のレデューサである。いくつかの態様では、レデューサはValue Plastics #3040-6005である。

20

【0041】

廃棄物チューブ構成はまた、灌流ポート出口チューブを含み得る。例えば、図4A~Bは、灌流ポート出口チューブ437を含む。灌流ポート出口チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル（PVC）チューブであり得る。いくつかの態様では、灌流ポート出口チューブはシリコンチューブである。いくつかの態様では、灌流ポート出口チューブは、 $1/8 \times 1/4$ のシリコンチューブである。灌流ポート出口チューブは、長さが約1000~2000mm、1250~1750mm、1500~1600mm、または1520mmであり得る。廃棄物チューブ構成は、灌流ポート出口チューブにクランプを含むことができる。図4A~Bは、灌流ポート出口チューブクランプ423を示す。灌流ポート出口チューブクランプは、ピンチクランプまたはスライドクランプであり得る。いくつかの態様では、ポストレデューササンプリング用灌流ポート出口チューブクランプは、シリコンチューブに適している。

30

【0042】

廃棄物チューブ構成はまた、中間廃棄物チューブを含むことができる。例えば、図4Bは中間廃棄物チューブ438を含む。中間廃棄物チューブは他の2つのチュービングチューブの間にあり得る。いくつかの態様では、中間廃棄物チューブは2つのレデューサの間にある。中間廃棄物チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル（PVC）チューブであり得る。いくつかの態様では、中間廃棄物チューブはPVCチューブである。いくつかの態様において、中間廃棄物チューブは、 0.118×0.164 のPVCチューブである。いくつかの態様において、中間廃棄物チューブは、Tygon（登録商標） 0.118×0.164 のチューブである。いくつかの態様では、中間廃棄物チューブは、追加の廃棄物バッグなどの追加の要素を中間廃棄物チューブに接合することができるようなものである。いくつかの態様では、中間廃棄物チューブは、Terumo TSCD-II接合装置の仕様を満たすことができる。いくつかの態様では、中間廃棄物チューブは、標準のPVC採血型チューブと適合性があり得る。いくつかの態様において、中間廃棄物チューブは、ID:2.9~3.1mm/OD:3.9~4.5mmを有する。いくつかの態様において、中間廃棄物チューブは、ID:3mm/OD:4.17mmを有する。中間廃棄物チューブは、長さが約500~1500mm、750~1250mm、900~1000mm、または920mmであり得る。

40

【0043】

バイオリアクタバッグからの廃棄物を灌流ポートを通して廃棄物バッグに移送することができるように、廃棄物チューブ構成のチューブの一部を、1つまたは複数のポンプに接続することができる。いくつかの態様では、廃棄物チューブ構成のシリコンチューブ

50

がポンプに接続されている。いくつかの態様で、灌流ポート出口チューブおよび/または廃棄物バッグ入口チューブはポンプに接続されている。いくつかの態様では、重力が、バイオリアクタバッグから廃棄物を取り出して廃棄物バッグに移すための力を付与することができる。

【0044】

廃棄物チューブ構成で使用されるコネクタは、バンプコネクタおよび/またはルアーロックコネクタであり得る。いくつかの態様では、バンプコネクタのみが使用される。いくつかの態様では、廃棄物チューブ構成の接続部の少なくとも一部は、それらに接続部を固定するためのケーブルタイまたは他のタイを有することができる。他の態様では、ケーブルタイ424を含む図4Bに示されるように、廃棄物チューブ構成のあらゆる接続部にケーブルタイがあり得る。さらに、廃棄物チューブ構成のすべての接続部は流体接続することができる。

10

【0045】

バイオリアクタバッグアセンブリはまた、バイオリアクタバッグのガス出口ポートに流体接続されたガス出口チューブ構成を含み得る。ガス出口チューブ構成は、バイオリアクタバッグからの排気ガスを排出することを可能にし得る。図5は、バイオリアクタバッグのガス廃棄物ポート505に流体接続されたガス出口チューブ構成539の例を示す。ガス出口チューブ構成は、排気フィルタを含むことができる。排気フィルタは、細胞および/または培地がバイオリアクタバッグからエアロゾルとして放出されないことを確実にすることができる。さらに、排気フィルタはまた、排気フィルタを通るいかなる逆流もバイオリアクタバッグの細胞培養物の汚染を引き起こさないことを確実にすることもできる。図5はフィルタ543を示す。ガス出口チューブ構成はまた、排気フィルタ入口チューブおよび排気フィルタ出口チューブを含むことができる。排気フィルタは、排気フィルタ入口チューブと排気フィルタ出口チューブとの間にあってもよい。例えば、図5は、排気フィルタ入口チューブ544と排気フィルタ出口チューブ542との間の排気フィルタ543を示す。

20

【0046】

排気フィルタ入口チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル (PVC) チューブであり得る。いくつかの態様では、排気フィルタ入口チューブはシリコンチューブである。いくつかの態様では、排気フィルタ入口チューブは、3/16 x 5/16のシリコンチューブである。排気フィルタ入口チューブは、長さが約10 ~ 100mm、25 ~ 75mm、40 ~ 60mm、または50mmであり得る。ガス出口チューブ構成は、排気フィルタ入口チューブにクランプを含むことができる。図5は、排気フィルタ入口チューブクランプ523を示す。排気フィルタ入口チューブクランプは、ピンチクランプまたはスライドクランプであり得る。いくつかの態様では、排気フィルタ入口チューブクランプはシリコンチューブに適している。

30

【0047】

排気フィルタ出口チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル (PVC) チューブであり得る。いくつかの態様では、排気フィルタ出口チューブはシリコンチューブである。いくつかの態様では、排気フィルタ出口チューブは、3/16 x 5/16のシリコンチューブである。排気フィルタ出口チューブは、長さが約10 ~ 100mm、25 ~ 75mm、40 ~ 60mm、または50mmであり得る。ガス出口チューブ構成は、排気フィルタ出口チューブにクランプを含むことができる。排気フィルタ出口チューブクランプは、ピンチクランプまたはスライドクランプであり得る。いくつかの態様では、排気フィルタ出口チューブクランプはシリコンチューブに適している。

40

【0048】

図5に示されるように、ガス出口チューブ構成はまた、M-luer 3/16 (541) および逆止弁 (540) を含み得る。ガス出口チューブ構成に使用されるコネクタは、バンプコネクタおよび/またはルアーロックコネクタであり得る。いくつかの態様では、バンプコネクタのみが使用される。いくつかの態様では、ガス出口チューブ構成の接続部の少なくとも一部は、それらに接続部を固定するためのケーブルタイまたは他のタイを有することができ

50

る。他の態様では、ケーブルタイ524を含む図5に示すように、ケーブルタイをガス出口チューブ構成のあらゆる接続部に設けることができる。さらに、ガス出口チューブ構造のすべての接続部は流体接続することができる。

【0049】

バイオリアクタバッグアセンブリはまた、バイオリアクタバッグのガス入口ポートに流体接続されたガス入口チューブ構成を含み得る。ガス入口チューブ構造はガス供給源に接続され、ガス供給源からのガスがガス入口ポートに入ることを可能にし得る。図6は、バイオリアクタバッグのガス入口ポート606に流体接続されたガス入口チューブ構造645の例を示す。ガス入口チューブ構成は、入口フィルタを含むことができる。入口フィルタは滅菌入口フィルタであり得る。図6は入口フィルタ647を示す。ガス入口チューブ構成はガス入口チューブも含むことができる。例えば、図6はガス入口チューブ646を示している。

10

【0050】

ガス入口チューブは、シリコンチューブおよび/またはポリ塩化ビニル（PVC）チューブであり得る。いくつかの態様では、ガス入口チューブはシリコンチューブである。いくつかの態様では、ガス入口チューブは3/16 x 5/16のシリコンチューブである。ガス入口チューブは、長さが約10~100mm、25~75mm、40~60mm、または50mmであり得る。ガス入口チューブ構造は、ガス入口チューブにクランプを含むことができる。図6はガス入口チューブクランプ623を示している。ガス入口チューブクランプは、ピンチクランプまたはスライドクランプであり得る。いくつかの態様では、ガス入口チューブクランプはシリコンチューブに適している。

20

【0051】

ガス入口チューブ構成に使用されるコネクタは、バンプコネクタおよび/またはルアーロックコネクタであり得る。いくつかの態様では、バンプコネクタのみが使用される。いくつかの態様では、ガス入口チューブ構成の接続部の少なくとも一部は、それらに接続部を固定するためのケーブルタイまたは他のタイを有することができる。他の態様では、ケーブルタイ624を含む図6に示すように、ガス入口チューブ構成のあらゆる接続部にケーブルタイを設けることができる。さらに、ガス入口チューブ構成のすべての接続部を流体接続することができる。

【0052】

本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリは無菌であり得る。例えば、バイオリアクタバッグアセンブリを確実に無菌状態にする線量を利用して、バイオリアクタバッグアセンブリにガンマ線、電子ビーム、または高エネルギーX線などの電離放射線を照射することができる。さらに、バイオリアクタバッグアセンブリの様々な構成要素（例えば、バイオリアクタバッグ、ポート、チューブ構成、廃棄物バッグ、コネクタ、フィルタなど）はすべて、エチレンコポリマー、シリコン、スチレンコポリマー、ポリスルホンなどの耐放射線性材料から構築することができる。いくつかの態様では、本明細書に開示されるバイオリアクタバッグアセンブリは、追加の滅菌なしに滅菌されてすぐ使用できるようになる。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグアセンブリは、滅菌された状態（すなわち、開口チューブなし）で密封される。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグアセンブリは、チューブの開口を防ぐために、チューブにプラグ、シール、またはクランプを含み得る。

30

40

【0053】

いくつかの態様において、本明細書に開示されるPVCチューブは、DEHPのないPVC接合可能チューブであり得る。いくつかの態様において、本明細書に開示されているシリコンチューブは、シリコンポンプチューブであり得る。さらに、バイオリアクタバッグアセンブリは、好ましくはバンプ状の接続部を含み得る。いくつかの例では、ルアーロック接続部は、締め付けが不十分であるか、偶然に外れる可能性があり、それによってバイオリアクタバッグアセンブリの完全性が損なわれ得る。

【0054】

II. 細胞の培養および処理の方法

50

いくつかの態様では、灌流バイオリアクタバッグアセンブリなどの本明細書で提供されるバイオリアクタバッグアセンブリは、細胞療法の製造、生成または産生に関連してなど、細胞を培養するために使用することができる。いくつかの態様では、細胞療法は、CAR T細胞などのキメラ抗原受容体などの組換え受容体で操作されたT細胞などの細胞を含む。いくつかの態様では、培養は、例えばそれらの増殖および/または活性化を誘導するために、細胞の刺激などの細胞の培養および/または拡大のための条件下で行われる。

【0055】

いくつかの態様では、細胞療法の製造、生成または産生に関連してなど、バイオリアクタバッグアセンブリを使用して細胞を培養することは、細胞の単離、分離、選択、活性化または刺激、形質導入、洗浄、懸濁、希釈、濃縮、および/または製剤化のための工程などの、1つまたは複数のさらなる処理工程を含む方法によって実行できる。いくつかの態様において、細胞療法を生成または産生する方法は、対象から細胞を単離すること、1つまたは複数の刺激条件下で調製すること、処理すること、培養することを含み、培養することの少なくとも一部は、提供されたバイオリアクタバッグアセンブリを使用して、および/または細胞を操作して（例えば形質導入して）実行される。いくつかの態様では、方法は、細胞、例えば一次細胞が生物学的サンプルから最初に単離され、例えば選択または分離され、選択された細胞が、形質導入のためにウイルスベクター粒子と共にインキュベートされる、という順序で行われる処理工程を含み、任意で刺激用試薬の存在下で、単離された細胞を刺激する工程の後に、形質導入細胞を例えば細胞の拡大のために培養する工程、および形質導入細胞を組成物に製剤化する工程が伴う。いくつかの態様において、生成された操作された細胞は、凍結保存の前または後に同じ対象に再導入される。

10

20

【0056】

いくつかの態様において、提供される方法は、例えば養子細胞療法における、臨床的な使用のための細胞の調製における、1つ、複数、またはすべての工程が、細胞を非滅菌条件に曝すことなく、かつ滅菌室またはキャビネットを使用する必要滅菌条件なしで実施されるように、行われる。そのような方法のいくつかの態様において、細胞は、すべて閉鎖系内で、単離、分離または選択、形質導入、洗浄、任意で活性化または刺激および製剤化される。いくつかの態様では、閉鎖系は、灌流バイオリアクタバッグアセンブリなどの、本明細書に記載のバイオリアクタバッグアセンブリであるか、それを含む。いくつかの態様において、方法は自動化された様式で行われる。いくつかの態様では、閉鎖系またはデバイスとは別に工程の1つまたは複数を実行される。

30

【0057】

いくつかの態様では、本明細書に記載のバイオリアクタバッグアセンブリは、公知の細胞拡大システムおよび/または細胞療法を製造、生成または産生する方法の他の処理工程の1つまたは複数を実行するためのシステムに統合できる細胞を拡大するための閉鎖系を提供する。いくつかの態様において、処理工程、例えば形質導入および操作に関連した単離、選択および/または濃縮、処理、インキュベーション、ならびに製剤化工程のうちの1つまたは複数またはすべては、統合型または自己完結型システム、および/または自動化されたもしくはプログラム可能な方法で、システム、デバイスまたは装置を用いて行われる。いくつかの局面では、システムまたは装置は、システムまたは装置と通信するコンピュータおよび/またはコンピュータプログラムを含み、これにより、使用者は、処理、単離、操作および製剤化工程のおよび/または様々な局面のプログラム、制御、結果の評価、および/または調整が可能になる。一例では、システムは、国際特許出願公開番号WO2009/072003、またはUS 20110003380 A1に記載されているようなシステムである。一例では、システムは、国際公開WO2016/073602に記載されているようなシステムである。

40

【0058】

A. 細胞の培養

いくつかの態様では、灌流バイオリアクタバッグアセンブリなどの本明細書で提供されるバイオリアクタバッグアセンブリは、供給ポートを介して、例えば添加した細胞を培養するための細胞培地および/または細胞で充填することができる。細胞は、例えば細胞の

50

拡大および/または増殖のために細胞の培養が望まれる任意の細胞供給源に由来し得る。いくつかの態様では、細胞は、対象から得られた、または対象から得られた一次細胞に由来する一次細胞などの免疫細胞であるか、それを含む。いくつかの局面では、細胞はT細胞またはNK細胞であるか、それを含む。いくつかの態様において、細胞はCD4 + およびCD8 + T細胞を含む。いくつかの態様において、細胞はCD4 + またはCD8 + T細胞を含む。いくつかの態様では、培養用の細胞は、操作されているか、操作された細胞、例えばキメラ抗原受容体 (CAR) などの組換え受容体を発現するように形質導入された、例えば細胞療法を製造、産生または生成するための1つまたは複数の処理工程に従って生成される細胞である。そのような形質導入細胞の例、および1つまたは複数の処理工程を以下に記載する。

【0059】

いくつかの態様では、バイオリアクタバッグアセンブリは、1つまたは複数の処理工程を実行する閉鎖系またはデバイスに一体化および/または動作可能に接続するように構成され、かつ/または一体化または動作可能に接続される。一例では、システムは、国際公開WO2016/073602に記載されているようなシステムである。いくつかの態様では、システムは遠心分離チャンバを含み、プロセスは、遠心分離チャンバの内部キャビティから、提供されるアセンブリのバイオリアクタバッグ内への、組換え受容体をコードするウイルスベクターで形質導入された細胞を含む細胞サンプルなどの培養用細胞サンプルの取り出しを行うことを含む。いくつかの態様では、バッグは、排出ラインまたは排出位置で遠心分離チャンバを含むシステムに接続され、それによって、その後の培養 (culturingまたはcultivation) のために、チャンバの内部キャビティからバイオリアクタバッグに細胞が移動する。

【0060】

いくつかの態様において、バイオリアクタバッグに移されるか、充填される細胞および培地の総体積は、50mL ~ 5000mLまたは概ね該値の体積、例えば300mL ~ 3000mL、300mL ~ 1500mL、300mL ~ 1000mL、300mL ~ 1000mL、300mL ~ 500mL、500mL ~ 3000mL、500mL ~ 1500mL、500mL ~ 1000mL、1000mL ~ 2000mL、1000mL ~ 1500mL、もしくは1500mL ~ 2000mL、または概ね該値の体積である。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグに移されるか充填される細胞および培地の総体積は、少なくとも50mL、100mL、300mL、500mL、750mL、1000mL、1250mL、1500mL、1750mLもしくは2000mL、または概ね少なくとも該値の体積、または概ね該値の体積である。いくつかの態様において、バイオリアクタバッグは、300mL ~ 10Lまたは概ね該値の総体積、例えば500mL ~ 5000mL、500mL ~ 2500mL、500mL ~ 2000mL、500mL ~ 1500mL、500mL ~ 1000mL、1000mL ~ 5000mL、1000mL ~ 2500mL、1000mL ~ 2000mL、1000mL ~ 1500mL、1500mL ~ 5000mL、1500mL ~ 2500mL、1500mL ~ 2000mL、2000mL ~ 5000mL、2000mL ~ 2500mL、もしくは2500mL ~ 5000mL、または概ね該値の総体積を保持することができる。

【0061】

いくつかの局面において、培地は、T細胞などの細胞のその成長、培養、拡大または増殖を支持する、適合化された培地である。いくつかの局面において、培地は、塩、アミノ酸、ビタミン、糖またはそれらの任意の組み合わせの混合物を含有する液体であり得る。いくつかの態様では、培養培地は、インキュベーション中の細胞の培養、拡大または増殖を刺激するためなどの、1つまたは複数の刺激条件または作用物質をさらに含む。いくつかの態様では、刺激条件は、IL-2、IL-7またはIL-15から選択される1つまたは複数のサイトカインであるか、それを含む。いくつかの態様では、サイトカインは組換えサイトカインである。いくつかの態様では、培養またはインキュベーションの間の培地の1つまたは複数のサイトカインの濃度は、独立して、1IU/mL ~ 1500IU/mLまたは概ね該値の濃度、例えば1IU/mL ~ 100IU/mL、2IU/mL ~ 50IU/mL、5IU/mL ~ 10IU/mL、10IU/mL ~ 500IU/mL、50IU/mL ~ 250IU/mLもしくは100IU/mL ~ 200IU/mL、50IU/mL ~ 1500IU/mL、100IU/mL ~ 1000IU/mLもしくは200IU/mL ~ 600IU/mL、または概ね該値の濃度である。いくつかの態様において、1つまたは複数のサイトカインの濃度は、独立して、少なくとも1IU/mL、5IU/mL、10IU/mL、50IU/mL、100IU/mL、200IU/mL、500IU/mL、1000IU/mL、もしくは1500IU/mL、または少なくとも概ね該値の濃度である。特定の局面では、抗CD3抗体および/または抗CD28抗体な

10

20

30

40

50

どのTCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる作用物質はまた、インキュベーションの間またはその少なくとも一部の間またはインキュベーションの後に含まれ得る。

【0062】

いくつかの局面では、本明細書で提供される灌流バッグなどのバイオリアクタバッグは、細胞および培地の移動後に少なくとも一部の時間インキュベートされる。いくつかの態様では、刺激条件は一般に、ヒトTリンパ球などの一次免疫細胞の増殖に適した温度、例えば少なくとも約25℃、概して少なくとも約30℃、および概して37℃または約37℃を含む。いくつかの態様では、バイオリアクタバッグは、25~38℃、例えば30~37℃の温度で、例えば約37℃±2℃でインキュベートされる。いくつかの態様では、インキュベーションは培養までの期間行われ、例えば培養または拡大は、細胞の所望のまたは閾値の密度、数または用量をもたらす。いくつかの態様では、インキュベーションは、24時間、48時間、72時間、96時間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間を上回る、または概ね該値の時間を上回る、または概ね該値の時間にわたる、または該値の時間にわたる。

10

【0063】

いくつかの態様では、バイオリアクタバッグアセンブリは、細胞培養物における目標量の二酸化炭素を維持する条件下で培養される。いくつかの局面において、これは成長している間の細胞の最適な培養、拡大および増殖を確実にする。いくつかの局面では、二酸化炭素(CO₂)の量は、前記ガスの10%から0%(v/v)の間、例えば前記ガスの8%から2%(v/v)の間、例えば、約5%(v/v) CO₂の量である。

20

【0064】

場合によっては、バイオリアクタは動きまたはロッキングに曝される可能性があり、これは、いくつかの局面では、酸素の移動を増大させる可能性がある。バイオリアクタの動きは、水平軸に沿って回転すること、垂直軸に沿って回転すること、バイオリアクタの傾斜したまたは傾いた水平軸に沿ったロッキング運動、またはそれらの任意の組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの態様では、インキュベーションの少なくとも一部はロッキングを伴って行われる。ロッキング速度およびロッキング角度は、所望の揺動を達成するために調整され得る。いくつかの態様では、ロッキング角度は、20°、19°、18°、17°、16°、15°、14°、13°、12°、11°、10°、9°、8°、7°、6°、5°、4°、3°、2°または1°である。特定の態様において、ロッキング角度は6~16°の間である。他の態様では、ロッキング角度は7~16°の間である。他の態様では、ロッキング角度は8~12°の間である。いくつかの態様では、ロッキング速度は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40rpmである。いくつかの態様では、ロッキング速度は4~12rpm、例えば4~6rpmである。

30

【0065】

いくつかの態様では、インキュベーションの少なくとも一部は静的条件下で行われる。いくつかの態様では、培養中に使用済み培地を灌流させ、新鮮な培地で灌流させるなどのために、インキュベーションの少なくとも一部を灌流で行う。いくつかの態様では、方法は、供給ポートを介するなどで、新鮮な培地を細胞培養物に灌流する工程を含む。いくつかの態様では、灌流中に添加される培地は、1種または複数種の刺激性作用物質、例えばIL-2、IL-7および/またはIL-15などの1つまたは複数の組換えサイトカインを含有する。いくつかの態様では、灌流中に添加される培地は静的インキュベーション中に使用されるのと同じ培地である。

40

【0066】

いくつかの態様では、インキュベーションの後、バイオリアクタバッグアセンブリは、遠心分離チャンバを含むシステムに再接続されるなど、細胞療法を製造、生成、または産生するための1つまたは複数の他の処理工程を実行するためのシステムに再接続される。いくつかの局面において、培養した細胞は、培養した細胞の製剤化のためにバイオリアクタバッグからチャンバの内部キャビティに移される。

50

【 0 0 6 7 】

B. 他の処理工程

いくつかの態様では、培養は、細胞工学に関連してなど、1つまたは複数のさらなる処理工程に関連して実施することができる。そのような1つまたは複数の処理工程は、同じ閉鎖系の一部として、または同じ閉鎖系に動作可能に接続して実行することができる。

【 0 0 6 8 】

いくつかの態様では、1つまたは複数の処理工程は、(a)細胞を含む生物学的サンプル（例えば、全血サンプル、パフィコートサンプル、末梢血単核球（PBMC）サンプル、未分画T細胞サンプル、リンパ球サンプル、白血球サンプル、アフエレーシス産物、または白血球除去産物）を洗浄すること、(b)細胞を免疫親和性に基づく分離のための選択または免疫親和性試薬と共にインキュベートすることなどによって、サンプルから細胞の所望のサブセットまたは集団（例えば、CD4+および/またはCD8+T細胞）を単離、例えば選択すること、(c)選択された細胞などの単離された細胞をウイルスベクター粒子と共にインキュベートすること、(d)上記の方法などに従って細胞を培養（culture/cultivate）、または拡大すること、および(e)薬学的に許容される緩衝液、凍結保存剤または他の適切な媒体などの中に形質導入細胞を製剤化することの1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、方法は、(e)細胞を刺激条件に曝露することによって細胞を刺激することをさらに含み得、これは、細胞とウイルスベクター粒子とのインキュベーションの前、最中および/または後に行われ得る。いくつかの態様では、細胞の希釈、濃縮および/または緩衝液交換などのための洗浄または懸濁工程の1つまたは複数のさらなる工程もまた、上記工程のいずれかの前または後に実行することができる。

【 0 0 6 9 】

1. サンプルからの細胞の単離または選択

いくつかの態様では、処理工程は、特定の疾患もしくは状態を有するもの、または細胞療法を必要とする、もしくは細胞療法を与えられる者などの対象から得られるまたは該対象に由来するものなどの生物学的サンプルからの細胞またはその組成物の単離を含む。いくつかの局面では、対象はヒトであり、例えば細胞が単離される、処理される、および/または操作される養子細胞療法などの特定の治療的介入を必要とする患者である対象である。したがって、いくつかの態様における細胞は一次細胞、例えば一次ヒト細胞である。サンプルは、組織、体液、および対象から直接採取された他のサンプルを含む。生物学的サンプルは、生物学的供給源から直接得られたサンプルまたは処理されたサンプルであり得る。生物学的サンプルは、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗などの体液、組織および臓器のサンプル、例えばそれに由来する処理済サンプルを含むがこれらに限定されない。

【 0 0 7 0 】

いくつかの局面では、サンプルは、血液または血液由来のサンプルであるか、アフエレーシスもしくは白血球除去産物であるか、それらに由来する。例示的なサンプルとしては、全血、末梢血単核球（PBMC）、白血球、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸管、精巣、卵巣、扁桃腺、または他の臓器、および/またはそれらに由来する細胞が挙げられる。サンプルには、細胞療法、例えば養子細胞療法の状況において、自己由来および同種異系供給源由来のサンプルが含まれる。

【 0 0 7 1 】

いくつかの例において、対象の循環血液由来の細胞は、例えば、アフエレーシスまたは白血球除去によって得られる。サンプルは、いくつかの局面において、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および/または血小板を含むリンパ球を含み、いくつかの局面において、赤血球および血小板以外の細胞を含む。

【 0 0 7 2 】

いくつかの態様では、対象から集められた血球は、例えば血漿画分を除去し、その後の

処理工程のために細胞を適切な緩衝液または培地に入れるために洗浄される。いくつかの態様では、細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄する。いくつかの態様において、洗浄溶液は、カルシウムおよび/またはマグネシウムおよび/または多くのまたはすべての二価カチオンを欠く。いくつかの局面において、洗浄工程は、製造業者の指示に従って半自動「フロースルー」遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞プロセッサ、Baxter）によって達成される。いくつかの局面において、洗浄工程は、製造元の指示に従って接線流濾過（TFF）によって達成される。いくつかの態様において、細胞は、洗浄後に、例えば、 Ca^{++}/Mg^{++} を含まないPBSなどの様々な生体適合性緩衝液に再懸濁される。特定の態様では、血球サンプルの成分が除去され、細胞が培地に直接再懸濁される。

【0073】

いくつかの態様では、調製方法は、単離、選択および/または濃縮および/または形質導入および操作のためのインキュベーションの前または後のいずれかに細胞を凍結、例えば凍結保存する工程を含む。いくつかの態様において、凍結およびその後の解凍工程は、細胞集団中の顆粒球、およびある程度まで、単球を除去する。いくつかの態様において、細胞は、例えば血漿および血小板を除去するための洗浄工程の後に、凍結溶液にて懸濁される。いくつかの局面における様々な公知の凍結溶液およびパラメータのうちのいずれを使用してもよい。一例は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するPBS、または他の適切な細胞凍結培地を使用することを含む。次にこれを培地で1:1に希釈して、DMSOおよびHSAの最終濃度がそれぞれ10%および4%になるようにする。次いで細胞を全般的に毎分1°の速度で-80 に凍結し、液体窒素貯蔵タンクの気相で貯蔵する。

【0074】

いくつかの態様において、細胞または集団の単離は、1つまたは複数の調製および/または非親和性に基づく細胞分離工程を含む。いくつかの例では、1つまたは複数の試薬の存在下で細胞を洗浄、遠心分離、および/またはインキュベートして、例えば、不要な成分を除去し、所望の成分を濃縮し、特定の試薬に感受性のある細胞を溶解または除去する。いくつかの例では、細胞は、密度、付着特性、サイズ、感受性、および/または特定の構成要素に対する耐性などの1つまたは複数の特性に基づいて分離される。いくつかの態様では、方法は、赤血球を溶解することによる末梢血からの白血球の調製、およびパーコールまたはフィコール勾配による遠心分離などの密度に基づく細胞分離方法を含む。

【0075】

いくつかの態様において、選択工程の少なくとも一部は、細胞と選択試薬とのインキュベーションを含む。表面のマーカー、例えば表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸などの1つまたは複数の特異的分子の細胞における発現または存在に基づいて1つまたは複数の異なる細胞型を選択するための1つまたは複数の選択試薬を用いて行われ得る選択方法の一部としてなどの、選択試薬でのインキュベーションがある。いくつかの態様では、そのようなマーカーに基づいて選択試薬または分離用試薬を使用する任意の公知の方法を使用することができる。いくつかの態様では、選択試薬は、親和性または免疫親和性に基づく分離である分離をもたらす。例えば、いくつかの局面における選択は、1つまたは複数のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞の発現または発現レベルに基づく細胞および細胞の集団を分離するための1つまたは複数の試薬とのインキュベーションを含み、これは、例えば抗体とのインキュベーションまたはこれらのマーカーと特異的に結合する結合パートナーとのインキュベーション、その後、洗浄工程および抗体または結合パートナーに結合した細胞を抗体または結合パートナーに結合していない細胞から分離することによる。

【0076】

そのような方法のいくつかの局面において、ある量の細胞が、ある量の所望の親和性に基づく選択試薬と混合される。免疫親和性に基づく選択は、分離される細胞と細胞のマーカー、例えば固体の表面の抗体または他の結合パートナー、例えば粒子に特異的に結合する分子との間の有利なエネルギー的な相互作用をもたらす任意のシステムまたは方法を用いて行われ得る。いくつかの態様では、方法は、細胞のマーカーに特異的な選択剤（例え

10

20

30

40

50

ば抗体)で被覆された磁性ビーズといったビーズなどの粒子を使用して実行される。粒子(例えばビーズ)は、エネルギー的に有利な相互作用を促進するために一定の細胞密度と粒子(例えばビーズ)との比で、チューブやバッグなどの容器内の細胞と共に、振盪または混合しながら、インキュベートまたは混合され得る。他の場合では、本方法は、選択の全部または一部が遠心分離チャンバの内部キャビティで、例えば遠心回転下で行われる、細胞の選択を含む。いくつかの態様では、免疫親和性に基づく選択試薬などの選択試薬と細胞とのインキュベーションは、遠心分離チャンバで行われる。特定の態様において、単離または分離は、国際特許出願公開番号WO2009/072003、またはUS 20110003380 A1に記載されているシステム、デバイス、または装置を使用して行われる。一例では、システムは、国際公開WO2016/073602に記載されているようなシステムである。

10

【0077】

いくつかの態様では、遠心分離チャンバのキャビティでそのような選択工程またはその一部(例えば、抗体被覆粒子、例えば磁性ビーズとのインキュベーション)を実行することによって、使用者は、様々な溶液の体積、処理をしている間の溶液の追加、およびそのタイミングなどの特定のパラメータを制御することができ、これは、他の利用可能な方法と比較して利点を提供することができる。例えば、インキュベーション中にキャビティ内の液体の体積を減少できることは、キャビティ内の細胞の総数に影響を与えることなく、選択に使用される粒子(例えば、ビーズ試薬)の濃度、したがって溶液の化学ポテンシャルを増加させることができる。これはひいては、処理されている細胞と選択に使用される粒子との間の対の相互作用を強化することができる。いくつかの態様では、例えば本明細書に記載のシステム、回路、および制御と関連付けられたときにチャンバ内でインキュベーション工程を実行することにより、使用者はインキュベーション中の所望の時間に溶液を揺動させることができるようになり、そのことでまた相互作用を改善することができるようになる。

20

【0078】

いくつかの態様では、選択工程の少なくとも一部は、細胞と選択試薬とのインキュベーションを含む遠心分離チャンバで行われる。そのような処理のいくつかの局面では、ある体積の細胞を、製造元の指示に従った同一の数の細胞および/または体積の細胞を選択するためにチューブまたは容器で同様の選択を行うときに通常使用される量よりはるかに少ない量の所望の親和性ベースの選択試薬と混合する。いくつかの態様では、製造元の指示に従った同一の数の細胞および/または同一の体積の細胞に対するチューブまたは容器ベースのインキュベーションにおける細胞の選択に使用される同じ選択試薬の量の5%以下、10%以下、15%以下、20%以下、25%以下、50%以下、60%以下、70%以下または80%以下である、ある量の選択試薬を使用する。

30

【0079】

いくつかの態様では、選択、例えば、細胞の免疫親和性に基づく選択のために、細胞は、チャンバのキャビティにおいて、濃縮および/または枯渇が望まれる細胞上の表面マーカーに特異的に結合するが、組成物中の他の細胞上の表面マーカーには結合しない分子、例えば、ポリマーまたは表面、例えばビーズ、例えば磁性ビーズ、例えばCD4およびCD8に特異的なモノクローナル抗体に結合した磁性ビーズといった足場に任意で結合された抗体などの選択試薬を含む選択緩衝液も含む組成物中でインキュベートされる。いくつかの態様では、記載しているように、選択試薬は、振盪または回転させながらチューブ内で選択が実行される場合に、同一の数の細胞または同一の体積の細胞を選択するのとはほぼ同じまたは類似の効率を達成するのに通常使用されるか、または必要であろう選択試薬の量と比較して、実質的に少ない量(例えば、該量の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%以下)で、チャンバのキャビティにて細胞に添加される。いくつかの態様では、インキュベーションは、細胞および選択試薬への選択緩衝液の添加を伴って行われ、例えば、10mL~200mL、例えば少なくとも10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mLもしくは200mL、または概ね少なくとも該値の量、または概ね該値の量、または該値の量の試薬のインキュベーションで標的体積を達成する。いくつ

40

50

かの態様において、選択緩衝液および選択試薬は、細胞への添加前に予め混合される。いくつかの態様において、選択緩衝液および選択試薬は別々に細胞に添加される。いくつかの態様において、選択インキュベーションは、エネルギー的に有利な相互作用を促進するのを助け、それによって高い選択効率を達成しながらより少ない全体的な選択試薬の使用を可能にし得る、周期的な穏やかな混合条件で行われる。

【0080】

いくつかの態様では、選択試薬とのインキュベーションの全期間は、5分～6時間、または概ね該値の時間、例えば30分～3時間、例えば少なくとも30分、60分、120分もしくは180分、または概ね少なくとも該値の時間である。

【0081】

いくつかの態様では、インキュベーションは、一般に、スピンの存在下などの混合条件下で、一般に、細胞をペレット化するのに使用される速度より遅い速度など、比較的低い力または速度で、例えば600rpm～1700rpm、または概ね該値の速度（例えば600rpm、1000rpm、もしくは1500rpm、もしくは1700rpm、または概ね該値の速度、または少なくとも該値の速度）で、例えば、80g～100gまたは概ね該値の力（例えば、80g、85g、90g、95gもしくは100g、または概ね該値の力、または少なくとも該値の力）である、サンプルまたはチャンバもしくは他の容器の壁でのRCFで実行される。いくつかの態様では、スピンは、静止期間が後に続くこのような低速でのスピンの繰り返される間欠期を利用して、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10秒間のスピンおよび/または静止、例えば約1または2秒のスピンの後に約5、6、7、または8秒間静止することを利用して実行される。

【0082】

いくつかの態様では、そのような処理は、チャンバが一体化されている完全閉鎖系で行われる。いくつかの態様では、この処理（およびいくつかの局面ではさらに、アフエレーシスサンプルなどの細胞を含むサンプルを洗浄する先行する洗浄工程などの、1つまたは複数の追加の工程）は、自動プログラムを使用して、細胞、試薬および他の成分を適当な時間にチャンバに引き込み、押し出し、遠心分離を行い、単一の閉鎖系で洗浄および結合工程を完了するように、自動的に行われる。

【0083】

いくつかの態様において、細胞と選択試薬および/または試薬とのインキュベーションおよび/または混合の後、インキュベートされた細胞は、特定の試薬または複数の試薬の有無に基づいて細胞を選択するための分離に供される。いくつかの態様では、分離は、選択試薬と一緒に細胞のインキュベーションが行われたのと同じ閉鎖系で行われる。いくつかの態様では、選択試薬と共にインキュベートした後、選択試薬が結合した細胞を含むインキュベート細胞を、免疫親和性に基づく細胞分離のためのシステムに移す。いくつかの態様において、免疫親和性に基づく分離のためのシステムは、磁気分離カラムであるか、それを含む。

【0084】

そのような分離工程は、抗体または結合パートナーなどの試薬と結合した細胞が、さらなる使用のために保持される陽性の選択、および/または、抗体または結合パートナーなどの試薬に結合していない細胞が保持される陰性の選択に基づくことができる。いくつかの例において、両方の画分はさらなる使用のために保持される。いくつかの局面において、所望の集団以外の細胞が発現させるマーカーに基づいて分離が最もよく行われるように、異種集団において細胞型を特異的に同定する陰性の選択は、抗体が利用可能でない場合に、特に有用であり得る。

【0085】

いくつかの態様では、処理工程は、例えば、親和性に基づく選択を実行することができるシステムまたは装置を使用する、インキュベートされた細胞および細胞の陰性および/または陽性の選択をさらに含む。いくつかの態様では、単離は、陽性の選択による特定の細胞集団の濃縮、または陰性の選択による特定の細胞集団の枯渇によって行われる。いくつかの態様では、陽性の選択または陰性の選択は、それぞれ陽性または陰性に選択された

細胞において、発現、または比較的高いレベル（マーカー^高）で発現（マーカー⁺）した1以上の表面マーカーに特異的に結合する1つまたは複数の抗体または他の結合剤と細胞をインキュベートすることによって、達成される。

【0086】

分離は、特定のマーカーを発現する特定の細胞集団または細胞の100%濃縮または除去をもたらす必要はない。例えば、マーカーを発現する細胞などの、特定の種類の細胞の陽性の選択または濃縮は、そのような細胞の数または割合を増加させることを示すが、マーカーを発現しない細胞が完全に存在しなくなる必要はない。同様に、マーカーを発現する細胞などの、特定の種類の細胞の陰性の選択、除去、または枯渇は、そのような細胞の数または割合を減少させることを示すが、そのような細胞すべてを完全に除去する必要はない。

10

【0087】

いくつかの例では、1回の工程から陽性または陰性に選択された画分が、後続の陽性または陰性の選択などの別の分離工程にかけられる、複数回の分離工程が行われる。いくつかの例では、細胞を、それぞれ、陰性の選択の標的となるマーカーに特異的である複数の抗体または結合パートナーと共にインキュベートすることによってなど、単一の分離工程で複数のマーカーを同時に発現する細胞を枯渇させることができる。同様に、様々な細胞型において発現された複数の抗体または結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞型を同時に陽性に選択することができる。

20

【0088】

例えば、いくつかの局面において、T細胞の特定の亜集団、例えば1つまたは複数の表面マーカーが陽性であるかまたは発現レベルが高い細胞、例えばCD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、および/またはCD45RO⁺T細胞は、陽性または陰性の選択技術によって単離される。いくつかの態様において、そのような細胞は、そのようなマーカーに特異的に結合する1つまたは複数の抗体または結合パートナーとのインキュベーションによって選択される。いくつかの態様では、抗体または結合パートナーは、選択をもたらすための、磁性ビーズまたは常磁性ビーズなどの固体支持体またはマトリックスに、直接または間接的にコンジュゲートすることができる。例えば、CD3⁺、CD28⁺T細胞は、CD3/CD28がコンジュゲートした磁性ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander、および/またはExp ACT（登録商標）ビーズ）を用いて陽性に選択することができる。

30

【0089】

いくつかの態様において、T細胞は、B細胞、単球、または他の白血球例えばCD14などの非T細胞に発現されるマーカーの陰性の選択によって、PBMCサンプルから分離される。いくつかの局面では、CD4⁺またはCD8⁺選択工程を用いて、CD4⁺ヘルパーT細胞とCD8⁺細胞傷害性T細胞を分離する。そのようなCD4⁺およびCD8⁺集団は、1つまたは複数のナイーブ、メモリー、および/またはエフェクターT細胞亜集団で発現または比較的高度に発現されるマーカーについての陽性または陰性の選択によって、亜集団にさらに分類することができる。

40

【0090】

いくつかの態様では、CD8⁺細胞は、例えばそれぞれの亜集団に関連する表面抗原に基づく陽性の選択または陰性の選択によって、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、および/またはセントラルメモリー幹細胞がさらに濃縮または枯渇される。いくつかの態様では、セントラルメモリーT（TCM）細胞の濃縮は、投与後の長期生存、拡大、および/または生着を改善するなど、有効性を高めるために行われ、これはいくつかの局面では、そのような亜集団において特にロバストである。Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701を参照されたい。いくつかの態様で、TCMに富むCD8⁺T細胞とCD4⁺T細胞とを組み合わせることが効力をさらに高めている。

50

【0091】

態様では、メモリーT細胞は、CD8 + 末梢血リンパ球のCD62L + およびCD62L-サブセットの両方に存在する。PBMCは、例えば、抗CD8抗体および抗CD62L抗体を使用して、CD62L-CD8 + および/またはCD62L + CD8 + 画分を、濃縮または枯渇させることができる。

【 0 0 9 2 】

いくつかの態様では、セントラルメモリーT (TCM) 細胞の濃縮は、表面でのCD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、および/またはCD127の発現が陽性または高いことに基づく。いくつかの局面において、それは、CD45RAおよび/またはグランザイムBを発現するか、高度に発現する細胞についての陰性の選択に基づく。いくつかの局面において、TCM細胞が濃縮されたCD8 + 集団の単離は、CD4、CD14、CD45RAを発現する細胞の枯渇、およびCD62Lを発現する細胞の陽性の選択または濃縮によって行われる。1つの局面では、セントラルメモリーT (TCM) 細胞の濃縮は、CD14およびCD45RAの発現に基づく陰性の選択、およびCD62Lに基づく陽性の選択に供される、CD4の発現に基づいて選択された細胞の陰性の画分から開始して行われる。いくつかの局面におけるそのような選択は、同時に行われ、他の局面においては、どちらの順序でも順次行われる。いくつかの局面では、CD8 + 細胞集団または亜集団を調製するのに用いたのと同じCD4の発現に基づく選択工程はまた、CD4に基づく分離からの陽性および陰性画分の両方が保持され、方法のその後の工程において使用されるように、CD4 + 細胞集団または亜集団を生成するためにも用いられ、任意で、1つまたは複数のさらなる陽性または陰性の選択工程が続く。いくつかの態様において、CD4 + 細胞集団についての選択およびCD8 + 細胞集団についての選択は同時に行われる。いくつかの態様では、CD4 + 細胞集団およびCD8 + 細胞集団についての選択は、いずれかの順序で順次に行われる。いくつかの態様において、細胞を選択するための方法は、公開された米国特許出願公開第20170037369号に記載されているものを含み得る。いくつかの態様において、選択されたCD4 + 細胞集団および選択されたCD8 + 細胞集団は、選択後に組み合わせることができる。いくつかの局面において、選択されたCD4 + 細胞集団および選択されたCD8 + 細胞集団は、本明細書に記載されているようにバイオリアクタバッグで組み合わせることができる。

【 0 0 9 3 】

特定の例では、PBMCのサンプルまたは他の白血球のサンプルを、陰性画分と陽性画分の両方が保持されるCD4 + 細胞の選択に供する。次いで、陰性画分を、CD14およびCD45RAまたはCD19の発現に基づく陰性の選択、ならびにCD62LまたはCCR7などのセントラルメモリーT細胞に特徴的なマーカーに基づく陽性の選択に供し、この場合、陽性の選択および陰性の選択がいずれかの順序で行われる。

【 0 0 9 4 】

CD4 + Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を同定することによって、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、およびエフェクター細胞に分類され得る。CD4 + リンパ球は標準的な方法により得ることができる。いくつかの態様において、ナイーブCD4 + Tリンパ球はCD45RO-、CD45RA +、CD62L +、またはCD4 + T細胞である。いくつかの態様では、セントラルメモリーCD4 + 細胞はCD62L + およびCD45RO + である。いくつかの態様では、エフェクターCD4 + 細胞はCD62L- およびCD45RO- である。

【 0 0 9 5 】

一例では、陰性の選択によってCD4 + 細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的にはCD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。いくつかの態様では、抗体または結合パートナーは、陽性および/または陰性の選択のための細胞分離を可能にするために、磁性ビーズまたは常磁性ビーズなどの固体支持体またはマトリックスに結合される。例えば、いくつかの態様において、細胞および細胞集団は、免疫磁気 (または親和性磁気 (affinity magnetic)) 分離技術 (Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher (著作権) Humana Press Inc. トトワ、ニュージャージー州) に概説される) を用いて分離または単離される。

【 0 0 9 6 】

いくつかの局面では、インキュベートされるサンプルまたは分離される細胞組成物は、磁気応答性粒子または微小粒子、例えば常磁性ビーズ（例えば、DynalbeadsまたはMACS（登録商標）ビーズなど）のような小さな磁化可能または磁気応答性材料を含む選択試薬と共にインキュベートされる。一般に、分離することが望ましい、例えば陰性または陽性に選択することが望ましい1つの細胞、複数の細胞、または細胞の集団に存在する表面マーカーなどの分子に特異的に結合する抗体などの結合パートナーに、粒子などの磁気応答性材料は、直接または間接的に結合している。

【0097】

いくつかの態様において、磁性粒子またはビーズは、抗体または他の結合パートナーなどの特異的結合メンバーに結合した磁気応答性材料を含む。磁気分離法に使用するための多くの周知の磁気応答材料は、例えばMoldayの米国特許第4,452,773号および欧州特許明細書である欧州特許第452342号に記載されているものが公知である。これらは参照により本明細書に組み込まれる。Owenの米国特許第4,795,698号およびLibertiらの米国特許第5,200,084号に記載されているもののようなコロイドサイズの粒子も使用できる。

【0098】

インキュベーションは、一般に、抗体もしくは結合パートナー、または分子、例えば、磁性粒子もしくはビーズに結合しているそのような抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する二次抗体もしくは他の試薬が、サンプル内の細胞に存在する場合に細胞表面分子に特異的に結合する条件下で行われる。

【0099】

特定の態様では、磁気応答性粒子は、一次抗体または他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素、またはストレプトアビジンでコーティングされている。特定の態様では、磁性粒子は、1つまたは複数のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを介して細胞に付着している。特定の態様では、ビーズではなく細胞を一次抗体または結合パートナーで標識し、次いで細胞型特異的二次抗体または他の結合パートナー（例えばストレプトアビジン）でコーティングした磁性粒子を添加する。特定の態様では、ストレプトアビジン被覆磁性粒子はビオチン化一次抗体または二次抗体と組み合わせて使用される。

【0100】

いくつかの局面では、サンプルを磁場に置き、磁気応答性粒子または磁化可能粒子を付着させた細胞を磁石に引きつけて未標識細胞から分離する手順で分離が達成される。陽性の選択の場合、磁石に引きつけられる細胞が保持される。陰性の選択の場合、引きつけられていない細胞（非標識細胞）が保持される。いくつかの局面において、陽性および陰性の選択の組み合わせは、同じ選択工程の間に行われ、ここで、陽性の画分と陰性の画分は保持され、さらに処理されるか、さらなる分離工程に供される。

【0101】

いくつかの態様において、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（MACS：magnetic-activated cell sorting）（Miltenyi Biotech、カリフォルニア州オーバーン）を紹介する。磁気活性化細胞選別（MACS）、例えばCliniMACSシステムは、それに付着した磁化粒子を有する細胞の高純度の選択が可能である。特定の態様では、MACSは、外部の磁場の印加後に非標的種および標的種が順次溶出されるモードで動作する。すなわち、磁化された粒子に付着した細胞は、付着していない種が溶出されている間、適所に保持される。次に、この最初の溶出工程が完了した後、磁場に閉じ込められて溶出が妨げられた種は、それらを溶出し、回収することができるよう何らかの方法で解放される。特定の態様では、非標的細胞を標識し、細胞の不均一な集団から枯渇させる。

【0102】

いくつかの態様では、磁気応答性粒子は、続いてインキュベート、培養および/または操作されることになる細胞に付着したままである。いくつかの局面において、粒子は患者へ投与するために細胞に付着したままである。いくつかの態様では、磁化可能粒子または磁気応答性粒子は細胞から除去される。細胞から磁化可能粒子を除去する方法は公知であり、例えば競合する非標識抗体、磁化可能粒子、または切断可能なリンカーにコンジュゲ

10

20

30

40

50

ートした抗体などの使用が挙げられる。いくつかの態様では、磁化可能粒子は生分解性である。

【0103】

2. 遺伝子操作

いくつかの態様では、処理工程は、組換えタンパク質をコードする核酸分子の導入を含む。そのような組換えタンパク質の例は、セクションIIIに記載されているいずれかのような組換え受容体である。細胞内への組換え受容体などの組換えタンパク質をコードする核酸分子の導入は、多数の公知のベクターのいずれかを用いて行うことができる。そのようなベクターには、レンチウイルス系およびガンマレトロウイルス系を含むウイルス系および非ウイルス系、ならびにPiggyBacまたはSleeping Beautyに基づく遺伝子移入系などのトランスポゾンに基づく系が含まれる。例示的な方法としては、ウイルス、例えばレトロウイルスまたはレンチウイルス、形質導入、トランスポゾン、およびエレクトロポレーションを介することを含む、受容体をコードする核酸の導入のための方法が挙げられる。

10

【0104】

いくつかの態様では、例えばサイトカインまたは活性化マーカーの発現、続いて活性化細胞の形質導入、および臨床での応用に十分な数までの培養での拡大によって測定される、細胞を増殖、生存、および/または活性化などの応答を誘導する刺激と組み合わせる等により、最初に細胞を刺激することによって、遺伝子導入を達成する。

【0105】

いくつかの態様では、サルウイルス40 (SV40)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV) に由来するベクターなどの組換え感染性ウイルス粒子を使用して、組換え核酸を細胞に移入する。いくつかの態様では、組換えレンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターを使用して、組換え核酸をT細胞に移入する (例えば、Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28 (10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29 (11): 550-557を参照されたい)。

20

【0106】

いくつかの態様では、レトロウイルスベクターは長末端反復配列 (LTR)、例えばモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス (MPSV)、マウス胚性幹細胞ウイルス (MESV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、脾臓病巣形成ウイルス (SFFV)、またはアデノ随伴ウイルス (AAV) 由来のレトロウイルスベクターを有する。ほとんどのレトロウイルスベクターはマウスのレトロウイルスに由来する。いくつかの態様では、レトロウイルスは、任意のトリまたは哺乳動物の細胞供給源に由来するものを含む。レトロウイルスは典型的には兩種指向性であり、これはそれらがヒトを含むいくつかの種の宿主細胞に感染することができることを意味する。一態様では、発現させる遺伝子は、レトロウイルスのgag、polおよび/またはenv配列を置き換える。多数の例示的なレトロウイルス系が記載されている (例えば、米国特許第5,219,740号; 第6,207,453号; 第5,219,740号; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; および Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109)。

30

40

【0107】

レンチウイルス形質導入の方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Wang et al. (2012) J. Immunother. 35 (9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; および Cavalieri et al. (2003) Blood. 102 (2): 497-505に記載されている。

【0108】

いくつかの態様において、組換え核酸は、エレクトロポレーションによってT細胞に移入される (例えば、Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8 (3): e60298 および Van Ted

50

eloo et al. (2000) Gene Therapy 7 (16) : 1431-1437を参照されたい)。いくつかの態様において、組換え核酸は、転移を介してT細胞に導入される(例えば、Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21 (4) : 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74;およびHuang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126を参照されたい)。免疫細胞に遺伝物質を導入し発現させる他の方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載されている通り)、プロトプラスト融合、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクション;タングステン粒子促進微粒子銃法(tungsten particle-facilitated microparticle bombardment)(Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990));およびリン酸ストロンチウムDNA共沈殿(Brash et al., Mol.Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))が含まれる。 10

【0109】

組換え産生物をコードする核酸を移入するための他のアプローチおよびベクターは、例えば、国際特許出願公開番号WO2014055668、および米国特許第7,446,190号に記載されているものである。

【0110】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞は、拡大中または拡大後に、例えばT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)でトランスフェクションすることができる。所望の受容体の遺伝子を導入するためのこのトランスフェクションは、例えば任意の適切なレトロウイルスベクターを用いて実行することができる。次いで、遺伝子改変された細胞集団は、最初の刺激(例えば、CD3/CD28刺激)から解放され、続いて第2のタイプの刺激、例えばデノボに導入された受容体を介して刺激され得る。この第2の種類の刺激は、ペプチド/MHC分子、遺伝的に導入された受容体の同族(架橋)リガンド(例えばCARの天然リガンド)、または、(例えば、受容体内の定常領域を認識することによって)新しい受容体のフレームワーク内に直接結合する任意のリガンド(抗体など)の形態の抗原の刺激を含み得る。例えば、Cheadleらの「Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy」、Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 or Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)を参照されたい。 20

【0111】

場合によっては、細胞、例えばT細胞が活性化されることを必要としないベクターを使用することができる。いくつかのそのような例において、細胞は活性化の前に選択および/または形質導入してもよい。したがって、細胞は、細胞の培養の前または後に、場合によっては培養の少なくとも一部と同時に、またはその間に、操作することができる。 30

【0112】

いくつかの局面において、細胞はサイトカインまたは他の因子の発現を促進するようにさらに操作される。追加の核酸の中には、例えば例えば導入細胞の生存率および/または機能を促進することによって、治療の有効性を改善するための遺伝子である、導入用の遺伝子;細胞の選択および/または評価のための、例えばインビボでの生存または局在化を評価するための遺伝的マーカーを提供するための遺伝子;例えば、Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991);およびRiddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)によって記載されているようにインビボで陰性の選択に対して感受性がある細胞にすることによって、安全性を改善するための遺伝子が含まれ;ドミナントポジティブ選択可能マーカーとネガティブ選択可能マーカーとの融合に由来する二機能性選択可能融合遺伝子の使用を記載している、LuptonらのPCT/US91/08442およびPCT/US 94/05601の刊行物も参照されたい。例えば、Riddellら、米国特許第6,040,177号、第14~17欄を参照されたい。 40

【0113】

いくつかの態様では、導入は、組成物の1つまたは複数の細胞を、組換えタンパク質をコードする核酸分子、例えば組換え受容体に接触させることで実行される。いくつかの態 50

様において、接触は、スピノキュレーション (spinoculation) (例えば、遠心分離での接種) などの遠心分離を用いて達成され得る。そのような方法は、国際公開WO2016/073602に記載されているもののいずれかを含む。例示的な遠心分離チャンバとしては、Biosafe SAによって製造および販売されているものが挙げられ、これには、Sepax (登録商標) およびSepax (登録商標) 2のシステムと共に使用するためのもの、例えばA-200/FおよびA-200遠心分離チャンバならびにそのようなシステムと共に使用するための様々なキットが含まれる。例示的なチャンバ、システム、ならびに処理用の機器およびキャビネットは、例えば、米国特許第6,123,655号、米国特許第6,733,433号、および公開された米国特許出願、米国特許出願公開第2008/0171951号、ならびに公開された国際特許出願公開番号WO 00/38762に記載されている。これらのそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。そのようなシステムと共に使用するための例示的なキットは、製品名CS-430.1、CS-490.1、CS-600.1またはCS-900.2でBioSafe SAによって販売されている単回使用のキットを含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0114】

いくつかの態様では、システムは、本明細書または国際公開WO2016/073602に記載されているような遠心分離チャンバシステムと一緒に、またはそれに関連して実行することができる1つまたは複数の処理工程などのシステム内で実行される、形質導入工程および1つまたは複数の様々な他の処理工程の局面を動作、自動化、制御および/または監視するための機器を含む他の機器と共に含まれるおよび/または関連付けられる。いくつかの態様におけるこの機器は、キャビネット内に収容されている。いくつかの態様では、機器は、制御回路を含むハウジング、遠心分離機、カバー、モーター、ポンプ、センサー、ディスプレイ、およびユーザインターフェースを含むキャビネットを含む。例示的なデバイスは、米国特許第6,123,655号、米国特許第6,733,433号および米国特許出願公開第2008/0171951号に記載されている。

【0115】

いくつかの態様において、システムは、一連の容器、例えば、バッグ、チューブ、栓、クランプ、コネクタ、および遠心分離チャンバを含む。いくつかの態様では、バッグなどの容器は、同じ容器または別の容器、例えば同じバッグまたは別のバッグに、形質導入される細胞およびウイルスベクター粒子を含む、1つまたは複数のバッグなどの容器を含む。いくつかの態様では、システムは、方法中の成分および/または組成物を希釈、再懸濁、および/または洗浄するためにチャンバおよび/または他の成分に引き込まれる希釈剤および/または洗浄溶液などの媒体を収容する、1つまたは複数のバッグなどの容器をさらに含む。容器は、投入ライン、希釈ライン、洗浄ライン、廃棄ラインおよび/または排出ラインに対応する位置など、システムの1つまたは複数の位置に接続することができる。

【0116】

いくつかの態様では、チャンバは遠心分離機と関連付けられ、遠心分離機は、その回転軸の周りなどで、チャンバの回転をもたすことができる。回転は、細胞の形質導入に関連して、および/または他の処理工程の1つまたは複数において、インキュベーションの前、最中、および/または後に起こり得る。したがって、いくつかの態様では、様々な処理工程のうちの1つまたは複数は、回転下で、例えば特定の力で実行される。チャンバは典型的には垂直方向または大体垂直方向に回転することができ、その結果チャンバは遠心分離の間垂直に位置し、側壁および軸は垂直または大体垂直であり、端壁は水平または大体水平である。

【0117】

いくつかの態様では、細胞、ウイルス粒子および試薬を含有する組成物は、一般に、細胞をペレット化するのに使用される速度より遅い速度など、比較的低い力または速度、例えば600rpm~1700rpm、または概ね該値の速度 (例えば600rpm、1000rpm、もしくは1500rpm、もしくは1700rpm、または概ね該値の速度、または少なくとも該値の速度) で回転することができる。いくつかの態様では、回転は、100g~3200gまたは概ね該値の力 (例えば、100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000gもしくは3200g、

または概ね該値の力、または少なくとも該値の力、または少なくとも概ね該値の力)である相対遠心力などの力で、例えばチャンバまたはキャビティの内壁または外壁で測定して行われる。「相対遠心力」またはRCFという用語は、一般に、回転軸と比較した、空間内の特定の箇所における地球の重力に対する、物体または物質(細胞、サンプル、またはペレット、および/または回転するチャンバもしくは他の容器内の箇所など)に与えられる有効な力であると理解される。この値は、重力、回転速度および回転半径(回転軸からの距離、およびRCFが測定されている物体、物質、または粒子からの距離)を考慮に入れて、周知の式を使用して判定できる。

【0118】

いくつかの態様において、遺伝子操作、例えば形質導入の少なくとも一部の最中に、および/または遺伝子操作の後に、細胞は、上記のように、細胞の培養または拡大のためなど、遺伝子操作された細胞の培養のために、バイオリアクタバッグアセンブリに移される。

10

【0119】

形質導入用のウイルスベクター粒子の調製

ウイルスベクターゲノムは、典型的には、パッケージングまたは産生をする細胞株にトランスフェクトされ得るプラスミドの形態で構築される。そのような例のいずれにおいても、組換え受容体などの組換えタンパク質をコードする核酸は、一般にウイルスゲノムの非必須領域などのウイルスベクターの領域に挿入または配置される。いくつかの態様において、核酸は、複製欠損ウイルスを産生するために、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入される。

20

【0120】

ゲノムがウイルスベクターゲノムのRNAコピーを含むレトロウイルス粒子を生成するために、様々な公知の方法のいずれかを使用することができる。いくつかの態様では、少なくとも2つの構成要素がウイルスベクターの遺伝子送達システムの構築に関与し、第1の構成要素は、構造タンパク質ならびにウイルスベクター粒子を生成するのに必要な酵素を包含するパッケージングのプラスミドであり、第2の構成要素は、ウイルスベクター自体、すなわち、移される遺伝物質そのものである。バイオセーフティのためのセーフガードを、これらの構成要素の一方または両方の設計に導入することができる。

【0121】

いくつかの態様において、パッケージングするプラスミドは、例えばHIV-1などのすべてのレトロウイルス、エンベロープタンパク質以外のタンパク質を含み得る(Naldiniら、1998)。他の態様では、ウイルスベクターは、HIVの一次トランスアクチベーターであるvpr、vif、vpuおよびnef、および/またはTatといった病原性に関連するものなどの、追加のウイルス遺伝子を欠くことができる。いくつかの態様では、HIVベースのレンチウイルスベクターなどのレンチウイルスベクターは、親ウイルスの3つの遺伝子、gag、polおよびrevのみを含み、このことは、組換えによる野生型ウイルスの再構成の可能性を低減または排除する。

30

【0122】

いくつかの態様では、ウイルスベクターゲノムは、ウイルスベクターゲノムから転写されたウイルスゲノムRNAをウイルス粒子にパッケージングするのに必要なすべての成分を含むパッケージング用細胞株に導入される。あるいは、ウイルスベクターゲノムは、目的の1つまたは複数の配列、例えば組換え核酸に加えて、ウイルス成分をコードする1つまたは複数の遺伝子を含み得る。しかし、いくつかの局面において、標的細胞におけるゲノムの複製を防ぐために、複製に必要とされる内因性ウイルス遺伝子は除去され、パッケージング用細胞株において別々に準備される。

40

【0123】

いくつかの態様では、パッケージング用細胞株は、粒子を生成するために必要な構成要素を含む1つまたは複数のプラスミドベクターでトランスフェクトされる。いくつかの態様において、パッケージング用細胞株は、シス作用パッケージング用配列であるLTRと、

50

目的の配列、すなわちCARなどの抗原受容体をコードする核酸とを含むウイルスベクターゲノムを含むプラスミド；およびGag、polおよび/または、revなどのウイルスの酵素的および/または構造的成分をコードする1種類または複数種類のヘルパープラスミドを用いて、トランスフェクトされる。いくつかの態様では、レトロウイルスベクター粒子を産生する様々な遺伝的構成要素を分離するために、複数のベクターが利用される。いくつかのそのような態様において、パッケージング用細胞に別々のベクターを与えることは、そうでなければ複製コンピテントウイルスを生成し得る組換え事象の機会を減らす。いくつかの態様では、レトロウイルスの成分すべてを有する単一のプラスミドベクターを使用することができる。

【0124】

いくつかの態様では、レンチウイルスベクター粒子などのレトロウイルスベクター粒子は、宿主細胞の形質導入効率を高めるために偽型化されている。例えば、いくつかの態様において、レンチウイルスベクター粒子などのレトロウイルスベクター粒子は、VSV-G糖タンパク質で偽型化されており、それは形質導入可能な細胞型にわたる広い細胞宿主範囲を提供する。いくつかの態様では、パッケージング用細胞株は、シンドビスウイルスエンベロープ、GALVまたはVSV-Gなどの、異種指向性の、ポリトロピックまたは両種指向性のエンベロープを含むように、非天然エンベロープ糖タンパク質をコードするプラスミドまたはポリヌクレオチドでトランスフェクトされる。

【0125】

いくつかの態様では、パッケージング用細胞株は、ウイルスゲノムRNAをレンチウイルスベクター粒子にパッケージングするためにトランスで必要とされる、ウイルス調節タンパク質および構造タンパク質を含む成分を提供する。いくつかの態様では、パッケージング用細胞株は、レンチウイルスタンパク質を発現し、機能的レンチウイルスベクター粒子を産生することができる任意の細胞株であり得る。いくつかの局面では、適切なパッケージング用細胞株には、293 (ATCC CCL X)、293T、HeLA (ATCC CCL 2)、D17 (ATCC CCL 183)、MDCK (ATCC CCL 34)、BHK (ATCC CCL- 10) およびCf2Th (ATCC CRL 1430) 細胞が含まれる。

【0126】

いくつかの態様において、パッケージング用細胞株は、ウイルスタンパク質を安定的に発現する。例えば、いくつかの局面において、gag、pol、revおよび/または他の構造遺伝子を含むがLTRおよびパッケージング用成分を含まないパッケージング用細胞株を構築することができる。いくつかの態様において、パッケージング用細胞株は、異種タンパク質をコードする核酸分子および/またはエンベロープ糖タンパク質をコードする核酸を含有するウイルスベクターゲノムと共に、1つまたは複数のウイルスタンパク質をコードする核酸分子で一過性にトランスフェクトされ得る。

【0127】

いくつかの態様では、ウイルスベクターならびにパッケージング用および/またはヘルパープラスミドは、トランスフェクションまたは感染を介して、パッケージング用細胞株に導入される。パッケージング用細胞株は、ウイルスベクターゲノムを含むウイルスベクター粒子を産生する。トランスフェクションまたは感染のための方法は周知である。非限定的な例には、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランおよびリポフェクション法、エレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションが含まれる。

【0128】

組換えプラスミドならびにレトロウイルスLTRおよびパッケージング用配列を特別な細胞株に（例えばリン酸カルシウム沈殿によって）導入すると、パッケージング用配列は組換えプラスミドのRNA転写物をウイルス粒子にパッケージングすることを可能にし得る。それは、次いで培地に分泌され得る。いくつかの態様において、組換えレトロウイルスを含有する培地は、次いで集められ、任意に濃縮され、遺伝子導入のために使用される。例えば、いくつかの局面において、パッケージング用プラスミドおよび導入ベクターのパッケージング用細胞株への共導入の後、ウイルスベクター粒子は培地から回収され、当業者

10

20

30

40

50

が利用している標準的な方法によって滴定される。

【0129】

いくつかの態様では、レンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターは、レンチウイルス粒子の生成を可能にするためにプラスミドを導入することによって、例示的なHEK293T細胞株などのパッケージング用細胞株で産生することができる。いくつかの態様では、パッケージング細胞は、gagおよびpolをコードするポリヌクレオチド、ならびに抗原受容体、例えばCARなどの組換え受容体をコードするポリヌクレオチドをトランスフェクトされる、および/または該ポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、パッケージング用細胞株は、revタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、任意でおよび/または追加的にトランスフェクトされる、および/または該ポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、パッケージング用細胞株は、VSV-Gなどの非天然エンベロープ糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、任意でおよび/または追加的にトランスフェクトされる、および/または該ポリヌクレオチドを含む。いくつかのそのような態様において、細胞、例えばHEK 293T細胞のトランスフェクションの約2日後、細胞上清には組換えレンチウイルスベクターが含まれており、これを回収して滴定することができる。

10

【0130】

回収および/または産生されたレトロウイルスベクター粒子は、記載された方法を用いて標的細胞に形質導入を行うために使用され得る。標的細胞に入ると、ウイルスRNAは逆転写され、核に移入され、宿主ゲノムに安定して組み込まれる。ウイルスRNAの組み込みの1日後または2日後に、組換えタンパク質、例えばCARなどの抗原受容体の発現を検出することができる。

20

【0131】

3. 活性化と刺激

いくつかの態様では、1つまたは複数の処理工程は、選択された細胞集団などの単離された細胞を刺激する工程を含む。インキュベーションは、上記の形質導入方法の態様からもたらされる遺伝子操作などの遺伝子操作の前であっても、それに関連していてもよい。いくつかの態様では、刺激は、例えば形質導入の前に、細胞の活性化および/または増殖をもたらす。

【0132】

いくつかの態様において、処理工程は、選択された細胞などの細胞のインキュベーションを含み、ここでインキュベーション工程は、細胞の培養(culture)、培養(cultivation)、刺激、活性化、および/または増殖を含み得る。いくつかの態様では、組成物または細胞は、刺激条件または刺激性作用物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件には、集団内の細胞の増殖、拡大、活性化、および/または生存を誘導するため、抗原の曝露を模倣するため、および/または組換え抗原受容体の導入などの遺伝子操作のために細胞をプライミングするために設計されるものが含まれる。

30

【0133】

いくつかの態様では、刺激および/または活性化の条件は、特定の培地、温度、酸素含有量、二酸化炭素含有量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、および/または刺激因子、例えば、サイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された他の任意の作用物質の1つまたは複数を含み得る。

40

【0134】

いくつかの態様において、刺激条件または作用物質は、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンドを含む。いくつかの局面では、例えば、例えばTCRの構成要素に固有の、例えばITAM誘導シグナルの活性化を開始するための一次シグナルを送達するのに適した作用物質、および/または例えばT細胞共刺激受容体に特異的なものなどの共刺激シグナルを促進する作用物質、例えばビーズなどの固体支持体に結合している例えば抗CD3、抗CD28、もしくは抗41-BB、および/または1つもしくは複数のサイトカインなど、作用物質は、T細胞においてTCR/CD3

50

細胞内シグナル伝達カスケードをオンにするかまたは開始する。刺激性作用物質には、抗CD3/抗CD28ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander、および/またはExpACT（登録商標）ビーズ）が含まれる。任意で、拡大方法は、培地に抗CD3および/または抗CD28抗体を添加する工程をさらに含んでもよい。いくつかの態様において、刺激性作用物質は、IL-2、IL-7および/またはIL-15、例えば少なくとも約10単位/mL、少なくとも約50単位/mL、少なくとも約100単位/mL、または少なくとも約200単位/mLの濃度のIL-2を含む。

【0135】

条件は、特定の培地、温度、酸素含有量、二酸化炭素含有量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、および/または刺激因子、例えば、サイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された他の任意の作用物質の1つまたは複数を含み得る。

10

【0136】

いくつかの局面において、インキュベーションは、Riddellらの米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 117:72-82、および/またはWang et al. (2012) J Immunother. 35(9): 689-701に記載されているものなどの技法に従って行われる。

【0137】

いくつかの態様では、1つまたは複数の刺激条件または刺激性作用物質の存在下でのインキュベーションの少なくとも一部は、例えば、国際公開WO2016/073602に記載されているように、遠心回転下で遠心分離チャンバの内部キャビティで行われる。いくつかの態様では、遠心分離チャンバで行われるインキュベーションの少なくとも一部は、刺激および/または活性化を誘導するための試薬と混合することを含む。いくつかの態様では、選択された細胞などの細胞は、遠心分離チャンバ内で刺激条件または刺激性作用物質と混合される。そのような処理のいくつかの局面では、細胞培養プレートまたは他のシステムで同様の刺激を行うときに通常使用される量よりはるかに少ない量の1つまたは複数の刺激条件または作用物質と一定量の細胞が混合される。

20

【0138】

いくつかの態様では、刺激性作用物質は、周期的に振盪または回転をさせながらチューブまたはバッグ内などの遠心分離チャンバ内で混合せずに選択が実行される場合に、同一の数の細胞または同一の体積の細胞を選択するのとはほぼ同じまたは類似の効率を達成するのに通常使用されるか、または必要であろう刺激性作用物質の量と比較して、実質的に少ない量（例えば、該量の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%以下）で、チャンバのキャビティにて細胞に添加される。いくつかの態様では、インキュベーションは、細胞に対するインキュベーション緩衝液および刺激性作用物質の添加を伴って行われ、例えば、10mL~200mL、例えば少なくとも10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mLもしくは200mL、または概ね少なくとも該値の量、または概ね該値の量、または該値の量の試薬のインキュベーションで標的体積を達成する。いくつかの態様において、インキュベーション緩衝液および刺激性作用物質は、細胞への添加の前に予め混合される。いくつかの態様では、インキュベーション緩衝液および刺激性作用物質は別々に細胞に添加される。いくつかの態様では、刺激インキュベーションは、エネルギー的に有利な相互作用を促進するのを助け、それによって細胞の刺激および活性化を達成しながら、より少ない全体的な刺激性作用物質の使用を可能にし得る、周期的な穏やかな混合条件で行われる。

30

40

【0139】

いくつかの態様では、インキュベーションは、一般に、スピンの存在下などの混合条件下で、概して、細胞をペレット化するのに使用される速度より遅い速度など、比較的低い力または速度で、例えば600rpm~1700rpmまたは概ね該値の速度（例えば600rpm、1000rpm、もしくは1500rpm、もしくは1700rpm、または概ね該値の速度、または少なくとも該値の速度）で、例えば、80g~100gまたは概ね該値の力（例えば、80g、85g、90g、95gもしくは

50

は100g、または概ね該値の力、または少なくとも該値の力)である、サンプルまたはチャンバもしくは他の容器の壁でのRCFで実行される。いくつかの態様では、スピンは、静止期間が続くこのような低速でのスピンの繰り返される間欠期を利用して、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10秒間のスピンおよび/または静止、例えば約1または2秒のスピンの後に約5、6、7、または8秒間静止することを利用して実行される。

【0140】

いくつかの態様では、例えば刺激性作用物質を用いるインキュベーションの全期間は、1時間～96時間、1時間～72時間、1時間～48時間、4時間～36時間、8時間～30時間もしくは12時間～24時間、または概ね該値の時間、例えば少なくとも6時間、12時間、18時間、24時間、36時間もしくは72時間、または概ね少なくとも該値の時間である。いくつかの態様では、さらなるインキュベーションは、1時間～48時間、4時間～36時間、8時間～30時間、もしくは12時間～24時間、または概ね該値の時間にわたる。

10

【0141】

4. 製剤化

いくつかの態様では、細胞療法および/または操作された細胞を製造、生成または産生するための1つまたは複数のプロセス工程(例えば遠心分離チャンバおよび/または閉鎖系で行われる)は、培養(culturing)、例えば培養(cultivation)、および拡大の前または後の形質導入処理工程、および/または記載されているような1つまたは複数の他の処理工程を設けることに由来する、遺伝子操作された細胞の製剤化などの細胞の製剤化を含み得る。いくつかの態様において、細胞の製剤化に関連して提供される方法は、閉鎖系において、上記の処理工程を用いて形質導入および/または拡大された細胞などの形質導入細胞を処理することを含む。

20

【0142】

いくつかの態様では、CD4+および/またはCD8+T細胞などの、処理工程の1つまたは複数によって生成されたT細胞が製剤化される。いくつかの局面では、複数の組成物が別々に製造、産生、または生成され、それぞれは、別々にまたは独立して、任意で一定期間内に投与するためのものなど、対象に由来する細胞の異なる集団および/または亜型を含む。例えば、細胞の異なる集団または亜型を含有する操作された細胞の別々の製剤は、それぞれCD8+およびCD4+T細胞、および/またはそれぞれCD8+および/またはCD4+濃縮化集団、例えば各々が組換え受容体を発現するように遺伝子操作された細胞を個々に含むCD4+および/またはCD8+T細胞を含み得る。いくつかの態様では、少なくとも1つの組成物は、組換え受容体を発現するように遺伝子操作されたCD4+T細胞を含んで製剤化される。いくつかの態様では、少なくとも1つの組成物は、組換え受容体を発現するように遺伝子操作されたCD8+T細胞を含んで製剤化される。いくつかの態様では、用量の投与は、CD8+T細胞の用量またはCD4+T細胞の用量を含む第1の組成物の投与、ならびにCD4+T細胞およびCD8+T細胞の用量の残りを含む第2の組成物の投与を含む。いくつかの態様では、CD8+T細胞の用量またはCD4+T細胞の用量を含む第1の組成物は、CD4+T細胞およびCD8+T細胞の用量の残りを含む第2の組成物の前に投与される。いくつかの態様では、用量の投与は、CD8+T細胞の用量およびCD4+T細胞の用量の両方を含む組成物の投与を含む。

30

【0143】

いくつかの態様では、細胞は薬学的に許容される緩衝液中に製剤化され、それは、いくつかの局面では、薬学的に許容される担体または賦形剤を含み得る。いくつかの態様では、処理は、対象への投与に対して薬学的に許容されるかまたは望ましい媒体または製剤化緩衝液への媒体の交換を含む。いくつかの態様では、処理工程は、形質導入および/または増殖させた細胞を洗浄して、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を含み得る薬学的に許容される緩衝液中に細胞を再配置することを含み得る。薬学的に許容される担体または賦形剤を含むそのような薬学的形態の例は、細胞および組成物を対象に投与するのに許容される形態と共に後述されているいずれかであり得る。いくつかの態様における医薬組成物は、治療上有効な量または予防上有効な量など、疾患または状態を治療または予防するために有効な量で、細胞を含む。

40

50

【 0 1 4 4 】

「薬学的に許容される担体」は、対象に対して無毒である、活性成分以外の医薬製剤の成分を示す。薬学的に許容される担体は、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 4 5 】

いくつかの局面では、担体の選択は、部分的には特定の細胞によって、および/または投与方法によって決定される。したがって、様々な適切な処方がある。例えば、医薬組成物は保存剤を含み得る。適切な保存剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、および塩化ベンザルコニウムを挙げることができる。いくつかの局面では、2つまたはそれより多い保存剤の混合物が使用される。保存剤またはそれらの混合物は、典型的には全組成物の約0.0001重量%から約2重量%の量で存在する。担体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.

(1980)に記載されている。薬学的に許容される担体は一般に、用いられる用量および濃度でレシipientに無毒であり、緩衝剤、例えばリン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸;抗酸化剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン;保存剤(例えば塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム;塩化ヘキサメトニウム;塩化ベンザルコニウム;塩化ベンゼトニウム;フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール;アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;およびm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン;単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物;EDTAなどのキレート剤;糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール;ナトリウムなどの塩形成対イオン;金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体);および/またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤を非限定的に含む。

【 0 1 4 6 】

いくつかの局面において、緩衝剤が組成物に含まれる。適切な緩衝剤としては、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに他の様々な酸および塩が挙げられる。いくつかの局面では、2つまたはそれより多い緩衝剤の混合物が使用される。緩衝剤またはそれらの混合物は、典型的には全組成物の約0.001重量%から約4重量%の量で存在する。投与可能な医薬組成物を調製するための方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)に、より詳細に説明されている。

【 0 1 4 7 】

製剤は水溶液を含み得る。製剤または組成物はまた、細胞で治療されている特定の適応症、疾患、または状態に有用な2つ以上の活性成分、好ましくは細胞に対して補完的な活性を有し、それぞれの活性が互いに悪影響を及ぼさない活性成分を含み得る。そのような活性成分は、意図する目的に有効な量で、組み合わせて適切に存在する。したがって、いくつかの態様では、医薬組成物は、化学療法剤、例えばアスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、および/またはビンクリスチンなどの、他の医薬活性剤または薬物をさらに含む。

【 0 1 4 8 】

いくつかの態様における組成物は、いくつかの局面において選択されたpHに緩衝され得る、滅菌液体調製物、例えば、等張水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液、または粘性組成物として提供される。液体組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール)、およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒体であり得る担体を含み得る。滅

菌注射用溶液は、適切な担体、希釈剤、または滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどの賦形剤との混合物などの溶媒に、細胞を組み込むことによって、調製することができる。組成物は、投与経路および所望の製剤に応じて、湿潤剤、分散剤または乳化剤（例えばメチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル化剤または増粘剤、保存剤、着香料および/または着色剤などの補助的な物質を含み得る。いくつかの局面では、標準的な教科書を参考にして適切な製剤を調製することができる。

【0149】

抗微生物保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝剤を含む、組成物の安定性および滅菌性を高める様々な添加剤を添加することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、およびソルビン酸により、確実にすることができる。注射用医薬形態の持続的な吸収は、吸収を遅らせる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもた

10

【0150】

いくつかの態様では、製剤化緩衝剤は凍結保存剤を含有する。いくつかの態様では、細胞は、5%~20%のDMSO溶液または5%~10%のDMSO溶液などの1.0%~30%のDMSO溶液を含有する凍結保存溶液を用いて製剤化される。いくつかの態様では、凍結保存溶液は、例えば、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するPBS、または他の適切な細胞凍結培地であるか、それを含有する。いくつかの態様では、凍結保存溶液は、例えば少なくともまたは約7.5%のDMSOであるか、それを含む。いくつかの態様では、処理工程は、凍結保存溶液中に細胞を再配置するために形質導入および/または拡大させた細胞を洗浄することを伴い得る。

20

【0151】

いくつかの態様では、製剤化は、培養した細胞または拡大させた細胞などの細胞を洗浄、希釈または濃縮することを含む1つまたは複数の処理工程を利用して行われる。いくつかの態様では、処理は、所与の用量で投与するための細胞数またはその一部を含む単位用量形態の組成物など、細胞を所望の濃度または数に希釈または濃縮することを含むことができる。いくつかの態様では、処理工程は体積の減少を含み、それによって、所望に応じて細胞の濃度を増加させることができる。いくつかの態様では、処理工程は、体積の追加を含み、それによって、所望に応じて細胞の濃度を減少させることができる。いくつかの態様では、処理は、形質導入および/または拡大させた細胞に、一定量の製剤化緩衝液を添加することを含む。いくつかの態様では、製剤化緩衝液の体積は、10mL~1000mLまたは概ね該値の体積、例えば少なくとも50mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mLもしくは1000mL、または概ね少なくとも該値の体積、または概ね該値の体積である。

30

【0152】

いくつかの態様において、細胞組成物を製剤化するためのそのような処理工程は、閉鎖系で行われる。そのような処理工程の例は、Sepax（登録商標）またはSepax 2（登録商標）細胞処理システムを伴う使用のためのものを含む、Biosafe SAによって製造され販売されている遠心分離チャンバのような、細胞処理システムに関連する1つまたは複数のシステムまたはキットと組み合わせた遠心分離チャンバを用いて行われ得る。例示的なシステムおよび方法は、国際公開WO2016/073602に記載されている。いくつかの態様では、方法は、上述の態様のいずれかにおいて、遠心分離チャンバの内部キャビティからの、薬学的に許容される緩衝剤などの製剤化緩衝剤中に製剤化された細胞の成果組成物である製剤化組成物の取り出しを行うことを含む。いくつかの態様では、製剤化組成物の取り出しは、閉鎖系の一部として遠心分離チャンバと動作可能に連結されているバッグなどの容器に対するものである。いくつかの態様では、バッグなどの容器は、排出ラインまたは排出位置でシステムに接続されている。

40

【0153】

いくつかの態様では、遠心分離チャンバまたは細胞処理システムに関連するものなどの

50

閉鎖系は、チューブラインの各端部に、ポートと接続された多方向のチューブマニホールドを含む多ポート排出キットを含み、製剤化組成物の取り出しのために、ポートに1つまたは複数の容器を接続することができる。いくつかの局面では、所望の数または複数の排出容器、例えばバッグを、少なくとも3、4、5、6、7、8つまたはそれより多いといった、1つまたは複数、一般には2つまたはそれより多い多ポート排出のポートに、滅菌して接続することができる。例えば、いくつかの態様では、1つまたは複数の容器、例えばバッグをポートに取り付けることができ、または全ポートよりも少ないポートに取り付けることができる。したがって、いくつかの態様では、システムは、排出する組成物の複数の排出バッグ内への取り出しを行うことができる。いくつかの局面では、単回単位投与量の投与または複数回投与量の投与などの投与量の投与の量で、細胞は複数の排出バッグの1つまたは複数に取り出されることができる。例えば、いくつかの態様では、排出バッグはそれぞれ、所与の用量またはその分割量で投与するための細胞数を含み得る。したがって、いくつかの局面において、各バッグは、投与のための単回単位用量を含んでいても、2つの排出バッグ、または3つの排出バッグのような、複数の排出バッグのうちの2つ以上が、総合して投与のための1用量を構成するように、所望の用量の分割量を含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0154】

したがって、容器、例えば排出バッグは、一般に、投与される細胞、例えばその1つまたは複数のその単位用量を含む。単位用量は、対象に投与されるべき細胞の量もしくは数、または投与されるべき細胞の数の2倍（もしくはそれ以上）であり得る。それは、対象に投与される細胞の最低の用量または最低可能用量であり得る。

【0155】

いくつかの態様では、容器（例えば、バッグ）のそれぞれは、単位用量の細胞を個別に含む。したがって、いくつかの態様では、各容器は、同じ、またはほぼ同じ、もしくは実質的に同じ数の細胞を含む。いくつかの態様では、各単位用量は、少なくともまたは概ね少なくとも 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、または 1×10^8 の操作された細胞、全細胞、T細胞、またはPBMCを含む。いくつかの態様では、各バッグの製剤化細胞組成物の体積は、10mL～100mL、例えば少なくともまたは概ね少なくとも20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mLもしくは100mLである。

【0156】

いくつかの態様では、この方法によって産生されたそのような細胞、またはそのような細胞を含む組成物は、疾患または状態を治療するために対象に投与される。

【0157】

III. 組換えタンパク質

いくつかの態様では、細胞の拡大または培養等のための培養方法は、組換えタンパク質で遺伝子操作された細胞、例えば形質導入された細胞に対して行われる。いくつかの態様では、組換えタンパク質は組換え受容体、例えば抗原受容体であるか、それを含む。抗原受容体は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む機能的非TCR抗原受容体、およびトランスジェニックT細胞受容体（TCR）などの他の抗原結合受容体を含み得る。受容体はまた、他の受容体、例えば他のキメラ受容体、例えば特定のリガンドに結合し、CARに存在するものと類似の膜貫通および/または細胞内シグナル伝達ドメインを有する受容体を含み得る。

【0158】

CARを含む例示的な抗原受容体、およびそのような受容体を操作して細胞に導入する方法は、例えば、国際特許出願公開番号WO200014257、WO2013126726、WO2012/129514、WO2014031687、WO2013/166321、WO2013/071154、WO2013/123061、米国特許出願公開番号US2002131960、US2013287748、US20130149337、米国特許第6,451,995号、第7,446,190号、第8,252,592号、第8,339,645号、第8,398,282号、第7,446,179号、第6,410,319号、第7,070,995号、第7,265,209号、第7,354,762号、第7,446,191号、第8,324,353号、および第8,479,118号、ならびに欧州特許出願である欧州特許第2537416号に記載されているもの、および/またはSadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 Oct

ober; 24 (5) : 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18 (2) : 160-75に記載されているものを含む。いくつかの局面では、抗原受容体は、米国特許第7,446,190号に記載されているようなCAR、および国際特許出願公開番号WO/2014055668 A1に記載されているものを含む。CARの例は、WO2014031687、US8,339,645、US7,446,179、US 2013/0149337、米国特許第7,446,190号、米国特許第8,389,282号、Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35 (9) : 689-701;およびBrentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5 (177) などの前述の刊行物のいずれかに記載のCARを含む。また、WO2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、米国特許第7,446,190号、および米国特許第8,389,282号を参照されたい。

10

【0159】

いくつかの態様では、組換えタンパク質をコードする核酸は、例えば受容体を発現するための細胞の形質導入または操作、および/またはポリヌクレオチドによりコードされる分子を発現する細胞の選択および/または標的化を確認する目的で、1つまたは複数のマーカーをさらにコードする。いくつかの局面では、そのようなマーカーは異なる核酸またはポリヌクレオチドによってコードされてもよく、それはまた、典型的には同じ方法、例えば本明細書に提供される方法のいずれかによる形質導入、例えば同じベクターまたはベクターの種類を介して、遺伝子操作方法の間に導入できる。

【0160】

いくつかの局面において、マーカー、例えば形質導入マーカーはタンパク質であり、および/または細胞の表面の分子である。例示的なマーカーは、天然に存在する、例えば内因性マーカー、例えば天然に存在する細胞の表面の分子などのトランケート型 (truncated) 変異体である。いくつかの局面では、変異体は、天然のまたは内因性の細胞の表面の分子と比較して、免疫原性の低下、輸送機能の低下、および/またはシグナル伝達機能の低下を有する。いくつかの態様において、マーカーはトランケート型EGFR (tEGFR) のようなトランケート型の変形の細胞表面受容体である。いくつかの局面では、マーカーはCD34、NGFR、または上皮成長因子受容体 (例えば、tEGFR) の全部または一部 (例えば、トランケート型の形態) を含む。いくつかの態様において、マーカーをコードする核酸は、切断可能なリンカー配列、例えばT2A、P2A、E2Aおよび/またはF2Aなどのリンカー配列をコードするポリヌクレオチドに、動作可能に連結されている。例えば、WO2014/031687を

20

30

【0161】

いくつかの態様において、マーカーは、T細胞に天然には見出せない、またはT細胞の表面に天然には見出せない分子、例えば細胞の表面のタンパク質、またはその一部である。

【0162】

いくつかの態様において、分子は、非自己分子、例えば非自己タンパク質、すなわち、細胞が養子で移入される宿主の免疫系によって「自己」として認識されないものである。

【0163】

いくつかの態様では、マーカーは治療機能を果たさない、および/または遺伝子操作のためのマーカーとして使用する以外には、例えば成功裏に操作された細胞を選択する以外には、作用をまったくもたらさない。他の態様では、マーカーは、治療用分子または、別段に何らかの所望の作用を発揮する分子、例えばインビボで遭遇する細胞に対するリガンド、例えばリガンドとの養子での移入および遭遇の際に細胞の応答を増強および/または減衰させる共刺激分子または免疫チェックポイント分子であり得る。

40

【0164】

A. キメラ抗原受容体

いくつかの態様では、CARは一般に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達の構成要素に結合した、抗体またはその断片を含有する細胞外部分などの細胞外リガンド結合ドメインを有する、遺伝子操作される受容体である。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを結合する膜貫通ドメインおよび/

50

または細胞内ドメインを含む。そのような分子は、典型的には、天然の抗原受容体を介するシグナルおよび/または共刺激受容体と組み合わせたそのような受容体を介するシグナルを模倣する、またはそれらと近似する。

【0165】

いくつかの態様では、CARは、特定のマーカー、例えば養子療法によって標的とされる特定の細胞型で発現されるマーカー、例えば癌のマーカー、および/または記載される任意の抗原に対する特異性を伴って、構築される。したがって、CARは典型的には、抗体の1つまたは複数の抗原結合断片、ドメイン、もしくは部分、または1つまたは複数の抗体可変ドメイン、および/または抗体分子を含む。いくつかの態様では、CARは、抗体分子の1つまたは複数の抗原結合部分、例えば可変重鎖（VH）もしくはその抗原結合部分、またはモノクローナル抗体（mAb）の可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）に由来する一本鎖抗体断片（scFv）を含む。

10

【0166】

いくつかの態様において、CARは、細胞の表面に発現されるインタクトな抗原などの抗原を特異的に認識する抗体または抗原結合断片（例えばscFv）を含む。

【0167】

いくつかの態様では、抗原（またはリガンド）は腫瘍の抗原または癌のマーカーである。いくつかの態様では、抗原（またはリガンド）は、オーファンチロシンキナーゼ受容体 ROR1、B細胞成熟抗原（BCMA）、炭酸脱水酵素9（CAIX）、tEGFR、Her2/neu（受容体チロシンキナーゼerbB2）、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソセリン、CEA、およびB型肝炎の表面の抗原、抗葉酸（anti-folate）受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、上皮糖タンパク質（epithelial glycoprotein）2（EPG-2）、上皮糖タンパク質40（EPG-40）、EPHa2、erb-B2、erb-B3、erb-B4、erbB二量体、EGFR vIII、葉酸結合タンパク質（FBP）、FCRL5、FCRH5、胎児型アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、キナーゼ挿入ドメイン受容体（kdr）、カップ軽鎖、Lewis Y、L1細胞接着分子、（L1-CAM）、黒色腫関連抗原（MAGE）-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、メラノーマの優先発現抗原（PRAME）、サバイピン、TAG72、B7-H6、IL-13受容体アルファ2（IL-13Ra2）、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、葉酸受容体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6インテグリン、8H9、NCAM、VEGF受容体、5T4、胎児AChR、NKG2Dリガンド、CD44v6、二重抗原、癌精巢抗原、メソテリン、マウスCMV、ムチン1（MUC1）、MUC16、PSCA、NKG 2D、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胎児性抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胎児性抗原（CEA）、Her2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、c-Met、GD-2、O-アセチル化GD2（OGD2）、CE7、ウィルムス腫瘍1（WT-1）、サイクリン、サイクリンA2、CCL-1、CD138、病原体特異的抗原およびユニバーサルタグと会合した抗原、および/またはビオチン化分子、および/またはHIV、HCV、HBVまたは他の病原体によって発現される分子であるか、それらを含む。いくつかの態様において受容体によって標的化される抗原は、いくつかの公知のB細胞マーカーのいずれかなどの、B細胞悪性腫瘍に関連する抗原を含む。いくつかの態様において、受容体によって標的化される抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig、Ig、CD79a、CD79bまたはCD30である。

20

30

40

【0168】

いくつかの態様では、抗原は病原体特異的抗原である。いくつかの態様において、抗原はウイルスの抗原（例えば、HIV、HCV、HBVなどからのウイルス抗原）、細菌の抗原、および/または寄生虫の抗原である。

【0169】

いくつかの態様では、CARは、細胞の表面にMHCペプチド複合体として提示される腫瘍関連抗原などの細胞内抗原を特異的に認識する、抗体または抗原結合断片（例えばscFv）などのTCR様抗体を含有する。いくつかの態様において、MHCペプチド複合体を認識する抗体またはその抗原結合部分は、抗原受容体などの組換え受容体の一部として細胞に発現させることができる。抗原受容体の中には、キメラ抗原受容体（CAR）などの機能的非TCR抗原

50

受容体がある。一般に、ペプチドMHC複合体に対して向けられたTCR様特異性を示す抗体または抗原結合断片を含有するCARはまた、TCR様CARと称することができる。

【0170】

いくつかの態様では、CARの細胞外部分、例えばその抗体部分は、スパーサー、例えばscFvなどの抗原認識構成要素と、膜貫通ドメインと間のスパーサー領域などをさらに含む。スパーサーは、免疫グロブリン定常領域またはその変異体もしくは修飾型の少なくとも一部、例えば、ヒンジ領域、例えば、IgG4ヒンジ領域、および/またはCH1/CLおよび/またはFc領域であり得るか、それらを含み得る。いくつかの態様では、定常領域または部分は、IgG4またはIgG1などのヒトIgGのものである。スパーサーは、スパーサーが存在しない場合と比較して、抗原結合後の細胞の応答性の増大をもたらす長さのものであり得る。いくつかの例では、スパーサーは、長さが12または約12アミノ酸であるか、長さが12アミノ酸以下である。例示的なスパーサーとしては、少なくとも約10~229アミノ酸、約10~200アミノ酸、約10~175アミノ酸、約10~150アミノ酸、約10~125アミノ酸、約10~100アミノ酸、約10~75アミノ酸、約10~50アミノ酸、約10~40アミノ酸、約10~30アミノ酸、約10~20アミノ酸、または約10~15アミノ酸を有し、また列挙された範囲のいずれかの終点の間の任意の整数を含むものが挙げられる。いくつかの態様において、スパーサー領域は、約12以下のアミノ酸、約119以下のアミノ酸、または約229以下のアミノ酸を有する。例示的なスパーサーは、IgG4ヒンジ単独、CH2およびCH3ドメインに結合したIgG4ヒンジ、またはCH3ドメインに結合したIgG4ヒンジを含む。例示的なスパーサーとしては、Hudecek et al. (2013) Clin.Cancer Res., 19:3153または国際特許出願公開番号WO2014/031687に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0171】

抗原認識ドメインなどの細胞外リガンド結合は、一般に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達成分、例えばCARの場合にはTCR複合体などの抗原受容体複合体を介した活性化を模倣するシグナル伝達成分、および/または他の細胞表面受容体を介してシグナル伝達するシグナル伝達成分に結合する。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する。いくつかの態様において、CARは細胞外ドメインに融合した膜貫通ドメインを含む。一態様では、受容体中のドメインのうちの1つ、例えばCARと天然に関連している膜貫通ドメインが使用される。いくつかの例において、膜貫通ドメインは、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのそのようなドメインの結合を回避して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、アミノ酸の置換により選択または修飾される。

30

【0172】

いくつかの態様における膜貫通ドメインは、天然の供給源または合成の供給源のいずれかに由来する。供給源が天然である場合、いくつかの局面におけるドメインは任意の膜結合型または膜貫通型のタンパク質に由来する。膜貫通領域には、T細胞受容体の鎖、鎖または鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137またはCD154に由来する（すなわち、少なくともその膜貫通領域を含む）ものが含まれる。いくつかの態様における膜貫通ドメインは合成的である。いくつかの局面において、合成膜貫通ドメインは、ロイシンやバリンなどの主に疎水性の残基を含む。いくつかの局面において、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。いくつかの態様において、結合は、リンカー、スパーサー、および/または膜貫通ドメインによる。

40

【0173】

いくつかの態様では、短いオリゴ-またはポリペプチドリナー、例えば長さが2~10アミノ酸のリンカー、例えばグリシン-セリンダブレットなどのグリシンおよびセリンを含むものが存在し、CARの膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインの間に結合を形成する。

【0174】

組換え受容体、例えばCARは、一般に、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達成分を含む

50

。いくつかの態様では、受容体は、T細胞活性化および細胞毒性を媒介するTCR CD3鎖、例えばCD3ゼータ鎖などのTCR複合体の細胞内成分を含む。したがって、いくつかの局面において、抗原結合部分は1つまたは複数の細胞シグナル伝達モジュールに連結されている。いくつかの態様において、細胞シグナル伝達モジュールは、CD3膜貫通ドメイン、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、および/または他のCD膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様では、受容体、例えばCARは、Fc受容体、CD8、CD4、CD25、またはCD16などの1つもしくは複数の追加の分子の一部をさらに含む。例えば、いくつかの局面において、CARまたは他のキメラ受容体は、CD3-ゼータ（CD3- ）またはFc受容体とCD8、CD4、CD25またはCD16との間のキメラ分子を含む。

【0175】

10

いくつかの態様では、CARまたは他のキメラ受容体の連結時に、受容体の細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、正常なエフェクター機能または免疫細胞、例えばCARを発現するように操作されたT細胞の応答の少なくとも1つを活性化する。例えば、いくつかの状況では、CARは、細胞溶解活性またはTヘルパー活性、例えばサイトカインの分泌または他の因子などのT細胞の機能を誘導する。いくつかの態様では、抗原受容体成分または共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインのトランケート部分が、例えばそれがエフェクター機能のシグナルを伝達する場合、無傷の免疫刺激鎖の代わりに使用される。いくつかの態様において、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体（TCR）の細胞質配列、およびいくつかの局面において、天然の状況でかような受容体と協調して作用して抗原受容体結合に続くシグナル伝達を開始する共受容体のもの、および/またはそのような分子の任意の誘導体もしくは変異体、および/または同じ機能的能力を有する任意の合成配列を含む。

20

【0176】

天然のTCRの状況では、完全な活性化は一般に、TCRを介するシグナル伝達だけでなく共刺激シグナルも必要とする。したがって、いくつかの態様では、完全な活性化を促進するために、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための成分もCARに含まれる。他の態様では、CARは共刺激シグナルを生成するための成分を含まない。いくつかの局面では、追加のCARが同じ細胞で発現され、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための成分を提供する。

【0177】

30

T細胞活性化は、いくつかの局面において、少なくとも2つのクラスの細胞質シグナル伝達配列:TCRを介して抗原依存性の一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）、および抗原非依存的に作用して二次シグナルまたは共刺激シグナル（二次細胞質シグナル伝達配列）を提供するものによって媒介されるものとして記載される。いくつかの局面では、CARはそのようなシグナリング構成要素の一方または両方を含む。

【0178】

いくつかの局面では、CARはTCR複合体の一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激的に作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして公知であるシグナル伝達モチーフを含み得る。一次細胞質シグナル伝達配列を含むITAMの例には、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD8、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するものが含まれる。いくつかの態様では、CARの細胞質シグナル伝達分子は、細胞質シグナル伝達ドメイン、その一部、またはCD3ゼータに由来する配列を含む。

40

【0179】

いくつかの態様で、CARは、CD28、4-1BB、OX40、CD27、DAP10、およびICOSなどの共刺激受容体のシグナル伝達ドメインおよび/または膜貫通部分を含む。いくつかの局面では、同じCARは活性化成分と共刺激成分の両方を含む。

【0180】

いくつかの態様では、活性化ドメインは1つのCAR内に含まれ、一方、共刺激成分は他の抗原を認識する他のCARによって提供される。いくつかの態様では、CARは、両方とも同じ

50

細胞上で発現される活性化または刺激CAR、および共刺激CARを含む（WO2014/055668を参照）。いくつかの局面において、CARは刺激性または活性化のCARである。他の局面では、それは共刺激性CARである。いくつかの態様では、細胞はさらに、異なる抗原を認識するCARなどの抑制性CAR（iCAR、Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5（215）（December, 2013））を参照）を含み、それによって第1の抗原を認識するCARを介して伝達される活性化シグナルは、例えばオフターゲット効果を減少させるために、阻害性CARのそのリガンドへの結合によって減少または阻害される。

【0181】

いくつかの態様において、CD8⁺細胞傷害性T細胞の細胞内シグナル伝達ドメインはCD4⁺ヘルパーT細胞の細胞内シグナル伝達ドメインと同じである。いくつかの態様において、CD8⁺細胞傷害性T細胞の細胞内シグナル伝達ドメインは、CD4⁺ヘルパーT細胞の細胞内シグナル伝達ドメインとは異なる。

10

【0182】

特定の態様では、細胞内シグナル伝達領域は、CD3（例えば、CD3-ゼータ）細胞内ドメインに連結したCD28膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達領域は、CD3ゼータ細胞内ドメインに連結したキメラCD28およびCD137（4-1BB、TNFRSF9）共刺激ドメインを含む。

【0183】

いくつかの態様では、CARは、細胞質部分における1つまたは複数、例えば2つまたはそれより多い共刺激ドメインおよび活性化ドメイン、例えば一次活性化ドメインを包含する。例示的なCARは、CD3-ゼータ、CD28、および4-1BBの細胞内成分を含む。

20

【0184】

場合によっては、CARは、第1、第2、および/または第3世代のCARと呼ばれる。いくつかの局面において、第1世代のCARは、抗原の結合の際にCD3鎖誘導シグナルを単独で提供するものである。いくつかの局面では、第2世代のCARは、CD28またはCD137などの共刺激受容体からの細胞内シグナル伝達ドメインを含むものなど、そのようなシグナルおよび共刺激シグナルを提供するものである。いくつかの局面において、いくつかの局面の第3世代のCARは、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むものである。

【0185】

いくつかの態様では、キメラ抗原受容体は、抗体またはその断片などの抗原結合部分などの細胞外リガンド結合部分を細胞内ドメインに含む。いくつかの態様において、抗体または断片はscFvまたは単一ドメインVH抗体を含み、細胞内ドメインはITAMを含む。いくつかの局面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ（CD3_ζ）鎖のゼータ鎖のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインを含む。いくつかの局面において、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通部分を含む。細胞外ドメインと膜貫通は、直接的または間接的に連結することができる。いくつかの態様では、細胞外ドメインと膜貫通は、本明細書に記載されるいずれかのものなどのスペーサーによって連結されている。いくつかの態様では、キメラ抗原受容体は、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間など、T細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含む。いくつかの局面において、T細胞共刺激分子はCD28または4-1BBである。

30

40

【0186】

いくつかの態様では、CARは、抗体、例えば抗体断片、CD28の膜貫通部分またはその機能的変異体であるか、それらを含む膜貫通ドメイン、ならびにCD28のシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータのシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む。いくつかの態様では、CARは、抗体、例えば抗体断片、CD28の膜貫通部分またはその機能的変異体であるか、それらを含む膜貫通ドメイン、ならびに4-1BBのシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3ゼータのシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む。いくつかのそのような態様において、受容体はさらに、ヒトIg分子などのIg分子の一部、例え

50

ばIgG4ヒンジなどのIgヒンジを含むスペーサー、例えばヒンジのみのスペーサーを含む。

【0187】

いくつかの態様において、受容体、例えばCARの膜貫通ドメインは、ヒトCD28の膜貫通ドメインまたはその変異体、例えば、ヒトCD28の27アミノ酸膜貫通ドメイン（アクセッション番号:P10747.1）である。いくつかの態様において、細胞内ドメインは、ヒトCD28の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的変異体、例えばその41アミノ酸ドメインおよび/または天然CD28タンパク質の186～187位にLLからGGへの置換を有するドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内ドメインは、4-1BBの細胞内共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的変異体、例えばヒト4-1BBの42アミノ酸細胞質ドメイン（アクセッション番号Q07011.1）を含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3 のアイソフォーム3の112 AA細胞質ドメイン（アクセッション番号:P20963.2）などの、ヒトCD3ゼータ刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的変異体、または米国特許第7,446,190号に記載されているCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの局面において、スペーサーは、IgG4またはIgG1のヒンジのみなど、IgGのヒンジ領域のみを含有する。他の態様では、スペーサーは、CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインに結合したIgヒンジ、例えばIgG4ヒンジである。いくつかの態様において、スペーサーは、CH2ドメインおよびCH3ドメインに結合したIgヒンジ、例えばIgG4ヒンジである。いくつかの態様では、スペーサーは、CH3ドメインのみに結合しているIgヒンジ、例えばIgG4ヒンジである。いくつかの態様では、スペーサーは、グリシン-セリンリッチな配列または他の可撓性のリンカー、例えば公知の可撓性リンカーであるか、それらを含む。

10

20

【0188】

例えば、いくつかの態様において、CARは以下を含む：抗原、例えば本明細書に記載の抗原等の抗原に特異的に結合する、sdAbおよびscFvを含む抗体またはその断片などの抗原結合部分などの細胞外リガンド結合部分；任意のIgヒンジ含有スペーサーなどのスペーサー；CD28の一部である膜貫通ドメインまたはその変異体；CD28のシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む細胞内シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ゼータシグナル伝達ドメインのシグナル伝達部分またはその機能的変異体。いくつかの態様において、CARは以下を含む：抗原、例えば本明細書に記載の抗原等の抗原に特異的に結合する、sdAbおよびscFvを含む抗体またはその断片などの抗原結合部分などの細胞外リガンド結合部分；任意のIgヒンジ含有スペーサーなどのスペーサー；CD28の一部である膜貫通ドメインまたはその変異体；4-1BBのシグナル伝達部分またはその機能的変異体を含む細胞内シグナル伝達ドメイン；ならびにCD3ゼータシグナル伝達ドメインのシグナル伝達部分またはその機能的変異体。いくつかの態様において、そのようなCAR構築物は、例えばCARの下流に、T2Aリボソームスキップ要素および/またはtEGFR配列をさらに含む。

30

【0189】

B.T細胞受容体（TCR）

いくつかの態様では、組換えタンパク質は組換えT細胞受容体（TCR）であるか、それを含む。いくつかの態様では、組換えTCRは、抗原、一般に標的細胞に存在する抗原、例えば腫瘍特異的抗原、自己免疫疾患または炎症性疾患に関連する特定の細胞型上で発現される抗原、またはウイルス性病原体または細菌性病原体に由来する抗原に特異的である。

40

【0190】

いくつかの態様において、TCRは天然に存在するT細胞からクローン化されたものである。いくつかの態様において、標的抗原（例えば、癌の抗原）に対する高親和性T細胞のクローンが同定され、患者から単離される。いくつかの態様において、標的抗原に対するTCRクローンは、ヒト免疫系遺伝子（例えば、ヒト白血球抗原系、すなわちHLA）を用いて操作されたトランスジェニックマウスにおいて生成されている。例えば、腫瘍の抗原について参照されたい（例えば、Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 and Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808参照）。いくつかの態様では、ファージディスプレイを用いて、標的抗原に対するTCRを単離する（例えば、Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 and Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354

50

を参照)。

【0191】

いくつかの態様では、T細胞クローンが得られた後、TCRアルファ鎖およびベータ鎖が単離され、遺伝子発現ベクターにクローニングされる。いくつかの態様では、TCRアルファおよびベータ遺伝子は、両方の鎖が共発現されるようにピコルナウイルス2Aリボソームスキップペプチドを介して連結されている。いくつかの態様において、TCRをコードする核酸は、受容体を発現するための細胞の形質導入または操作を確認するためのマーカーをさらに含む。

【0192】

IV. 定義

10

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語、表記および他の技術的および科学的用語または術語は、特許請求の範囲に関連する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有するように意図されている。いくつかの場合において、一般に理解されている意味を有する用語を、明確にするため、および/または容易に参照するために、本明細書に定義されている。本明細書においてそのような定義を含むことは、当技術分野において一般に理解されているものに対する実質的な相違を表すと必ずしも解釈されるべきではない。

【0193】

本明細書で使用されるとき、単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の指示対象を含む。例えば、「a」または「an」は、「少なくとも1つ」または「1つまたは複数」を意味する。本明細書に記載の局面および変形は、局面および変形「からなる」および/または「本質的にからなる」を含むことが理解される。本明細書において使用される「および/または」という用語は、関連する列挙された項目のうちの1つまたは複数のありとあらゆる可能な組み合わせを示し、かつそれらを包含することも理解されたい。さらに、「含む」、「含んでいる」、「構成する」、および/または「構成している」という用語は、本明細書において使用される場合、記載された特徴、整数、工程、動作、要素、構成要素、および/またはユニットの存在を特定するが、1つまたは複数の他の特徴、整数、工程、動作、要素、構成要素、ユニット、および/またはそれらの群の存在または追加を排除するものではないことを理解されたい。

20

30

【0194】

本願は、本文および図においていくつかの数値範囲を開示している。本開示を開示された数値範囲全体にわたって実施することができるので、正確な範囲の限定が本明細書に逐語的には記載されていなくても、開示の数値範囲は、終点を含む開示の数値範囲内の任意の範囲または値を本質的に裏付けている。

【0195】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが結合している別の核酸を増殖させることができる核酸分子を示す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびにそれが導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれているベクターを含む。特定のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。ベクターの中にはレトロウイルスのようなウイルスベクター、例えばガンマレトロウイルスおよびレンチウイルスベクターがある。

40

【0196】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、そのような細胞の子孫を含む、外因性核酸が導入されている細胞を示す。宿主細胞には、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これらは一次形質転換細胞および継代の数に関係なくそれに由来する子孫を含む。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一ではない場合があるが、突然変異を含む場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異子

50

孫が本明細書に含まれる。

【0197】

本明細書で使用される場合、特定のマーカーについて細胞または細胞の集団が「陽性」とあるという記載は、特定のマーカー、典型的には表面のマーカーが細胞上または細胞内に検出可能に存在していることを示す。表面のマーカーについて言及する場合、この用語は、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色すること、および該抗体を検出することによって、フローサイトメトリーによって検出される表面の発現の存在を示し、ここで染色は、他の点では同一の条件下で、アイソタイプ適合対照と同じ手順を実施して検出される染色より実質的に高いレベルで、および/またはマーカーに対して陽性であることが公知である細胞のレベルと実質的に同様のレベルで、および/またはマーカーについて陰性であることが公知である細胞よりも実質的に高いレベルで、フローサイトメトリーにより検出可能である。

10

【0198】

本明細書で使用される場合、特定のマーカーについて細胞または細胞集団が「陰性」とあるという記載は、特定のマーカー、典型的には表面のマーカーの細胞上または細胞内に実質的に検出可能な存在がないことを示す。表面のマーカーについて言及する場合、この用語は、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色すること、および該抗体を検出することによってフローサイトメトリーによって検出される表面の発現の不在を示し、ここで染色は、他の点では同一の条件下でアイソタイプ適合対照と同じ手順を実施して検出される染色より実質的に高いレベルで、および/またはマーカーに対して陽性であることが公知である細胞のレベルよりも実質的に低いレベルで、および/またはマーカーについて陰性であることが公知である細胞と実質的に同様のレベルで、フローサイトメトリーにより検出されることがない。

20

【0199】

本明細書で使用されるとき、組成物は、細胞を含む、2つまたはそれより多い生成物、物質、または化合物の任意の混合物を意味する。組成物は、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはそれらの任意の組合わせであり得る。

【0200】

本明細書で使用される場合、「対象」は、ヒトまたは他の動物などの哺乳動物であり、典型的にはヒトである。

30

【0201】

本願で言及される特許文書、科学論文およびデータベースを含むすべての刊行物は、あたかも各個々の刊行物が個別に参照により組み込まれるのと同程度に、すべての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。本明細書に記載の定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開出願、および他の刊行物に記載の定義と相反する、またはさもなければ矛盾する場合、本明細書に記載の定義は、参照により本明細書に組み込まれる定義を上回る。

【0202】

本明細書で使用されている節の見出しは、編成する目的のためだけであり、記載されている主題を限定するものとして解釈するべきではない。

40

【0203】

V. 例示的な態様

1.

供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む複数のポートを含む、上面と、

底面と、

前記灌流ポートに流体接続された灌流フィルタと

を含むバイオリアクタバッグ；ならびに

前記バイオリアクタバッグの前記灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグ

を含む、バイオリアクタバッグアセンブリ。

50

2．前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の端部と、前記第1の端部と反対側の第2の端部とを有し、前記灌流ポートが前記第1の端部よりも前記第2の端部に近い、態様1のバイオリアクタバッグアセンブリ。

3．前記供給ポートおよび前記サンプリングポートが、前記第2の端部よりも前記第1の端部に近い、態様1～2のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

4．前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の側面と、前記第1の側面と反対側の第2の側面とを有し、前記供給ポートが前記第2の側面よりも前記第1の側面に近い、態様1～3のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

5．前記サンプリングポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、態様4のバイオリアクタバッグアセンブリ。

6．前記灌流ポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、態様4～5のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

7．前記灌流フィルタが前記バイオリアクタバッグの内側にある、態様1～6のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

8．前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成をさらに含む、態様1～7のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

9．前記供給チューブ構成がポリ塩化ビニル（PVC）チューブを含む、態様8のバイオリアクタバッグアセンブリ。

10．前記供給チューブ構成が2つの入口を有するように、前記供給チューブ構成がY字型コネクタを含む、態様8～9のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

11．前記サンプリングポートに流体接続されたサンプリングチューブ構成をさらに含む、態様1～10のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

12．前記サンプリングチューブ構成がPVCチューブを含む、態様11のバイオリアクタバッグアセンブリ。

13．前記廃棄物バッグが、廃棄物チューブ構成を介して前記灌流ポートに流体接続されている、態様1～12のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

14．前記廃棄物チューブ構成がPVCチューブを含む、態様13のバイオリアクタバッグアセンブリ。

15．前記複数のポートがガス入口ポートとガス出口ポートとをさらに含む、態様1～14のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

16．前記バイオリアクタバッグの前記上面が、前記第1の端部と前記第2の端部との間の中間にある中心を有し、前記ガス入口ポートおよび前記ガス出口ポートが、前記第1の端部または前記第2の端部よりも前記中心に近い、態様15のバイオリアクタバッグアセンブリ。

17．前記複数のポートが、前記供給ポート、前記サンプリングポート、前記灌流ポート、前記ガス入口ポート、および前記ガス出口ポートからなる、態様15～16のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

18．前記ガス入口ポートに流体接続された入口フィルタを含むガス入口チューブ構成と、前記ガス出口ポートに流体接続された排気フィルタを含むガス出口チューブ構成とをさらに含む、態様15～17のいずれか一つのバイオリアクタバッグアセンブリ。

19．

バイオリアクタロッカー；ならびに

供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む複数のポートを含む、上面と、

底面と、

前記灌流ポートに流体接続された灌流フィルタと、

バイオリアクタバッグの前記灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグと

を含む、前記バイオリアクタロッカーに支持されたバイオリアクタバッグ

を含むバイオリアクタシステム。

20．前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成をさらに含む、態様19のバイオ

10

20

30

40

50

リアクタシステム。

21．前記供給チューブ構成が第1および第2の入口を有するように、前記供給チューブ構成がY字型コネクタを含む、態様20のバイオリアクタシステム。

22．細胞培地供給源が、前記供給チューブ構成の各入口に流体接続されている、態様21のバイオリアクタシステム。

23．各入口がPVCを含み、前記細胞培地供給源が前記入口の前記PVCに接合されている、態様22のバイオリアクタシステム。

24．細胞供給源が前記第1の入口に流体接続され、細胞培地供給源が前記第2の入口に流体接続される、態様21のバイオリアクタシステム。

25．各入口がPVCを含み、前記細胞供給源が前記第1の入口の前記PVCに接合され、前記細胞培地供給源が前記第2の入口の前記PVCに接合されている、態様24のバイオリアクタシステム。

26．前記灌流フィルタが前記バイオリアクタバッグの内側にある、態様19～25のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

27．前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の端部と、前記第1の端部と反対側の第2の端部とを有し、前記灌流ポートが前記第1の端部よりも前記第2の端部に近い、態様19～26のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

28．前記供給ポートおよび前記サンプリングポートが、前記第2の端部よりも前記第1の端部に近い、態様27のバイオリアクタシステム。

29．前記バイオリアクタバッグの前記上面が、第1の側面と、前記第1の側面と反対側の第2の側面とを有し、前記供給ポートが前記第2の側面よりも前記第1の側面に近い、態様19～28のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

30．前記サンプリングポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、態様29のバイオリアクタシステム。

31．前記灌流ポートが、前記第1の側面よりも前記第2の側面に近い、態様29～30のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

32．前記灌流フィルタが前記バイオリアクタバッグの内側にある、態様19～31のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

33．前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成をさらに含む、態様19～32のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

34．前記供給チューブ構成がポリ塩化ビニル（PVC）チューブを含む、態様33のバイオリアクタシステム。

35．前記供給チューブ構成が2つの入口を有するように、前記供給チューブ構成がY字型コネクタを含む、態様33～34のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

36．前記サンプリングポートに流体接続されたサンプリングチューブ構成をさらに含む、態様19～35のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

37．前記サンプリングチューブ構成がPVCチューブを含む、態様36のバイオリアクタシステム。

38．前記廃棄物バッグが、廃棄物チューブ構成を介して前記灌流ポートに流体接続されている、態様19～37のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

39．前記廃棄物チューブ構成がPVCチューブを含む、態様38のバイオリアクタシステム。

40．前記複数のポートがガス入口ポートとガス出口ポートとをさらに含む、態様19～39のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

41．前記バイオリアクタバッグの前記上面が、前記第1の端部と前記第2の端部との間の中間にある中心を有し、前記ガス入口ポートおよび前記ガス出口ポートが、前記第1の端部または前記第2の端部よりも前記中心に近い、態様40のバイオリアクタシステム。

42．前記複数のポートが、前記供給ポート、前記サンプリングポート、前記灌流ポート、前記ガス入口ポート、および前記ガス出口ポートからなる、態様40～41のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

10

20

30

40

50

4 3 . 前記ガス入口ポートに流体接続された入口フィルタを含むガス入口チューブ構成と、前記ガス出口ポートに流体接続された排気フィルタを含むガス出口チューブ構成とをさらに含む、態様40~42のいずれか一つのバイオリアクタシステム。

4 4 .

供給ポート、サンプリングポート、および灌流ポートを含む複数のポートを含む、上面と、底面と、前記灌流ポートに流体接続された灌流フィルタとを含む、バイオリアクタバッグ、

前記バイオリアクタバッグの前記灌流ポートに流体接続された廃棄物バッグ、を含むバイオリアクタバッグアセンブリのバイオリアクタバッグを準備する工程；ならびに

細胞培地を前記供給ポートを通して前記バイオリアクタバッグに供給する工程；

細胞を前記供給ポートを通して前記バイオリアクタバッグに供給する工程；

バイオリアクタロッカーから提供される揺動を使用しながら前記バイオリアクタバッグ中の前記細胞を培養する工程；

廃濾液を前記灌流ポートを通して前記廃棄物バッグに移送する工程；ならびに

前記培養した細胞を収集する工程

を含む、バイオリアクタシステムを使用する方法。

4 5 . 前記バイオリアクタバッグアセンブリが、前記供給ポートに流体接続された供給チューブ構成を含み、前記供給チューブ構成が、前記供給チューブ構成が第1の入口および第2の入口を有するようにY字型コネクタを含む、態様44の方法。

4 6 . 前記細胞培地が、細胞培地供給源を前記第1の入口に接合することによって添加される、態様45の方法。

4 7 . 前記細胞が、細胞供給源を前記第1の入口に接合することによって添加される、態様45の方法。

4 8 . 前記細胞培地が、細胞培地供給源を前記第1の入口に接合することによって添加され、前記細胞が、細胞供給源を前記第2の入口に接合することによって添加される、態様45の方法。

4 9 . 前記複数のポートがガス入口ポートとガス出口ポートとをさらに含む、態様44~48のいずれか一つの方法。

5 0 . 前記ガス入口ポートを通して細胞培養用ガスを前記バイオリアクタバッグに供給する工程をさらに含む、態様49の方法。

5 1 . 前記ガス出口ポートを通る排気として前記バイオリアクタバッグから前記ガスの一部を除去する工程をさらに含む、態様50の方法。

5 2 . 収集バッグを前記第1または前記第2の入口に接合すること、および前記供給チューブ構成の前記流れの方向を逆にすることによって、前記培養した細胞が収集される、態様45の方法。

5 3 . 前記複数のポートがガス入口ポートを含み、前記方法が前記ガス入口ポートを通して前記バイオリアクタバッグをガスで膨張させる工程をさらに含む、態様44~52のいずれか一つの方法。

5 4 . 前記サンプリングポートを通して前記培養した細胞のサンプルを回収する工程をさらに含む、態様44~53のいずれか一つの方法。

【実施例】

【0204】

VI . 実施例

以下の実施例は説明目的のためだけに含まれ、本発明の範囲を限定することを意図していない。

【0205】

実施例1: 自己由来細胞療法のための操作されたT細胞を生成するための例示的方法

この実施例は、本明細書に提供される特定の態様による自己由来細胞療法のための操作されたT細胞を調製するための、任意の提供される態様のバイオリアクタバッグアセンブ

10

20

30

40

50

リ、例えば図1～7によって示される例示的バイオリアクタバッグアセンブリを利用する例示的プロセスを記載する。

【0206】

CD4+ およびCD8+ 細胞を含む組成物を、免疫親和性に基づく濃縮および凍結 (cryofrozen) によって、ヒト白血球除去サンプルから単離する。続いてCD4+ およびCD8+ 細胞を解凍し、滅菌条件下で閉鎖系に移す。細胞を刺激条件下で培養し、次いで組換え受容体をコードするレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクターで形質導入する。組換え受容体は、抗CD19 CARなどのキメラ抗原受容体 (CAR) であり得る。形質導入後、細胞は、その後の拡大のために、滅菌条件下で閉鎖系に接続されたバイオリアクタバッグアセンブリに移される。

10

【0207】

バイオリアクタバッグアセンブリは、閉鎖系の下で細胞培養条件を調節するバイオリアクタ (例えば、Xuri W25) に接続されている。1つまたは複数のサイトカインを含有する拡大培地を細胞に添加する。バイオリアクタは、静的条件下または灌流下で細胞を培養することができ、それによって新鮮な培地により使用済みの培地を一定の速度で徐々に置き換える。細胞培養拡大の少なくとも一部は、290mL/日、580mL/日、または1160mL/日の速度などの灌流で行われる。バイオリアクタは、0.1L/分またはそれに近い安定した空気の流れを使用して温度を37℃ またはそれに近い温度におよびCO₂濃度を5%またはそれに近い濃度に維持することによって、細胞培養状態を調節する。細胞培養物拡大の少なくとも一部は、5°～10°の角度、例えば6°などのロッキング運動で、5～15RPMの速度、例えば6RPMまたは10RPMなどの一定のロッキング速度で行われる。細胞は、それらが閾値の量または細胞密度に達するまで拡大される。閾値が達成されると、バイオリアクタバッグとバイオリアクタとの間の接続が封止され、バッグはその後の細胞製剤化、例えば凍結のために移送される。

20

【0208】

実施例2: 自己由来細胞療法のための操作されたCD4+ およびCD8+ T細胞組成物を生成するための例示的方法

この実施例は、本明細書に提供される特定の態様による自己由来細胞療法のための操作されたCD4+ およびCD8+ T細胞の別々の組成物を調製するための、任意の提供される態様のバイオリアクタバッグアセンブリ、例えば図1～図7によって示される例示的バイオリアクタバッグアセンブリを利用する例示的プロセスを記載する。

30

【0209】

CD4+ およびCD8+ 細胞の別々の組成物を、免疫親和性に基づく濃縮および凍結によって、ヒト白血球除去サンプルから単離する。組成物のCD4+ およびCD8+ 細胞は続いて解凍され、滅菌条件下で別々に閉鎖系に移される。CD4+ およびCD8+ 細胞を刺激条件下で培養し、次いで組換え受容体をコードするレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクターで形質導入する。組換え受容体は、抗CD19 CARなどのキメラ抗原受容体 (CAR) であり得る。形質導入後、CD4+ およびCD8+ 細胞は別々に、その後の拡大のために、滅菌条件下で閉鎖系に接続されたバイオリアクタバッグアセンブリに移される。

40

【0210】

バイオリアクタバッグアセンブリは、閉鎖系の下で、細胞培養条件を調節するバイオリアクタ (例えば、Xuri W25) に接続されている。1つまたは複数のサイトカインを含有する拡大培地をCD4+ およびCD8+ 細胞に添加する。CD4+ 細胞およびCD8+ 細胞に添加される拡大培地は同じでも異なってもよい。細胞培養拡大の少なくとも一部は、290mL/日、580mL/日、または1160mL/日の速度などの灌流で行われる。バイオリアクタは、0.1L/分またはそれに近い安定した空気の流れを使用して、温度を37℃ またはそれに近い温度およびCO₂濃度を5%またはそれに近い濃度に維持することによって、細胞培養状態を調節する。細胞培養物拡大の少なくとも一部は、5°～10°の間の角度、例えば6°などのロッキング運動で、5～15RPMの速度、例えば6RPMや10RPMなどの一定のロッキング速度で行われる。C

50

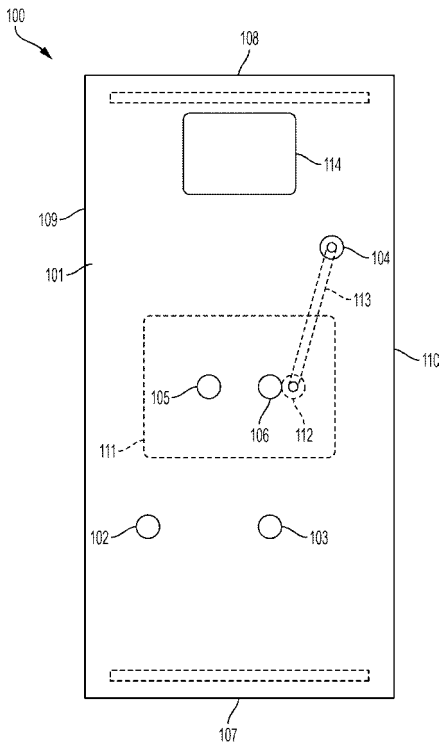
D4 + およびCD8 + 細胞は、それぞれ別々に、それらが閾値の量または細胞密度に達するまで拡大される。閾値が達成されると、バイオリアクタバッグとバイオリアクタとの間の接続が封止され、バッグはその後の細胞製剤化、例えば凍結のために移送される。

【 0 2 1 1 】

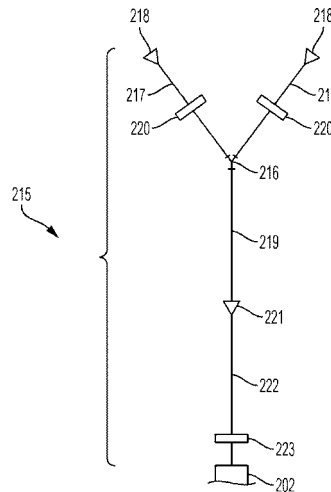
上述の説明は、当業者が本開示を行い使用することを可能にするために提示されており、特定の用途およびその要件の状況において提供される。好ましい態様に対する様々な変更は当業者に容易に明らかになり、本明細書において定義された一般的な原理を、本開示の精神および範囲から逸脱することなく他の態様および用途に適用してもよい。したがって、本開示は、記載された態様に限定されることを意図するものではないが、本明細書において開示された原理および特徴と一致する最も広い範囲にふさわしいものである。

10

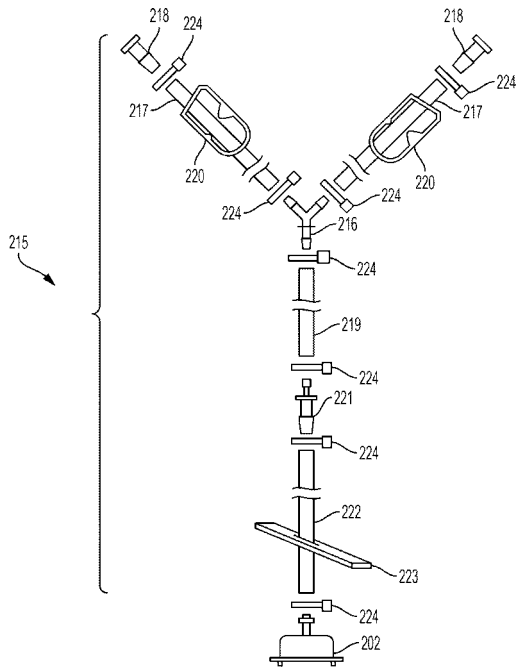
【 図 1 】



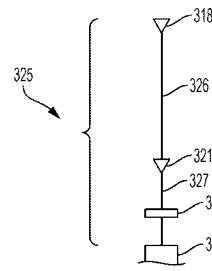
【 図 2 A 】



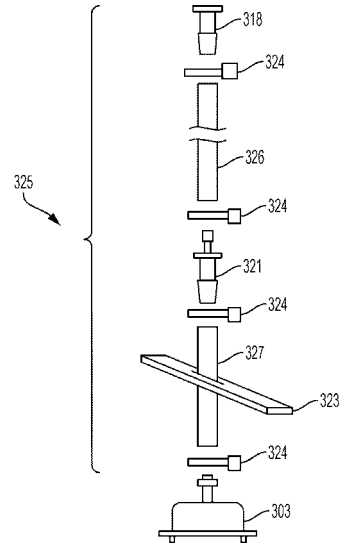
【図 2 B】



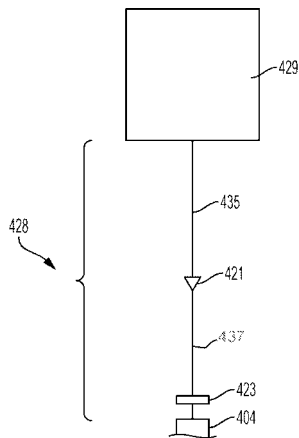
【図 3 A】



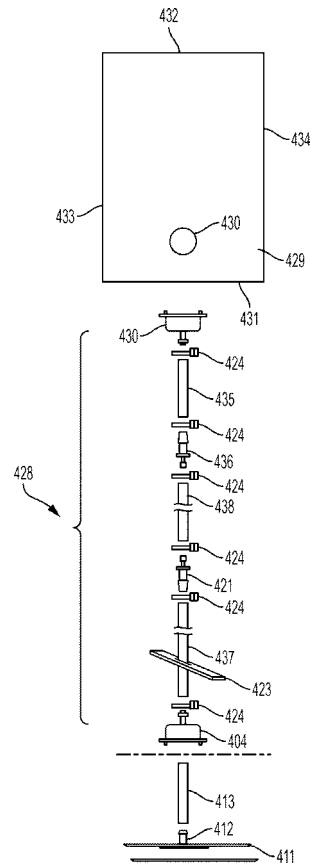
【図 3 B】



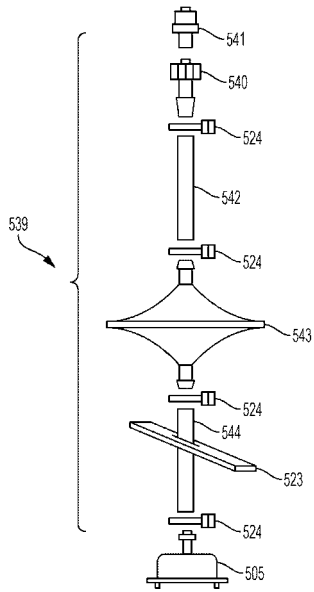
【図 4 A】



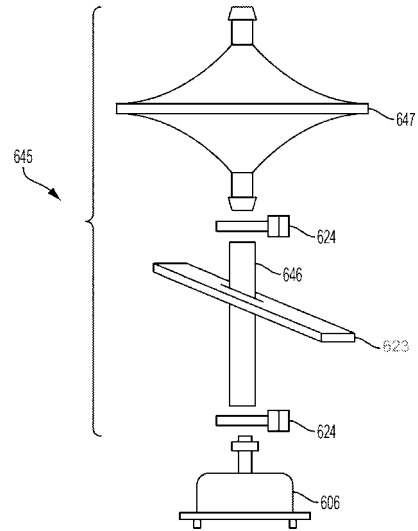
【図 4 B】



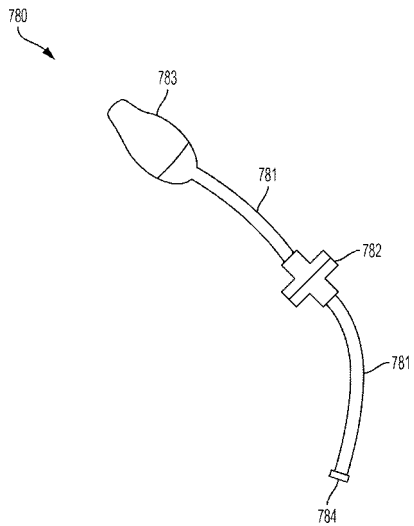
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/051228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12M1/00 C12M3/06
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/128703 A1 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES AB [SE]; CHOTTEAU VERONIQUE [SE]; DIANA RAF) 27 September 2012 (2012-09-27)	1-51,53, 54
Y	page 1, line 27 - page 2, line 2 page 4, line 24 - line 30 page 7, line 6 - line 23 page 10, line 7 - line 13 page 15, line 7 - line 10; figures 5,8,9	1-8,10, 13, 19-22, 26,27, 29, 31-33, 35,38, 44,45,52
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2017

Date of mailing of the international search report

08/12/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schönwasser, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/051228

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 91/04317 A1 (CELLCO ADVANCED BIOREACTORS IN [US]) 4 April 1991 (1991-04-04)</p> <p>page 24, line 23 - page 25, line 30 page 36, line 31 - page 37, line 2</p> <p>-----</p>	<p>1-8,10, 13, 19-22, 26,27, 29, 31-33, 35,38, 44,45,52</p>
X	<p>GE Life Sciences: "GE rocking bioreactors: How to best set up high density T cell cultures", 1 October 2013 (2013-10-01), XP002775880, Retrieved from the Internet: URL:https://www.youtube.com/watch?v=qbKM3BsAZBQ [retrieved on 2017-11-22]</p>	<p>1-8,10, 11, 15-17, 19-22, 24, 26-33, 36, 40-51, 53,54</p>
Y	<p>the whole document</p>	<p>1-8,10, 13, 19-22, 26,27, 29, 31-33, 35,38, 44,45</p>
Y	<p>-----</p> <p>WO 2011/142670 A1 (XPAND BIOTECHNOLOGY B V [NL]; DIJKHUIZEN BORGART ELISE LEONORE ISOLDE) 17 November 2011 (2011-11-17)</p> <p>page 12, line 28 - page 23, line 25; figures 1,5</p> <p>-----</p>	<p>1-8,10, 13, 19-22, 26,27, 29, 31-33, 35,38, 44,45</p>
A	<p>WO 2016/012249 A1 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES AB [SE]) 28 January 2016 (2016-01-28) page 5, line 11 - line 26</p> <p>-----</p>	<p>1-54</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/051228

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012128703 A1	27-09-2012	CN 103415610 A EP 2686415 A1 JP 5923529 B2 JP 2014507959 A US 2014011270 A1 WO 2012128703 A1	27-11-2013 22-01-2014 24-05-2016 03-04-2014 09-01-2014 27-09-2012
WO 9104317 A1	04-04-1991	AU 652725 B2 CA 2066645 A1 EP 0491851 A1 JP H05502369 A WO 9104317 A1	08-09-1994 15-03-1991 01-07-1992 28-04-1993 04-04-1991
WO 2011142670 A1	17-11-2011	AU 2011250989 B2 EP 2550357 A1 US 2013157353 A1 WO 2011142670 A1	07-05-2015 30-01-2013 20-06-2013 17-11-2011
WO 2016012249 A1	28-01-2016	CN 106536712 A EP 3172310 A1 JP 2017521080 A US 2017211027 A1 WO 2016012249 A1	22-03-2017 31-05-2017 03-08-2017 27-07-2017 28-01-2016

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ボーシュネ パスカル
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0
0 スイート 1 2 0 0

(72)発明者 バルバーグ クリス ダンカン
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0
0 スイート 1 2 0 0

Fターム(参考) 4B029 AA02 BB11 CC01 DA03 DC04 DG06 DG08 HA05
4B065 AA90X BC01

【要約の続き】

