



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114667341 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 24

(21) 申请号 202080078112.2

(22) 申请日 2020.11.10

(30) 优先权数据

62/933,575 2019.11.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/059818 2020.11.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/096850 EN 2021.05.20

(71) 申请人 隆萨沃克斯维尔股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 M·休伊特 E·亚伯拉罕

N·奥斯拓特

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所

(普通合伙) 44240

专利代理师 金辉

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

权利要求书3页 说明书30页 附图5页

(54) 发明名称

用于自动化细胞处理的质量控制方法

(57) 摘要

本公开提供了用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述基于细胞的疗法是在自动化细胞工程系统中产生的。所述方法适当地包含在自动化过程之前、期间和之后监测细胞的分子特性以向过程参数提供反馈。在各实施例中,所产生的细胞是嵌合抗原受体 (CAR) T细胞。



1. 一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述方法包括:
 - (a) 确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;
 - (b) 通过自动化细胞工程系统对所述细胞培养物进行基因修饰;
 - (c) 在所述基因修饰期间和之后确定修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及
 - (d) 优化所述自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种分子特性选自由以下组成的组:基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述细胞培养物是免疫细胞培养物、自然杀伤细胞培养物和用于神经退行性疗法的细胞培养物。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述免疫细胞培养物是T细胞培养物。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中T细胞培养物是嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。
7. 根据权利要求1到6中任一项所述的方法,其中(d)中的所述优化在所述基因修饰之前、期间和/或之后发生。
8. 根据权利要求1到7中任一项所述的方法,其中所述优化包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。
9. 一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述方法包括:
 - (a) 确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;
 - (b) 优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前细胞培养物的所述一种或多种分子特性;
 - (c) 用激活试剂激活所述修饰前细胞培养物,以产生激活的细胞培养物;
 - (d) 用载体转导所述激活的免疫细胞培养物,以产生经转导的细胞培养物;
 - (e) 对所述经转导的细胞培养物进行扩增;
 - (f) 对(e)的经扩增的细胞培养物进行浓缩;
 - (g) 采集(f)的经浓缩的细胞培养物,以产生经基因修饰的细胞培养物;
 - (h) 在步骤(c)到(g)中的任何一个步骤期间或之后确定所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及
 - (i) 优化步骤(c)到(g)中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述一种或多种分子特性选自由以下组成的组:基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化。
11. 根据权利要求9或权利要求10所述的方法,其中所述细胞培养物是免疫细胞培养物、自然杀伤细胞培养物和用于神经退行性疗法的细胞培养物。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述免疫细胞培养物是T细胞培养物。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中T细胞培养物是嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。
15. 根据权利要求9到14中任一项所述的方法,其中所述优化包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。
16. 一种用于评估并优化嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物的细胞质量的方法,所述方法包括:
 - (a) 确定修饰前T细胞培养物的一种或多种分子特性;
 - (b) 优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前T细胞培养物的所述一种或多种分子特性;
 - (c) 用激活试剂激活所述修饰前T细胞培养物,以产生激活的T细胞培养物;
 - (d) 用编码嵌合抗原受体的载体转导所述激活的T细胞培养物,以产生CAR T细胞培养物;
 - (e) 对所述CAR T细胞培养物进行扩增;
 - (f) 对(e)的经扩增的CAR T细胞培养物进行浓缩;
 - (g) 采集(f)的经浓缩的CAR T细胞培养物;
 - (h) 在步骤(c)到(g)中的任何一个步骤期间或之后确定所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及
 - (i) 优化步骤(c)到(g)中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述方法产生至少约1亿个存活的CAR T细胞。
18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述方法产生至少约20亿个存活的CAR T细胞。
19. 根据权利要求16到19中任一项所述的方法,其中所述T细胞培养物包括外周血单核细胞和/或经纯化的T细胞。
20. 根据权利要求16到19中任一项所述的方法,其中所述T细胞培养物包括至少一种辅佐细胞。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述辅佐细胞包括单核细胞或单核细胞源性细胞。
22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述辅佐细胞包括T细胞受体的抗原,包含CD28、CD40、CD2、CD40L和/或ICOS。
23. 根据权利要求16到22中任一项所述的方法,其中所述激活试剂包括抗体或树突细胞。
24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述抗体固定在表面上。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述表面是珠粒的表面。
26. 根据权利要求23所述的方法,其中所述抗体是可溶性抗体。

27. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述抗体包括抗CD3抗体和抗CD28抗体中的至少一种。

28. 根据权利要求16到27中任一项所述的方法, 其中所述转导包括病毒感染、电穿孔、膜破坏或其组合。

29. 根据权利要求16到28中任一项所述的方法, 其中所述载体是慢病毒载体或逆转录病毒。

30. 根据权利要求16到29中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。

31. 根据权利要求16到30中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种分子特性选自由以下组成的组: 基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中确定了至少约500种基因表达。

33. 根据权利要求31所述的方法, 其中确定了至少约700种基因表达。

34. 根据权利要求31所述的方法, 其中确定了约780种基因表达。

35. 根据权利要求16到34中任一项所述的方法, 其中所述优化包含以下中的一个或多个: 增加或减小细胞培养基的流速; 增加或减小氧气浓度; 增加或减小二氧化碳浓度; 增加或减小葡萄糖水平; 增加或减小细胞扩增的温度; 增加或减小细胞培养基的pH; 修改细胞转导程序; 修饰用于转导程序的载体; 以及修改细胞分离程序。

36. 一种用于评估并优化细胞培养物的细胞质量的方法, 所述方法包括:

(a) 确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;

(b) 通过自动化细胞工程系统对所述细胞培养物进行基因修饰;

(c) 在所述基因修饰期间和之后确定修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性; 以及

(d) 优化所述自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

用于自动化细胞处理的质量控制方法

技术领域

[0001] 本公开提供了用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述基于细胞的疗法是在自动化细胞工程系统中产生的。所述方法适当地包含在自动化过程之前、期间和之后监测细胞的分子特性以向过程参数提供反馈。在各实施例中,所产生的细胞是嵌合抗原受体 (CAR) T细胞。

背景技术

[0002] 由于预期建立对先进细胞疗法的加速临床采用,因此更多的注意力转向将使这些疗法惠及全世界患者的基础制造策略。虽然细胞疗法在临床上拥有广阔的前景,但相对于偿付的高制造成本是商业化的巨大障碍。因此,对成本效益、过程效率和产品一致性的需求正在推动众多细胞疗法领域中针对自动化的努力,并且具体地T细胞免疫疗法(参见例如Wang 2016)。

[0003] 然而,仍然存在巨大的挑战,这阻碍了自体细胞疗法的广泛采用并且使得制造失败。由于起始细胞材料通常源自患者,所以这表示了另外的复杂性水平以及变异性的来源。目前用细胞疗法治疗的许多患者都患有晚期疾病并且多次复发,对于多种其它疗法而言是难治性的。因此,患者可以从这些细胞疗法中受益的治疗窗是较窄的,这需要准确且可靠的制造过程。

[0004] 在制造细胞疗法产品之后,在产品可以施用于患者之前存在另外的延迟,主要是目前缓慢且成本高昂的大量监管要求和释放测试。目前的细胞疗法释放测试提供使监管机构对向患者给药感到放心的必要信息,但几乎无助于预测临床功效。

[0005] 在用于产生基于细胞的疗法的自动化过程中,通常需要基于个体患者需要优化并且修改过程的各个参数,以及方法期间的实时变化。本发明通过适当地在自动化系统中提供评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法来满足这些需要。

发明内容

[0006] 在一些实施例中,本文提供了一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述方法包括:确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;通过自动化细胞工程系统对所述细胞培养物进行基因修饰;在所述基因修饰期间和之后确定修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及优化所述自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0007] 在另外的实施例中,本文提供了一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述方法包括:确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前细胞培养物的所述一种或多种分子特性;用激活试剂激活所述修饰前细胞培养物,以产生激活的细胞培养物;用载体转导所述激活的免疫细胞培养物,以产生经转导的细胞培养物;对所述经转导的细胞培养物进行扩增;对(e)的经扩增的细胞培养物进行浓缩;采集(f)的经浓缩的细胞培养物,以产生经基因修饰

的细胞培养物；在步骤(c)到(g)中的任何一个步骤期间或之后确定所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性；以及优化步骤(c)到(g)中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0008] 在另外的实施例中，提供了一种用于评估并优化嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物的细胞质量的方法，所述方法包括：确定修饰前T细胞培养物的一种或多种分子特性；优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前T细胞培养物的所述一种或多种分子特性；用激活试剂激活所述修饰前T细胞培养物，以产生激活的T细胞培养物；用编码嵌合抗原受体的载体转导所述激活的T细胞培养物，以产生CAR T细胞培养物；对所述CAR T细胞培养物进行扩增；对(e)的经扩增的CAR T细胞培养物进行浓缩；采集(f)的经浓缩的CAR T细胞培养物；在步骤(c)到(g)中的任何一个步骤期间或之后确定所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性；以及优化步骤(c)到(g)中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0009] 本文还提供了一种用于评估并优化细胞培养物的细胞质量的方法，所述方法包括：确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性；通过自动化细胞工程系统对所述细胞培养物进行基因修饰；在所述基因修饰期间和之后确定修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性；以及优化所述自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

附图说明

[0010] 图1示出了用于产生如本文所描述的基于细胞的疗法的通用制造过程。

[0011] 图2示出了含有如本文实施例中所描述的示例性细胞工程系统的实验室空间。

[0012] 图3示出了可以在如本文实施例中所描述的细胞工程系统中进行的基于细胞的疗法的产生过程。

[0013] 图4示出了用于自动化细胞工程系统的过程流程图例。

[0014] 图5示出了注射器和袋从自动化细胞工程系统的盒采样的用途。

具体实施方式

[0015] 本公开提供了用于监测、评估并优化各种基于细胞的疗法的自动化产生的方法。

[0016] 自动化细胞处理

[0017] 对于如T细胞疗法等基于自体细胞的疗法和治疗，对于成本效益、过程效率和产品一致性的需求尤其突出，因为制造微批次(每批次一个患者)批量缺乏同种异体过程(每批次多个患者)可以利用的规模经济(参见例如Jones 2012; Trainor 2014)。微批次所需的更大且更本地化的劳动力和设施对于物流、手动生产的GMP合规性提出了相当高的要求，特别是关于员工的可用性和训练。另外，操作员之间潜在的技术差异可能会对持续满足释放标准并确保安全且可靠的产物构成不良风险。

[0018] 如本文所描述的，自动化制造的安装和全面验证为这些物流和操作挑战提供了解决方案。将自动化引入生产过程的一个重要方法是标识操作员对生产材料应用物理或化学变化的关键模块化步骤，这被称为“单元操作”。在细胞制造的情况下，这包含如细胞分离、基因操纵、增殖、洗涤、浓缩和细胞采集等步骤。制造商通常将焦点过程瓶颈标识为用于引

入自动化的直接机会。这反映在大多数可商购获得的生物反应器的技术操作范围内,其倾向于关注离散的过程步骤。细胞制造中的过程挑战(从无菌维护到样品跟踪)在本文中通过产生一致的细胞输出,同时改善不可避免的过程可变性的端到端自动化来解决。本文所描述的方法还提供了简化,并且相关联的电子记录有助于遵守GMP标准(参见例如Trainor 2014)。

[0019] 单元操作的自动化和关键过程敏感性

[0020] 各种基于细胞的疗法的临床开发最近快速进展,包含用于癌症免疫疗法的修饰后自体T细胞,这已导致了为相关联的转变和规模化影响制定计划。

[0021] 虽然针对不同基于细胞的疗法的具体方案将有所变化,但在图1中展示了通用过程。图1描述了从患者血液样品的初始处理到针对包含例如自体T细胞疗法调配输出细胞的基于细胞的疗法的制造的单元操作。

[0022] 如本文所描述的,为了实现细胞制造自动化,本文所描述的方法提供了用于了解细胞在每个转变点处的状态以及所述细胞如何受到特定单元操作的影响。针对患者特异性疗法的微批次生产应尊重影响自动化可行性的关键过程敏感性。本文所描述的自动化成功地涵盖各个过程步骤。

[0023] 下表1突显了包含T细胞自动化的基于细胞的疗法的自动化标识的一些过程步骤的挑战,并指出了敏感性对自动化策略的影响。注意,对于所有单元操作,由于污染风险,相应设备之间的细胞开放转移具有关键的敏感性。

[0024] 表1:自动化挑战和益处

[0025]

单元操作	关键过程步骤的挑战	自动化的益处
------	-----------	--------

[0026]

分馏	• 基于供体细胞和操作人员技术的高度可变（参见例如 Nilsson 2008） • 残留杂质可能影响性能	• 靶标起始群体的高纯度 • 更一致且经改进的产物
细胞接种	• 不均匀的细胞分布导致生长速率的可变性	• 均匀的自动化接种策略可以提高一致性和效力
激活	• 细胞与激活试剂之间的稳定接触 • 一致激活 - 均匀分布	• 自动化装载可以确保可再现的均匀分布和激活，而用手动方法难以一致地实现这一点
转导	• 效率可能受细胞病毒混合程度的影响，这可能因操作人员处理而不同 • 暴露时间增加可能对细胞可以产生负面影响	• 在病毒添加之前容积减少使得实现高度的细胞-病毒接触 • 基于时间的操作使细胞转移不受一天中的时间的影响 • 封闭系统降低了操作员的危险
电穿孔	• 效率可能因操作人员混合、洗涤和浓缩技术而不同	• 当上游步骤和下游步骤集成时，标准化方案确保了一致的结果
饲养	• 更换培养基的定时需要考虑基于细胞生长的营养需求（参见例如 Bohenkamp 2002），以及在 37°C 下的组分稳定性	• 生物反馈可以优化饲养计划（参见例如 Lu 2013）并且最小化培养基的使用 • 组分可以在冷藏温度下储存以延长稳定性，并使用前自动预热
选择	• 大量的处理步骤可能导致细胞损失 • 操作员可变性	• 全自动化提高了一致性
采集	• 在最终调配之前要去除的非细胞材料（如细胞分离珠粒）（参见例如 Hollyman 2009） • 手动移液可变性可能影响最终产率	• 无论一天中的什么时间，细胞都自动从培养容器中转移 • 与手动移液相比，提高最终产率一致性

[0027]	洗涤	• 侵袭性洗涤可能在上清液去除期间引起剪切应力或导致细胞损失	• 在没有移动培养容器的情况下进行温和的洗涤、过滤或沉降，可以用于减少细胞损失并去除残留物
	浓缩	• 在抽吸期间，细胞回收可以因操作员而不同	• 自动化容积减少降低了操作员可变性 • 过滤方法也使细胞损失最小化
	调配	• 产物必须充分混合 • 小工作容积降低了容积不准确性的影响 • 活力随着暴露于冷冻保存时间的延长而降低	• 自动化混合确保最终调配物中细胞的均匀分布 • 自动化容积添加去除了手动移液错误或可变性的风险 • 自动化程度增加减少了温度敏感性步骤中的可变性

[0028] 围绕表1中所列的敏感性定制手动过程的自动化可以支持成功转变、维持或改进细胞疗法性能。

[0029] 离散自动化对完全集成自动化

[0030] 虽然自动化的价值有着令人信服的证据 (例如参见Trainor 2014;Levine 2017)，但仍需要对将这些自动化步骤集成到具有自动化转移的端到端序列中的价值和实用性进行后续分析。对于离散过程自动化的优势对端到端集成的优势有着不同的观点。

[0031] 离散自动化的主要益处是灵活性。这涉及以下领域：

[0032] 1) 维持独特的过程操作；

[0033] 2) 基于单独单元操作验证加速转变活动；

[0034] 3) 能够修改处理步骤以适应供体与供体之间的变异性。

[0035] 涉及增加的灵活性的第一点为操作员提供了对于过程的更多控制。在过程具有可以影响最终产品的高敏感性步骤的环境中，这是重要的。切换到一体化系统可以强加影响产品结果的约束条件。离散方法提供了选择如何执行每个步骤的灵活性，这对于高敏感性单元操作可以是特别重要的。离散方法还允许从手动处理逐步转变到自动化，如果每个单元操作可以单独测试，那么这有助于证明等效效力。另外，自动化特定单元操作为基于细胞性能所做的决定提供了灵活性。例如，如果细胞快速增长，可能需要从一个细胞培养袋扩增到两个细胞培养袋。最后，使用离散系统的自动化方法还使得小组能够挑选用于每个单元操作的设备。

[0036] 设备利用率是离散自动化的另一争议。一些单元操作比其它单元操作可能需要显著更多的时间。端到端处理系统需要所有多个单元操作在单个系统上运行，由此占用了用于培养过程的持续时间的设备。

[0037] 虽然离散自动化具有益处，但是端到端方法提供了不同的但仍然令人信服的益处。首先，完全集成系统大大减少了污染风险。由于离散方法需要增加处理，因此由于操作员干预，增加了产品变异性的可能性。第二，并且如先前所提及的，这不可避免地产生了更

高的劳动成本。

[0038] 离散方法提供的灵活性是重要的。在过程在定义产品时重要的情况下,端到端系统应具有集成独特敏感性的灵活性。这可以包含某些饲养策略、氧气水平、表面处理等等。此类方法需要软件和一次性组件两者的灵活性。系统应提供在过程中不同点处推动细胞和培养基样品的选项以确认特定单元操作满足产品规格检查点。如果需要进行修改,软件应能够实施这些改变以提供理想的条件。虽然易于使用和灵活的软件对于转变目的十分有益,但软件可以容易锁定以符合临床标准是重要的(FDA 21CFR部分11)。一旦锁定,如果操作员有更改方案的任何能力,则应存在限制。然而,为了解决固有供体可变性的问题,应存在基于细胞增长速率从一系列经验证的方案中进行选择的选项。例如,如果细胞增长迅速,系统应能够对此做出响应并且相应地调整饲养或采集时间点。

[0039] 相比离散自动化,端到端集成的选择也取决于临床过程的长期远见。单个一体化系统可以显著提高空间效率,从而最小化昂贵的GMP净室中所需的占用空间。例如,如图2所示,完全集成的自动化系统被设计成最大化所需占用空间,以减少昂贵的GMP净室空间。图2示出了在标准实验室空间中运行的96个患者特异性端到端单元。

[0040] 单个系统还为数据追踪提供了更大的便利,然而离散系统可能不提供将所有电子数据文件连接在一起的兼容软件。如VINETI (Vineti有限公司) 和TRAKCEL (TrakCel有限公司) 等软件平台允许供应链物流的电子监测和组织。然而,通过将每个单元操作相关联的处理事件和生物监测培养条件两者的历史并入到批次记录,单个一体化培养系统可以更进一步发展。因此,端到端集成的益处提供了显著的竞争优势。

[0041] 用于单元操作集成的商业平台

[0042] 多个自体细胞疗法,尤其是对于基于血液的癌症的免疫疗法中的临床试验成功已突显了新的临床方案能够转变成强劲的生产平台以便满足计划的临床需求的重要性(参见例如Levine 2017;Locke 2017)。对于自体疗法,处理每个患者特异性细胞治疗适当地利用了全面制造活动和操作管理。本文中的方法连接统包自动化系统中的单元操作以实现过程优化、安全性和经济性。

[0043] 在设计自体过程时的挑战是双重的。首先,与单独处理步骤可以在物理分离和优化的设备块中发生的同种异体制造不同,规模化自体平台在单个封闭独立的自动化环境中适当地进行所有必要步骤。第二,与每次运行理论上用已知质量和可预测的过程行为,用来自细胞库的高质量小瓶开始的同种异体过程不同,自体过程汇总的起始材料高度可变,并且通常来自健康受损的个体。

[0044] 因此,本文提供的是能够通过控制如物理搅拌、pH、饲养和气体处理等因素来感测培养条件并作为复杂的生物反应器做出相应响应的方法。此外,与同种异体治疗相比,与自体治疗相关的技术转移存在显著不同的挑战。自体产物可能对制造过程与患者治疗之间的稳定性有更大的限制。站点可以定位于全局而不是单个中心。具有锁定(例如,全封闭式)一体化系统显著改善了站点之间的技术转移过程。

[0045] 虽然不能消除来源变异性,但自动化有助于通过标准化和再现性去除了最终自体产品的变异性。领先的细胞系统供应商采用这种实践以通过监测活性细胞培养物的状态的生物传感器获得细胞性能参考点。在端到端集成中,来自过程中的任何特定阶段的输出应在过程向前进展的可接受的参数内。

[0046] 如本文所描述的,在实施例,所提供的方法利用COCOON平台(傲克生物技术公司(Octane Biotech)(安大略省金斯顿(Kingston,ON))),所述平台将多个单元操作集成在单个统包平台中。向多个细胞方案提供了非常具体的细胞处理目标。为了提供高效且有效的自动化转变,所描述的方法利用结合多个单元操作的应用特定/赞助商特定一次性盒的概念,所有这些都集中在最终细胞疗法产品的核心要求上。

[0047] 本文所描述的方法已用于在完全集成的封闭式自动化系统中扩增包含CAR T细胞的各种基于细胞的疗法(包含激活、病毒转导和扩增、浓缩和洗涤)(图3)。

[0048] 自动化的优势

[0049] 细胞疗法生产中的单元操作的自动化为同种异体细胞疗法应用和自体细胞疗法应用的普遍益处提供了机会。在患者特异性自体细胞产品的独特场景中,并且最近这些疗法的临床成功始终强调的是,由于小批量GMP合规性、经济性、患者可追溯性和过程偏差的早期标识的显著微批次复杂性,自动化的优势特别引人注目。复杂制造方案的相关联的出现吸引了人们对这样一种事实的关注,即微批次细胞生产中自动化单元操作的端到端集成的价值尚未成为重要研究点。然而,在这些疗法即将获得批准后对这些疗法的预期需求指示,实施全封闭式端到端系统可以为制造瓶颈提供更需要的解决方案,如手动操作时间和占地面积等。

[0050] 鼓励先进疗法的开发者在临床转变推广和临床试验方案的规模化的早期考虑自动化。早期自动化可能影响方案开发,避免在后期在从手动过程切换到自动化过程时进行可比性研究的需要,并且提供对长期商业化路线的更好理解。

[0051] 用于产生基于细胞的疗法,包含CAR T细胞的自动化系统的质量控制

[0052] 如本文所描述的,提供了允许监测、评估并优化各种基于细胞的疗法的自动化产生的方法。本文所描述的方法包含在自动化过程之前、期间和之后的不同时间监测各种不同分子特性,并且对于自动化系统的各个参数做出改变和调整以优化输出。此类优化可以基于特定疗法或者甚至单个患者的期望的细胞数量、浓度或特性。

[0053] 因此,在实施例,本文提供了一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法。如本文所使用的,“评估”是指测量或确定细胞的一种或多种特性的行为,包含细胞的分子特性,以帮助指导对方法进行任何改变。如本文所使用的,“优化”是指修改本文所描述的自动化细胞工程系统的一个或多个参数。如本文所使用的,“细胞质量”是指细胞所需的特性以在基于细胞的疗法按需操作。此质量包含膜完整性、核完整性、期望的基因谱、期望的蛋白质谱、期望的细胞寿命、期望的细胞数量或密度等。

[0054] 如本文所使用的,“基于细胞的疗法”是指将细胞材料注射、移植或植入到患者中的疗法。基于细胞的疗法适当地包含完整的活细胞。基于细胞的疗法包含各种类型的细胞,如免疫细胞、自然杀伤细胞、用于神经退行性疗法的细胞和干细胞。本文所描述的方法通常可以适于用于基于细胞的疗法或细胞培养物的任何细胞类型,其可以包含用于如病毒载体或蛋白质表达等生物产生的组织工程化应用和细胞培养。

[0055] 用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法适当地包含确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性。如本文所使用的,“分子特性”包含细胞的基因谱(例如,基因表达谱)、氨基酸或蛋白质谱(例如,在细胞内或所述细胞表面上表达的蛋白质)、脂质谱等中的一种或多种。如本文所使用的,“细胞培养物”是指用于本文所描述的自动化方法的

单个细胞以及细胞集合。

[0056] 所述方法适当地以确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性开始。其为尚未置于本文所描述的自动化细胞工程系统中的细胞培养物。修饰前细胞培养物可以包含从患者直接获取的细胞(例如,抽血或血浆样品),以及已经从患者取出并且经历一些过滤、选择或其它修饰以达到期望的细胞培养物群体的细胞,所述期望的细胞培养物群体要在本文所描述的自动化细胞工程系统中被修饰。

[0057] 所述方法适当地包含通过自动化细胞工程系统对细胞培养物进行基因修饰。如本文所使用的,“基因修饰”包含将一个或多个基因引入到细胞中(例如,通过转导)以适当地修饰细胞的基因组。基因修饰还可以包含瞬态修饰,其未集成到基因组中。用于对细胞培养物进行基因修饰的方法描述于本文并且适当地包含:用激活试剂激活细胞培养物,以产生激活的免疫细胞培养物;(例如,用载体)转导激活的细胞培养物,以产生经转导的细胞培养物;以及对经转导的免疫细胞培养物进行扩增(参见例如图1和3)。用于制备、激活、转导和扩增细胞培养物的方法描述于本文。

[0058] 在示例性实施例中,用于评估并优化细胞质量的方法适当地进一步包含在基因修饰期间和之后确定修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。换句话说,在激活、转导和/或扩增的任何一个期间的任何点时,可以评估细胞培养物,并且适当地确定细胞培养物的一种或多种分子特性。此采样和评估提供了关于自动化处理期间以及自动化处理之后的不同点时的细胞培养物的特性的数据,这允许在自动化的每个阶段追踪一种或多种分子特性。

[0059] 用于评估并优化细胞质量的方法适当地进一步包含优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。如本文所描述的,可以被优化的自动化细胞工程系统的参数包含处理参数(例如,pH、温度、热量)以及激活、转导和表达、细胞选择等的质量和持续时间。

[0060] 在示例性实施例中,所述一种或多种分子特性包含基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化中的一种或多种。

[0061] 适当地,分子特性由用于基于细胞的疗法和/或细胞培养物的RNA、DNA和/或蛋白质靶标的多重分析的一种或多种方法确定。示例性多个分析工具包含各种阵列、条形码技术、下一代测序方法、定量PCR等。

[0062] 在示例性实施例中,分子特性可以使用如由NANOSTRING®(华盛顿州西雅图(Seattle,WA))开发的分子条形码方法NCOUNTER®等方法确定。分子条形码方法利用被设计成与期望的靶标(例如,核酸(RNA、DNA)、蛋白质或肽)结合的独特捕获探针。包含条形码(例如,基于荧光的、基于颜色的或基于放射性的标签)的报告探针与捕获探针结合。将样品纯化并且固定,并且然后对条形码靶分子进行计数并分析。参见例如Geiss等人,“用颜色编码的探针对的基因表达的直接多重测量(Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs)”《自然生物技术(Nat.Biotechnol.)》26: 317-325 (2008),所述文献的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0063] 如本文所描述的,可以用于本文所描述的自动化细胞工程系统的细胞培养物包含免疫细胞培养物、自然杀伤细胞培养物和用于神经退行性疗法的细胞培养物。

[0064] 在示例性实施例中,免疫细胞培养物是T细胞培养物,并且在实施例中是嵌合抗原

受体T (CAR T) 细胞培养物。嵌合抗原受体T细胞或“CAR T细胞”是用嵌合抗原受体 (CAR) 修饰以更特异性地靶向癌细胞的T细胞。通常, CAR包含三个部分: 胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域。胞外结构域是受体暴露于细胞外液的区域, 并且包含三个部分: 信号传导肽、抗原识别区域和间隔子。信号传导肽引导新生蛋白进入到内质网中。在CAR中, 信号传导肽是单链可变片段 (scFv)。scFv包含与短接头肽连接的免疫球蛋白的轻链 (V_L) 和重链 (V_H)。在一些实施例中, 接头包含甘氨酸和丝氨酸。在一些实施例中, 接头包含谷氨酸和赖氨酸。

[0065] CAR的跨膜结构域是跨膜的疏水性 α 螺旋。在一些实施例中, CAR的跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一些实施例中, CD28跨膜结构域产生高度表达的CAR。在一些实施例中, CAR的跨膜结构域是CD3- ζ 跨膜结构域。在一些实施例中, CD3- ζ 跨膜结构域产生并入到天然T细胞受体中的CAR。

[0066] CAR的胞内结构域通常被认为是受体的“官能”末端。在胞外结构域的抗原识别区域识别抗原之后, CAR簇和信号传递到细胞。在一些实施例中, 胞内结构域是CD3- ζ 胞内结构域, 其包含3个基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM)。在此情况下, 在抗原结合之后, ITAM向T细胞传递激活信号, 从而触发T细胞免疫应答。

[0067] 在产生CAR T细胞期间, 从人受试者中取出T细胞, 经基因更改, 并且重新引入到患者中以攻击癌细胞。CAR T细胞可以源自患者自身血液 (自体), 或者源自另外的健康供体 (同种异体)。通常, CAR T细胞被开发为对在肿瘤上表达而在健康细胞中不表达的抗原具有特异性。

[0068] 在示例性实施例中, 所述一种或多种分子特性包含CAR T细胞的基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化中的一种或多种。在另外的实施例中, 所述一种或多种分子特性涉及T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。

[0069] 适当地, 分子特性用CAR T表征组套使用如由NANOSTRING® (华盛顿州西雅图) 开发的分子条形码方法NCOUNTER®确定。CAR T表征组套的示例性特性包含查看约500-1000个基因, 适当地约700-800个基因、包含约700个、约750个、约760个、约770个、约780个、约790个、约800个或约850个人类基因的表达能力。基因包含CAR T细胞生物学的组成中的八个组成, 包含T细胞激活、代谢、耗竭、TCR受体多样性和转基因表达。

[0070] 分子特性适当地使用允许至多6-log动态范围的分子的直接数字检测的非酶非放大的条形码技术 (例如, NCOUNTER®) 确定。当与下一代测序 (NGS) 或定量PCR (qPCR) 方法比较时, 工作流具有仅15分钟总手动时间和少于24小时内的数据, 提高了生产率。这两者可能花费更久的数天到数周并且可以包含文库制备、DNA合成和扩增, 所有这些需要另外的手动时间、潜在的用户错误和通过使用酶引入的再现性挑战。从条形码技术产生的数据导致分子的直接计数, 不需要专门的生物信息学家, 并且通过各种分析软件或通过其它定制报告修正为简单可视化分析和报告。

[0071] 测量nCounter平台上的基因表达的nCounter CAR-T表征组套被创建以具体地用于细胞疗法领域内以进一步能够进行表征、优化和特征开发, 以分析制造中的各个阶段并且允许更好控制过程, 这进而可以解决围绕细胞疗法的一致性和可再现的制造的挑战。nCounter CAR T表征组套被创建以与CAR T疗法领域中8个领先的中心合作, 并且被设计成用于整个CAR T工作流, 从而能够进行白细胞去除术、所制造的产品以及输注后CAR T细胞的一致且稳健的分析。可定制的780种基因表达组套并入内容以测量CAR T细胞生物学的8

个基本组成,包含T细胞激活、代谢、耗竭和TCR受体多样性,其中任选的定制用于测量转基因表达。

[0072] 下表提供了可从CAR T表征组套获得的示例性信息(参见nanosttring.com;car-t-表征组套):

CAR-T 生物学	说明	途径或过程
表型	维持、促进并调节其活性的细胞因子和途径。	Notch、Wnt 信号传导、Tfh、TGF- β 、Th1、Th17、Th2、Th9、Treg、先天样 T 细胞、维生素 A (RA) 信号传导
细胞类型	污染细胞类型的标识。	免疫细胞分析
TCR 多样性	白细胞去除术、制造和输注之后存在的克隆数。	TCR 含量
激活	通过呈递到 TCR 复合物的抗原并通过共刺激分子调节。	趋化因子信号传导、共刺激分子、白介素信号传导、TCR 信号传导、JAK-STAT、MAPK 和 PI3K 信号传导、Myc 靶标、NFAT、抗原处理和呈递、T 细胞激活标志物

[0073]

[0074]

代谢	代谢途径，包含碳水化合物和脂肪酸代谢。	糖酵解、线粒体生物发生、脂肪酸代谢 谷氨酰胺代谢、昼夜节律钟、一碳代谢、 氧化磷酸化、mTOR、细胞周期、自噬
持久性	参与 T 细胞迁移的分子	T 细胞迁移、T 细胞细胞类型分析
耗竭	T 细胞耗竭可以通过共刺激分子、其它细胞间相互作用和通过细胞凋亡的细胞死亡来诱导。	T 细胞耗竭标志物、细胞凋亡、与非淋巴细胞的相互作用、共刺激分子
毒性	CAR-T 治疗的脱靶细胞毒性的可能性。	NK 细胞细胞毒性、NKT 受体、NF-kB、 I 型干扰素信号传导 II 型干扰素信号传导、白介素信号传导、 趋化因子信号传导

[0075] CAR T 表征组套内包含的基因可以包含以下 (参见nanosttring.com;car-t-表征组套)：

[0076]

细胞类型	组套基因
B 细胞	BLK、CD19、CD20、 TNFRSF17
T 细胞	CD3D、CD3E、CD3G、 CD6、SH2D1A
TH1	TBX21
调控 T 细	FOXP3

[0077]

胞 (Treg)	
CD8 ⁺ T 细胞	CD8A、CD8B
耗 竭 的 CD8 ⁺ T 细 胞	CD244 、 EOMES 、 CD223
细胞毒性 细胞	CTSW 、 GNLY 、 GZMA、GZMB、GZMH、 CD161、CD94、KLRK1、 PRF1
树突细胞	CCL13 、 CD209 、 HSD11B1
巨噬细胞	CD163、CD68、CD84
肥大细胞	MS4A2、TPSAB1
嗜中性粒 细胞	CSF3R 、 CD16 、 S100A12
自然杀伤 (NK) 细胞	NKP46、XCL2
NK CD56 暗淡 细胞	IL21R 、 KIR2DL3 、 KIR3DL1、KIR3DL2

[0078] 对于CAR T表征组套,样品输入可以包含分选的T细胞(例如,在基因修饰步骤之前的细胞)、CAR-T细胞(例如,在自动化过程的最终步骤之后的细胞)、CAR-T制造产品(例如,在自动化过程的不同阶段期间的细胞)、全血或核酸。

[0079] 基于从分子特性获得的信息,一种或多种优化可以在自动化过程中发生。这些优化可以发生在自动化过程的基因修饰步骤之前、期间和/或之后。

[0080] 所述优化可以包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。

[0081] 用于优化自动化过程的方法包含结合关于分子特性收集的信息,在开始自动化方法之前优化细胞培养物条件,以及使用来自不同传感器的反馈等以辅助针对生长条件(例如,气体浓度、培养基条件、温度、pH、废物和营养物浓度等)的实时修改。

[0082] 如本文所描述的,优化自动化细胞工程系统的所述一个或多个参数适当地更改修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。换句话说,针对自动化细胞工程系统所做的改变(例如,改变气体浓度、培养基条件、温度、pH、废物和营养物浓度等)改变了细胞培养物的分子特性,使得经优化的细胞培养物的特性有所改进。这些改进的特性可以包含例如更高的抗原浓度、更高效的或更完全的转导或更高的细胞密度或更高的细胞计数。另外的改进的特性可以在基因水平下表现出来,包含例如具有延长的寿命的细胞或对于特定患者具有改进的特性的细胞等。

[0083] 在实施例中,优化过程是自调整过程,即不需要来自外部(人)用户的输入并且能够通过各种计算机程序和条件来确定对细胞培养物的所需修改或确定其它用于优化自动化过程的特性的过程。在实施例中,自调整过程包含用温度传感器、pH传感器、葡萄糖传感器、氧气传感器、二氧化碳传感器和光密度传感器中的一个或多个进行监测。这些自调整过程还可以监测如本文所描述的一种或多种分子特性,从而在自动化过程开始之前、在自动化过程期间或在过程结束之后向自动化系统提供实时反馈。

[0084] 如本文所描述的,在全封闭式细胞工程系统中使用这些不同传感器发生在系统内的不同时间和位置,并且共同工作以提供优化。例如,自调整过程可以基于监测来调整(例如,升高或降低)经转导的T细胞培养物的温度、pH水平、葡萄糖水平、氧气水平、二氧化碳水平和光密度中的一个或多个。

[0085] 图4示出了用于如本文所描述的自动化细胞工程系统的过程流程图例,包含各种传感器(例如,pH传感器450、溶解氧传感器451)、以及采样/样品端口452和各种阀(控制阀453、旁通止回阀454)以及一个或多个流体通路440的定位,所述一个或多个流体通路适当地包括连接组件的基于硅酮的管组件。图4中还示出了在盒402的流动路径中的一个或多个疏水过滤器455或亲水过滤器456以及泵管457和袋/阀模块458的用途。还示出了细胞培养室410在流动路径内的定位。

[0086] 优化过程还可以基于起始细胞群的独特特性,包含例如如本文所描述的确定的细胞总数、细胞来源、细胞密度、细胞年龄以及细胞(包含CAR T细胞)的分子特性。这些起始细胞群特性可以在开始自动化方法之前输入到计算机控制系统中,此时系统将进行各种初始修改以优化方法,例如,氧气和二氧化碳浓度、流速、温育时间、pH等。可替代地,细胞过程的监测使得能够自动化表征细胞培养物序列从起始群体的进展,从而使得能够逐个调整条件以优化最终细胞培养物特性。

[0087] 虽然本文描述的优化参数和修改通常适用于COCOON®自动化细胞工程系统,但

应理解此类优化可以应用到其它自动化细胞工程系统。通常,培养基流速、气体浓度和pH等的控制是可以控制和优化的所有参数,无论所利用的自动化细胞工程系统的类型如何。

[0088] 在示例性实施例中,本文所描述的方法产生了至少约5000万个存活的经基因修饰的免疫细胞。在合适的实施例中,所描述的方法产生至少约1亿个存活的经基因修饰的免疫细胞、或至少约2亿个细胞、至少约3亿个细胞、至少约4亿个细胞、至少约5亿个细胞、至少约6亿个细胞、至少约7亿个细胞、至少约8亿个细胞、至少约10亿个细胞、至少约11亿个细胞、至少约12亿个细胞、至少约13亿个细胞、至少约14亿个细胞、至少约15亿个细胞、至少约16亿个细胞、至少约17亿个细胞、至少约18亿个细胞、至少约19亿个细胞、至少约20亿个细胞、至少约21亿个、至少约22亿个、至少约23亿个、至少约24亿个、至少约25亿个、至少约26亿个、至少约27亿个、至少约28亿个、至少约29亿个或至少约30亿个经基因修饰的免疫细胞。在一些方面,所述方法可以用于产生多于约30亿个经基因修饰的免疫细胞,例如100亿个细胞、120亿个细胞或150亿个细胞。适当地,但不限制地,这些经基因修饰的免疫细胞是CAR T细胞。

[0089] 如本文所描述的,由所述方法产生的经基因修饰的免疫细胞培养物适当地是T细胞培养物,包含嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物。在此类实施例中,用于产生此类CAR T细胞的载体是编码嵌合抗原受体的载体。适当地,免疫细胞培养物包括外周血单核细胞和/或纯化的T细胞。在实施例中,免疫细胞培养物包括至少一种辅佐细胞,适当地是单核细胞或单核细胞源性细胞。如本文所描述的,在实施例中,辅佐细胞包括用于T细胞受体的抗原,包含CD28、CD40、CD2、CD40L和/或ICOS。

[0090] 本文所描述的方法还可以在基因修饰之前、期间或之后提供关于基于细胞的疗法的分子特性的信息,其发现与低效力或高效力、或低细胞毒性或高细胞毒性或副作用相关。因此,方法将在自动化过程之前、期间或之后提供可以用于确定基于细胞的疗法是否应施用于患者的质量控制信息,或者相反,如果利用此类细胞群,出现问题的可能性更高。

[0091] 在另外的实施例中,关于基于细胞的疗法的分子特性的信息还可以在所制备的基于细胞的疗法已施用于患者之后才确定。例如,可以抽取患者的血液并且可以确定期望的细胞类型的分子特性,从而使得能够改进对功效的监测并且增加对于如何将临床结果与细胞特性和自动化细胞工程化过程联系起来的洞察。

[0092] 在另外的实施例中,本文提供了一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述方法包括:确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前细胞培养物的所述一种或多种分子特性;用激活试剂激活所述修饰前细胞培养物,以产生激活的细胞培养物;用载体转导所述激活的免疫细胞培养物,以产生经转导的细胞培养物;对所述经转导的细胞培养物进行扩增;对经扩增的细胞培养物进行浓缩;以及采集经浓缩的细胞培养物,以产生经基因修饰的细胞培养物。

[0093] 如本文所描述的,所述方法适当地包含:在激活、转导、扩增、浓缩或采集的步骤中的任何一个步骤期间或之后确定所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及优化这些步骤中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0094] 如本文所描述的,所述一种或多种分子特性适当地包含基因表达、蛋白质表达、

mRNA表达和拷贝数变化。

[0095] 示例性细胞培养物包含免疫细胞培养物,如自然杀伤细胞培养物和用于神经退行性疗法的细胞培养物。在合适的实施例中,免疫细胞培养物是T细胞培养物,包含嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物。在此类实施例中,所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。

[0096] 图5示出了一种用于访问自动化细胞工程系统的细胞的方法,所述方法包含如本文所描述的用于产生各种细胞疗法的方法。如所指示的,执行各种过程(转导、扩增等)的盒402可以附接到注射器502。此注射器可以用于在所述过程的任何阶段期间(例如,在激活、转导、扩增和/或采集中的任何一个期间或之后)抽取细胞的样品。然后此样品可以用于分析本文所描述的各种分子特性。图5中还示出了袋504,如果期望或需要更大的细胞样品,所述袋可以连接到盒。

[0097] 本文描述了各种优化方法并且可以包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。

[0098] 例如,如果细胞培养物的分子特性表明培养物将无法达到所期望的细胞培养物大小的所需生长,那么细胞工程系统可以通过例如引入氧化的细胞培养基、通过用氧化的细胞培养基替换细胞培养基或通过使细胞培养基流过氧合组件(即,硅酮管)来自动增加细胞培养物的氧气水平。

[0099] 在另一个实例中,如果分子特性表明细胞培养物生长太快(例如,细胞可能过度拥挤可能导致不期望的特性),则细胞工程系统可以自动降低细胞培养物的温度,以维持细胞的稳定生长速率(或指数生长速率,根据需要)。在另外的实施例中,基于所分析的分子特性,细胞工程系统可以基于分子特性自动调整细胞饲养(即,向细胞培养物提供新鲜培养基和/或营养物)时间表。

[0100] 在另外的实施例中,本文提供了一种用于评估并优化嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物的细胞质量的方法。所述方法适当地包含:确定修饰前T细胞培养物的一种或多种分子特性;优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前T细胞培养物的所述一种或多种分子特性;用激活试剂激活所述修饰前T细胞培养物,以产生激活的T细胞培养物;用编码嵌合抗原受体的载体转导所述激活的T细胞培养物,以产生CAR T细胞培养物;对所述CAR T细胞培养物进行扩增;对经扩增的CAR T细胞培养物进行浓缩;以及采集经浓缩的CAR T细胞培养物。

[0101] 适当地,所述方法包含:在激活、转导、扩增、浓缩或采集步骤中的任何一个步骤期间或之后确定所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及优化这些步骤中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0102] 如本文所描述的,适当地,所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。在示例性实施例中,所述一种或多种分子特性包含基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化。

[0103] 如本文所描述的,关于CAR T表征组套,适当地,所述方法包含确定至少约500种基

因表达、适当地至少约700种基因表达,包含确定了约700-800种基因表达(包含约750、760、770、780、790或800种基因表达)。

[0104] 如本文所描述的,优化自动化过程适当地包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。

[0105] 本文所描述的方法适当地优化以产生至少约1亿个存活的CAR T细胞,包含至少约20亿个存活的CAR T细胞。

[0106] 如本文所描述的示例性起始T细胞培养物适当地包含外周血单核细胞和/或纯化的T细胞。

[0107] 在示例性实施例中,T细胞培养物包括至少一种辅佐细胞,其可以是单核细胞或单核细胞源性细胞。

[0108] 适当地,辅佐细胞包括用于T细胞受体的抗原,包含CD28、CD40、CD2、CD40L和/或ICOS。

[0109] 如本文所描述的,在实施例中,激活试剂包括抗体或树突细胞。适当地,抗体固定在表面上。此表面包含珠粒的表面。适当地,抗体是可溶性抗体,包含抗CD3抗体和抗CD28抗体中的至少一种。

[0110] 在示例性实施例中,转导包括病毒感染、电穿孔、膜破坏或其组合。

[0111] 在合适的实施例中,用于转导的载体是慢病毒载体或逆转录病毒。

[0112] 用于评估和优化CAR T生产的示例性过程流程

[0113] 健康供体和患者白细胞去除术用于在自动化细胞工程系统中制造CAR T细胞。

[0114] 在贯穿细胞疗法制造的多个时间点时,细胞样品由CAR-T细胞组套采集并表征。

[0115] 来自所有测试的数据被分析以持续改进检测组套(潜在的检测组套改变)并且产生知识以理解如何将细胞特性转变到允许另外的制造过程优化的途径。

[0116] 通过与医疗中心合作,数据库可以产生以获得关于如何将临床结果与细胞特性以及改进的制造过程联系起来的洞察以改善临床功效并且减少治疗不良事件。

[0117] 与转变的细胞特性组合以优化自动化制造过程的改进的CAR-T细胞组套将提供可以被提供的分析包。

[0118] 以下部分提供了在自动化细胞工程系统中使用的用于产生CAR T细胞的方法的描述。

[0119] T细胞的激活。在一些实施例中,通过本文所描述的方法产生的免疫细胞培养物是CAR T细胞培养物。可以激活CAR T细胞以形成激活的T细胞培养物。在体内,如树突细胞等抗原呈递细胞(APC)通过T细胞受体(TCR)与APC主要组蛋白相容性复合物(MHC)的相互作用作为T细胞激活的刺激物。TCR与CD3相关联,其为有助于激活细胞毒性T细胞(例如,CD8+原初T细胞)和T辅助细胞(例如,CD4+原初T细胞)两者的T细胞共受体。通常,T细胞激活遵循双信号模式,从而需要TCR/CD3复合物的刺激以及共刺激受体。T细胞激活进一步描述于例如Kochenderfer2015;Kalos 2011中。

[0120] 在没有共刺激信号的情况下,细胞易于无反应性并且变得无应答。因此,T细胞共刺激对于T细胞增殖、分化和存活率可以是重要的。T细胞的共刺激分子的非限制性实例包

含CD28,其是APC膜上的CD80和CD86的受体;以及CD278或ICOS(可诱导T细胞共刺激分子),其为在激活的T细胞上表达的与ICOS-L相互作用的CD28超家族分子。因此,在一些实施例中,共刺激分子是CD28。在其它实施例中,共刺激分子是ICOS。在体内,可以由APC上的B7分子提供共刺激信号,其结合到T细胞上的CD28受体。B7是一种存在于激活的APC上的外周跨膜蛋白,可以与T细胞上的CD28或CD152表面蛋白相互作用以产生共刺激信号。因此,在一些实施例中,共刺激分子是B7。共刺激受体进一步描述于例如Lafferty 1975;Harding 1992;Clavreul2000;Charron 2015;Fathman 2007;Greenwald 2005中。共刺激进一步描述于例如Carpenter 2000;Andris 2004中。B7分子进一步描述于例如Fleischer 1996;Schwartz2003中。

[0121] 在体外使用各种激活方法来模拟T细胞激活。在实施例中,用激活试剂激活T细胞培养物。在另外的实施例中,激活试剂是抗原呈递细胞(APC)。在仍另外的实施例中,激活试剂是树突细胞。树突细胞是处理抗原并且将其在细胞表面呈递给T细胞的APC。在一些实施例中,激活试剂与T细胞培养物共培养。共培养可能需要单独纯化和培养第二细胞类型,这可能增加劳动力需要和变异性来源。因此,在一些实施例中,使用了替代性激活方法。

[0122] 在一些实施例中,激活试剂是抗体。在一些实施例中,将细胞培养物用与表面,包含聚合物表面,包含珠粒,结合的抗体激活。在另外的实施例中,所述一个或多个抗体是抗CD3抗体和/或抗CD28抗体。例如,珠粒可以是磁珠,例如,涂覆有抗CD3和抗CD28的DYNABEADS®。抗CD3珠粒和抗CD28珠粒可以适当地提供刺激信号以支持T细胞激活。参见例如Riddell 1990;Trickett 2003。

[0123] 在其它实施例中,用可溶性抗体激活细胞培养物。在另外的实施例中,可溶性抗体是可溶性抗CD3抗体。OKT3是免疫球蛋白IgG2a同种型的鼠单克隆抗体并且靶向CD3。因此,在一些实施例中,可溶性抗CD3抗体是OKT3。OKT3进一步描述于例如Dudley 2003;Manger 1985;Ceuppens 1985;Van Wauwe 1980;Norman 1995中。

[0124] 在一些实施例中,用于T细胞激活的共刺激信号由辅佐细胞提供。辅佐细胞可以包含例如Fc受体,其使得CD3抗体能够与T细胞上的TCR/CD3复合物交联。在一些实施例中,细胞培养物是外周血单核细胞(PBMC)的混合群体。PBMC可以包含能够支持T细胞激活的辅佐细胞。例如,CD28共刺激信号可以由PBMC中的单核细胞上存在的B7分子提供。因此,在一些实施例中,辅佐细胞包含单核细胞或单核细胞源性细胞(例如,树突细胞)。在另外的实施例中,辅佐细胞包含B7、CD28和/或ICOS。辅佐细胞进一步描述于例如Wolf 1994;Chai 1997;Verwilghen 1991;Schwartz1990;Ju 2003;Baroja 1989;Austyn 1987;Tax 1983中。

[0125] 如本文所描述的,激活试剂可以确定所产生的CAR T细胞的表型,允许促进期望的表型。在一些实施例中,激活试剂确定T细胞亚群,即CD4+辅助T细胞与CD8+细胞毒性T细胞的比率。细胞毒性CD8+ T细胞通常负责杀伤癌细胞(即,抗肿瘤应答)、已感染的细胞(例如,具有病毒的细胞)或以其它方式受损的细胞。CD4+T细胞通常产生细胞因子并且有助于调节免疫应答,并且在一些情况下可以支持细胞裂解。CD4+细胞激活APC,然后使原初CD8+ T细胞致敏以进行抗肿瘤应答。因此,在实施例中,本公开的方法进一步包含产生预定义表型的CAR T细胞(即,促进期望表型的细胞)。预定义表型可以是例如CD8+细胞与CD4+细胞的预定义比率。在一些实施例中,CAR T细胞群中CD8+细胞与CD4+细胞的比率为约1:1、约0.25:1或约0.5:1。在其它实施例中,CAR T细胞群中CD8+细胞与CD4+细胞的比率为约2:1、约3:1、约

4:1或约5:1。

[0126] 产生预定义表型的方法适当地包含确定一种或多种分子特性,即CD8和CD4的水平,并且通过选择此类细胞或者修改产生参数以推动生成此类细胞来优化。

[0127] 在实施例中,在激活步骤之后将激活试剂从激活的T细胞培养物中去除。激活试剂,例如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体可以存在于细胞培养基中。因此,在一些实施例中,在激活步骤之后将含有激活试剂,例如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体的细胞培养基从激活的T细胞培养物中去除。在一些实施例中,去除激活试剂包含去除可溶性抗体。例如,可以通过更换细胞培养基去除可溶性抗体。还可以通过对可溶性抗体具有特异性的亲和方法去除可溶性抗体。在其它实施例中,去除激活试剂包含去除含有抗体的珠粒。去除珠粒可以包含例如过滤珠粒或通过磁铁来去除。

[0128] 激活的T细胞的转导。在一些实施例中,经基因修饰的免疫细胞培养物是激活的T细胞培养物,其用编码嵌合抗原受体的载体转导以产生经转导的T细胞培养物。在一些实施例中,转导包含病毒感染、转座子、mRNA转染、电穿孔或其组合。在一些实施例中,转导包含电穿孔。因此,在实施例中,细胞工程系统包含电穿孔系统或电穿孔单元。在另外的实施例中,转导包含病毒感染。载体可以是病毒载体,例如慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、腺相关病毒载体或腺病毒载体。在实施例中,转导包含将病毒载体引入到细胞培养物的激活的T细胞中。在另外的实施例中,将载体递送作为病毒颗粒。

[0129] 在一些实施例中,转导步骤包含用慢病毒载体转导激活的T细胞,其中慢病毒载体以约0.5到约50、约0.5到约30或约0.5到约20的感染复数(MOI)引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.5到约8的MOI引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.5到约6的MOI引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.5到约4的MOI引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.5到约2的MOI引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.6到约1.5的MOI引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.7到约1.3的MOI引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.8到约1.1的MOI引入。在一些实施例中,慢病毒载体以约0.5、约0.6、约0.7、约0.8、约0.9、约1、约1.1、约1.2、约1.3、约1.4、约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9或约2的MOI引入。

[0130] 在一些实施例中,在激活步骤之后,将来自T细胞培养物的细胞培养基去除,并且然后将培养基与载体(例如,慢病毒载体)混合并且均匀地分布到细胞。在一些实施例中,去除的细胞培养基用于稀释载体并且将所述载体均匀地递送到激活的T细胞培养物。T细胞培养物中的载体(例如,慢病毒载体)的均匀分布和随后均匀暴露改进了转导效率。在一些实施例中,细胞培养物的容积在激活之后且在添加载体之前减小。容积减小可以使得细胞与载体更高程度接触。在一些实施例中,激活的T细胞培养物在转导期间基本上未受干扰的。在一些实施例中,细胞培养物在激活和转导步骤期间基本上未受干扰的,即在将激活试剂或载体提供到细胞时,细胞通常保持处于室的同一区域(例如,细胞培养室的底部)。这可以促进激活试剂和/或载体的均匀分布且均匀暴露到细胞,并且因此可以改进激活和/或转导效率。

[0131] 经转导的T细胞的扩增。在一些实施例中,将经转导的T细胞培养物(或其它细胞疗法或免疫细胞培养物)扩增到预定义的培养物大小(即,细胞数量)。预定义的培养物大小可以包含足够数量的适于临床使用,即输血到患者体内、研发工作等的细胞。在一些实施例中,用于施用到患者的CAR T细胞的临床或治疗剂量为约 10^5 个细胞、约 10^6 个细胞、约 10^7 个

细胞、约 10^8 个细胞、约 10^9 个细胞或约 10^{10} 个细胞。在一些实施例中,所述方法产生至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个临床剂量的CAR T细胞。在一些实施例中,经转导的T细胞培养物扩增到约0.1L到约5L、约0.1L到约2L或约0.2L到约2L的总容积。在一些实施例中,经转导的T细胞培养物扩增到约0.1L、约0.2L、约0.3L、约0.4L、约0.5L、约0.6L、约0.7L、约0.8L、约0.9L或约1.0L的总容积。容积还可以在过程中变化,如基于细胞产生过程的阶段所要求的。在一些实施例中,预定义的培养物大小由细胞工程系统的用户所输入。用户可以输入预定义的培养物大小作为期望要产生的细胞计数(例如, 10^{10} 个CAR T细胞),或者预定义的培养物大小可以输入作为要产生的临床或治疗剂量的期望数量(例如,CAR T细胞的10个临床或者治疗剂量)。在实施例中,通过本文所描述的方法产生的CAR T细胞的数量是至少约1亿(即, 1×10^6)个细胞或至少约3亿个、至少约5亿个、至少约6亿个、至少约7亿个、至少约8亿个、至少约9亿个、至少约10亿(即, 1×10^9)个、至少约11亿个、至少约12亿个、至少约13亿个、至少约14亿个、至少约15亿个、至少约16亿个、至少约17亿个、至少约18亿个、至少约19亿个、至少约20亿(即, 2×10^9)个细胞,包含至少约21亿个、至少约22亿个、至少约23亿个、至少约24亿个、至少约25亿个、至少约26亿个、至少约27亿个、至少约28亿个、至少约29亿个或至少约30亿个CAR T细胞。

[0132] 在一些实施例中,经转导的T细胞培养物的扩增包含经转导的T细胞培养物的至少一轮饲养、洗涤、监测和选择。饲养细胞培养物可以包含用培养基和/或另外的营养物补充细胞培养物。洗涤细胞培养物可以包含去除用过的培养基(即,耗竭营养物和/或含有细胞废物产物的培养基)并且用新鲜的培养基补充细胞培养物。监测细胞培养物可以包含监测细胞培养物的温度、pH、葡萄糖、氧气水平、二氧化碳水平和/或光密度。选择细胞培养物可以包含选择具有期望特性,例如活力、类型和/或形态学等的细胞并且去除不具备期望特性的细胞。在一些实施例中,细胞工程系统被配置成对经转导的T细胞培养物进行几轮饲养、洗涤、监测和/或选择以实现预定义的培养物大小。在一些实施例中,细胞工程系统对经转导的T细胞培养物进行至少2轮、至少3轮、至少4轮、至少5轮、至少6轮、至少7轮、至少8轮、至少9轮、至少10轮、至少15轮、至少20轮、至少25轮、至少30轮、至少35轮、至少40轮、至少45轮、至少50轮或至少100轮饲养、洗涤、监测和/或选择以实现预定义的培养物大小。

[0133] 在实施例中,可以去除饲养、洗涤和监测中的一个或多个,或者事件的顺序可以根据期望的细胞表型或细胞数量等变化。

[0134] 在实施例中,监测包含用温度传感器、pH传感器、葡萄糖传感器、氧气传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器进行监测。因此,在一些实施例中,细胞工程系统包含温度传感器、pH传感器、葡萄糖传感器、氧气传感器、二氧化碳传感器和/或光密度传感器中的一个或多个。在另外的实施例中,细胞工程系统被配置成基于预定义的培养物大小来调整细胞培养物的温度、pH、葡萄糖、氧气水平、二氧化碳水平和/或光密度。例如,如果细胞工程系统检测到细胞培养物的当前氧气水平太低,无法实现期望的细胞培养物大小的必要生长,那么细胞工程系统将通过例如引入氧化的细胞培养基、通过用氧化的细胞培养基替换细胞培养基或通过使细胞培养基流过氧合组件(即,硅酮管)来自动增加细胞培养物的氧气水平。在另一个实例中,如果细胞工程系统检测到细胞培养物的当前温度太高并且细胞生长

太快(例如,细胞过度拥挤可能会导致不期望的特性),那么细胞工程系统将自动降低细胞培养物的温度,以维持细胞的稳定生长速率(或指数生长速率,根据需要)。在仍另外的实施例中,细胞工程系统基于细胞生长速率和/或细胞计数或其它监测因素,如pH、氧气、葡萄糖等自动化调整细胞饲养(即,向细胞培养物提供新鲜培养基和/或营养物)的时间表。细胞工程系统可以被配置成在低温室中(例如,4℃或-20℃下)储存培养基(和其它试剂,如洗涤溶液等),并且在将温热的培养基引入到细胞培养物之前在室温或更高温度的室中(例如,分别在25℃或37℃下)温热培养基。

[0135] 在实施例中,洗涤包含通过过滤或沉降洗涤细胞。在实施例中,选择包含将细胞培养物与一种或多种选择试剂混合。选择试剂可以是珠粒,例如磁珠,其对于期望的细胞类型具有特异性,并且例如通过穿过磁室将结合到珠粒的细胞然后从未结合的细胞中分离。例如,选择珠粒包含对期望的细胞类型具有特异性的抗体,例如,抗CD8抗体或抗CD4抗体。还可以通过过滤进行选择以基于大小去除或选择某些细胞类型。还可以利用通过塑料粘附进行的细胞选择(即,细胞可以在一个室内开始,不想要的细胞粘连到表面,并且然后仍然处于悬浮液中的期望的细胞被移动到另一室中)。

[0136] 经扩增的培养物的浓度。在一些实施例中,将经扩增的T细胞培养物(或其它细胞疗法包含其它免疫细胞培养物)浓缩到预定义的浓度。预定义的浓度是可以适当地输注到患者中的容积。例如,经扩增的T细胞培养物可以浓缩到约1ml、约2ml、约5ml、约10ml、约15ml、约20ml、约25ml、约30ml、约35ml、约40ml、约45ml、约50ml、约55ml、约60ml、约65ml、约70ml、约75ml、约80ml、约85ml、约90ml、约95ml或约100ml。在一些实施例中,通过离心分离进行浓缩。在一些实施例中,通过过滤进行浓缩。在一些实施例中,过滤是超滤和/或透析过滤。在一些实施例中,预定义的浓度是由细胞工程系统的用户输入的。在其它实施例中,预定义的浓度是基于用户的不同参数输入,例如要产生的临床或治疗剂量的数量或容积;或要产生的细胞数量由细胞工程系统确定的。在一些实施例中,细胞工程系统基于输入参数来自动调整所产生的临床或治疗剂量的容积或数量。在一些实施例中,细胞工程系统基于预定义的浓度来自动调整离心(例如,离心的速度、持续时间)或过滤(例如,过滤大小、容积、时长)的参数。

[0137] 还可以利用基于端口位置和室的设计的沉降。换句话说,在不去除细胞的情况下,流体容积可以在室内减少到约0.5mL。

[0138] CAR T细胞培养物采集。在一些实施例中,将经浓缩的T细胞培养物(或包含其它免疫细胞培养物的其它细胞疗法)适当地采集以产生嵌合抗原受体(CAR)T细胞培养物。在一些实施例中,采集包含CAR T细胞的搅拌、流体流动和洗涤。在一些实施例中,采集包含将细胞从不期望的产物中分离,包含例如细胞废物产物、选择试剂,如珠粒(例如,含有抗体的珠粒和/或用于细胞分离的珠粒)、或过量的病毒载体。在一些实施例中,采集包含CAR T细胞均匀分布到一个或多个烧瓶、小瓶或容器。在一些实施例中,采集包含将CAR T细胞重悬于调配物试剂中,例如使CAR T细胞稳定以用于长期储存的溶液。在一些实施例中,采集包含CAR T细胞的冷冻保存。

[0139] 另外的下游过程。在一些实施例中,CAR T细胞(或包含其它免疫细胞的其它细胞疗法)在患者进行治疗使用之前经历另外的下游处理。例如,CAR T细胞可以通过无菌过滤进行过滤以去除可能的病毒颗粒残留物。在无菌过滤之后,CAR T细胞可以经历至少再一个

浓缩步骤,然后包装在一个或多个小瓶、烧瓶、容器(vessel或container)中。经包装的CAR T细胞可以经受如本文所描述的质量评估和/或质量控制测试。在一些实施例中,CAR T细胞在施用于患者之前经历最小下游处理。例如,在一些实施例中,所采集的CAR T细胞在采集后短时间内未冷冻保存而是转移到患者。避免冷冻保存步骤可以增加细胞的活力。

[0140] 另外的示例性实施例

[0141] 实施例1是一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述方法包括:确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;通过自动化细胞工程系统对所述细胞培养物进行基因修饰;在所述基因修饰期间和之后确定修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及优化所述自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0142] 实施例2包含根据实施例1所述的方法,其中所述一种或多种分子特性选自以下组成的组:基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化。

[0143] 实施例3包含根据实施例1或实施例2所述的方法,其中所述细胞培养物是免疫细胞培养物、自然杀伤细胞培养物和用于神经退行性疗法的细胞培养物。

[0144] 实施例4包含根据实施例3所述的方法,其中所述免疫细胞培养物是T细胞培养物。

[0145] 实施例5包含根据实施例4所述的方法,其中T细胞培养物是嵌合抗原受体T(CAR T)细胞培养物。

[0146] 实施例6包含根据实施例5所述的方法,其中所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。

[0147] 实施例7包含根据实施例1到6中任一项所述的方法,其中(d)中的所述优化在所述基因修饰之前、期间和/或之后发生。

[0148] 实施例8包含根据实施例1到7中任一项所述的方法,其中所述优化包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。

[0149] 实施例9是一种用于评估并优化基于细胞的疗法的细胞质量的方法,所述方法包括:确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前细胞培养物的所述一种或多种分子特性;用激活试剂激活所述修饰前细胞培养物,以产生激活的细胞培养物;用载体转导所述激活的免疫细胞培养物,以产生经转导的细胞培养物;对所述经转导的细胞培养物进行扩增;对(e)的经扩增的细胞培养物进行浓缩;采集(f)的经浓缩的细胞培养物,以产生经基因修饰的细胞培养物;在步骤(c)到(g)中的任何一个步骤期间或之后确定所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及优化步骤(c)到(g)中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0150] 实施例10包含根据实施例9所述的方法,其中所述一种或多种分子特性选自以下组成的组:基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化。

[0151] 实施例11包含根据实施例9或实施例10所述的方法,其中所述细胞培养物是免疫细胞培养物、自然杀伤细胞培养物和用于神经退行性疗法的细胞培养物。

[0152] 实施例12包含根据实施例11所述的方法,其中所述免疫细胞培养物是T细胞培养

物。

[0153] 实施例13包含根据实施例12所述的方法,其中T细胞培养物是嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物。

[0154] 实施例14包含根据实施例13所述的方法,其中所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。

[0155] 实施例15包含根据实施例9到14中任一项所述的方法,其中所述优化包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。

[0156] 实施例16是一种用于评估并优化嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞培养物的细胞质量的方法,所述方法包括:确定修饰前T细胞培养物的一种或多种分子特性;优化自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰前T细胞培养物的所述一种或多种分子特性;用激活试剂激活所述修饰前T细胞培养物,以产生激活的T细胞培养物;用编码嵌合抗原受体的载体转导所述激活的T细胞培养物,以产生CAR T细胞培养物;对所述CAR T细胞培养物进行扩增;对(e)的经扩增的CAR T细胞培养物进行浓缩;采集(f)的经浓缩的CAR T细胞培养物;在步骤(c)到(g)中的任何一个步骤期间或之后确定所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及优化步骤(c)到(g)中的任何一个步骤的一个或多个参数以更改所述CAR T细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0157] 实施例17包含根据实施例16所述的方法,其中所述方法产生至少约1亿个存活的CAR T细胞。

[0158] 实施例18包含根据实施例16所述的方法,其中所述方法产生至少约20亿个存活的CAR T细胞。

[0159] 实施例19包含根据实施例16到19所述的方法,其中所述T细胞培养物包括外周血单核细胞和/或经纯化的T细胞。

[0160] 实施例20包含根据实施例16到19中任一项所述的方法,其中所述T细胞培养物包括至少一种辅佐细胞。

[0161] 实施例21包含根据实施例20所述的方法,其中所述辅佐细胞包括单核细胞或单核细胞源性细胞。

[0162] 实施例22包含根据实施例20所述的方法,其中所述辅佐细胞包括T细胞受体的抗原,包含CD28、CD40、CD2、CD40L和/或ICOS。

[0163] 实施例23包含根据实施例16到22中任一项所述的方法,其中所述激活试剂包括抗体或树突细胞。

[0164] 实施例24包含根据实施例23所述的方法,其中所述抗体固定在表面上。

[0165] 实施例25包含根据实施例24所述的方法,其中所述表面是珠粒的表面。

[0166] 实施例26包含根据实施例23所述的方法,其中所述抗体是可溶性抗体。

[0167] 实施例27包含根据实施例23所述的方法,其中所述抗体包括抗CD3抗体和抗CD28抗体中的至少一种。

[0168] 实施例28包含根据实施例16到27中任一项所述的方法,其中所述转导包括病毒感染、电穿孔、膜破坏或其组合。

[0169] 实施例29包含根据实施例16到28中任一项所述的方法,其中所述载体是慢病毒载体或逆转录病毒。

[0170] 实施例30包含根据实施例16到29中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子特性包含T细胞激活、代谢、耗竭和T细胞受体多样性。

[0171] 实施例31包含根据实施例16到30中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子特性选自以下组成的组:基因表达、蛋白质表达、mRNA表达和拷贝数变化。

[0172] 实施例32包含根据实施例31所述的方法,其中确定了至少约500种基因表达。

[0173] 实施例33包含根据实施例31所述的方法,其中确定了至少约700种基因表达。

[0174] 实施例34包含根据实施例31所述的方法,其中确定了约780种基因表达。

[0175] 实施例35包含根据实施例16到34中任一项所述的方法,其中所述优化包含以下中的一个或多个:增加或减小细胞培养基的流速;增加或减小氧气浓度;增加或减小二氧化碳浓度;增加或减小葡萄糖水平;增加或减小细胞扩增的温度;增加或减小细胞培养基的pH;修改细胞转导程序;修饰用于转导程序的载体;以及修改细胞分离程序。

[0176] 实施例36是一种用于评估并优化细胞培养物的细胞质量的方法,所述方法包括:确定修饰前细胞培养物的一种或多种分子特性;通过自动化细胞工程系统对所述细胞培养物进行基因修饰;在所述基因修饰期间和之后确定修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性;以及优化所述自动化细胞工程系统的一个或多个参数以更改所述修饰后细胞培养物的所述一种或多种分子特性。

[0177] 参考文献:

[0178] FDA,再生医学先进疗法认定(FDA,Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation.) (2017).可从以下获得:<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ucm537670.htm>. (访问于:2017年8月8日)

[0179] Wang,X.和Rivière,I.CAR T细胞的临床制造:有前景的疗法的基础(Clinical manufacturing of CAR T cells:foundation of a promising therapy.)《分子疗法-溶瘤(Mol.Ther.-Oncolytics)》3,16015(2016)。

[0180] Jones,S.D.,McKee,S.和Levine,H.L.细胞疗法制造中的新兴挑战(Emerging challenges in cell therapy manufacturing.)《生物过程国际杂志(BioProcess Int)》10,S4--S7(2012)。

[0181] Trainor,N.,Pietak,A.和Smith,T.重新思考成人干细胞疗法的临床递送(Rethinking clinical delivery of adult stem cell therapies.)《自然生物技术(Nat Biotech)》32,729-735(2014)。

[0182] Nilsson,C.等人,用于健康瑞典和坦桑尼亚受试者的 γ 干扰素酶联免疫点测试的最佳血液单核细胞分离程序(Optimal Blood Mononuclear Cell Isolation Procedures for Gamma Interferon Enzyme-Linked Immunospot Testing of Healthy Swedish and Tanzanian Subjects.)《临床和疫苗免疫学(Clin.Vaccine Immunol.)》15,585-589(2008)。

[0183] Bohnenkamp,H.,Hilbert,U.和Noll,T.用于以临床规模培养人T淋巴细胞的生物过程开发(Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale.)《细胞技术(Cytotechnology)》38,135-145(2002)。

[0184] Lu, F. 等人, 用于实现高生产率的细胞培养过程开发的自动化动态饲养分批过程和培养基优化(Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development.)《生物技术与生物工程(Biotechnol. Bioeng.)》110, 191-205 (2013)。

[0185] Hollyman, D. 等人, 用于自体过继性细胞疗法的靶向CD19抗原的生物功能性T细胞的制造验证(Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy.)《免疫疗法杂志(J. Immunother.)》32, 169-180 (2009)。

[0186] FDA, Sepax 细胞分离系统和一次性使用试剂盒(FDA, Sepax Cell Separation System and single use kits.) (2011). 可从以下获得:<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/SubstantiallyEquivalent510kDeviceInformation/UCM278385.pdf>。(访问于: 2017年11月8日)

[0187] Wegener, C. 用LOVO细胞处理系统进行细胞洗涤(Cell Washing with the LOVO Cell Processing System.)《生物过程国际工业(BioProcess Int Industry)》Y, p78 (2014)。

[0188] Trickett, A. 和 Kwan, Y. L. 使用抗CD3/CD28珠粒刺激和扩增T细胞(T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads.)《免疫学方法杂志(J. Immunol. Methods)》275, 251-255 (2003)。

[0189] Hasegawa, K. 等人, 通过装载含有含胆固醇的疏水化普鲁兰多糖和NY-ESO-1蛋白的复合物的树突细胞对CD8和CD4 T细胞进行体外刺激: 鉴定新的HLA-DR15结合CD4 T细胞表位(In vitro stimulation of CD8 and CD4 T cells by dendritic cells loaded with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan and NY-ESO-1 protein: Identification of a new HLA-DR15-binding CD4 T-cell epitope.)《临床癌症研究(Clin. Cancer Res.)》12, 1921-1927 (2006)。

[0190] Odeleye, A. O. O., Marsh, D. T. J., Osborne, M. D., Lye, G. J. 和 Micheletti, M. 实验室规模一次性使用的搅拌的生物反应器的流体动力学(On the fluid dynamics of a laboratory scale single-use stirred bioreactor.)《化学工程化科学(Chem. Eng. Sci.)》111, 299-312 (2014)。

[0191] Grishagin, I. V. 用ImageJ的自动化细胞计数(Automatic cell counting with ImageJ.)《分析生物化学(Anal. Biochem.)》473, 63-65 (2015)。

[0192] Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K. 和 Keir, C. CAR T细胞疗法的全球制造(Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy.)《分子疗法: 方法与临床发展(Mol. Ther. Methods Clin. Dev.)》4, 92-101 (2017)。

[0193] Locke, F. L. 等人, 摘要CT019: 来自ZUMA-1的主要结果: 益基利仑赛(axicel; KTE-C19)在难治性侵袭性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)患者中的关键性试验(Abstract CT019: Primary results from ZUMA-1: a pivotal trial of axicabtagene ciloleucel (axicel; KTE-C19) in patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL).)《癌症研究(Cancer Res.)》77, CT019 LP-CT019 (2017)。

[0194] Lu YC, Parker LL, Lu T, Zheng Z, Toomey MA, White DE, Yao X, Li YF, Robbins

PF,Feldman SA, van der Bruggen P, Klebanoff CA, Goff SL, Sherry MS, Kammula US, Yang JC, Rosenberg SA. 使用靶向癌症种系抗原MAGE-A3的主要组织相容性复合物II类限制性T细胞受体治疗患有转移性癌症的患者 (Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor targeting the cancer germline antigen MAGE-A3.)《临床肿瘤学杂志 (Journal of Clinical Oncology)》(2017) 35:29,3322-3329。

[0195] FDA, 可从以下在线获得: <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM566166.pdf>

[0196] Berdeja JG, Lin Y, Raje NS, Siegel DSD, Munshi NC, Liedtke M, Jagannath S, Maus MV, Turka A, Lam LP, Hege K, Morgan R, Quigley MT, Kochenderfer J. 针对复发性/难治性多发性骨髓瘤的bb2121抗BCMA CAR T细胞疗法的首例人多中心研究:更新结果 (First-in-human multicenter study of bb2121 anti-BCMA CAR T-cell therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results.)《临床肿瘤学杂志》2017 35:15_增刊, 3010-3010

[0197] Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figiola MJ, Bassett R, Olivares S, Jena B, Dawson MJ, Kumaresan PR, Su S, Maiti S, Dai J, Moriarity B, Forget MA, Senyukov V, Orozco A, Liu T, McCarty J, Jackson RN, Moyes JS, Rondon G, Qazilbash M, Ciurea S, Alousi A, Nieto Y, Rezvani K, Marin D, Popat U, Hosing C, Shpall EJ, Kantarjian H, Keating M, Wierda W, Do KA, Largaespada DA, Lee DA, Hackett PB, Champlin RE, Cooper LJN. 使用睡美人产生CD19特异性CAR T细胞的I期试验 (Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells.)《临床研究杂志 (J Clin Invest.)》2016年9月1日; 126 (9): 3363-3376。

[0198] Morrissey JB, Shi Y, Trainor N. 端到端细胞疗法自动化: 免疫疗法案例研究 (End-to-end cell therapy automation: an immunotherapy case study.)《国际生物过程 (BioProcess International)》(2017) 10-18。

[0199] Lafferty KJ, Cunningham AJA. 同种异体相互作用的新分析 (New analysis of allogeneic interactions.)《免疫学杂志 (J. Immunol.)》(1975) 112:436-437。

[0200] Harding F, McArthur J, Gross J, Raulet D, Allison J. CD28介导的信号传导共同刺激鼠T细胞并防止诱导T细胞克隆中的无反应性 (CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones) (1992)《自然 (Nature)》356:607-609。

[0201] Clavreul A, Fisson S, D'hellencourt CL, Couez D. 鼠T细胞胸腺瘤中的CD3途径与CD28途径之间的相互关系 (Interrelationship between CD3 and CD28 pathways in a murine T cell thymoma.)《分子免疫学 (Mol Immunol.)》(2000) 37 (10): 571-7。

[0202] Charron L, Doctrinal A, Choileain SN, Astier AL. 单核细胞: T细胞相互作用通过CD28/CD46串扰调控人T细胞激活 (Monocyte: T cell interaction regulates human T cell activation through a CD28/CD46 crosstalk.)《免疫学与细胞生物学 (Immunol Cell Biol.)》(2015) 93 (9): 796-803。

- [0203] Fathman CG1,Lineberry NB.CD4+ T细胞无反应性的分子机制(Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy.)《自然评论免疫学(Nat Rev Immunol.)》(2007)7 (8):599-609。
- [0204] Greenwald RJ,Freeman GJ,Sharpe AH.B7家族重访(The B7 family revisited.)《免疫学年度评论(Annual Review of Immunology)》(2005)23(1):515-548。
- [0205] Kochenderfer JN,Dudley ME,Kassim SH等人,可以用表达抗CD19嵌合抗原受体的自体T细胞有效地治疗化疗难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤和惰性B细胞恶性肿瘤(Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19chimeric antigen receptor.)《临床肿瘤学杂志》(2015);33(6):540-549。
- [0206] Kalos M,Levine BL,Porter DL等人,具有嵌合抗原受体的T细胞具有强效的抗肿瘤作用并且可以在患有晚期白血病的患者中建立记忆(T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia.)《科学转化医学(Science Translational Medicine)》(2011)3 (95):95ra73。
- [0207] Riddell SR,Greenberg PD.使用抗CD3单克隆抗体和抗CD28单克隆抗体来克隆和扩增人抗原特异性T细胞(The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells.)《免疫学方法杂志》(1990)4月17日;128(2):189-201。
- [0208] Trickett A,Kwan YL.使用抗CD3/CD28珠粒刺激和扩增T细胞.《免疫学方法杂志》275(2003)251-255。
- [0209] Dudley ME,Wunderlich JR,Shelton TE,Even J,Rosenberg SA.生成用于黑色素瘤患者的过继性转移疗法的肿瘤浸润淋巴细胞培养物(Generation of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures for Use in Adoptive Transfer Therapy for Melanoma Patients.)《免疫疗法杂志》(2003)26(4):332-342。
- [0210] Dudley ME,Wunderlich JR,Shelton TE,Even J,Rosenberg SA.生成用于黑色素瘤患者的过继性转移疗法的肿瘤浸润淋巴细胞培养物.《免疫疗法杂志》(2003)26(4):332-342。
- [0211] Manger B,Weiss A,Weyand C,Goronzy J,Stobo JD.T细胞激活:非激活和激活的T细胞产生IL 2所需的信号差异(T cell activation:differences in the signals required for IL 2production by nonactivated and activated T cells.)《免疫疗法杂志》(1985)135(6)3669-3673。
- [0212] Ceuppens J,Bloemmen FJ,Van Wauwe JP.T细胞对OKT3抗体的促有丝分裂活性无应答是由于缺乏针对鼠IgG2a的单核细胞Fc γ 受体以及无法交联T3-Ti复合物(Tcell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from a deficiency of monocyte Fc gamma receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the T3-Ti complex.)《免疫学杂志》1985,135(6)3882-3886。
- [0213] Van Wauwe JP,De Mey JR,Goossens JG.OKT3:具有强效的促有丝分裂特性的单克隆抗人T淋巴细胞抗体(OKT3:a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with

potent mitogenic properties.)《免疫学杂志》(1980) 124 (6):2708-13。

[0214] Carpenter PA,Pavlovic S,Tso JY,Press OW,Gooley T,Yu XZ,Anasetti C.非Fc受体结合的人源化抗CD3抗体诱导激活的人T细胞的细胞凋亡(Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells.)《免疫学杂志》2000,165 (11) 6205-6213。

[0215] Andris F,Denanglaire S,de Mattia F,Urbain J,Leo O.原初T细胞耐受抗CD3抗体诱导的无反应性(Naive T cells are resistant to anergy induction by anti-CD3 antibodies.)《免疫学杂志》(2004) 173 (5) 3201-3208。

[0216] Wolf H,Müller Y,Salmen S,Wilmanns W,Jung G.通过固定的抗CD3抗体诱导静息的人T淋巴细胞的无反应性(Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies.)《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol.)》(1994) 24 (6):1410-1417。

[0217] Chai JG,Lechler RI.固定的抗CD3 mAb在体外诱导鼠原初和记忆CD4⁺ T细胞的无反应性(Immobilized anti-CD3 mAb induces anergy in murine naive and memory CD4⁺T cells in vitro.)《国际免疫学(Int Immunol.)》(1997) 9 (7):935-944。

[0218] Verwilghen J,Baroja ML,Van Vaecck F,Van Damme J,Ceuppens JL.固定的抗CD3单克隆抗体的刺激能力的差异:作为T细胞激活的辅助信号的白介素-1的可变依赖性(Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies:variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation.)《免疫学(Immunology)》(1991) 72 (2):269-276。

[0219] Schwartz RH.淋巴细胞-T克隆性无反应性的细胞培养模型(A cell-culture model for lymphocyte-T clonal anergy.)《科学(Science)》(1990) 248:1349-1356。

[0220] Ju SW,Ju SG,Wang FM,Gu ZJ,Qiu YH,Yu GH,Ma HB,Zhang XG.通过4-1BBL的反向信号传导增强单核细胞的增殖的功能性抗人4-1BB配体单克隆抗体(Afunctional anti-human 4-1BB ligand monoclonal antibody that enhances proliferation of monocytes by reverse signaling of 4-1BBL.)《杂交瘤与杂交组学(Hybridoma and Hybridomics.)》(2003) 22:333-338。

[0221] Baroja ML,Lorre K,Van Vaecck F,Ceuppens JL.抗T细胞单克隆抗体9.3(抗CD28)提供辅助信号并且用固定的抗CD3和有丝分裂原绕过T细胞激活中辅佐细胞的需要(The anti-T cell monoclonal antibody 9.3(anti-CD28)provides a helper signal and bypasses the need for accessory cells in T cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens.)《细胞免疫学(Cell Immunol.)》(1989) 120 (1):205-217。

[0222] Austyn JM,Smith KG,Morris PJ.抗CD3抗体激活T细胞:Fc受体对B细胞原始细胞而不是静止的B细胞的作用,以及CD18对响应T细胞的作用(T cell activation by anti-CD3 antibodies:function of Fc receptors on B cell blasts,but not resting B cells,and CD18 on the responding T cells.)《欧洲免疫学杂志》1987 17 (9):1329-35。

[0223] Tax WJM,Willems HW,Reekers PPM,Capel PJA,Koene RAP.针对T3抗原的IgG1单克隆抗体对人T细胞的促有丝分裂作用的多态性(Polymorphism in mitogenic effect of

IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells.)《科学》(1983) 304:445-447。

[0224] Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2) 在人外周血单核细胞上的表达和功能差异 (Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes.)《免疫学 (Immunology)》(1996) 89 (4):592-598。

[0225] Schwartz RH. T细胞无反应性 (T cell anergy.)《免疫学年度评论》(2003) 21: 305-34。

[0226] Feldmann A, Arndt C, Töpfer K, Stamova S, Krone F, Cartellieri M, Koristka S, Michalk I, Lindemann D, Schmitz M, Temme A, Bornhäuser M, Ehninger G, Bachmann M. 新型的人源化且高效的双特异性抗体介导 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞杀伤表达前列腺干细胞抗原的肿瘤细胞 (Novel humanized and highly efficient bispecific antibodies mediate killing of prostate stem cell antigen-expressing tumor cells by CD8⁺ and CD4⁺ T cells.)《免疫学杂志》(2012) 189 (6):3249-3259。

[0227] Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH, Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenhuth V, Gall FL 等人, 四价双特异性 TandAb (CD19/CD3), 即 AFM11 高效募集用于 CD19⁺ 肿瘤细胞的强效裂解的 T 细胞 (A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19⁺ tumor cells.)《MAb》(2015) 7:584-604。

[0228] Church SE, Jensen SM, Antony PA, Restifo NP, Fox BA. 肿瘤特异性 CD4⁺ T 细胞维持效应蛋白和记忆肿瘤特异性 CD8⁺ T 细胞 (Tumor-specific CD4⁺ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8⁺ T cells.)《欧洲免疫学杂志》(2014) 44 (1): 69-79。

[0229] Feldmann A, Arndt C, Töpfer K, Stamova S, Krone F, Cartellieri M, Koristka S, Michalk I, Lindemann D, Schmitz M, Temme A, Bornhäuser M, Ehninger G, Bachmann M. 新型的人源化且高效的双特异性抗体介导 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞杀伤表达前列腺干细胞抗原的肿瘤细胞.《免疫学杂志》(2012) 189:3249-3259。

[0230] Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH, Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenhuth V, Gall FL, Topp M, Little M, Zhukovsky EA. 四价双特异性 TandAb (CD19/CD3), 即 AFM11 高效募集用于 CD19⁺ 肿瘤细胞的强效裂解的 T 细胞. (2015) 7: 584-604。

[0231] Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C 等人, 具有确定子集组成的嵌合抗原受体修饰的 T 细胞的过继性疗法 (Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition.)《癌症杂志 (Cancer J)》(2014) 20 (2):141-144。

[0232] Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C 等人, 成人 B 细胞 ALL 患者中定义的 CD4⁺:CD8⁺ 组成的 CD19 CAR-T 细胞 (CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients.)《临床研究杂志 (The Journal of Clinical Investigation.)》(2016) 126 (6):2123-2138。

- [0233] Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, Siddiqi T, Siddiqi T, Chavez JC, Hosing CM, Ghobadi A, Budde LE, Bot A, Rossi JM, Jiang Y, Xue AX, Elias M, Aycock J, Wietzorek J, Go WY. ZUMA-1 的 1 期结果: 难治性侵袭性淋巴瘤中的 KTE-C19 抗 CD19 CAR T 细胞疗法的多中心研究 (Phase I Results of ZUMA-1: A multicenter study of KTE-C19 anti-CD19 CAR T cell therapy in refractory aggressive lymphoma.) 《分子疗法 (Molecular Therapy)》(2017) 25 (1): 285-295。
- [0234] Trainor N, Pietak A, Smith T. 重新思考成人干细胞疗法的临床递送. 《自然生物技术》(2014) 729-735。
- [0235] Mahdavi B, Gottschalk U, Trainor N, Smith T. 个性化的宣传、希望和现实 (The hype, hope and reality of personalization.) 《药物制造商 (The Medicine Maker)》(2015) 38-41。
- [0236] Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. 不同癌症中的 HER2 表达状态: 来自 37,992 名患者的结果综述 (HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients.) 《癌症转移综述 (Cancer Metastasis Review)》(2015) 34 (1): 157-164。
- [0237] Tueffler M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broët P, Guastalla JP, Allouache D, Combe M, Weber B, Pujade-Lauraine E, Camilleri-Broët S. 卵巢癌中的 HER2 状态: 320 名患者的多中心 GINECO 研究 (HER2 Status in Ovarian Carcinomas: A Multicenter GINECO Study of 320 Patients) (2007) 2 (11): e1138。
- [0238] Lu TL, Pugach M, Somerville R, Rosenberg SA, Kochendefter JN, Better M, Feldman SA. 用于产生工程化的自体 CAR-T 细胞疗法的快速细胞扩增过程 (A rapid cell expansion process for production of engineered autologous CAR-T cell therapies.) 《人类基因疗法 (Human Gene Therapy)》(2016) 27: 209-218。
- [0239] Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. 新型的一步高敏感性荧光测定以评估细胞介导的细胞毒性 (A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity.) 《免疫学方法杂志》(1998) 213 (2): 157-167。
- [0240] Romagnani S. 1 型 T 辅助细胞和 2 型 T 辅助细胞: 在保护和疾病中的功能、调控和作用 (Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease.) 《国际临床与实验室研究杂志 (Int J Clin Lab Res)》(1991) 21 (2): 152-158。
- [0241] Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2) 在人外周血单核细胞上的表达和功能差异. 《免疫学 (Immunology)》(1996) 89 (4): 592-598。
- [0242] Laux I, Khoshnan A, Tindell C, Bae D, Zhu XM, June CH, Effros RB, Nel A. 在 CD28 共刺激期间人 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞之间的应答差异: 对基于免疫细胞的疗法以及与衰老期间双阳性 T 细胞扩增相关的研究的影响 (Response differences between human CD4⁺ and CD8⁺ T-cells during CD28 costimulation: Implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging.) 《临床免疫学 (Clin Immunol)》(2000) 96: 187-197。

[0243] Li Y, Kurlander RJ. 抗CD3和抗CD28涂覆的珠粒与用于扩增人T细胞的可溶性抗CD3的比较:对CD8 T细胞表型的影响和对再刺激的反应性(Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: Differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation.)《转化医学杂志(J Transl Med.)》(2010)8:104。

[0244] Zhu YW, Zhu GF, Luo LQ, Flies AS, Chen LP. CD137刺激针对具有记忆表型的T淋巴细胞递送抗原非依赖性生长信号(CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype.)《血液学(Blood)》(2007)109:4882-4889。

[0245] Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, Grosmaire LS, Rabinovitch PS, Lindsten T, Thompson CB, June CH. T细胞激活中的CD28连接:两种信号转导途径的证据(CD28 Ligation in T-cell Activation: Evidence for Two Signal Transduction Pathways.)《血液学》(1990)75(7):1531-1539。

[0246] Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. 在大气氧气水平下进行培养影响淋巴细胞功能(Culturing at atmospheric oxygen levels impacts lymphocyte function.)《美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》(2005)102(10):3756-3759。

[0247] Avgoustiniatos ES, Hering BJ, Rozak PR等人, 可商购获得的可透气细胞培养袋可能无法防止培养或运送的胰岛缺氧(Commercially Available Gas-Permeable Cell Culture Bags May Not Prevent Anoxia in Cultured or Shipped Islets.)《移植学会会报(Transplantation proceedings.)》2008;40(2):395-400。

[0248] Hammill JA, VanSeggelen H, Helsen CW, Denisova GF, Eveleigh C, Tantaló DGM, Bassett JD, Bramson JL. 所设计的锚蛋白重复蛋白是嵌合抗原受体的有效靶向元件(Designed ankyrin repeat proteins are effective targeting elements for chimeric antigen receptors.)《癌症免疫疗法杂志(Journal for immunotherapy of cancer)》(2015)3:55。

[0249] VanSeggelen H, Tantaló DGM, Afsahi A, Hammill JA, Bramson JL. 嵌合抗原受体工程化T细胞作为溶瘤病毒载体(Chimeric antigen receptor-engineered T cells as oncolytic virus carriers.)《分子疗法-溶瘤》(2015)2,150014。

[0250] 对相关领域普通技术人员而言将显而易见的是,在不脱离任何实施例的范围的情况下,可以对本文所描述的方法和应用作出其它适合的修改和调整。

[0251] 应当理解的是,虽然本文中已经展示和描述了某些实施例,但是权利要求不限于所描述和示出的部分的特定形式或布置。在本说明书中已经公开了说明性实施例,并且尽管采用了具体术语,但其仅用于一般性和描述性意义并且不是出于限制的目的。鉴于以上教导,对所述实施例的修改和变化都是可能的。因此,应当理解的是,可以以与具体描述的方式不同的方式实践所述实施例。

[0252] 本说明书中所提及的所有公开、专利以及专利申请通过引用并入本文中,其程度如同每个单独的公开、专利或专利申请被专门地且单独地指示通过引用并入。

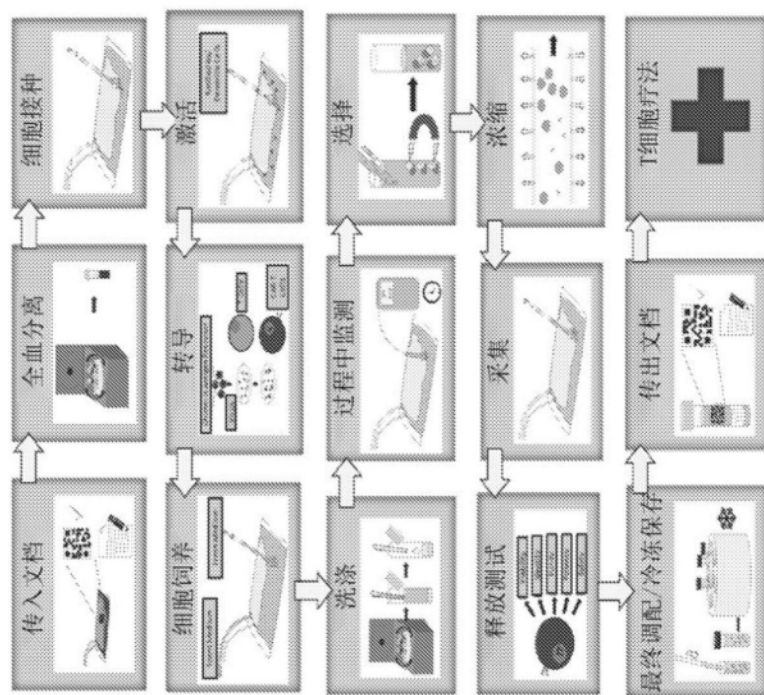


图1

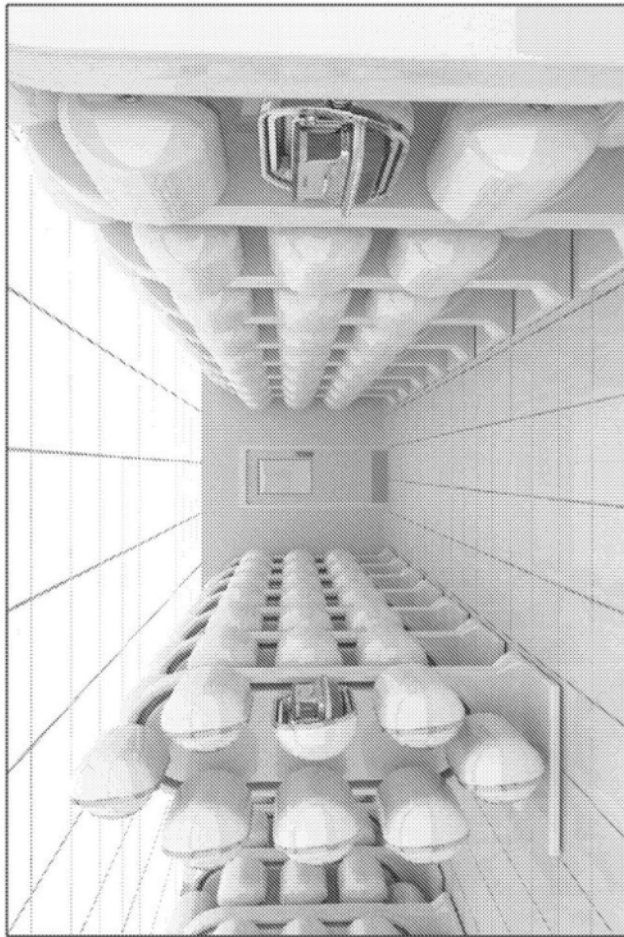


图2

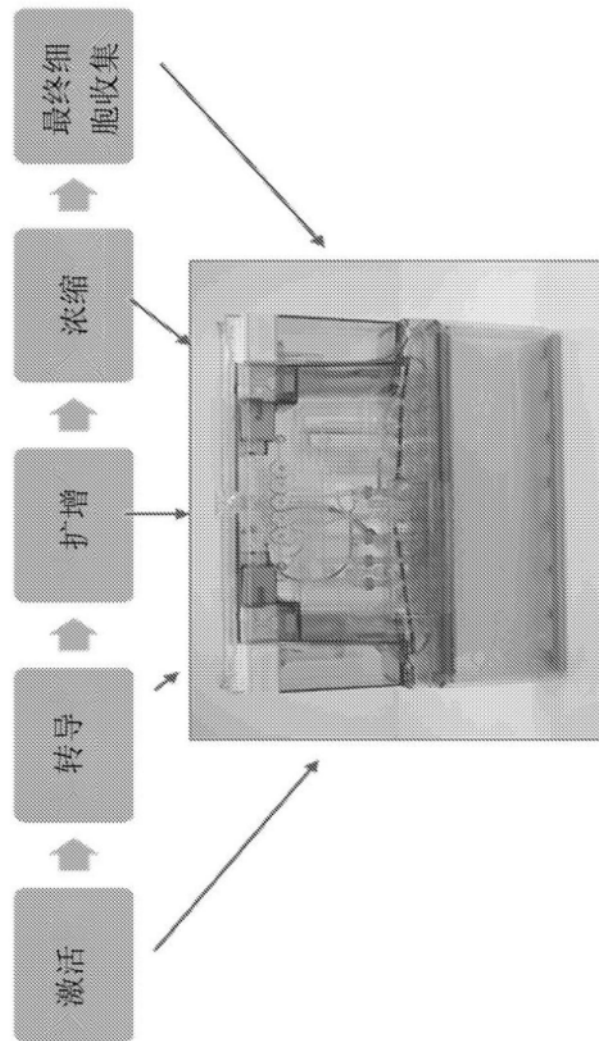


图3

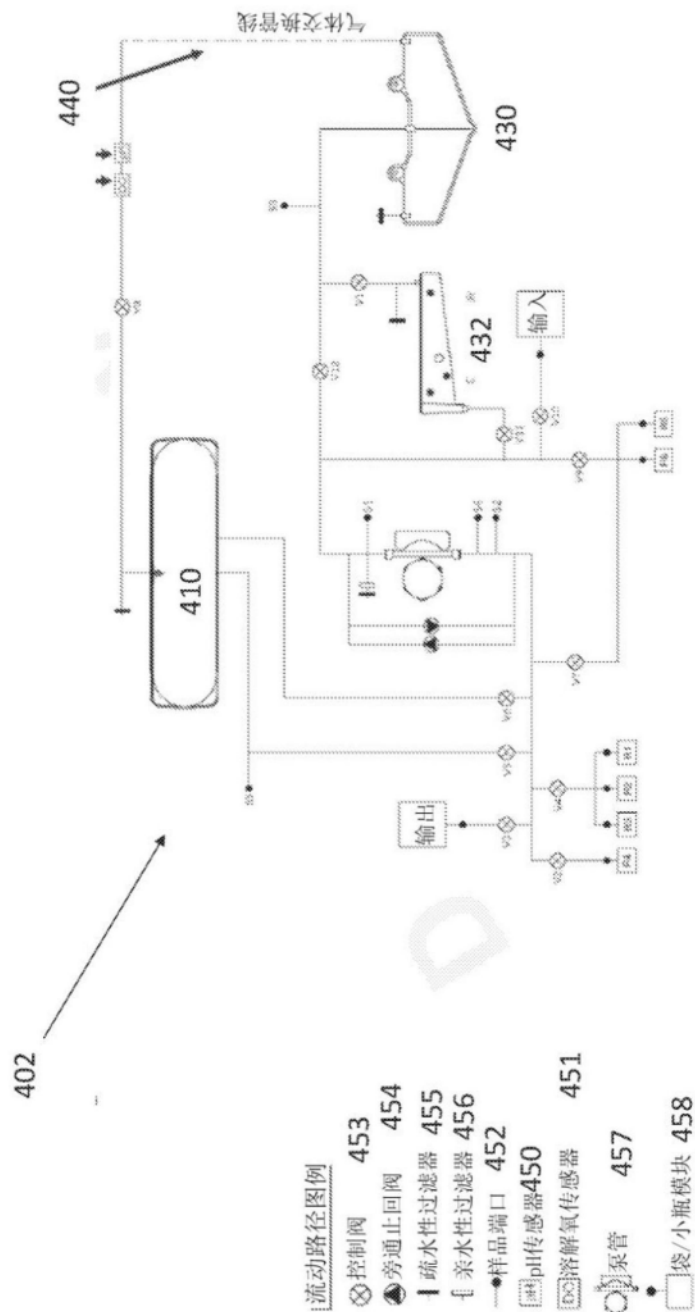


图4

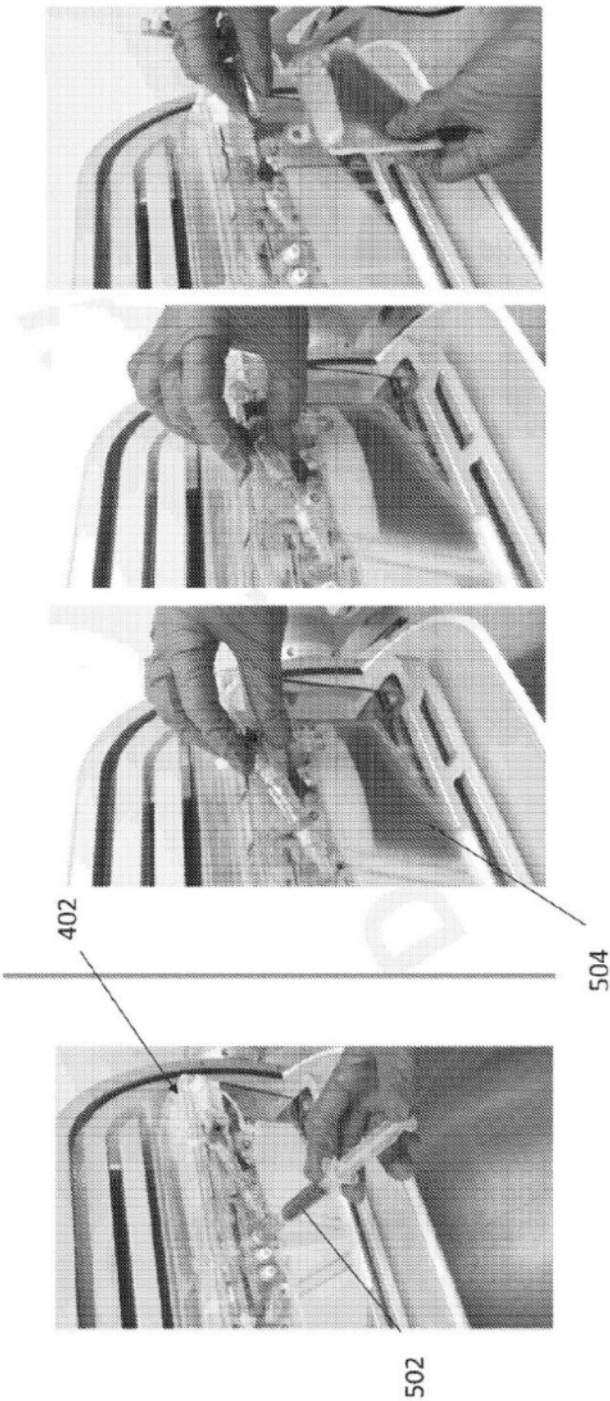


图5