



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월02일
(11) 등록번호 10-2296580
(24) 등록일자 2021년08월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/34 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 41/00 (2013.01)
C12M 23/42 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7008598
- (22) 출원일자(국제) 2018년08월31일
심사청구일자 2020년04월21일
- (85) 번역문제출일자 2020년03월25일
- (65) 공개번호 10-2020-0054215
- (43) 공개일자 2020년05월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/049171
- (87) 국제공개번호 WO 2019/046766
국제공개일자 2019년03월07일
- (30) 우선권주장
62/553,214 2017년09월01일 미국(US)
62/670,391 2018년05월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020160145162 A*
WO2017068425 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
론자 워크스빌 아이엔씨.
미합중국 21793 메릴랜드주, 워크스빌, 박스 포드
로드 8830
론차 콜로그네 게엠베하
독일50829 쾰른 나테르만알레 1
옥테인 바이오테크 인코포레이티드
캐나다, K7K 6Z1 온타리오 달톤 에비뉴 킹스턴
369
- (72) 발명자
쉬, 엘링
미합중국 21793메릴랜드주, 워크스빌, 박스 포드
로드 8830
맥아피, 에리카
미합중국 21793메릴랜드주, 워크스빌, 박스 포드
로드 8830
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
황이남

전체 청구항 수 : 총 59 항

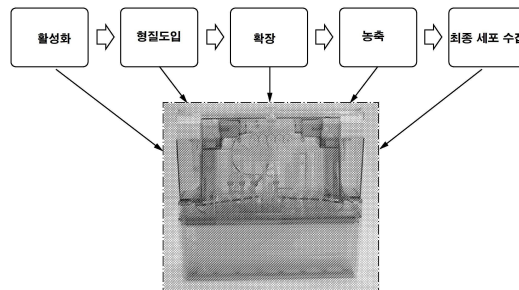
심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 엔드-투-엔드 세포 요법의 자동화

(57) 요약

본 발명은 완전 밀폐식 세포 공학 시스템을 이용하여 카메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포의 자동화된 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12M 29/20 (2013.01)

C12M 47/10 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

C12N 2740/10041 (2013.01)

C12N 2740/15041 (2013.01)

(72) 발명자

반다페이일, 사마타

미합중국 21793메릴랜드주, 워커스빌, 빅스 포드
로드 8830

시에호프, 앤

독일, 50829 쾰른, 나테르만알레 1,

글라이스너, 티모

독일, 50829 쾰른, 나테르만알레 1,

오코너, 요셉

미합중국 21793메릴랜드주, 워커스빌, 빅스 포드
로드 8830

아브라함, 이튼

미합중국 21793메릴랜드주, 워커스빌, 빅스 포드
로드 8830

피퓨러, 켈리

캐나다, K7K 6Z1 온타리오 스완필드 스트리트 킹스
턴 988

트레이노, 누알라

캐나다, K7P 1S6 온타리오 크레스트우드 애비뉴 킹
스턴 868

스미스, 티머시

캐나다, K7L 4P8 온타리오 알윈턴 플레이스 킹스턴
228

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법에 있어서,

(a) 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;

(b) 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;

(c) 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계;

(d) 단계 (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및

(e) 단계 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고,

확장된 면역 세포 배양물 및 농축된 면역 세포 배양물 중 하나 또는 둘 모두를 세척하는 단계를 더 포함하며,

단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에 의해 수행되고, 단계 (a) 내지 (e)는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하기 위해 수행되고,

상기 면역 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함하고,

상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터, 및 세포 배양 배지를 포함하는 단일 카세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함하는 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법에 있어서,

- (a) 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;
- (b) 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;
- (c) 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계;
- (d) 단계 (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및
- (e) 단계 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고,

확장된 면역 세포 배양물 및 농축된 면역 세포 배양물 중 하나 또는 둘 모두를 세척하는 단계를 더 포함하며,

단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에 의해 수행되고, 단계 (a) 내지 (e)는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하기 위해 수행되고,

상기 공정은 자체-조정 공정이며, 이는

(a) 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서 및 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 모니터링하는 단계; 및

(b) 모니터링을 기반으로, 형질도입된 T 세포 배양물의 온도, pH 수준, 포도당 수준, 산소 수준, 이산화탄소 수준 및 광학 밀도 중 하나 이상을 조정하는 단계를 포함하고,

상기 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 면역 세포 배양물을 위해 선택되고,

상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터, 및 세포 배양 배지를 포함하는 단일 카세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 적어도 하나의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시키는 방법.

청구항 23

유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법에 있어서,

(a) 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;

(b) 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;

(c) 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계;

(d) 단계 (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및

(e) 단계 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고,

확장된 면역 세포 배양물 및 농축된 면역 세포 배양물 중 하나 또는 둘 모두를 세척하는 단계를 더 포함하며,

단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에 의해 수행되고, 단계 (a) 내지 (e)는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하기 위해 수행되고,

상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 동안 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시키고,

상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터, 및 세포 배양 배지를 포함하는 단일 카세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23 항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링, 및 선별 중 하나 이상을 여러 번 수행하도록 구성되는 것인 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 농축 단계는 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함하고,

상기 공정은 원심분리 또는 여과의 파라미터를 조정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

제9항에 있어서, 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 30

제9항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터 및 세포 배양 배지를 함유하는 것인 방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

- 청구항 44
삭제
- 청구항 45
삭제
- 청구항 46
삭제
- 청구항 47
삭제
- 청구항 48
삭제
- 청구항 49
삭제
- 청구항 50
삭제
- 청구항 51
삭제
- 청구항 52
삭제
- 청구항 53
삭제
- 청구항 54
삭제
- 청구항 55
삭제
- 청구항 56
삭제
- 청구항 57
삭제
- 청구항 58
삭제
- 청구항 59
삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법에 있어서,

- (a) 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화시켜 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;
- (b) 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;
- (c) 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계;
- (d) 단계 (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및
- (e) 단계 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고,

상기 단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행되고,

상기 단계 (a) 내지 (e)는 각각 (a)에 대한 세포 밀도 0.05×10^6 세포/mL 내지 60×10^6 세포/mL 를 갖는 면역 세포 배양물로 수행되고,

상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터, 및 세포 배양 배지를 포함하는 단일 카세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 단계 (a)에 대한 세포 밀도는 0.05×10^6 세포/mL 내지 40×10^6 세포/mL인 방법.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 단계 (a)에 대한 세포 컨플루언시는 0.1×10^6 세포/cm² 내지 60×10^6 세포/cm²인 방법.

청구항 66

제63항에 있어서, 상기 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제 66 항에 있어서, 상기 항체는 표면에 고정되는 것인 방법.

청구항 68

제 67 항에 있어서, 상기 표면은 비드의 표면인 방법.

청구항 69

제 66 항에 있어서, 상기 항체는 가용성 항체인 방법.

청구항 70

제66항에 있어서, 상기 항체는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 71

제66항에 있어서, 상기 방법은 1억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조하는 것인 방법.

청구항 72

제63항에 있어서, 상기 방법은 20억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조하는 것인 방법.

청구항 73

제63항에 있어서, 상기 면역 세포 배양물은 T 세포 배양물인 방법.

청구항 74

제 73 항에 있어서, 상기 T 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물인 방법.

청구항 75

제 74 항에 있어서, 상기 벡터는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 것인 방법.

청구항 76

제64항에 있어서, 상기 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제64항에 있어서, 상기 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 78

제 77 항에 있어서, 상기 보조 세포는 단핵구를 포함하는 것인 방법.

청구항 79

제 77 항에 있어서, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함하는 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제63항에 있어서, 상기 형질도입은 바이러스 감염, 전기 천공, 막 파괴, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제63항에 있어서, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스인 방법.

청구항 82

제63항에 있어서, 상기 형질도입은 세포 배양 배지에 벡터를 혼합하는 단계 및 배지 내 벡터를 활성화된 면역 세포 배양물에 균일하게 전달하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 83

제63항에 있어서, 상기 확장은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링, 및 선별 중 적어도 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 84

제63항에 있어서, 상기 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 세포 밀도 및 세포 컨플루언시를 위해 선택 되는 것인 방법.

청구항 85

제63항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 하나 이상의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시키는 것인 방법.

청구항 86

제 85 항에 있어서, 상기 산소 재순환은 단계 (a) 내지 (c) 동안 실리콘 튜브에 의해 제공되는 것인 방법.

청구항 87

제63항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 동안 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시키는 것인 방법.

청구항 88

제63항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소하는 것인 방법.

청구항 89

제63항에 있어서, 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스의 재순환은 0.05×10^6 세포/mL 내지 60×10^6 세포/mL의 밀도 및 0.1×10^6 세포/cm² 내지 60×10^6 세포/cm²의 컨플루언시를 갖는 세포와 함께 균질하게 제공되는 것인 방법.

청구항 90

제63항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링, 및 선별을 여러 번 수행하도록 구성되는 것인 방법.

청구항 91

제63항에 있어서, 상기 농축 단계는 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함하는 것인 방법.

청구항 92

제63항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 상기 단계 (a) 내지 (e)의 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행되는 것인 방법.

청구항 93

제63항에 있어서, 단계 (a) 후에 활성화 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 94

제63항에 있어서, 단계 (b)에서 형질도입 후 백터를 제거하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 95

제63항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 백터 및 세포 배양 배지를 함유하는 것인 방법.

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

유전적으로 변형된 면역 세포 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법에 있어서,

(a) 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;

(b) 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계;

(c) 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계로, 상기 형질도입된 세포 배양물은 확장 동안 흔들리지 않는 단계;

(d) 단계 (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및

(e) 단계 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고,

상기 단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행되고,

상기 방법은 20억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조하고,

상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터, 및 세포 배양 배지를 포함하는 단일 카세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

제103항에 있어서, 상기 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 109

제 108 항에 있어서, 상기 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 110

제 109 항에 있어서, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함하는 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함하는 것인 방법.

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

제103항에 있어서, 상기 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 면역 세포 배양물을 위해 선택되는 것인 방법.

청구항 116

제103항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 하나 이상의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시키는 것인 방법.

청구항 117

제103항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시키는 것인 방법.

청구항 118

제103항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소하는 것인 방법.

청구항 119

제103항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링, 및 선별을 여러 번 수행하도록 구성되는 것인 방법.

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

제103항에 있어서, 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 123

제103항에 있어서, 단계 (b)에서 형질도입 후 백터를 제거하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 124

제103항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터, 및 세포 배양 배지를 함유하는 것인 방법.

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

제9항에 있어서, 상기 방법의 단계 (b)에서 형질도입 효율은 세포 배양을 위해 가요성의 가스 투과성 백(bag)을 이용하는 방법보다 적어도 20% 이상 더 높은 것인 방법.

청구항 155

제9항에 있어서, 상기 방법은 가요성의 가스 투과성 백에 의한 수동 세포 배양을 이용하는 방법보다 적어도 20%

이상 많은 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조하는 방법.

청구항 156

제9항에 있어서, 상기 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 상기 단계 (a) 내지 (e) 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행되며, 단계 (a)의 활성화 시약, 벡터, 및 세포 배양 배지는 각각, 상기 방법을 시작하기 전에 다수의 챔버 중 상이한 챔버에 함유되고, 다수의 챔버 중 적어도 하나는 세포를 성장시키기 위한 온도로 유지되고, 다수의 챔버 중 적어도 하나는 냉장 온도로 유지되는 것인 방법.

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 완전 밀폐식 세포 공학 시스템(fully-enclosed cell engineering system)을 이용하여 키메라 항원 수용체 T (chimeric antigen receptor, CAR T) 세포를 포함하는 유전적으로 변형된 면역 세포의 자동화된 제조 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 선진 세포 요법의 가속화된 임상적 채택에 대한 기대가 높아짐에 따라, 이들 요법이 전세계 환자들에게 도움을 줄 수 있는 기본적인 제조 전략에 더 많은 관심이 쏠리고 있다. 세포 요법은 임상적으로 큰 가능성을 지니고 있는 반면, 상환 대비 높은 제조 비용은 상업화에 대한 엄청난 장벽이 된다. 따라서, 비용 효율성, 공정 효율 및 제품의 일관성에 대한 요구는 수많은 세포 요법 분야, 특히 T 세포 면역요법의 자동화를 위한 노력을 이끌어내고 있다 (가령, Wang 2016 참조).

[0003] 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포를 이용한 면역요법 시험에서 얻은 최근의 성공적인 임상 결과는 이전에 치료가 불가능한 암을 앓고 있는 환자에게 새로운 희망을 준다 (가령, Lu 2017; Berdeja 2017; Kebriaei 2016 참조). 이들 새로운 요법이 임상 시험 단계에서 상업적인 규모 확장으로 이동함에 따라, 세포 제조와 관련된 도전과제가 발생한다 (가령, Morrissey 2017 참조).

[0004] 이들 세포의 제조는 환자 맞춤형 제품으로 인해 상당한 수동적인 개입을 필요로 할 수 있다. CAR T 세포 배양의

자동화는 세포 활성화, 형질도입 및 확장을 포함한 다수의 민감한 단위 작업으로 인해 특히 도전적이다. 이러한 공정의 효율성이 형질도입 및 확장에 영향을 줄 수 있으므로, 활성화가 특히 중요할 수 있다.

[0005] 세포 활성화, 형질도입 및 확장을 상업적인 제조 플랫폼으로 통합시키는 것은 이들 중요한 면역요법을 광범위한 환자 개체군에게 옮기는데 있어서 중요하다. 생명을 구하는 이들 치료법을 전세계 환자 개체군에 적용할 수 있으려면, 개인맞춤형 의료를 지원할 수 있게 제조 기술의 변화를 실현해야 한다. 자동화의 이점은 이전에 기재되었다 (가령, Trainor 2014; Mahdavi 2015 참조). 이러한 이점은 자동화의 사용과 관련된 노동 시간의 절약을 비롯해, 향상된 제품의 일관성, 감소된 실내 분류, 감소된 클린 룸 점유 공간, 감소된 교육훈련의 복잡성, 및 개선된 규모 확장과 물류 추적을 포함한다. 또한, 소프트웨어를 이용하면, 자동으로 생성된 전자 배치 기록 (electronic batch record)을 사용하여 모든 처리 장비, 시약, 환자 식별, 작업자 식별, 공정중 센서 데이터 등의 이력을 제공함으로써 문서 공정을 간소화할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0006] 일부 구현예에서, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이 제공되며, 이 방법은: 활성화 시약(activation reagent)으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장(expand)하는 단계; (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 확장된 면역 세포 배양물 및 농축된 면역 세포 배양물 중 하나 또는 둘 모두를 세척하는 단계를 더 포함하며, 단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에 의해 수행되고, 단계 (a) 내지 (e)는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 공정을 통해 최적화된다.

[0007] 추가의 구현예에서, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 바람직한 표현형을 촉진하는 방법이 제공되며, 이 방법은: 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계로, 활성화 시약 및 활성화 조건은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 표현형을 촉진하는, 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행된다.

[0008] 추가의 구현예에서, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이 제공되며, 이 방법은: 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행되고, 단계 (a) 내지 (e)는 각각 최적화된 세포 밀도 (세포/mL) 및 최적화된 세포 컨플루언시(confluency) (세포/cm²)를 갖는 면역 세포 배양물로 수행된다.

[0009] 추가의 구현예에서, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이 제공되며, 이 방법은: 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계로, 확장 동안 형질도입된 세포 배양물을 흔들지 않는, 단계; (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 단계 (a) 내지 (e)는 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행된다.

[0010] 또 다른 추가 구현예에서, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이 제공되며, 세포 공학 시스템에 의해 수행되는 이 방법은: 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 세포 공학 시스템의 제 1 챔버에서 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 형질도입하는

단계로, 형질도입은: 활성화된 면역 세포 배양물을 제 1 챔버로부터 전기 천공부(electroporation unit)로 옮기는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 전기 천공하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 및 형질도입된 면역 세포 배양물을 세포 공학 시스템의 제 2 챔버로 옮기는 단계를 포함하는, 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0011] 추가의 구현예에서, 본원에서는 자동화된 세포 공학 시스템에서 사용하는 카세트가 제공되며, 이 카세트는 세포 배양 배지를 저장하기 위한 저온 챔버; 면역 세포 배양물의 활성화, 형질도입 및 확장을 수행하기 위한 고온 챔버로서, 고온 챔버는 열 장벽에 의해 저온 챔버와 분리되고, 세포 배양 챔버를 포함하는, 고온 챔버; 및 세포 배양 챔버에 연결된 하나 이상의 유체 경로를 포함하고, 유체 경로는 세포 배양 챔버 내에서 세포를 방해하지 않고 세포 배양 챔버에 대한 폐기물의 재순환 및 제거와, 균질한 가스 교환 및 영양소 분배를 제공한다.

[0012] 또 다른 추가 구현예에서, 본원에서는 자동화된 세포 공학 시스템에서 사용하는 카세트가 제공되며, 이 카세트는 면역 세포 배양물의 활성화, 형질도입 및/또는 확장을 수행하고, 면역 세포 배양물을 수용하도록 구성되는 챔버 부피를 갖는 세포 배양 챔버; 및 면역 세포 배양물을 수용하지 않으며, 배지 및 다른 작동 유체에 대한 추가 부피를 제공함으로써 챔버의 작업 부피를 증가시키는 위성 부피를 포함하고, 위성 부피는 하나 이상의 유체 경로를 통해 세포 배양 챔버에 유체 연결되어, 면역 세포 배양물을 방해하지 않고 배지가 배양 챔버와 교환된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포의 일반화된 제조 공정을 나타낸다.

도 2는 본원의 구현예에서 설명한 바와 같은 예시적인 세포 공학 시스템을 포함하는 실험실 공간을 나타낸다.

도 3은 본원의 구현예에서 설명한 바와 같은 세포 공학 시스템에서 수행될 수 있는 CAR T 세포 제조 공정을 나타낸다.

도 4는 CD8+ 및 CD4+ 세포의 개체수를 유지하기 위한 COCOON 시스템과 제어 방법 간의 비교를 나타낸다.

도 5는 CD8+ 및 CD4+ 세포 개체군에서 COCOON 시스템과 CAR T 세포의 양을 제어하는 방법 간의 비교를 나타낸다.

도 6a 내지 6c는 실시예 1에서 사용한 COCOON 시스템의 개요를 나타낸다. 도 6a는 폐쇄된 구성의 COCOON 시스템을 나타낸다. 도 6b는 COCOON에 삽입할 수 있는 카세트를 나타낸다. 도 6c는 개방된 구성의 COCOON 시스템을 나타낸다.

도 6d 내지 6e는 COCOON 시스템에서 이용되는 세포 배양 챔버의 위치 및 배향을 나타낸다.

도 6f는 COCOON 시스템에서 이용되는 세포 배양 챔버의 보다 상세한 도면을 나타낸다.

도 6g는 COCOON 시스템의 공정 흐름의 범례를 나타낸다.

도 6h는 COCOON 시스템을 사용한 가스 이송 데이터를 나타낸다.

도 7a 내지 7c는 COCOON 시스템에서 GFP 형질도입과 수동 조작을 비교하는 실시예 1에 기재된 실험 결과를 나타낸다. 도 7a는 평균 수확량의 비교를 나타낸다. 도 7b는 평균 수확 생존율의 비교를 나타낸다. 도 7c는 평균 형질도입 효율의 비교를 나타낸다.

도 8a 및 8b는 COCOON 시스템과 PERMALIFE 백에서 HER-2 CAR T 형질도입을 비교하는 실시예 1에 기재된 실험 결과를 나타낸다. 도 8a는 생존 세포 수율의 비교를 나타낸다. 도 8b는 생존율 및 형질도입 효율의 비교를 나타낸다.

도 9a 내지 9d는 COCOON 시스템과 PERMALIFE 백을 비교하는 실시예 1에 기재된 실험 결과를 나타낸다. 도 9a는 상대적인 CAR T 순도의 비교를 나타낸다. 도 9b는 CD8+ 세포 백분율의 비교를 나타낸다. 도 9c 및 9d는 각각 TNF α 및 INF γ의 생성을 나타낸다.

도 10a 및 10b는 COCOON 시스템 (도 10a)과 PERMALIFE 백 (도 10b)에서 배양된 CAR T 세포에 의한 표적 종양 세포의 사멸을 비교하는 실시예 1에 기재된 실험 결과를 나타낸다.

도 11a 내지 11e는 본원의 구현예에서 설명한 바와 같은 COCOON 시스템의 또 다른 구성을 나타낸다. 도 11a는

COCOON 시스템에 로딩할 수 있는 일회용 T 세포 카세트를 나타낸다. 도 11b는 개방된 구성의 COCOON 시스템을 나타낸다. 도 11c는 COCOON에 로딩된 카세트를 나타낸다. 도 11d는 폐쇄된 구성의 COCOON을 나타낸다. 도 11e는 COCOON과 함께 사용하는 카세트의 상세도를 나타낸다.

도 11f는 주사기 및 백을 사용하여 카세트로부터 샘플을 추출하는 것을 나타낸다.

도 12a는 CAR T 세포 제조 공정에 대한 공정 개요를 나타낸다. 도 12b는 진행중인 CAR T 세포 배양물을 갖는 COCOON 카세트 세포 증식 챔버를 나타낸다. 도 12c는 인큐베이터에서 세포 배양 백을 사용하여 수동 조작으로 CAR T 세포를 제조하는 공정을 나타낸다.

도 13a 내지 13h는 PERMALIFE 백 및 COCOON 시스템을 비롯해, DYNABEADS 또는 OKT3에 의한 T 세포 활성화를 비교하는 실시예 2에 기재된 실험 결과를 나타낸다. 도 13a는 생존 세포 수율을 비교한다. 도 13b는 개체수 배가 수준 (population doubling level, PDL)을 비교한다. 도 13c는 생존 가능한 CD3+ T 세포 수율을 비교한다. 도 13d는 CD3+ 세포 PDL을 비교한다. 도 13e는 CD3+ 서브세트 (CD4+ 및 CD8+)의 백분율을 비교한다. 도 13f는 항-PD-1로 측정된 세포 소진을 비교한다. 도 13g 및 13h는 각각 DYNABEADS 또는 OKT3으로 활성화된 CD8+ CD3+ T 세포의 세포계산 선도를 나타낸다.

도 14a 내지 14f는 PERMALIFE 백과 COCOON 시스템을 비교하는 실시예 2에 기재된 실험 결과를 나타낸다. 도 14a는 CD3+ 세포의 형질도입 효율을 비교한다. 도 14b는 생존 가능한 CAR T 세포의 총 수를 비교한다. 도 14c는 T 세포 서브세트 (CD4+ 및 CD8+)의 형질도입 효율을 비교한다. 도 14d는 서브세트에 의해 총 CAR T 세포를 비교한다. 도 14e 및 14f는 각각 COCOON 및 PERMALIFE 백에서 CD3+ OKT3 활성화된 세포의 세포계산 선도를 나타낸다.

도 15a 내지 15f는 PERMALIFE 백과 COCOON 시스템을 비교하는 실시예 2에 기재된 실험 결과를 나타낸다. 도 15a는 TNF α 를 생성하는 세포의 백분율을 비교한다. 도 15b는 IFN γ 를 생성하는 세포의 백분율을 비교한다. 도 15c 및 15d는 각각 TNF α 및 IFN γ 를 분비하는 DYNABEAD-활성 COCOON-생성 세포의 세포계산 선도를 나타낸다. 도 15e 및 15f는 각각 PERMALIFE 백 또는 COCOON 시스템에서 제조된 CAR T 세포의 종양 사멸 효율을 나타낸다.

도 16은 COCOON과 PERMALIFE의 비교 및 DYNABEADS 또는 OKT3에 의한 활성화의 요약을 나타낸다.

도 17은 본원의 구현예에 따른 세포 공학 시스템과 전기 천공부의 통합을 나타낸다.

도 18은 세포 공학 시스템으로부터 전기 천공부로, 그리고 다시 되돌아가는 면역 세포 배양물의 흐름을 나타낸다.

도 19 및 20은 본원에서 설명한 바와 같은 인간 줄기 세포 실험의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포의 자동화된 제조방법을 제공한다. CAR T 세포의 제조는 전형적으로 환자 맞춤형 제품으로 인해 수동 개입을 필요로 한다. CAR T 세포 배양의 자동화는 세포 활성화, 형질도입 및 확장을 포함한, 다수의 민감한 단위 작업으로 인해 특히 도전적이었다. 따라서, 본원에서는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템을 이용하는 자동화된 CAR T 세포 제조방법을 개시한다.

[0015] 자동화된 세포 처리

[0016] T 세포 요법 같은 자가 세포 치료의 경우, 마이크로-로트(micro-lot) (로트당 한 명의 환자) 배치들(batches)을 제조하는 것은, 동종이계 (로트당 여러 명의 환자) 공정에서 활용할 수 있는 규모의 경제성이 부족하므로, 비용 효율성, 공정 효율성 및 제품의 일관성에 대한 요구가 특히 급박하다 (가령, Jones 2012; Trainor 2014 참조). 마이크로-로트에서 필요로 하는 더 크고 보다 국소화된 인력과 시설은, 특히 직원의 이용 가능성 및 교육훈련과 관련하여 물류, 수동 생산을 위한 GMP 준수에 대한 상당한 요구에 직면해 있다. 또한, 작업자들 간의 기술 변동성의 가능성은 출시 기준을 연속으로 충족하며, 안전하고 신뢰할 수 있는 제품을 보장하는데 있어서 바람직하지 않은 위험을 초래할 수 있다.

[0017] 본원에서 설명한 바와 같이, 자동화된 제조의 설치 및 포괄적인 검증은 이들 물류 및 운영 상의 도전과제에 대한 해결책을 제공한다. 제조 공정에 자동화를 도입하는데 있어서 중요한 접근방식은, 작업자가 "단위 작업"이라고 하는 제조 물질에 물리적 또는 화학적 변화를 가하는 주요 모듈식 단계를 식별하는 것이다. 세포 제조의 경우, 이는 세포 분리, 유전자 조작, 증식, 세척, 농축 및 세포 수확 등의 단계를 포함한다. 제조업자는 종종, 초점 공정 병목현상을 자동화 도입의 즉각적인 기회로서 인식한다. 이는 별개의 공정 단계에 초점을 맞추게 되는 대부분의 상업적으로 이용가능한 생물반응기의 기술 운영 스펙트럼에 반영된다. 여기서, (무균 유지부터 시료

추적에 이르는) 세포 제조에서의 공정상 도전과제는 불가피한 공정 변동성을 개선하면서 일관된 세포 배출 (cellular output)을 발생시키는 엔드-투-엔드 자동화에 의해 해결된다. 또한, 본원에서 설명하는 방법은 단순화를 제공하고, 관련 전자 기록은 GMP 표준을 준수하는 것을 돕는다 (가령, Trainer 2014 참조).

[0018] 단위 작업의 자동화 및 주요 공정 민감도

[0019] 암 면역요법을 위한 변형된 자가 T 세포의 임상 개발에 대한 최근의 신속한 진행은 관련 전환 및 스케일 업/아웃의 결과를 계획하는 것으로 이어졌다.

[0020] T 세포 제조의 경우 특정 프로토콜이 다를 수 있지만, 일반화된 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR T) 공정이 도 1에 도시되어 있다. 도 1은 환자 혈액 샘플의 초기 처리부터 자가 T 세포 요법을 위한 배출 세포의 제형화까지 CAR T 세포 제조의 단위 작업들을 설명한다.

[0021] 본원에서 설명한 바와 같이, 세포 제조의 자동화를 달성하기 위해, 본원에서 설명한 방법은 각 전이 지점에서 세포의 상태 및 이들 세포가 특정 단위 작업에서 어떤 영향을 받는지에 대한 이해를 돕기 위해 제공한다. 환자 맞춤형 요법을 위한 마이크로-로트 생산에서는 자동화의 실현 가능성에 영향을 주는 주요 공정 민감도를 증시해야 한다. 본원에서 설명한 자동화는 다양한 공정 단계를 성공적으로 수용한다.

[0022] 아래의 표 1은 T 세포 자동화를 위해 식별된 일부 공정 단계의 도전과제를 강조하고, 자동화 전략에 대한 민감도의 영향을 나타낸다. 모든 단위 작업의 경우, 오염의 위험으로 인해 각 장비들 간에 세포를 개방적으로 이송하는 것이 중요한 점을 주목해야 한다.

표 1

자동화의 과제 및 이점

[0023]

단위 작업	주요 공정 단계의 도전과제	자동화의 이점
분류	<ul style="list-style-type: none"> 공여자의 세포 및 작업자의 기술에 따라 매우 가변적임 (가령, Nilsson 2008 참조) 잔류 불순물이 성능에 영향을 줄 수 있다 	<ul style="list-style-type: none"> 고순도의 표적 출발 개체군 보다 일관되고 향상된 제품
세포 접종	<ul style="list-style-type: none"> 불균질한 세포 분포는 성장 속도의 변동성을 초래한다 	<ul style="list-style-type: none"> 균질한 자동 접종 전략은 일관성과 효능을 향상시킬 수 있다
활성화	<ul style="list-style-type: none"> 세포와 활성화 시약 간의 안정적인 접촉 균일한 활성화-균질한 분포 	<ul style="list-style-type: none"> 자동 로딩은 수동 방법으로 일관되게 달성하기 어려운 재현 가능하고 균질한 분포 및 활성화를 보장할 수 있다
형질 도입	<ul style="list-style-type: none"> 효율이 세포와 바이러스의 혼합 정도에 영향을 받을 수 있으며, 이는 작업자의 취급에 따라 달라질 수 있다 증가된 노출 시간은 세포에 부정적인 영향을 줄 수 있다 	<ul style="list-style-type: none"> 바이러스 추가 전 부피 감소는 높은 수준의 세포와 바이러스 간 접촉을 가능케 한다 시간 기반 작업은 시간 지연에 상관 없이 세포 이송을 가능케 한다 폐쇄 시스템은 작업자에 대한 위험을 감소시킨다
전기 천공	<ul style="list-style-type: none"> 효율성은 작업자의 혼합, 세척 및 농축 기술에 따라 달라질 수 있다 	<ul style="list-style-type: none"> 표준화된 프로토콜은 상류 및 하류 단계의 통합시 일관된 결과를 보장한다
공급	<ul style="list-style-type: none"> 배지 교환 시기는 세포 성장 (가령, Bohenkamp 2002 참조) 및 37°C에서의 성분 안정성을 기반으로 영양적인 요건을 고려해야 한다 	<ul style="list-style-type: none"> 바이오 피드백은 공급 스케줄을 최적화하고 (가령, Lu 2013 참조) 배지의 사용을 최소화할 수 있다 성분은 냉장 온도에서 저장되어 안정성이 연장되고 사용 전에 자동으로 예열할 수 있다
선별	<ul style="list-style-type: none"> 광범위한 취급 단계는 세포 손실을 초래할 수 있다 작업자 변동성 	<ul style="list-style-type: none"> 완전 자동화로 일관성 향상
수확	<ul style="list-style-type: none"> 최종 제형화 전에 제거해야 하는 (세포 분리 비드 등의) 무세포 물질 (가령, Hollyman 2009 참조) 수동 피펫팅 변동성은 최종 수율에 영향을 줄 수 있다 	<ul style="list-style-type: none"> 시간에 상관 없이 세포가 배양 용기로부터 자동으로 옮겨진다 수동 피펫팅에 비해 향상된 최종 수율의 일관성
세척	<ul style="list-style-type: none"> 공격적인 세척은 상등액 제거 동안 전단 응력을 유발하거나 세포 손실을 초래할 수 있다 	<ul style="list-style-type: none"> 배양 용기를 움직이지 않고 부드러운 세척, 여과 또는 침전을 이용하여 세포 손실을 줄이고 잔류물을 제거할 수 있다

농축	· 흡인하는 동안 작업자에 따라 세포 회수가 달라질 수 있다	· 자동 부피 감소 기능으로 작업자의 변동성이 감소된다 · 여과 방법 역시 세포 손실을 최소화한다
제형화	· 제품을 잘 혼합해야 한다 · 작은 작업 부피는 부피 부정확성의 영향을 확대시킨다 · 동결 보존제에 노출 시간이 길어질수록 생존율이 감소된다	· 자동 혼합으로 최종 제형화에서 세포의 균질한 분포를 보장한다 · 자동 부피 추가로 수동 피펫팅 에러 또는 변동성의 위험을 없앤다 · 증가된 자동화는 온도에 민감한 단계의 변동성을 감소시킨다

[0024] 표 1에 나열한 감도를 중심으로 수동 공정의 자동화를 조절하면, 세포 요법의 성능에 대한 성공적인 전환, 유지 관리 또는 개선을 지원할 수 있다.

[0025] 자동화된 단위 작업의 통합

[0026] 자동화에 따른 GMP 물류, 경제 및 환자 안전상의 결과를 고려함과 동시에, 단위 작업당 전형적인 노동 시간 (작업자와 품질 보증 모니터 요원 모두에 대한 작업 시간 포함)의 맥락에서 단위 작업을 평가할 수 있다. 표 2는 CAR T 자동화의 대표적인 단계에 대한 공칭 수동 처리 시각표를 나타낸다. 이 표는 일반화된 CAR T 세포 공정에서 각 단위 작업에 필요한 자원의 투입을 강조한다. 각 단계마다, 자동화 공정에 대한 예상 잔여 노동 시간을 비롯해, 감소에 대한 이론적 근거가 나타나 있다.

표 2

자동화에 따른 노동 시간 감소

[0027]

단위 작업	수동 노동	자동화된 노동	노동 절감
도입 문서화	2 시간	0.5 시간	· 식별, 시료 추적 상세 및 작업 로그는 모두 균일한 라벨링 및 해당 소프트웨어로 개시된다
시약 준비	4 시간	2 시간	· 냉장 구역에 저장된 단일 시약 준비 단계는 각 부의 작동 전에 시약을 준비할 필요성을 없앤다
전혈 (whole blood)에서 분리	3 시간	0.5 시간	· 일단 혈액 샘플이 로딩되면, 원심분리 (가령, FDA 2011 참조), 여과 (가령, Wegener 2014 참조) 및/또는 항체 선택을 사용하여 전혈에서 자동화된 PBMC 분리가 가능하다
세포 접종	1 시간	0 시간	· 분류 직후 자동화된 접종
활성화	2 시간	0 시간	· 시약과 세포 배양액의 자동 혼합에 의해 수행되는 항체 또는 비드 등의 일반적인 방법에 의한 T 세포 활성화 (가령, Trickett 2003 참조) · 수지상 세포 공동 배양에 의한 활성화는 동일한 자동화 배양 원리를 원용한다 (가령, Hasegawa 2006 참조)
형질 도입	6 시간	2 시간	· T 세포는 자동으로 형질 도입 챔버로 옮겨짐 (바이러스 벡터를 사용하는 경우 선택적인 코팅 사용) · 냉장 조건에서 안정적이지 않으면, 바이러스 벡터를 부착하는데 수동 상호작용을 필요로 함
전기 천공	2 시간	0 시간	· 통합된 전기 천공으로 추가 준비 단계의 필요성을 없앤다
세포 공급	13.5 시간	0 시간	· 배지 제거 및 공급 자동화
세척	1 시간	0 시간	· 자동화되고 통합된 조용한 세포 세척 · 여과에 의한 세포 농도는 원심 분리와 비교하여 세척 시간을 줄인다
공정 중 문서화/모니터링	2 시간	1 시간	· 바이오센서 모니터링 (가령, pH, 산소, 포도당) · 미리 프로그래밍된 판독을 처리하기 위한 응답; 비상사태를 잠재적으로 회피 · 자동화된 프로세스를 위해 개발중인 유체 모니터링 (가령, Odeleye 2014 참조) 및 세포 계수 (가령, Grishagin 참조) 등의 프로세스에 이미징 기술 응용
선별	2 시간	0 시간	· 세포와 선별 시약의 자동 혼합 · 항체-접합된 비드를 세포에 결합시키고 자화된 챔버를 통과시켜 수행되는 자기 세포 분류
농축	2 시간	0 시간	· 세포 원심 분리 또는 여과 모두 자동화

수확	2 시간	0 시간	· 교반, 유체 유동 및 세척에 의해 T 세포가 자동으로 수확됨
출시 시험	9 시간	7 시간	· 바이오매스 또는 커패시턴스 검출은 세포의 상대적인 풍부함을 나타낸다 · 자동 세포 카운터, 유세포 분석기 및 기타 분석 장비로 수동 계수 시간 감소 · 표현형 및 기능 분석에는 여전히 육체 노동을 필요로 할 것 같다
최종 제형화또는 냉동 보존	2 시간	1 hour	· 세포 농축 및 제형화 용액과의 혼합 자동화 · 발송되지 않은 경우 제어된 속도의 동결로 빠르게 전환하기 위해 작업자에게 알리는 것이 필요함
출하 추적 및 문서화	4 시간	2 시간	· 식별, 샘플 추적 상세 및 작업 로그는 모두 라벨링 및 환자에게 전달하기 위해 소프트웨어로 생성됨
총 노동	57.5 시간	16 시간	자동화는 72%의 노동 시간을 감소시킬 수 있다

[0028] 본원에서 설명한 방법을 기반으로 하여, 단위 작업의 자동화는 공칭 수동 공정을 거의 40 시간에서 원래 시간의 1/4까지 감소시킬 수 있다.

[0029] 개별 대 완전 통합 자동화

[0030] 자동화의 가치에 대한 유력한 증거가 있지만 (가령, Trainor 2014; Levine 2017 참조), 자동화된 이송으로 엔드-투-엔드 순서에 이들 자동화 단계를 통합하는데 있어서의 가치와 실용성에 대한 후속 분석이 필요하다. 개별 공정 자동화의 장점 대 엔드-투-엔드 통합의 장점에 대한 상이한 시각이 존재한다.

[0031] 개별 자동화의 주요 이점은 유연성이다. 이것은 다음의 영역, 즉:

[0032] 1) 고유한 공정 작업의 유지보수;

[0033] 2) 개별 단위 작업 검증을 기반으로 번역 활동의 가속화

[0034] 3) 공여자와 공여자 간의 변동성을 수용하기 위해 처리 단계를 수정하는 능력과 관련이 있다.

[0035] 증가된 유연성과 관련한 첫 번째 포인트는 작업자가 공정을 보다 잘 제어하도록 하는 것이다. 이는 공정이 최종 제품에 영향을 줄 수 있는 매우 민감한 단계를 지닌 상황에서 중요하다. 올-인-원 시스템(all-in-one system)으로 전환하면, 제품 결과에 영향을 주는 제약이 있을 수 있다. 개별 접근방식은 각 단계를 수행하는 방법을 선택하는데 유연성을 제공하며, 이는 매우 민감한 단위 작업에서 특히 중요할 수 있다. 또한, 개별 접근방식은 수동 처리에서 자동화로의 점진적인 전환을 가능케 할 수도 있으며, 이는 각 단위 작업을 독립적으로 시험할 수 있는 경우 동등성을 입증하는데 도움을 준다. 또한, 특정 단위 작업의 자동화는 세포 성능을 기반으로 이루어지는 의사 결정에 대한 유연성을 제공한다. 예를 들어, 세포가 빠르게 성장하면, 하나의 세포 배양 백(bag)을 2개로 확장해야 할 수도 있다. 마지막으로, 개별 시스템을 사용하는 자동화에 대한 접근방식으로 인해, 그룹은 각 단위 작업에서 사용할 장비를 신중히 선택하는 것도 가능하다.

[0036] 장비 활용은 개별 자동화에 대한 또 다른 논쟁거리이다. 다른 것보다 상당히 더 많은 시간을 요하는 일부 단위 작업이 있을 수 있다. 엔드-투-엔드 처리 시스템은 단일 시스템에서 모든 여러 단위 작업의 운영을 필요로 하므로, 배양 공정 동안 장비를 점유하게 된다.

[0037] 개별 자동화에 대한 이점이 있는 한편, 엔드-투-엔드 접근방식은 그다지 매력적인 이점은 아니지만, 다른 장점을 제공한다. 첫째, 완전 통합 시스템은 오염에 대한 위험을 크게 줄인다. 개별 접근방식에서 필요로 하는 처리가 증가함에 따라, 작업자의 개입으로 인해 제품 변동성에 대한 가능성은 더 크다. 둘째, 전술한 바와 같이, 이것은 불가피하게 보다 많은 인건비를 초래한다.

[0038] 개별 접근방식에서 제공하는 유연성은 중요하다. 제품을 규정하는데 있어서 공정이 중요한 상황에서, 엔드-투-엔드 시스템은 고유한 감도를 통합할 수 있는 유연성을 가져야 한다. 이는 특정 공급 전략, 산소 수준, 표면 처리 등을 포함할 수 있다. 이러한 접근방식은 소프트웨어와 일회용 구성요소 모두에서 유연성을 필요로 한다. 시스템은 공정의 여러 지점에서 세포 및 배지 샘플을 끌어오는 옵션을 제공하여 특정 단위 작업이 제품 사양 검사 점을 충족하는지 확인해야 한다. 수정이 필요한 경우, 소프트웨어는 이러한 변화들을 실현하여 이상적인 조건을 제공할 수 있어야 한다. 사용하기 쉽고 유연한 소프트웨어는 번역 목적으로 매우 유용하지만, 임상 표준 (FDA 21 CFR Part 11)을 준수하기 위해 소프트웨어를 쉽게 잠글 수 있는 것이 중요하다. 일단 잠긴 후에는 작업자가

프로토콜을 변경할 수 있는 임의의 능력에 제한이 있어야 한다. 그러나, 고유한 공여자-변동성 문제를 해결하기 위해, 세포 성장물에 기반하여 검증된 프로토콜의 범위에서 선택할 수 있는 옵션은 있어야 한다. 예를 들어, 세포가 빠르게 성장하면, 따라서 시스템은 그에 대응해서 공급 또는 수확 시점을 조절할 수 있어야 한다.

[0039] 엔드-투-엔드 통합 대 개별 자동화의 선택은 임상 과정에 대한 장기적인 비전에 좌우되기도 한다. 단일 올-인-원 시스템은 상당히 큰 공간 효율을 제공하여 고가의 GMP 클린 룸에서 필요로 하는 점유 공간을 최소화할 수 있다. 예를 들어, 도 2에 도시한 바와 같이, 완전히 통합된 자동화 시스템은 필요한 점유 공간을 최대화하여 고가의 GMP 클린 룸 공간을 줄이도록 설계된다. 도 2는 표준 실험실 공간에서 운영되는 96개의 환자 맞춤형 엔드-투-엔드 유닛을 나타낸다.

[0040] 단일 시스템은 보다 용이한 데이터 추적도 제공하는 반면, 개별 시스템은 모든 전자 데이터 파일을 서로 연결하는 호환 소프트웨어를 제공하지 않을 수 있다. VINETI (Vinet사) 및 TRAKCEL (TrakCel사) 등의 소프트웨어 플랫폼은 공급망 물류의 전자 모니터링 및 조직화를 가능케 한다. 그러나, 단일 올-인-원 배양 시스템은 각 단위 작업과 관련된 처리 이벤트 및 바이오 모니터링 배양 조건 모두의 이력을 배치 기록에 통합함으로써, 여전히 더 발전될 수 있다. 따라서, 엔드-투-엔드 통합의 이점은 상당한 경쟁 우위를 제공한다.

[0041] 단위 작업 통합을 위한 상용 플랫폼

[0042] 다수의 자가 세포 요법, 특히 혈액 기반 암에 대한 면역요법에서 임상 시험의 성공은 새로운 임상 프로토콜을 강력한 생산 플랫폼으로 전환하여 예상되는 임상 수요를 충족시킬 수 있는 중요성이 강조되고 있다 (가령, Levine 2017; Locke 2017 참조). 자가 요법의 경우, 환자별 맞춤형 세포 치료의 처리에서는 포괄적인 제조 활동 및 운영 관리를 적절하게 활용한다. 본원의 방법은 턴키 방식의 자동화 시스템에서 단위 작업을 연결시켜 공정의 최적화, 안전성 및 경제성을 달성한다.

[0043] 자가 공정을 설계하는데 있어서 두가지 도전과제가 있다. 첫째, 물리적으로 분리되고 최적화된 장비의 피스에서 별도의 처리 단계가 일어날 수 있는 동종 제조와 달리, 스케일 아웃된(scaled-out) 자가 플랫폼은 단일 폐쇄형 자족식의 자동화된 환경에서 필요로 하는 모든 단계를 적절하게 수행해야 한다. 둘째, 모든 운영이 이론적으로는, 알려진 품질과 예측가능한 공정 거동으로, 세포 은행으로부터의 고품질 바이알로 시작하는 동종 공정과는 달리, 자가 공정에서 출발 물질은 매우 가변적이며, 일반적으로 건강이 악화된 개인에게서 비롯된다.

[0044] 따라서, 본원에서는 물리적 교반, pH, 공급 및 가스 취급 등의 인자를 제어함으로써, 배양 조건을 감지하고, 그에 따라 정교한 생물반응기로서 반응할 수 있는 방법이 제공된다. 게다가, 동종 치료와 비교하여, 자가 치료와 관련된 기술 이전에는 매우 상이한 도전과제가 있다. 자가 제품은 제조 공정과 환자 치료 간의 안정성 면에서 더 큰 제약을 받을 수 있다. 현장은 단일 센터가 아닌 전세계 도처에 위치할 수 있다. 잠금식(가령, 완전 밀폐식) 올-인-원 시스템을 지닌 경우, 현장들 간의 기술 이전 공정이 크게 개선된다.

[0045] 공급원 변동성을 없앨 수는 없지만, 자동화는 표준화 및 재현성을 통해 최종 자가 제품의 변동성을 없애는데 도움을 준다. 이러한 실행을 선도적인 세포 시스템 제공업체가 채택함으로써, 활성 세포 배양물의 상태를 모니터링하는 바이오센서를 통해 세포 성능의 기준점을 얻는다. 엔드-투-엔드 통합에 있어서, 공정내 어떤 특정 단계에서의 출력은 공정의 향후 진행을 위해 허용가능한 파라미터 내에 있어야 한다.

[0046] 본원에서 설명한 바와 같이, 구현예에서, 제공되는 방법들은 COCOON 플랫폼 (Octane Biotech (Kingston, ON)) 을 이용하며, 이는 여러 단위 작업들을 단일 턴키(turnkey) 플랫폼으로 통합시킨다. 다중 세포 프로토콜은 매우 특정한 세포 처리 목적을 갖고 있다. 효율적이고 효과적인 자동화 전환을 제공하기 위해, 전술한 방법은 모두, 최종 세포 요법 제품의 핵심 요건에 초점을 맞춘 여러 단위 작업을 조합시킨 용도 맞춤형/스폰서 맞춤형 일회용 카세트의 개념을 활용한다.

[0047] 본원에서 설명하는 방법은 완전 통합된 폐쇄식 자동화 시스템에서 CAR T 세포를 확장(활성화, 바이러스 형질도입과 확장, 농축 및 세척을 포함)하는데 이용했다 (도 3).

[0048] 수행한 실험에 있어서, 10 내지 14 일째 배양에서 CAR T 세포의 폴드 확장(fold expansion)은 약 40 내지 60에 도달했다. 성공적인 CAR T 요법을 위해서는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 서브세트 모두가 필요하다. 따라서, 양 T 세포 서브세트의 배양을 유지하는 그의 능력에 대해, 유세포 분석(flow cytometry)을 통해서 운영 및 관련 대조군을 평가했다. 도 4는 모든 운영 및 모든 대조군이 양 T 세포 서브세트를 유지할 수 있었음을 나타낸다. 또한, 존재하는 CAR T 세포의 백분율 역시 T 세포 서브세트의 각 개체군에서 평가했다 (도 5). 비록 모든 샘플에서, CD8+ 부분에서의 NGFR + 분획이 쌍으로 된 CD4+ 개체군에서 발견된 분획의 50%를 초과하지만, CD8+ 분획과 비교하여 CD4+ 분획에서 NGFR (CAR 제작물을 나타냄)의 검출이 더 높았다. 요약하면, 본원에서 설명한 방법을 이용한 자

동화된 CAR T 공정은 건강한 T 세포 서브세트 개체군을 생산한다.

- [0049] 자동화의 장점
- [0050] 세포 요법의 제조에서 단위 작업의 자동화는 동종 및 자가 세포 요법의 응용에서 보편적인 이점에 대한 기회를 제공한다. 환자-맞춤형, 자가 세포 제품의 독특한 시나리오에서, 이들 요법의 최근 임상적인 성공으로 인해 더욱 강조되는 것으로, 자동화의 이점은 작은 배치 GMP 준수에서 중요한 마이크로-로트 복잡성, 경제성, 환자 추적성 및 공정 편차의 조기 식별로 인해 특히 매력적이다. 복잡한 제조 프로토콜의 관련 출현으로, 마이크로-로트 세포 제조에서 자동화된 단위 작업의 엔드-투-엔드 통합의 가치가 중요한 연구의 포인트는 아니라는 사실이 관심을 끈다. 그러나, 그들의 임박한 승인 후 이들 요법에 대한 예상 수요는, 완전 폐쇄식 엔드-투-엔드 시스템의 구현이 체험 시간 및 점유 공간 같은 제조 병목현상에 필요한 많은 해결책을 제공할 수 있음을 나타낸다.
- [0051] 선진 요법의 개발자는 임상적 번역의 첫 공개(rollout)에서 초기 자동화를 고려하여 임상 시험 프로토콜의 규모를 확장(scale up)할 것을 권장한다. 초기 자동화는 프로토콜 개발에 영향을 주며, 이후 단계에서 수동 공정으로부터 자동화 공정으로 전환하는 경우, 공통점 연구에 대한 필요성을 없애며, 장기적인 상용화 경로에 대한 보다 많은 이해를 제공할 수 있다.
- [0052] CAR T 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조하는 방법
- [0053] 구현예에서, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이 제공된다. 본원에서 사용한 바와 같이, “유전적으로 변형된 면역 세포 배양물” (또는 유전적으로 변형된 면역 세포)란, (가령, 항원 제시 세포와의 공동 배양을 통해) 변형되거나 프라이밍되어(primed) 인간을 비롯한 동물에게서 한가지 이상의 질병을 치료, 예방 또는 개선하는데 유용한 원하는 표현형을 갖는 세포를 생성하는 면역 시스템의 세포를 말한다. 본원에서 사용한 바와 같이, “면역 세포 배양물”이란, 본원에서 설명한 방법에 의해 제조된 세포의 수집물을 말하며, 연구 또는 임상 시험에 사용하기 위한, 그리고 의료적 치료를 위해 인간 환자를 비롯한 포유 동물에게 투여하기 위한 세포 개체군을 포함할 수 있다. 본원에서 설명한 방법을 이용하여 제조할 수 있는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물은 비만 세포, 수지상 세포, 자연 살해 세포, B 세포, T 세포 등을 포함할 수 있다.
- [0054] 본원에서 설명한 다양한 방법은, 예를 들어 조절 줄기 세포를 포함하는 유전적으로 변형된 인간 줄기 세포 배양물의 생성을 비롯해, 다른 유전적으로 변형된 세포 배양물까지 확장될 수도 있다.
- [0055] 예시적인 구현예에서, 상기 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함한다. 적절하게는, 이 방법은 확장된 면역 세포 배양물 및 농축된 면역 세포 배양물 중 하나 또는 둘 모두를 세척하는 단계를 더 포함한다. 구현예에서, 상기 방법의 다양한 단계는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에 의해 수행되고, 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 공정을 통해 최적화된다.
- [0056] 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조하는 과정을 최적화하는 방법은, 자동화 방법을 시작하기 전에 세포 배양 조건을 최적화하는 것을 비롯해, 다양한 센서 등으로부터의 피드백을 이용하여 성장 조건 (가령, 가스 농도, 배치 조건, 온도, pH, 폐기물 및 영양소 농도 등)에 대한 실시간 수정을 지원하는 것을 포함한다.
- [0057] 구현예에서, 최적화 공정이란 자체 조절 공정, 즉 외부 (인간) 사용자로부터의 입력을 필요로 하지 않으며, 다양한 컴퓨터 프로그램 및 조건을 통해 세포 배양물에 필요한 수정 또는 그 밖의 특성을 결정하여 자동화된 공정을 최적화할 수 있는 공정을 말한다. 구현예에서, 자체 조절 공정은 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서 및 광학 밀도 센서 중 하나 이상으로 모니터링하는 단계를 포함한다. 본원에서 설명한 바와 같이, 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에서 이들 다양한 센서의 사용은 시스템 내의 다양한 시간 및 위치에서 이루어지며, 협력 작업을 통해 최적화를 제공한다. 예를 들어, 자체 조절 공정은 모니터링에 기반하여 형질도입된 T 세포 배양물의 온도, pH 수준, 포도당 수준, 산소 수준, 이산화탄소 수준 및 광학 밀도 중 하나 이상을 조절할 (가령, 상승 또는 하강시킬) 수 있다.
- [0058] 또한, 최적화 공정은 총 세포 수, 세포의 공급원, 세포의 밀도, 세포의 나이 등을 포함하여 출발 세포 개체군의 고유한 특성을 기반으로 할 수 있다. 자동화된 방법을 시작하기 전에 이들 출발 세포 개체군의 특성을 컴퓨터 제어 시스템에 입력할 수 있으며, 상기 방법, 가령 산소와 이산화탄소의 농도, 유량, 배양 시간, pH 등을 최적화하기 위해 시스템 상에서 다양한 초기 수정을 수행하게 된다. 대안적으로, 세포 공정의 모니터링은 출발 개체군으로부터 세포 배양 순서의 진행에서 자동적인 특성화를 가능케 하여, 최적화된 최종 세포 배양 특성을 위한

조건을 건별로 조절할 수 있게 한다.

- [0059] 예시적인 구현예에서, 본원에서 설명하는 방법은 약 5천만개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다. 적절한 구현예에서, 전술한 방법은 약 1억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포, 또는 약 2억개 이상의 세포, 약 3억개 이상의 세포, 약 4억개 이상의 세포, 약 5억개 이상의 세포, 약 6억개 세포, 약 7억개 세포, 약 8억개 세포, 약 10억개 세포, 약 11억개 세포, 약 12억개 세포, 약 13억개 세포, 14억개의 세포, 약 15억개 이상의 세포, 약 16억개 이상의 세포, 약 17억개 이상의 세포, 약 18억개 이상의 세포, 약 19억개 이상의 세포, 약 20억개 이상의 세포, 약 21억개, 약 22억개 이상, 약 23억개 이상, 약 24억개 이상, 약 25억개 이상, 약 26억개 이상, 약 27억개 이상, 약 28억개 이상, 약 29억개 이상, 또는 약 30억개 이상의 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0060] 본원에서 설명한 바와 같이, 상기 방법에 의해 생성된 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물을 포함한 T 세포 배양물이 적합하다. 이들 구현예에서, 이러한 CAR T 세포를 제조하는데 사용하는 벡터는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 벡터이다. 적절하게는, 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함한다. 구현예에서, 면역 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포(accessory cell), 적절하게는, 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함한다. 본원에서 설명한 바와 같이, 구현예에서, 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.
- [0061] 적절하게는, 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함한다. 구현예에서, 항체는 폴리스티렌 플라스틱, 실리콘 또는, 예를 들어 비드의 표면을 포함하는 다른 표면에 고정된다.
- [0062] 다른 구현예에서, 활성화 시약은 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함하는 가용성(soluble) 항체인 항체를 포함한다. 예시적인 항체는 OKT3을 포함한다.
- [0063] 세포의 형질도입을 위한 다양한 방법은, 예를 들어 바이러스 감염, 전기 천공, 막 파괴 또는 그의 조합을 포함하는 자동화된 방법에 이용할 수 있다.
- [0064] 예시적인 구현예에서, 상기 방법에서 사용되는 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스이다. 적절하게는, 형질도입은 세포 배양 배지에 벡터를 혼합하고 배지 내 벡터를 활성화된 면역 세포 배양물에 균일하게 전달하는 단계를 포함한다. 본원에서 설명한 바와 같이, 세포에 균질한 방식으로 벡터를 균일하게 전달하는 경우, 원하는 유전적으로 변형된 많은 면역 세포의 배출을 위한 다양한 세포 특성의 최적화를 제공한다.
- [0065] 본원에서 설명한 바와 같이, 세포를 확장하는 방법은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별 중 적어도 하나 이상을 포함하는 것이 적절하다.
- [0066] 본원에서 설명한 다양한 방법은 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준이 면역 세포 배양을 위해 최적화되도록 하는 방식으로 수행된다. 이러한 최적화는 본원에서 설명한 바와 같이, 원하는 세포 표현형의 촉진을 포함하여, 원하는 표현형 특성을 갖는 다수의 생존 세포를 제조할 수 있게 한다. 구현예에서, 산소 수준 또는 농도는 단계 (a) 내지 (e) 중 적어도 하나의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시키는 세포 공학 시스템에 의해 최적화된다. 본원에서 설명한 바와 같이, 산소화는 실리콘계 튜브(tubing) 구성요소를 포함하는 하나 이상의 유체 경로를 통해 적절하게 일어난다.
- [0067] 추가의 구현예에서, 세포 공학 시스템은 다양한 방법 공정 동안 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시킨다. 이러한 재순환은 원하는 표현형(들)을 갖는 다수의 생존 가능한 세포의 제조를 돕는데 도움을 준다. 적절하게는, 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계, 특히 확장 단계 동안 세포 성장 등을 최적화하도록 감소된다. 다른 구현예에서, 예를 들어, 완전한 배지 교환이 이용되는 경우, CO₂ 수준이 상승할 수 있다.
- [0068] 세포의 성장 조건을 최적화하기 위한 다른 메커니즘은 세포에 제공되는 배지의 유량을 변경 및 제어하는 것을 포함한다. 세포가 성장하기 시작함에 따라, 제공되는 배지의 순환 속도가 증가되며, 이는 가스 교환을 개선하고 세포의 상태 및 당시의 요건에 따라 산소 및 이산화탄소가 세포 배양물에 들어오거나 나갈 수 있게 한다.
- [0069] 구현예에서, 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척과 모니터링, 및 구현예들에서 선별 중 적어도 하나를 여러 번 수행하도록 구성된다. 이러한 다양한 활동은 임의의 순서로 수행될 수 있으며, 단독으로 또는 다른 활동과 조합하여 수행할 수 있다. 구현예에서, 세포의 농축은 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함한다. 적절하게는, 최적화 공정은, 자체 조절 공정에서 원심분리 또는 여과의 파라미터를 적절히 조절하는 단계를 더 포함한다. 형질도입된 세포의 선별은, 예를 들어 자기 분리(magnetic separation),

여과, 플라스틱 또는 다른 기질에 접촉 등에 의해 수행할 수 있다.

- [0070] 본원에서 설명한 바와 같은 구현예에서, 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 방법의 각 단계는 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행된다.
- [0071] 적절하게는, 상기 방법은 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함하며, 형질도입 단계 후 백터를 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 활성화 시약은 세포 또는 활성화 시약을 세척, 배출 또는 물리적으로 제거함으로써 면역 세포 배양물로부터 적절하게 제거된다. 세척 또는 백터를 표면 (가령, 레트로넡틴 또는 피브로넡틴 코팅된 표면)에 결합시킨 다음 세포를 다른 챔버로 이송함으로써, 백터를 제거할 수 있다.
- [0072] 예시적인 구현예에서, 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에, 세포 배양물, 활성화 시약, 백터 및 세포 배양 배지를 함유한다. 다른 구현예에서, 활성화 시약 및/또는 백터는 제조방법의 시작 후에 또는 공정 동안 임의의 적절한 시간에 별도로 첨가할 수 있다.
- [0073] 추가의 구현예에서, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 바람직한 표현형을 촉진하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계를 포함하고, 상기 활성화 시약 및 활성화 조건은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 표현형을 촉진하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 백터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함한다. 본원에서 설명한 바와 같이, 상기 방법은 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 적절하게 수행된다.
- [0074] 본원에서 설명한 바와 같이, 적합한 활성화 시약 및 적합한 활성화 조건의 선택은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물에서 원하는 표현형의 촉진을 제공한다. 즉, 면역 세포 배양물의 표현형은 구체적으로 선택되고 촉진될 수 있어, 상기 방법에 의해 제조되는 세포의 대부분이 원하는 바람직한 표현형을 갖도록 한다. 다른 구현예에서, 하나의 세포 표현형 대 또 다른 표현형의 원하는 비를 제어하고 촉진하여, 원하는 바람직한 표현형 균형을 제공할 수 있다.
- [0075] 본원에서 설명한 바와 같이, 항체, 특히 가용성 항체인 활성화 시약의 사용을 통해, 유전적으로 변형된 면역 세포의 원하는 표현형이 촉진될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 적절하게는, 이용되는 항체는 가용성 항체 OKT3을 포함한 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 및 항-CD2 항체 중 적어도 하나이다.
- [0076] 구현예에서, 활성화 조건은 실질적으로 방해받지 않는 면역 세포 배양물을 제공하여 활성화 시약과 면역 세포 배양물 간의 안정적인 접촉을 가능케 한다. 본원에서 설명한 바와 같이, 세포가 실질적으로 방해받지 않는 조건 하에서, 그리고 평평하고 실질적으로 비-가요성(non-flexible) 세포 배양 챔버의 사용을 통해 세포를 활성화시키는 것이 가능한 것으로 밝혀졌다. 이는 세포가 활성화 시약과 균질하게 접촉함과 아울러, 필요한 영양소, 용해된 가스 등과 상호 작용하여 원하는 촉진된 표현형을 달성할 수 있는 환경을 제공한다.
- [0077] 본원에서 설명한 방법은 적합한 활성화 방법을 선택하여 바람직한 표현형을 제공함으로써, 최종 면역 세포 배양 생성물의 특성에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 본원에서 설명한 바와 같은 비드-기반 공정을 이용하는 활성화는 보다 균형 잡힌 CD4:CD8 비를 촉진하는 반면, 가용성 항-CD3의 사용으로 CD4보다 CD8에서 더 많은 개체수를 촉진한다. 다른 수준의 CD8 및 CD4 역시 본원에서 설명한 방법을 이용하여 제공할 수 있다. 예시적인 구현예에서, 본원에서 설명한 바와 같이, 상기 방법을 이용하여 CAR T 세포를 제조할 수 있다. 적절하게는, 상기 방법을 이용하여 약 0.5:1 내지 약 5:1, 약 0.8:1 내지 약 3:1, 또는 약 1:1, 약 2:1 등의 CD8+ 세포 대 CD4+ 세포의 비를 포함하여, 약 0.1:1 내지 약 10:1의 CD8+ 세포 대 CD4+ 세포의 비를 갖는 CAR T 세포의 표현형을 촉진할 수 있다.
- [0078] 추가의 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화 제조방법이 제공되며, 상기 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 백터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; (c)의 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함한다. 본원에서 설명한 바와 같이, 상기 방법은 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 적절하게 수행된다. 구현예에서, 상기 방법의 각 단계는 최적화된 세포 밀도 (세포/mL) 및 최적화된 세포 컨플루언시(세포/cm²)를 갖는 면역 세포 배양물로 수행된다.

- [0079] 본원에서 설명한 바와 같이, 최적화된 세포 밀도 (세포 배지의 mL당 세포수) 및/또는 세포 컨플루언시 (세포가 활동하고 성장하는 세포 배양 챔버의 면적(cm^2)당 세포수)를 이용하여, 생존 세포의 증가된 제조를 비롯해, 세포 표현형의 더 우수한 제어를 제공한다.
- [0080] 구현예에서, 최적화된 세포 밀도는 약 0.05×10^6 세포/mL 내지 약 60×10^6 세포/mL, 약 0.05×10^6 세포/mL 내지 약 40×10^6 세포/mL, 또는 약 0.05×10^6 세포/mL 내지 약 20×10^6 세포/mL이다. 상기 방법의 각 단계 (즉, 활성화, 형질도입, 확장, 농축)에서, 세포 밀도를 제어 또는 조작하여 상기 방법의 특정 단계를 위한 최상의 세포 밀도를 제공하도록, 최적화된 세포 밀도는 제조방법의 과정에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 최적의 출발 세포 밀도의 선택, 산소 및/또는 이산화탄소 농도의 증가 또는 감소, pH, 온도, 영양소, 폐기물 제거 등을 조절함으로써, 세포 밀도를 최적화할 수 있다. 예시적인 세포 밀도는 약 0.05×10^6 세포/mL, 약 0.08×10^6 세포/mL, 약 1×10^6 세포/mL, 약 5×10^6 세포/mL, 약 10×10^6 세포/mL, 약 20×10^6 세포/mL, 약 30×10^6 세포/mL, 약 40×10^6 세포/mL, 약 50×10^6 세포/mL, 또는 약 60×10^6 세포/mL 등을 포함한다.
- [0081] 구현예에서, 최적화된 세포 컨플루언시는 약 0.1×10^6 세포/ cm^2 내지 약 60×10^6 세포/ cm^2 , 또는 약 0.1×10^6 세포/ cm^2 내지 약 40×10^6 세포/ cm^2 , 또는 약 0.1×10^6 세포/ cm^2 내지 약 20×10^6 세포/ cm^2 이다. 방법의 각 단계 (즉, 활성화, 형질도입, 확장, 농축)에서, 세포 컨플루언시를 제어 또는 조작하여 상기 방법의 특정 단계를 위한 최상의 세포 컨플루언시를 제공하도록, 최적화된 세포 컨플루언시는 제조방법의 과정에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 최적의 출발 세포 컨플루언시의 선택, 세포 배양 챔버의 재료 선택, 산소 및/또는 이산화탄소 농도의 증가 또는 감소, pH, 온도, 영양소 조절, 폐기물 제거 등을 조절함으로써, 세포 컨플루언시를 최적화할 수 있다. 예시적인 세포 컨플루언시는 약 0.1×10^6 세포/ cm^2 , 약 0.5×10^6 세포/ cm^2 , 약 1×10^6 세포/ cm^2 , 약 5×10^6 세포/ cm^2 , 약 10×10^6 세포/ cm^2 , 약 20×10^6 세포/ cm^2 , 약 30×10^6 세포/ cm^2 , 약 40×10^6 세포/ cm^2 , 약 50×10^6 세포/ cm^2 , 또는 약 60×10^6 세포/ cm^2 등을 포함한다.
- [0082] 구현예에서, 상기 방법은 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인, 및/또는 용해된 가스의 재순환이 약 0.05×10^6 세포/mL 내지 약 20×10^6 세포/mL의 밀도 및 약 0.1×10^6 세포/ cm^2 내지 약 20×10^6 세포/ cm^2 의 컨플루언시를 갖는 세포에 균질하게 제공되는 것을 포함한다.
- [0083] 추가의 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이 제공되며, 상기 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 백터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계로, 확장 동안 형질도입된 세포 배양물을 흔들지 않는 단계; 및 확장된 면역 세포 배양물을 농축시키고, 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함한다. 본원에서 설명한 바와 같이, 상기 방법은 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행된다.
- [0084] 본원에서 설명한 바와 같이, 놀랍게도 세포를 흔들지 않는 (즉, 세포들이 또 다른 세포 위로 흐르도록 하기 위해 회전하거나 흔들지 않는) 조건 하에서 확장될 수 있게 하면, 상기 방법은 높은 생존 세포 수율 및 원하는 표현형을 포함하여, 최적의 세포 특성을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 흔들리지 않는 큰 세포 배양 챔버는, 세포를 흔들거나 방해하는 요건 없이 세포 폐기물을 제거하면서, 필요한 시약, 영양소, 가스 교환 등에 대한 세포의 균질한 접근을 제공하여 원하는 결과를 달성할 수 있는 것으로 판명되었다. 실제로, 본원에서 설명한 바와 같이, 유전적으로 변형된 면역 세포의 이러한 자동화된 제조방법은, 예를 들어 Miltenyi 등의 미국 특허 제 8,727,132호, "샘플 처리 시스템 및 방법"에 기재된 바와 같이, 세포 흔들림을 이용하는 방법과 비교하여, 더 많은 수의 생존 세포, 더 많은 수/비의 원하는 세포 유형, 및 보다 건실한 세포 특성을 생성하는 것으로 밝혀졌다.
- [0085] 적절하게는, 방법의 확장 단계는 면역 세포 배양물을 흔들지 않고, 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별 중 적어도 하나 이상을 포함한다.
- [0086] 또한, 본원에서는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이 제공되며, 세포 공학 시스템에 의해 수행되는 상기 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 세포 공학 시스템의 제 1 챔버에서 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 및 활성화된 면역 세포 배양물을 형질도입하는 단계를 포함한다.

예시적인 방법에서, 형질도입 단계는 활성화된 면역 세포 배양물을 제 1 챔버로부터 전기 천공부로 옮기는 단계; 및 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 전기 천공하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 및 형질도입된 면역 세포 배양물을 세포 공학 시스템의 제 2 챔버로 옮기는 단계를 포함한다. 상기 방법은 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 (d)의 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 세포 배양물을 제조하는 단계를 더 포함한다.

[0087] 예를 들어, 도 17에 도시한 바와 같이, 활성화된 면역 세포 배양물은, 예를 들어 연결(connection) 튜브(1704)를 통해 세포 공학 시스템(600)의 카세트(602)로부터 전기 천공부(1706)로 전달된다. 전기 천공부(1706)는 적절하게는, 전기 천공 카트리리지(1708)를 포함하고, 이는 전기 천공 공정 동안 세포 배양물을 유지한다. 전기 천공 공정 후, 형질도입된 면역 세포 배양물은 연결 튜브(1704)를 통해 세포 공학 시스템(600)으로 다시 옮겨진다. 또한, 도 17은 전기 천공 전후에 세포 배양물을 유지하고, 상이한 펌프 속도, 요구되는 압력 및 유량의 결과로서, 세포 공학 시스템과 전기 천공부 간의 이송을 돕는데 사용하는 2개의 선택적인 리저버(reservoirs)(1710 및 1712)의 사용도 나타낸다. 그러나, 이러한 리저버를 제거한 후, 세포 배양물을 세포 공학 시스템(1702)으로부터 전기 천공부(1706)로 직접 옮길 수도 있다.

[0088] 도 18은 1) 세포 공학 시스템으로부터 제 1 리저버로, 2) 전기 천공부로, 3) 제 2 리저버로, 그리고 마지막으로 4) 세포 공학 시스템으로의 세포 배양물의 흐름도를 나타낸다.

[0089] 예시적인 구현예에서, 도 17 및 도 18에 도시한 바와 같이, 전기 천공부(1706)는 세포 공학 시스템(1702)의 외부에 위치된다. 이러한 구현예에서, 형질도입은 제 1 멸균 폐쇄 연결 (가령, 연결 튜브(1704))을 통해, 활성화된 면역 세포 배양물을 제 1 챔버로부터 전기 천공부로 옮기고, 벡터로 활성화된 면역 세포 배양물을 전기 천공하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하고, 제 2 멸균 폐쇄 연결 (가령, 연결 튜브(1704))을 통해, 형질도입된 면역 세포 배양물을 세포 공학 시스템의 제 2 챔버로 옮기는 것을 포함한다.

[0090] 또한, 다수의 개별 세포 공학 시스템(600) (가령, 도 2 참조)이 단일 전기 천공부에 연결되고, 세포 배양물이 세포 공학 시스템으로부터 전기 천공부로 옮겨진 다음, 적합한 세포 공학 시스템으로 되돌아가도록 적절한 순서로 운영할 수 있는 것도 이해해야 한다.

[0091] 다른 구현예에서, 전기 천공부(1706)는 세포 공학 시스템(600) 내에 위치됨으로써, 전체 시스템은 폐쇄형 자속식 시스템이 될 수 있다. 세포 공학 시스템(600)의 내부에 전기 천공부(1706)를 포함시키는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 다양한 소형화 전략 등을 이용한다.

[0092] 본원에서 설명한 다양한 방법은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조할 수 있으며, 이 방법의 형질도입 효율은 세포 배양을 위해 가요성의 가스 투과성 백(bag)을 사용하는 방법의 형질도입 효율보다 적어도 20% 이상 더 높다. 본원에서 설명하고 실시예에서 입증된 바와 같이, 본원에서 설명한 바와 같은 세포 공학 시스템을 이용하는 방법은 세포 배양을 수행하기 위한 유연한 가스 투과성 백을 사용하는 전통적인 방법보다 우수하다. 추가의 구현예에서, 상기 방법의 형질도입 효율은 세포 배양을 위해 유연한 가스 투과성 백을 사용하는 방법의 형질도입 효율보다 10% 이상, 보다 적절하게는, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 또는 구현예에서 40% 이상, 더 높다.

[0093] 적절하게는, 본원에서 설명하는 방법은 수동 세포 배양을 위해 유연한 가스 투과성 백을 이용하는 방법보다 20% 이상 더 많이 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다. 보다 적절하게는, 상기 방법은 수동 세포 배양을 위해 유연한 가스 투과성 백을 이용하는 방법보다 유전적으로 변형된 면역 세포를 25% 이상, 유전적으로 변형된 면역 세포를 30% 이상, 유전적으로 변형된 면역 세포를 35% 이상, 또는 유전적으로 변형된 면역 세포를 40% 이상, 더 많이 제조한다.

[0094] 예시적인 구현예에서, 본원에서 설명한 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 본원에서 설명한 다양한 방법의 각 단계는 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행되며, 활성화 시약, 벡터 및 세포 배양 배지는 각각, 상기 방법을 시작하기 전에 다수의 챔버 중 상이한 챔버에 함유되고, 다수의 챔버 중 적어도 하나는 세포를 성장시키기 위한 온도 (가령, 약 37°C)로 유지되며, 다수의 챔버 중 적어도 하나는 냉장 온도 (가령, 약 4-8°C)로 유지된다.

[0095] 일부 구현예에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 T 세포의 제조방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함하는 배양 배지로 적절하게 말초 혈액 단핵세포 배양물을 활성화시켜 활성화된 T 세포 배양물을 생성하는 단계; (b) 키메라 항원 수용체를 코딩하는 벡터인 렌티바이러스 벡터로 활성화된 T 세포 배양물을 형질도입하여 형질도입된 T 세포 배양물을 생성하는 단계; (c) 형질도입된 T 세포 배양물

을 미리 정의된 배양 크기로 확장하는 단계; (d) 단계 (c)의 확장된 T 세포 배양물을 약 20 mL 내지 약 500 mL, 적절하게는, 약 50 mL 내지 약 200 mL의 부피으로 농축하는 단계; 및 (e) 단계 (d)의 농축된 T 세포 배양물을 수확하여 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물을 제조하는 단계로, 상기 활성화된 T 세포 배양물은 단계 (a) 내지 (b) 동안 실질적으로 방해받지 않는 단계를 포함하고, 상기 방법은 단계 (a) 내지 (e)를 수행하기 위한 명령을 적절히 갖는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에 의해 수행된다. 적절하게 단계 (a) 내지 (e)는 세포 공학 시스템의 하나 이상의 챔버에서 수행된다. 본원에서 설명한 바와 같이, 구현예에서, 상기 방법은 세포 배양을 위해 유연한 가스 투과성 백을 이용하는 방법보다 CAR T 세포를 20% 이상 더 많이 제조한다. 예시적인 구현예에서, 이 방법은 20억개 이상의 생존 CAR T 세포를 제조한다.

[0096] 키메라 항원 수용체 T 세포, 또는 "CAR T 세포"는, 보다 구체적으로 암 세포를 표적화하기 위해 키메라 항원 수용체 (CAR)로 변형된 T 세포이다. 일반적으로, CAR은 3개의 부분, 즉 엑토도메인(ectodomain), 막횡단 도메인(transmembrane domain) 및 엔도도메인(endodomain)을 포함한다. 엑토도메인은 세포의 액에 노출되는 수용체의 영역이며, 3개의 부분, 즉 신호전달 펩티드, 항원 인식 영역 및 스페이서를 포함한다. 신호전달 펩티드는 초기 단백질을 소포체로 보낸다. CAR에서, 신호전달 펩티드는 단일쇄 가변 단편(single-chain variable fragment, scFv)이다. scFv는 짧은 링커 펩티드와 연결된 면역글로빈의 경쇄(V_L) 및 중쇄(V_H)를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 글리신 및 세린을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 글루타메이트(glutamate) 및 리신(lysine)을 포함한다.

[0097] CAR의 막횡단 도메인은 막에 걸쳐있는 소수성 α -나선이다. 일부 구현예에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인이다. 일부 구현예에서, CD28 막횡단 도메인은 고도로 발현된 CAR을 생성한다. 일부 구현예에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD3- ζ 막횡단 도메인이다. 일부 구현예에서, CD3- ζ 막횡단 도메인은 천연 T 세포 수용체에 통합되는 CAR을 생성한다.

[0098] CAR의 엔도도메인은 일반적으로 수용체의 "기능적" 말단으로 여겨진다. 엑토도메인의 항원 인식 영역에 의해 항원을 인식한 후, CAR 클러스터 및 신호가 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, 엔도도메인은 3개의 면역수용체 티로신-기반 활성화화 모티프들(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAMs)을 포함하는 CD3- ζ 엔도도메인이다. 이 경우, ITAMs는 항원 결합 후 T 세포에 활성화 신호를 전달하여 T 세포 면역 반응을 유발한다.

[0099] CAR T 세포의 제조 동안, T 세포는 인간 대상체에서 제거되고, 유전적으로 변형된 후, 환자에게 재도입되어 암 세포를 공격한다. CAR T 세포는 환자 자신의 혈액(자가)에서, 또는 다른 건강한 공여자(동종)에서 유래될 수 있다. 일반적으로, CAR T 세포는 건강한 세포에서 발현되지 않는 중앙에서 발현된 항원에 특이적이도록 발달한다.

[0100] **T 세포의 활성화.** 일부 구현예에서, 본원에서 설명한 방법에 의해 제조된 면역 세포 배양물은 CAR T 세포 배양물이다. CAR T 세포는 활성화되어 활성화된 T 세포 배양물을 형성할 수 있다. 생체 내에서, 수지상 세포 등의 항원-제시 세포들(antigen-presenting cells, APCs)은 T 세포 수용체(TCR)와 APC 주요 히스톤 복합체(major histone compatibility complex, MHC)의 상호 작용을 통해 T 세포 활성화를 위한 자극제로서 작용한다. TCR은 세포독성 T 세포(가령, CD8+ 나이브 T 세포)와 T 헬퍼 세포(가령, CD4+ 나이브(naive) T 세포) 모두를 활성화시키는 것을 돕는 T 세포 공동 수용체인 CD3과 관련이 있다. 일반적으로, T 세포 활성화는 TCR/CD3 복합체를 비롯해, 공동 자극 수용체의 자극을 필요로 하는 2개-신호 모델을 따른다. T 세포의 활성화는, 가령, Kochenderfer 2015; Kalos 2011에 추가로 기재되어 있다.

[0101] 공동 자극 신호 없이, 세포는 에너지를 받기 쉬우며 반응이 없게 된다. 따라서, T 세포 공동 자극은 T 세포 증식, 분화 및 생존에 중요할 수 있다. T 세포에 대한 공동 자극 분자의 비제한적인 예는 APC 막 상의 CD80 및 CD86에 대한 수용체인 CD28; 및 ICOS-L과 상호 작용하는 활성화된 T 세포 상에서 발현된 CD28 수퍼패밀리 분자인 CD278 또는 ICOS(유도성 T-세포 공동 자극기)를 포함한다. 그러므로, 일부 구현예에서, 공동 자극 분자는 CD28이다. 다른 구현예에서, 공동 자극 분자는 ICOS이다. 생체 내에서, 공동 자극 신호는 APC 상의 B7 분자에 의해 제공될 수 있고, 이는 T 세포 상의 CD28 수용체에 결합된다. B7은 T 세포 상에서 CD28 또는 CD152 표면 단백질과 상호 작용하여 공동 자극 신호를 발생시킬 수 있는 활성화된 APC에서 발견되는 말초 막횡단 단백질이다. 그러므로, 일부 구현예에서, 공동 자극 분자는 B7이다. 공동 자극 수용체는, 가령 Lafferty 1975; Harding 1992; Clavreul 2000; Charron 2015; Fathman 2007; Greenwald 2005에 추가로 기재되어 있다. 공동 자극은, 가령 Carpenter 2000; Andris 2004에 추가로 기재되어 있다. B7 분자는, 가령 Fleischer 1996; Schwartz 2003에 추가로 기재되어 있다.

[0102] 다양한 활성화 방법을 이용하여 시험관 내에서 T 세포 활성화를 시뮬레이션한다. 구현예에서, T 세포 배양물은

활성화 시약으로 활성화된다. 추가의 구현예에서, 활성화 시약은 항원-제시 세포 (APC)이다. 또 다른 추가 구현예에서, 활성화 시약은 수지상 세포이다. 수지상 세포는 항원을 처리하고 이를 세포 표면 상에서 T 세포에 제시하는 APC이다. 일부 구현예에서, 활성화 시약은 T 세포 배양물과 공동 배양된다. 공동 배양은 별도의 정제와 제 2 세포 유형의 배양을 필요로 할 수 있으며, 이는 노동 요건 및 공급원 변동성을 증가시킬 수 있다. 그러므로, 일부 구현예에서는, 대안적인 활성화 방법이 사용된다.

[0103] 구현예에서, 세포는 활성화 단계 동안 활성화 시약과 안정적으로 접촉을 유지한다. 세포와 활성화 시약 간의 안정적인 접촉을 유지하는 한가지 방법은 불필요하거나 과도한 세포의 움직임을 방지하는 것이다. 따라서, 구현예에서, 세포 배양물은 활성화 단계 동안 실질적으로 방해받지 않는다. "실질적으로 방해받지 않는"이란 세포 배양 배지가 변화하는 동안, 세포가 일반적으로 세포 배양 챔버의 동일한 영역, 예를 들어 챔버의 바닥에 남아 있는 것을 의미한다. 세포가 상이한 용기들 사이에서 이동하면, 가령 하나의 배양 플라스크로부터 다른 배양 플라스크로 옮겨지면, 세포는 방해받을 수 있으며, 또는 용기가 유연하면, 세포가 방해받을 수 있다. 가령, 배양 백 등의 유연한 용기는 백의 취급시에 세포를 움직이게 할 수 있다. 본원에서 설명한 바와 같이, 상기 방법은 실질적으로 평평하고 낮은 세포 배양 챔버를 적절하게 이용하여, 다양한 영양소 및 가스에 대한 세포의 균일한 접근을 가능케 하고, 폐기물의 용이한 제거 및 배지 이송도 가능케 한다. 또한, 실질적으로 평평한 세포 배양 챔버는 세포 성장 및 원하는 세포 표현형(들)의 생성을 향상시킬 수 있는 방법의 다양한 단계 동안 세포가 서로 접촉할 수 있게 한다.

[0104] 일부 구현예에서, 활성화 시약은 항체이다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 비드를 포함하여, 중합체 표면을 포함한 표면에 결합된 항체로 활성화된다. 추가의 구현예에서, 하나 이상의 항체는 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체이다. 예를 들어, 비드는 항-CD3 및 항-CD28로 코팅된, 가령 DYNABEADS 등의 자기(magnetic) 비드일 수 있다. 항-CD3 및 항-CD28 비드는 자극 신호를 적절하게 제공하여 T 세포 활성화를 지원할 수 있다. 가령, Riddell 1990; Trickett 2003을 참조한다.

[0105] 다른 구현예에서, 세포 배양물은 가용성 항체로 활성화된다. 추가의 구현예에서, 가용성 항체는 가용성 항-CD3 항체이다. OKT3은 면역 글로불린 IgG2a 동형(isotype)의 생쥐 단일클론 항체이고 CD3을 표적으로 한다. 그러므로, 일부 구현예에서, 가용성 항-CD3 항체는 OKT3이다. OKT3은, 가령 Dudley 2003; Manger 1985; Ceuppens 1985; Van Wauwe 1980; Norman 1995에 추가로 기재되어 있다.

[0106] 일부 구현예에서, T 세포 활성화를 위한 공동 자극 신호는 보조 세포에 의해 제공된다. 보조 세포는 예를 들어, Fc 수용체를 포함할 수 있으며, 이는 T 세포 상에서 CD3 항체와 TCR/CD3 복합체의 가교 결합을 가능케 한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포들(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)의 혼합 개체군이다. PBMC는 T 세포 활성화를 지원할 수 있는 보조 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, CD28 공동 자극 신호는 PBMC에서 단핵구 상에 존재하는 B7 분자에 의해 제공될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포(가령, 수지상 세포)를 포함한다. 추가의 구현예에서, 보조 세포는 B7, CD28 및/또는 ICOS를 포함한다. 보조 세포는, 가령 Wolf 1994; Chai 1997; Verwilghen 1991; Schwartz 1990; Ju 2003; Baroja 1989; Austyn 1987; Tax 1983에 추가로 기재되어 있다.

[0107] 본원에서 설명한 바와 같이, 활성화 시약은 제조된 CAR T 세포의 표현형을 결정하여, 원하는 표현형을 촉진시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 활성화 시약은 T 세포 서브세트, 즉 CD4+ 헬퍼 T 세포와 CD8+ 세포독성 T 세포의 비를 결정한다. 세포독성 CD8+ T 세포는 전형적으로, 암 세포(즉, 항 종양 반응), (가령, 바이러스로) 감염된 세포, 또는 다른 방식으로 손상된 세포의 사멸에 책임이 있다. CD4+ T 세포는 전형적으로 사이토카인을 생성하고 면역 반응의 조절을 도우며, 일부 경우에는 세포 용해를 지원할 수 있다. CD4+ 세포는 APC를 활성화시키며, 이는 다음에 항 종양 반응을 위해 나이브 CD8+ T 세포를 프라이밍한다. 따라서, 구현예에서, 본 발명의 방법은 미리 정의된 표현형의 CAR T 세포를 제조하는 단계(즉, 원하는 표현형의 세포를 촉진하는 단계)를 더 포함한다. 미리 정의된 표현형은, 예를 들어 CD8+ 세포 대 CD4+ 세포의 미리 정의된 비일 수 있다. 일부 구현예에서, CAR T 세포의 개체수에서 CD8+ 세포 대 CD4+ 세포의 비는 약 1:1, 약 0.25:1 또는 약 0.5:1이다. 다른 구현예에서, CAR T 세포의 개체수에서 CD8+ 세포 대 CD4+ 세포의 비는 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1 또는 약 5:1이다.

[0108] 구현예에서, 활성화 시약은 활성화 단계 후에 활성화된 T 세포 배양물에서 제거된다. 활성화 시약, 가령 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체는 세포 배양 배지에 존재할 수 있다. 그러므로, 일부 구현예에서, 활성화 시약, 가령 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체를 함유하는 세포 배양 배지는 활성화 단계 후에 활성화된 T 세포 배양물에서 제거된다. 일부 구현예에서, 활성화 시약의 제거는 가용성 항체의 제거를 포함한다. 예를 들어, 가용성 항체는 세포 배양 배지를 교환함으로써 제거될 수 있다. 가용성 항체는, 이 가용성 항체에 특이적인 친화적 방법

에 의해서 제거될 수도 있다. 다른 구현예에서, 활성화 시약의 제거는 항체를 함유한 비드를 제거하는 것을 포함한다. 비드의 제거는, 예를 들어 비드의 여과 또는 자석에 의한 제거를 포함할 수 있다.

[0109] **활성화된 T 세포의 형질도입.** 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물은 키메라 항원 수용체를 코딩하는 벡터로 형질도입되어 형질도입된 T 세포 배양물을 생성하는 활성화된 T 세포 배양물이다. 일부 구현예에서, 형질도입은 바이러스 감염, 트랜스포존(transposons), mRNA 형질감염, 전기 천공 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 형질도입은 전기 천공을 포함한다. 따라서, 구현예에서, 세포 공학 시스템은 본원에서 설명한 바와 같은 전기 천공 시스템 또는 전기 천공부를 포함한다. 추가의 구현예에서, 형질도입은 바이러스 감염을 포함한다. 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터, 감마레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터 또는 아데노 바이러스 벡터일 수 있다. 구현예에서, 형질도입은 바이러스 벡터를 세포 배양물의 활성화된 T 세포에 도입하는 것을 포함한다. 추가의 구현예에서, 벡터는 바이러스 입자로서 전달된다.

[0110] 일부 구현예에서, 형질도입 단계는 활성화된 T 세포를 렌티바이러스 벡터로 형질도입하는 단계를 포함하고, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 50, 약 0.5 내지 약 30, 또는 약 0.5 내지 약 20의 감염 다중도 (multiplicity of infection, MOI)로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 8의 MOI로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 6의 MOI로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 4의 MOI로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 2의 MOI로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.6 내지 약 1.5의 MOI로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.7 내지 약 1.3의 MOI로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.8 내지 약 1.1의 MOI로 도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5, 약 0.6, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 약 1, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9 또는 약 2의 MOI로 도입된다.

[0111] 일부 구현예에서, 활성화 단계 후, T 세포 배양물로부터의 세포 배양 배지를 제거하고, 다음에 배지는 벡터 (가령, 렌티바이러스 벡터)와 혼합되어 세포에 균일하게 분포된다. 일부 구현예에서, 제거된 세포 배양 배지를 사용하여 벡터를 희석시키고 이를 활성화된 T 세포 배양물로 균일하게 전달한다. T 세포 배양물에서 벡터 (가령, 렌티바이러스 벡터)의 균일한 분포 및 따라서 균질한 노출은 형질도입 효율을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 세포 배양물의 부피는 활성화 후 및 벡터의 첨가 전에 감소된다. 부피 감소는 더 높은 정도의 세포-벡터 접촉을 가능케 할 수 있다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포 배양물은 형질도입 중에 실질적으로 방해받지 않는다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 활성화 및 형질도입 단계 동안 실질적으로 방해받지 않는다. 즉, 세포는 일반적으로, 활성화 시약 또는 벡터가 세포에 제공되는 동안 챔버의 동일한 영역(가령, 세포 배양 챔버의 바닥)에 유지된다. 이는 세포에 대한 활성화 시약 및/또는 벡터의 균일한 분포와 균질한 노출을 촉진할 수 있고, 따라서 활성화 및/또는 형질도입 효율을 향상시킬 수 있다.

[0112] 따라서, 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템을 사용하는 방법의 형질도입 효율은 세포 배양을 위해 유연한 가스 투과성 백을 사용하는 방법의 형질도입 효율보다 높다. 일부 구현예에서, 본원에서 설명한 바와 같은 CAR T 세포의 자동화된 제조방법의 형질도입 효율은 유연한 가스 투과성 백을 이용하는 방법의 형질도입 효율보다 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 100% 이상, 더 높다.

[0113] **형질도입된 T 세포의 확장.** 일부 구현예에서, 형질도입된 T 세포 배양물 (또는 다른 면역 세포 배양물)은 미리 정의된 배양 크기 (즉, 세포 수)로 확장된다. 미리 정의된 배양 크기는 임상 용도, 즉 환자로의 수혈, 연구 및 개발 작업 등에 적절한 충분한 수의 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 환자에게 투여하기 위한 임상 또는 치료 용량의 CAR T 세포는 약 10^5 세포, 약 10^6 세포, 약 10^7 세포, 약 10^8 세포, 약 10^9 세포 또는 약 10^{10} 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 30개 이상, 35개 이상, 40개 이상, 45개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상, 또는 100개 이상의 임상 용량의 CAR T 세포를 제조한다. 일부 구현예에서, 형질도입된 T 세포 배양물은 약 0.1 L 내지 약 5 L, 약 0.1 L 내지 약 2 L, 또는 약 0.2 L 내지 약 2 L의 총 부피으로 확장된다. 일부 구현예에서, 형질도입된 T 세포 배양물은 약 0.1 L, 약 0.2 L, 약 0.3 L, 약 0.4 L, 약 0.5 L, 약 0.6 L, 약 0.7 L, 약 0.8 L, 약 0.9 L 또는 약 1.0 L의 총 부피으로 확장된다. 세포 제조 공정의 단계를 기반으로 필요에 따라서, 공정을 통해 부피를 변화시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 미리 정의된 배양 크기는 세포 공학 시스템의 사용자가 입력한다. 사용자는 제조할 원하는 세포 계수(cell count) (가령, 10^{10} CAR T 세포)로서 미리 정의된 배양 크기를 입력할 수 있으며, 또는 제조할 원하는 임상 또는 치료 용량의 원하는 수 (가

령, 10개의 임상 또는 치료 용량의 CAR T 세포)로 미리 정의된 배양 크기를 입력할 수 있다. 구현예에서, 본원에서 설명한 방법에 의해 제조된 CAR T 세포의 수는 약 1억개 이상 (즉, 1×10^6 개)의 세포, 또는 약 3억개 이상, 약 5억개 이상, 약 6억개 이상, 약 7억개 이상, 약 8억개 이상, 약 9억개 이상, 약 10억개 (즉, 1×10^9) 이상, 약 11억개 이상, 약 12억개 이상, 약 13억개 이상, 약 14억개, 약 15억개 이상, 약 16억개 이상, 약 17억개 이상, 약 18억개 이상, 약 19억개 이상, 약 20억개 (즉, 2×10^9) 이상의 세포, 약 21억개 이상, 약 22억개 이상, 약 23억개 이상, 약 24억개 이상, 약 25억개 이상, 약 26억개 이상, 약 27억개 이상, 약 28억개 이상, 약 29 억개 이상, 또는 약 30억개 이상의 CAR T 세포이다.

[0114] 일부 구현예에서, 형질도입된 T 세포 배양물의 확장은 형질도입된 T 세포 배양물의 적어도 1회의 공급, 세척, 모니터링 및 선별을 포함한다. 세포 배양물의 공급은 세포 배양물에 배지 및/또는 추가 영양소를 보충하는 것을 포함할 수 있다. 세포 배양물의 세척은 사용한 배지 (즉, 영양소가 고갈되고/되거나 세포 폐기물을 함유한 배지)를 제거하고 세포 배양물에 새로운 배지를 보충하는 것을 포함할 수 있다. 세포 배양물의 모니터링은 세포 배양물의 온도, pH, 포도당, 산소 수준, 이산화탄소 수준 및/또는 광학 밀도를 모니터링하는 것을 포함할 수 있다. 세포 배양물의 선별은, 가령 생존율, 유형 및/또는 형태 등의 원하는 특성을 갖는 세포를 선별하는 한편, 원하는 특성을 갖지 않는 세포는 제거하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 미리 정의된 배양 크기를 달성하기 위해 형질도입된 T 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및/또는 선별을 여러 번 수행하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 형질도입된 T 세포 배양물의 2회 이상, 3회 이상, 4회 이상, 5회 이상, 6회 이상, 7회 이상, 8회 이상, 9회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 20회 이상, 25회 이상, 30회 이상, 35회 이상, 40회 이상, 45회 이상, 50회 이상 또는 100회 이상의 공급, 세척, 모니터링 및/또는 선별을 수행하여 미리 정의된 배양 크기를 달성한다.

[0115] 구현예에서, 공급, 세척 및 모니터링 중 한가지 이상을 없앨 수 있으며, 또는 원하는 세포 표현형 또는 세포 수 등에 따라 이벤트의 순서를 변경할 수 있다.

[0116] 구현예에서, 모니터링은 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서 및/또는 광학 밀도 센서로 모니터링하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서 및/또는 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 포함한다. 추가의 구현예에서, 세포 공학 시스템은 미리 정의된 배양 크기를 기반으로 세포 배양물의 온도, pH, 포도당, 산소 수준, 이산화탄소 수준 및/또는 광학 밀도를 조절하게 된다. 예를 들어, 원하는 세포 배양 크기에 필요한 성장을 달성하기에 너무 낮은 세포 배양물의 현재 산소 수준이 세포 공학 시스템에 의해 검출되면, 세포 공학 시스템은, 가령 세포 배양 배지를 산소화된 세포 배양 배지로 교환함으로써, 또는 산소화 성분 (즉, 실리콘 튜브)을 통해 세포 배양 배지를 유동시킴으로써, 산소화된 세포 배양 배지를 도입하여 세포 배양물의 산소 수준을 증가시키게 된다. 또 다른 예에서, 세포 배양물의 현재 온도가 너무 높고 세포가 너무 빠르게 성장하고 있는 (가령, 세포의 과밀화가 바람직하지 않은 특성을 초래할 수 있는) 것이 세포 공학 시스템에 의해 검출되면, 세포 공학 시스템은 자동으로 세포 배양물의 온도를 낮추어 세포의 일정한 성장률 (또는 원하는 대로의 지수 성장률)을 유지하게 된다. 또 다른 추가 구현예에서, 세포 공학 시스템은 세포 성장률 및/또는 세포 계수, 또는 다른 모니터링한 인자, 예컨대 pH, 산소, 포도당 등에 기반하여 세포를 공급 (즉, 세포 배양물에 신선한 배지 및/또는 영양소를 제공)하는 스케줄을 자동으로 조절한다. 세포 공학 시스템은 저온 챔버 (가령, 4°C 또는 -20°C)에 배지(및 세척액 등의 다른 시약)를 저장하고, 가온된 배지를 세포 배양물에 도입하기 전에 실온 챔버 또는 고온 챔버 (가령, 각각 25°C 또는 37°C)에서 배지를 가온하도록 할 수 있다.

[0117] 구현예에서, 세척은 여과 또는 침강에 의해 세포를 세척하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세척 단계는 세포 배양 용기 또는 플라스크의 이동을 필요로 하지 않는다. 즉, 세포는 동일한 세포 배양 용기 또는 플라스크에서 세척할 수 있다. 추가의 구현예에서, 세포는 세척 단계 동안 실질적으로 방해받지 않고 유지된다. 구현예에서, 선별은 세포 배양물을 하나 이상의 선별 시약과 혼합하는 것을 포함한다. 선별 시약은 원하는 세포 유형에 특이적인 비드, 가령 자기 비드일 수 있고, 다음에 비드에 결합된 세포는, 가령 자기 챔버를 통과함으로써 비결합 세포와 분리된다. 예를 들어, 선별 비드는 원하는 세포 유형에 특이적인 항체, 가령 항-CD8 항체 또는 항-CD4 항체를 포함한다. 또한, 선별은 여과에 의해 수행하여 크기를 기반으로 특정 세포 유형을 제거하거나 선택할 수도 있다. 플라스틱-접착에 의한 세포 선별 (즉, 세포는 하나의 챔버에서 시작될 수 있고, 원치 않는 세포는 표면에, 이어서 여전히 현탁 상태로 있는 원하는 세포에 부착되거나, 다른 챔버로 이동)도 이용할 수 있다.

[0118] 적절하게는, 확장 단계 동안, 세포는 흔들리지 않거나 회전되지 않는다. 확장 동안 세포를 상대적으로 정지된 위치에 유지하는 것은 원하는 세포 표현형을 제공할뿐만 아니라, 전체 세포의 제조를 돕는데 도움이 되는 것으

로 판명되었다.

- [0119] **확장된 배양물의 농도.** 일부 구현예에서, 확장된 T 세포 배양물 (또는 다른 면역 세포 배양물)은 미리 정의된 농도로 농축된다. 미리 정의된 농도는 환자에게 적절히 주입할 수 있는 부피이다. 예를 들어, 확장된 T 세포 배양물은 약 1 ml, 약 2 ml, 약 5 ml, 약 10 ml, 약 15 ml, 약 20 ml, 약 25 ml, 약 30 ml, 약 35 ml, 약 40 ml, 약 45 ml, 약 50 ml, 약 55 ml, 약 60 ml, 약 65 ml, 약 70 ml, 약 75 ml, 약 80 ml, 약 85 ml, 약 90 ml, 약 95 ml 또는 약 100 ml로 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 농축은 원심분리에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 농축은 여과에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 여과는 한외여과 및/또는 투석여과이다. 일부 구현예에서, 미리 정의된 농도는 세포 공학 시스템의 사용자가 입력한다. 다른 구현예에서, 미리 정의된 농도는 사용자가 입력한 상이한 파라미터, 예를 들어 제조할 임상 또는 치료 용량의 수 또는 부피; 또는 제조할 세포의 수를 기반으로 세포 공학 시스템에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 입력 파라미터에 기반하여, 제조된 임상 또는 치료 용량의 부피 또는 수를 자동으로 조정한다. 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 미리 정의된 농도를 기반으로 원심분리(가령, 속도, 원심분리 기간) 또는 여과(가령, 필터 크기, 부피, 지속시간)의 파라미터를 자동으로 조절한다.
- [0120] 챔버의 포트 위치 및 설계에 기반한 침강도 이용할 수 있다. 즉, 세포를 제거하지 않고 챔버 내의 유체 부피를 대략 0.5 mL로 감소시킬 수 있다.
- [0121] **CAR T 세포 배양물 수확.** 일부 구현예에서, 농축된 T 세포 배양물 (또는 다른 면역 세포 배양물)을 수확하여, 카메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 배양물을 제조한다. 일부 구현예에서, 수확은 CAR T 세포의 교반, 유체 유동 및 세척을 포함한다. 일부 구현예에서, 수확은, 가령 세포 폐기물, 비드 (가령, 항체를 함유하는 비드 및/또는 세포의 분리에 사용한 비드) 등의 선별 시약, 또는 과량의 바이러스 벡터를 포함하는 원치 않는 생성물로부터 세포를 분리하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 수확은 하나 이상의 플라스크, 바이알 또는 용기 내에 CAR T 세포를 균일하게 분포시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 수확은 제형화 시약, 가령, 장기간 저장을 위해 CAR T 세포를 안정화시키는 용액에서 CAR T 세포를 재현탁시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 수확은 CAR T 세포의 동결 보존을 포함한다.
- [0122] **추가 하류(Downstream) 공정.** 일부 구현예에서, 환자에게서 치료를 위해 사용하기 전에 CAR T 세포에 추가 하류 처리를 실시한다. 예를 들어, 동결 보존된 CAR T 세포는 멸균 여과에 의해 여과되어 잠재적인 바이러스 입자 잔존물을 제거할 수 있다. 멸균 여과 후, CAR T 세포는 하나 이상의 바이알, 플라스크, 용기 또는 컨테이너에 포장하기 전에 적어도 하나 이상의 농축 단계를 거칠 수 있다. 포장된 CAR T 세포에서 품질 평가 및/또는 품질 관리 시험을 실시할 수 있다. 일부 구현예에서, 환자에게 투여하기 전에 CAR T 세포에 최소의 하류 처리를 실시한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 수확한 CAR T 세포를 동결 보존하지 않고, 수확 후 짧은 시간 내에 환자에게 보낸다. 동결 보존 단계를 피하면, 세포의 생존율이 증가될 수 있다.
- [0123] **세포 공학 시스템.** 일부 구현예에서, 본원에서 설명하는 방법은 활성화, 형질도입, 확장, 농축 및 수확 단계들을 수행하기 위한 명령을 적절히 갖는 완전 밀폐식 세포 공학 시스템(600) (도 6a, 6b 참조)에 의해 수행된다. 본원에서는 CAR T 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포의 자동화 제조를 위한 세포 공학 시스템을 설명하고 있으며, 이는 전체에 걸쳐서 자동화된 세포 공학 시스템, COCOON 또는 COCOON 시스템이라고도 부른다. 예를 들어, 사용자는 세포 배양물과 시약 (가령, 활성화 시약, 벡터, 세포 배양 배지, 영양소, 선별 시약 등)이 미리 채워져 있고, 세포 제조를 위한 파라미터 (가령, 시작 세포 수, 배지의 유형, 활성화 시약의 유형, 벡터의 유형, 제조할 세포 또는 용량 등)가 설정된 세포 공학 시스템을 제공할 수 있으며, 세포 공학 시스템은 사용자로부터의 추가 입력 없이, CAR T 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 방법을 수행할 수 있다. 자동화된 제조 공정의 끝에서, 세포 공학 시스템은 제조된 세포를 수집하기 위해 (가령, 경고 메시지를 재생하거나 모바일 앱 경고를 전송함으로써) 사용자에게 알릴 수 있다. 일부 구현예에서, 완전 밀폐식 세포 공학 시스템은 멸균 세포 배양 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 완전 밀폐식 세포 공학 시스템은 비멸균 환경에 대한 세포 배양물의 노출을 감소시킴으로써 세포 배양물의 오염을 최소화한다. 추가의 구현예에서, 완전 밀폐식 세포 공학 시스템은 사용자에 의한 세포의 취급을 줄임으로써 세포 배양물의 오염을 최소화한다.
- [0124] 본원에서 설명한 바와 같이, 세포 공학 시스템은 카세트(602)를 적절하게 포함한다. 그러므로, 구현예에서, 본원에서는 자동화된 세포 공학 시스템에서 사용하는 카세트가 제공된다. 본원에서 사용한 바와 같이, “카세트”란 본원에서 설명하는 방법의 다양한 원리를 수행하기 위한 하나 이상의 챔버를 포함하고, 적절하게는 하나 이상의 세포 배지, 활성화 시약, 벡터 등도 포함하는 세포 공학 시스템의 상당히 자족적이고 제거 및 교환 가능한 요소를 말한다.

- [0125] 도 6b는 본원의 구현예에 따른 카세트(602)의 구현예를 나타낸다. 구현예에서, 카세트(602)는 세포 배양 배지의 저장에 적절한 저온 챔버(604)를 비롯해, 면역 세포 배양물의 활성화, 형질도입 및/또는 확장을 수행하기에 적절한 고온 챔버(606)를 포함한다. 적절하게는, 고온 챔버(606)는 열 장벽(1102)에 의해 저온 챔버(606)와 분리되어 있다 (도 11b 참조). 본원에서 사용한 바와 같이, “저온 챔버”란 실온 미만, 및 보다 적절하게는, 약 4°C 내지 약 8°C로 적절하게 유지되는 챔버를 지칭하며, 냉장 온도에서 세포 배지 등을 유지하기 위함이다. 저온 챔버는 약 1L, 약 2L, 약 3L, 약 4L 또는 약 5L의 유체를 수용하는 배지용 백 또는 다른 홀더를 포함할 수 있다. 추가 배지 백 또는 기타 유체 공급원을 외부에서 카세트에 연결하거나, 접근 포트를 통해 카세트에 연결할 수 있다.
- [0126] 본원에서 사용한 바와 같이, “고온 챔버”란 실온 이상, 보다 적절하게는 세포 증식 및 성장을 가능케 하기 위한 온도, 즉 약 35 내지 40°C, 보다 적절하게는 약 37°C로 적절하게 유지되는 챔버를 말한다.
- [0127] 구현예에서, 고온 챔버(606)는 도 6d 및 도 6e에 도시한 바와 같이, 세포 배양 챔버(610) (명세서 전체에 걸쳐서 증식 챔버 또는 세포 증식 챔버라고도 함)를 적절하게 포함한다.
- [0128] 카세트는 세포 배양 챔버에 연결된 하나 이상의 유체 경로를 더 포함하며, 유체 경로는 세포 배양 챔버 내에서 세포를 방해하지 않고 세포 배양 챔버에 대한 폐기물의 재순환 및 제거와, 균질한 가스 교환 및 영양소 분배를 제공한다. 또한, 카세트(602)는 다양한 유체 경로를 통한 유동을 제어하기 위해, 하나 이상의 밸브(607)뿐만 아니라, 본원에서 설명한 바와 같이, 카세트를 통해 유체를 구동하기 위한 연동 펌프를 포함한 하나 이상의 펌프 (605)를 더 포함한다.
- [0129] 예시적인 구현예에서, 도 6d에 도시한 바와 같이, 세포 배양 챔버(610)는 평평하며, 쉽게 구부러지거나 휘지 않으며 비-가요성 (즉, 플라스틱 등의 실질적으로 비-가요성 재료로 제조된) 챔버이다. 비-가요성 챔버를 사용하면, 세포는 실질적으로 방해받지 않는 상태로 유지될 수 있다. 도 6e에 도시한 바와 같이, 세포 배양 챔버(610)는 면역 세포 배양물이 세포 배양 챔버의 바닥(612)을 가로질러 분산되도록 배향된다. 도 6e에 도시한 바와 같이, 세포 배양 챔버(610)는 바닥 또는 테이블과 평행한 위치에 적절하게 유지되고, 세포 배양물이 방해받지 않는 상태로 유지되어, 세포 배양물은 세포 배양 챔버의 바닥(612)의 넓은 면적에 걸쳐서 분산된다. 구현예에서, 세포 배양 챔버(610)의 전체 두께 (즉, 챔버 높이(642))는 약 0.5 cm 내지 약 5 cm 정도로 낮다. 적절하게는, 세포 배양 챔버는 약 0.50 ml 내지 약 300 ml, 보다 적절하게는, 약 50 ml 내지 약 200 ml의 부피를 갖거나, 세포 배양 챔버는 약 180 ml의 부피를 갖는다. 낮은 챔버 높이(642) (5 cm 미만, 적절하게는, 4 cm 미만, 3 cm 미만, 또는 2 cm 미만)를 사용하면, 세포에 근접하여 효과적인 배지 및 가스 교환이 가능하다. 포트는 세포를 방해하지 않고 유체의 재순환을 통한 혼합을 가능케 한다. 더 큰 높이의 정적 용기는 농도 구배를 생성하여 세포 근처의 영역이 산소 및 신선한 영양소로 제한되는 결과를 초래한다. 제어된 유동 역학을 통해, 세포를 방해하지 않고 배지 교환을 수행할 수 있다. 세포 손실 위험 없이 (세포가 존재하지 않는) 추가 챔버로부터 배지를 제거할 수 있다.
- [0130] 본원에서 설명한 바와 같이, 예시적인 구현예에서, 카세트에는 이들의 임의의 조합을 포함하여, 세포 배양물, 배양 배지, 활성화 시약, 및/또는 백터 중 적어도 하나가 미리 채워져 있다. 다른 구현예에서, 이들 다양한 요소는 적절한 주입 포트 등을 통해 나중에 추가할 수 있다.
- [0131] 본원에서 설명한 바와 같이, 구현예에서, 카세트는 적절하게는 pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 젖산 센서/모니터 및/또는 광학 밀도 센서 중 적어도 하나를 더 포함한다. 또한, 카세트는 하나 이상의 샘플링 포트 및/또는 주입 포트를 포함할 수도 있다. 이러한 샘플링 포트 및 주입 포트(1104)의 예는 도 11a에 도시되어 있으며, 전기 천공부 또는 추가의 배지 공급원 같은 외부 장치에 카트리지를 연결하기 위한 접근 포트를 포함할 수 있다. 도 11a는 예를 들어, 세포 배지, 백터, 영양소 및 폐기물 등을 포함하여, 배양 배지에서 사용하는 다양한 성분을 유지하는 배양 구역(1107)뿐만 아니라, 세포 배지 등을 가온하는데 사용할 수 있는 세포 투입구(1105), 및 시약 가온 백(1106)의 위치도 나타낸다.
- [0132] 도 11b는 카세트(602)를 제거한 COCOON 세포 공학 시스템을 나타낸다. 도 11b에는 가스 제어 씰(seal)(1120), 가온 구역(1121), 액추에이터(1122), 원하는 대로 세포 공학 시스템을 요동시키거나 기울이기 위한 피봇(1123), 및 저온 챔버(606)를 유지하기 위한 저온 구역(1124)을 포함하는 세포 공학 시스템의 구성요소가 도시되어 있다. 또한, 바코드 판독기를 포함할 수 있고, 터치 패드 또는 다른 유사한 장치에 의한 입력장치를 사용하여 수신하는 능력을 지닌 예시적인 사용자 인터페이스(1130)가 도시되어 있다. 도 11e는 추가적인 세포 배양 부피가 필요한 경우에 사용할 수 있는 2차 챔버(1150)의 위치를 포함하여, 본원에서 제조한 바와 같은 최종 세포 배

양물을 회수하는데 사용할 수 있는 수확 챔버(1152)뿐만 아니라, 카세트(602)의 추가 상세도를 나타낸다.

- [0133] 예시적인 구현예에서, 도 6f에 도시한 바와 같이, 세포 배양 챔버(610)는: 세포 배양 챔버로부터 기포를 제거할 수 있고/있거나 재순환 포트로서 구성되는 원위 포트(620); 재순환 투입(inlet) 포트로서 기능하도록 구성되는 중간 포트(622); 및 세포 제거를 위한 배출 포트로서 기능하도록 구성되는 근위 포트(624) 중 적어도 하나를 더 포함한다.
- [0134] 또 다른 추가 구현예에서, 본원에서는 자동화된 세포 공학 시스템(600)에서 사용하는 카세트(602)가 제공되며, 이 카세트는 면역 세포 배양물의 활성화, 형질도입 및/또는 확장을 수행하는 것으로 면역 세포 배양물을 수용하도록 구성되는 챔버 부피를 갖는 세포 배양 챔버(610); 및 면역 세포 배양물을 수용하지 않으며, (즉, 위성 부피는 어떠한 세포도 함유하지 않음) 배지 및 다른 작동 유체에 대한 추가 부피를 제공함으로써 세포 배양 챔버의 작업 부피를 증가시키는 위성 부피(630)를 포함한다. 적절하게는, 위성 부피는 면역 세포 배양물을 방해하지 않고 배지가 배양 챔버와 교환되도록 세포 배양 챔버에 유체 연결된다. 예시적인 구현예에서, 위성 부피는 백이고, 다른 구현예에서, 위성 부피는 비수확 챔버(non-yielding chamber)이다. 구현예에서, 위성 부피는 약 0.50 ml 내지 약 300 ml, 보다 적절하게는, 약 50 ml 내지 약 200 ml이다. 도 6d 내지 6e는 카세트(602)에서 위성 부피(630)의 위치를 나타낸다.
- [0135] 도 6g는 세포 배양 챔버(610)와 위성 부피(630) 간의 연결을 나타내는 개략도이다. 또한, 도 6g에는 다양한 센서 (가령, pH 센서(650), 용존 산소 센서(651))를 비롯해, 샘플링/샘플 포트(652) 및 다양한 밸브 (제어 밸브(653), 바이패스(bypass) 체크 밸브(654)), 및 적절하게는 실리콘계 튜브 구성요소를 포함하고, 구성요소를 연결하는 하나 이상의 유체 경로(640)의 위치도 도시되어 있다. 본원에서 설명한 바와 같이, 실리콘계 튜브 구성요소를 사용하면, 튜브 구성요소를 통한 산소화가 가능해져 세포 배양물용 가스 전달 및 최적의 산소화를 촉진한다. 또한, 도 6g에는 펌프 튜브(657) 및 백/바이알 모듈(658)과 함께, 카세트의 유로에서 사용하는 하나 이상의 소수성 필터(655) 또는 친수성 필터(656)도 도시되어 있다.
- [0136] 도 6h는 전통적인 백과 비교하여, COCOON 시스템을 사용한 가스 교환 데이터를 나타낸다.
- [0137] 구현예에서, 위성 부피(630)은 추가로 면역 세포 배양물에서 세포의 손실 없이 배지 제거를 가능하게 구성된다. 즉, 위성 부피와 세포 배양 챔버 간의 배지 교환은 세포가 방해받지 않으며 세포 배양 챔버에서 제거되지 않는 방식으로 수행된다.
- [0138] 추가의 구현예에서, 도 6g에 도시한 바와 같이, 카세트(602)는 필요에 따라 추가의 배지 등을 유지하기 위한 직교류 리저버(crossflow reservoir)(632)를 더 포함한다. 적절하게는, 직교류 리저버는 약 0.50 ml 내지 약 300 ml, 보다 적절하게는, 약 100 ml 내지 약 150 ml의 부피를 갖는다.
- [0139] 본원에서 설명한 세포 공학 시스템은 3가지 관련 부피, 즉, 세포 배양 챔버 부피, 작업 부피 및 총 부피를 적절하게 갖는다. 적절하게는, 카세트에서 사용한 작업 부피는 공정 단계를 기반으로 180 mL 내지 460 mL의 범위이며, 약 500 mL, 약 600 mL, 약 700 mL, 약 800 mL, 약 900 mL 또는 약 1L까지 증가될 수 있다. 구현예에서, 카세트는 4×10^9 세포 내지 10×10^9 세포를 쉽게 달성할 수 있다. 공정 동안의 세포 농도는 0.3×10^6 세포/ml 내지 대략 10×10^6 세포/ml에서 변한다. 세포는 세포 배양 챔버에 위치되지만, 본원에서 설명한 바와 같이, 추가 챔버 (가령, 직교류 리저버 및 위성 부피)를 통해 배지를 연속으로 재순환시켜 작업 부피를 증가시킨다.
- [0140] 본원에서 설명한 바와 같이, 액체 (가령, 세포 배양물)로 채워지는 경우, 및 픽업 또는 이동되는 경우, 형태가 변하는 가요성 백과는 달리, "실질적으로 비-수확 챔버" (가령, 예시적인 세포 배양 챔버(610))는 전형적인 취급 조건에서 액체로 채워지거나, 픽업되거나, 이동되는 경우에 형상 (가령, 굽힘, 곡선 또는 변형)이 변화되지 않는다. 그러므로, 일부 구현예에서, 실질적으로 비수확 챔버는, 이 챔버가 픽업 또는 이동되는 경우에도 세포가 챔버의 동일한 영역에 실질적으로 남아 있게 한다. 또한, 실질적으로 비-수확 챔버는 백과 관련된 곡률을 갖지 않는다. 그러므로, 일부 구현예에서, 세포는 백과 비교하여 실질적으로 비-수확 챔버 내에 보다 균일하게 분포된다. 일부 구현예에서, 활성화 시약 및/또는 백터는 백과 비교하여 실질적으로 비-수확 챔버 내에 보다 균일하게 분포된다.
- [0141] 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함한다. 추가의 구현예에서, 본원에서 설명한 방법에서 세포의 활성화, 형질도입, 확장, 농축 및 수확 단계는 각각 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행된다. 일부 구현예에서, 세포들은 하나의 챔버로부터 또 다른 챔버로 이송되는 동안 실질적으로 방해받지 않는다. 다른 구현예에서, 상기 방법의 단계는 세포 공학 시스템의 동일한 챔버에서 수행되고, 세포 공학 시

시스템은 방법의 각 단계에서 필요한 챔버 환경을 자동으로 조정한다. 따라서, 추가로 다양한 단계 동안 세포는 방해받지 않는다.

[0142] 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 세포 배양을 위해 가요성 가스 투과성 백과 비교하여 가스 교환이 개선되었다. 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 가스 교환 라인을 포함한다. 가스 교환 라인은, 가령 실리콘 등의 가스 투과성 재료로 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 가스 교환 라인의 가스 투과 계수는 가요성 가스 투과성 백에서 사용한 물질의 투과 계수보다 높다. 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 세포 제조방법 동안 실질적으로 비-수확 챔버 전체에 걸쳐서 산소를 재순환시킨다. 그러므로, 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템에서 세포 배양물의 산소 수준은 유연한 가스 투과성 백에서 세포 배양물의 산소 수준보다 높다. 증가된 산소 수준은 증가된 세포 성장 및 증식을 지원할 수 있으므로, 세포 배양 확장 단계에서 더 높은 산소 수준이 중요할 수 있다.

[0143] 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 세포를 방해하지 않고 챔버 전체에 걸쳐서 배지를 연속으로 재순환시킨다. 예를 들어, 세포 공학 시스템은 세포가 챔버의 동일한 영역에 남아 있으면서, 연속으로 영양소를 보충하고, 폐기물을 제거하며, 분비된 사이토카인 및 용해된 가스를 챔버를 통해 순환시킨다. 연속적인 순환은 양성 인자의 균일한 분포 및 음성 인자의 균일한 제거를 향상시킬 수 있으며, 이는 세포를 방해하지 않고 불균일 분포로 인한 국소화 영향을 감소시킨다.

[0144] 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 (CAR T 제조를 포함하는) 세포 제조방법 동안 챔버 전체에 걸쳐서 이산화탄소를 제공한다. CO₂는 세포 배양물에서 표적 pH를 유지하는데 도움을 줄 수 있으며, 이는 세포 성장 및 증식에 중요할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 공학 시스템은 세포 배양물의 CO₂ 수준을 모니터링하고 측정된 CO₂ 수준을 기반으로 제공되는 CO₂의 양을 조정한다. 예를 들어, 세포 배양물이 증가함에 따라, 세포에 의해 생성된 CO₂의 양이 상응하여 증가하게 되고, 세포 공학 시스템은 제공되는 CO₂의 양을 감소시킨다. 세포 배양물의 원하는 CO₂ 수준은, 예를 들어 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 또는 약 10% CO₂와 같이, 사용자가 정의할 수 있다. 세포 배양물의 측정된 CO₂ 수준을 기반으로 제공되는 CO₂의 양이 세포 공학 시스템에 의해 꾸준히 조절되므로, 세포 공학 시스템은 제조 공정 전체에 걸쳐서 원하는 CO₂ 수준을 유지할 수 있다. 용해된 CO₂는 일반적으로, (물과의 반응을 통해 탄산을 형성하는) 용액을 산성화시키므로, 세포 배양물에서 CO₂의 양 역시 배양물의 pH에도 영향을 줄 수 있다. 따라서, 세포 배양물에서 CO₂ 수준이 일정하게 유지되면, 보다 안정적인 pH를 가져올 수 있다. 따라서, 구현예에서, 세포 배양물의 pH 수준은 제조 공정 동안 거의 일정하게 유지된다. 추가의 구현예에서, 형질도입된 세포 배양물의 pH 수준은 확장 단계 동안 거의 일정하게 유지된다.

[0145] CAR T 세포 제조를 포함하는 유전적으로 변형된 면역 세포 제조에서의 수율은 세포의 성장 조건뿐만 아니라, 활성화 및 형질도입 효율에 영향을 받을 수 있다. 세포와 활성화 시약 간의 보다 안정적인 접촉을 통해 활성화 효율이 향상될 수 있다. 배양 용기 전체에 걸친 세포의 이동은 세포의 불균일한 분포를 초래할 수 있고, 따라서 활성화 시약이 세포 배양 챔버에 첨가되면, 국소화 영향을 야기할 수 있다. 가요성 배양 백과는 달리, 비-수확 챔버에서 성장한 세포는 활성화 공정 동안 방해받지 않고 유지되며, 이는 높은 활성화 효율에 기여할 수 있다.

[0146] 활성화 효율이 향상되면 보다 증대된 벡터 형질도입 효율을 가져올 수도 있다. 세포가 활성화되고 활발히 분열되면, 벡터 (가령, 렌티바이러스 벡터)는 세포에 보다 효과적으로 통합될 수 있다. 세포 배양 챔버(610)에서 세포의 균질한 분포는 세포에 대한 벡터의 균질한 노출을 촉진할 수 있는 반면, 세포는 유연한 세포 배양 백에서 불균일하게 분포됨으로써, 상이한 벡터 노출이 일어날 수 있다. 그러므로, 일부 구현예에서, 본원에서 설명한 바와 같은 CAR T 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포의 자동화된 제조방법의 형질도입 효율은 유연한 가스 투과성 백을 사용하는 방법의 형질도입 효율보다 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 적어도 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 100% 이상, 더 높을 수 있다.

[0147] 또한, 세포 배양물의 성장 조건은 세포 수율을 개선시킬 수도 있다. 예를 들어, 세포 배양 챔버에서 높은 가스 투과성 튜브(tubing) 및 산소의 연속적인 재순환에 의해 촉진되는 세포 공학 시스템에서 더 높은 산소 수준은 세포 증식을 증가시킬 수 있다. 세포 배양 시스템의 상태를 꾸준히 모니터링하고 그에 따라 조정하는 세포 공학 시스템의 능력 역시 유리할 수 있다. 예를 들어, 세포 공학 시스템은 세포 배양물의 CO₂, O₂, N₂ 및/또는 pH 수준을 모니터링하고, CO₂, O₂, 또는 N₂의 수준을 조절할 수 있다. 영양소 역시 시기 적절하고 일관된 방식으로 제

공될 수 있으며, 세포 배양물에 균일하게 분포될 수 있다. 따라서, 본원에서 설명한 CAR T 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조하는 자동화된 방법은, 유리하게는, 수동 방법 또는 유연한 배양 백을 이용하는 방법과 비교하여 더 높은 세포 수율을 가져온다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에서 설명한 바와 같은 세포 공학 시스템을 이용하는 CAR T 세포를 포함한 유전적으로 변형된 면역 세포의 자동화된 제조방법은 세포 배양을 위해 유연한 가스 투과성 백을 이용하는 방법보다 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 100% 이상 더 많은 세포를 제조한다. 구현예에서, 본원에서 설명한 방법에 의해 제조된 세포의 수는 약 21억개 이상, 약 22억개 이상, 약 23억개 이상, 약 24억개 이상, 약 25억개 이상, 약 26억개 이상, 약 27억개 이상, 약 28억개 이상, 약 29억개 이상, 또는 약 30억개 이상의 세포를 포함하여, 약 20억개 (즉, 2×10^9) 이상이다.

[0148] 추가예 예시적인 구현예

[0149] 구현예 1은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법으로서, 이 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 확장된 면역 세포 배양물 및 농축된 면역 세포 배양물 중 하나 또는 둘 모두를 세척하는 단계를 더 포함하며, 이 단계들은 완전 밀폐식 세포 공학 시스템에 의해 수행되며, 이 단계들은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 공정을 통해 최적화된다.

[0150] 구현예 2는 구현예 1의 방법을 포함하고, 상기 공정은 자체 조정 공정이며, 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및 광학 밀도 센서 중 하나 이상으로 모니터링하는 단계; 및 모니터링을 기반으로, 형질도입된 T 세포 배양물의 온도, pH 수준, 포도당 수준, 산소 수준, 이산화탄소 수준 및 광학 밀도 중 하나 이상을 조절하는 단계를 포함한다.

[0151] 구현예 3은 구현예 1 또는 2의 방법을 포함하고, 이 방법은 약 1억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다

[0152] 구현예 4는 구현예 1 내지 3의 방법을 포함하고, 이 방법은 약 20억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다

[0153] 구현예 5는 구현예 1 내지 4의 방법을 포함하고, 면역 세포 배양물은 T 세포 배양물이다.

[0154] 구현예 6은 구현예 5의 방법을 포함하고, T 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물이다.

[0155] 구현예 7은 구현예 6의 방법을 포함하고, 벡터는 키메라 항원 수용체를 코딩한다.

[0156] 구현예 8은 구현예 1 내지 7의 방법을 포함하고, 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함한다.

[0157] 구현예 9는 구현예 1 내지 8의 방법을 포함하고, 면역 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함한다.

[0158] 구현예 10은 구현예 9의 방법을 포함하고, 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함한다.

[0159] 구현예 11은 구현예 9의 방법을 포함하고, 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.

[0160] 구현예 12는 구현예 1 내지 11의 방법을 포함하고, 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함한다.

[0161] 구현예 13은 구현예 12의 방법을 포함하고, 항체는 표면에 고정된다.

[0162] 구현예 14는 구현예 13의 방법을 포함하고, 표면은 비드의 표면이다.

[0163] 구현예 15는 구현예 12의 방법을 포함하고, 항체는 가용성 항체이다.

[0164] 구현예 16은 구현예 12 내지 15의 방법을 포함하고, 항체는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함한다.

[0165] 구현예 17은 구현예 1 내지 16의 방법을 포함하고, 형질도입은 바이러스 감염, 전기 천공, 막 파괴 또는 이들의 조합을 포함한다.

- [0166] 구현예 18은 구현예 1 내지 17의 방법을 포함하고, 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스이다.
- [0167] 구현예 19는 구현예 1 내지 18의 방법을 포함하고, 형질도입은 세포 배양 배지에 벡터를 혼합하고 배지 내 벡터를 활성화된 면역 세포 배양물에 균일하게 전달하는 단계를 포함한다.
- [0168] 구현예 20은 구현예 1 내지 19의 방법을 포함하고, 확장은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척 및 모니터링 중 적어도 하나 이상을 포함한다.
- [0169] 구현예 21은 구현예 2 내지 20의 방법을 포함하고, 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 면역 세포 배양물을 위해 최적화된다.
- [0170] 구현예 22는 구현예 1 내지 21의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 적어도 하나의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시킨다.
- [0171] 구현예 23은 구현예 1 내지 22의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 동안 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시킨다.
- [0172] 구현예 24는 구현예 2 내지 23의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소된다.
- [0173] 구현예 25는 구현예 1 내지 24의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별 중 적어도 하나를 여러 번 수행하도록 구성된다.
- [0174] 구현예 26은 구현예 1 내지 25의 방법을 포함하고, 농축 단계는 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함한다.
- [0175] 구현예 27은 구현예 26의 방법을 포함하고, 공정은 원심분리 또는 여과의 파라미터를 조정하는 단계를 더 포함한다.
- [0176] 구현예 28은 구현예 1 내지 27의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 단계 (a) 내지 (e)의 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행된다.
- [0177] 구현예 29는 구현예 1 내지 28의 방법을 포함하고, 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0178] 구현예 30은 구현예 1 내지 29의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터 및 세포 배양 배지를 함유한다.
- [0179] 구현예 31은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 바람직한 표현형을 촉진하는 방법으로서, 이 방법은: 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계로, 활성화 시약 및 활성화 조건은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 표현형을 촉진하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 상기 단계는 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행된다.
- [0180] 구현예 32는 구현예 31의 방법을 포함하고, 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함한다.
- [0181] 구현예 33은 구현예 32의 방법을 포함하고, 항체는 표면에 고정된다.
- [0182] 구현예 34는 구현예 33의 방법을 포함하고, 표면은 비드의 표면이다.
- [0183] 구현예 35는 구현예 32의 방법을 포함하고, 항체는 가용성 항체이다.
- [0184] 구현예 36은 구현예 32 내지 35의 방법을 포함하고, 항체는 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 및 항-CD2 항체 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0185] 구현예 37은 구현예 36의 방법을 포함하고, 가용성 항체는 OKT3이다.
- [0186] 구현예 38은 구현예 31 내지 37의 방법을 포함하고, 활성화 조건은 실질적으로 방해받지 않는 면역 세포 배양물을 제공하여 활성화 시약과 면역 세포 배양물 간의 안정적인 접촉을 가능케 한다.
- [0187] 구현예 39는 구현예 31 내지 38의 방법을 포함하고, 이 방법은 약 1억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된

면역 세포를 제조한다.

- [0188] 구현예 40은 구현예 39의 방법을 포함하고, 이 방법은 약 20억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0189] 구현예 41은 구현예 31 내지 40의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 T 세포 배양물이다.
- [0190] 구현예 42는 구현예 41의 방법을 포함하고, 상기 T 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물이다.
- [0191] 구현예 43은 구현예 42의 방법을 포함하고, 상기 백터는 키메라 항원 수용체를 코딩한다.
- [0192] 구현예 44는 구현예 31 내지 43의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함한다.
- [0193] 구현예 45는 구현예 31 내지 44의 방법을 포함하고, 상기 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함한다.
- [0194] 구현예 46은 구현예 45의 방법을 포함하고, 상기 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함한다.
- [0195] 구현예 47은 구현예 45의 방법을 포함하고, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함하는 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.
- [0196] 구현예 48은 구현예 41 내지 47의 방법을 포함하고, 상기 T 세포 배양물의 표현형은 약 0.1:1 내지 약 10:1의 CD8+ 세포 대 CD4+ 세포의 비를 갖는다.
- [0197] 구현예 49는 구현예 31 내지 48의 방법을 포함하고, 상기 형질도입은 바이러스 감염, 전기 천공, 막 파괴 또는 이들의 조합을 포함한다. 상기 백터는 렌티바이러스 백터 또는 레트로바이러스이다.
- [0198] 구현예 51은 구현예 31 내지 50의 방법을 포함하고, 상기 형질도입은 세포 배양 배지에 백터를 혼합하고 배지 내 백터를 활성화된 면역 세포 배양물에 균일하게 전달하는 단계를 포함한다.
- [0199] 구현예 52는 구현예 31 내지 51의 방법을 포함하고, 상기 확장은 형질도입된 면역 세포 배양물을 공급, 세척 및 모니터링하는 것 중 적어도 하나 이상을 포함한다.
- [0200] 구현예 53은 구현예 31 내지 52의 방법을 포함하고, 상기 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 촉진된 표현형을 위해 최적화된다.
- [0201] 구현예 54는 구현예 31 내지 53의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 적어도 하나의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시킨다.
- [0202] 구현예 55는 구현예 31 내지 54의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 동안 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시킨다.
- [0203] 구현예 56은 구현예 31 내지 55의 방법을 포함하고, 여기서 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소된다.
- [0204] 구현예 57은 구현예 31 내지 56의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별을 여러 번 수행하게 된다.
- [0205] 구현예 58은 구현예 31 내지 57의 방법을 포함하고, 상기 농축 단계는 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함한다.
- [0206] 구현예 59는 구현예 31 내지 58의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 단계 (a) 내지 (e)의 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행된다.
- [0207] 구현예 60은 구현예 31 내지 59의 방법을 포함하고, 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0208] 구현예 61은 구현예 31 내지 60의 방법을 포함하고, (b)에서의 형질도입 후 백터를 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0209] 구현예 62는 구현예 31 내지 61의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 백터 및 세포 배양 배지를 함유한다.

- [0210] 구현예 63은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법으로서, 이 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 이들 단계는 각각 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행되고, 이들 단계는 각각 최적화된 세포 밀도 (세포/mL) 및 최적화된 세포 컨플루언시 (세포/cm²)를 갖는 면역 세포 배양물로 수행된다.
- [0211] 구현예 64는 구현예 63의 방법을 포함하고, 상기 단계 (a)를 위해 최적화된 세포 밀도는 약 0.05 X 10⁶ 세포/mL 내지 약 60 X 10⁶ 세포/mL이다.
- [0212] 구현예 65는 구현예 63 또는 64의 방법을 포함하고, 단계 (a)를 위해 최적화된 세포 컨플루언시는 약 0.1 X 10⁶ 세포/cm² 내지 약 60 X 10⁶ 세포/cm²이다.
- [0213] 구현예 66은 구현예 63 내지 65의 방법을 포함하고, 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함한다.
- [0214] 구현예 67은 구현예 66의 방법을 포함하고, 상기 항체는 표면에 고정된다.
- [0215] 구현예 68은 구현예 67의 방법을 포함하고, 상기 표면은 비드의 표면이다.
- [0216] 구현예 69는 구현예 66의 방법을 포함하고, 상기 항체는 가용성 항체이다.
- [0217] 구현예 70은 구현예 66 내지 69의 방법을 포함하고, 항체는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0218] 구현예 71은 구현예 63 내지 70의 방법을 포함하고, 상기 방법은 약 1억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0219] 구현예 72는 구현예 63 내지 71의 방법을 포함하고, 상기 방법은 약 20억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0220] 구현예 73은 구현예 63 내지 72의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 T 세포 배양물이다.
- [0221] 구현예 74는 구현예 73의 방법을 포함하고, 상기 T 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물이다.
- [0222] 구현예 75는 구현예 74의 방법을 포함하고, 상기 벡터는 키메라 항원 수용체를 코딩한다.
- [0223] 구현예 76은 구현예 64 내지 75의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함한다.
- [0224] 구현예 77은 구현예 64 내지 76의 방법을 포함하고, 상기 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함한다.
- [0225] 구현예 78은 구현예 77의 방법을 포함하고, 상기 보조 세포는 단핵구를 포함한다.
- [0226] 구현예 79는 구현예 77의 방법을 포함하고, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.
- [0227] 구현예 80은 구현예 63 내지 79의 방법을 포함하고, 상기 형질도입은 바이러스 감염, 전기 천공, 막 파괴 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0228] 구현예 81은 구현예 63 내지 80의 방법을 포함하고, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스이다.
- [0229] 구현예 82는 구현예 63 내지 81의 방법을 포함하고, 상기 형질도입은 세포 배양 배지에 벡터를 혼합하고 배지 내 벡터를 활성화된 면역 세포 배양물에 균일하게 전달하는 단계를 포함한다.
- [0230] 구현예 83은 구현예 63 내지 82의 방법을 포함하고, 상기 확장은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별 중 적어도 하나 이상을 포함한다.
- [0231] 구현예 84는 구현예 63 내지 83의 방법을 포함하고, 상기 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 세포 밀도 및 세포 컨플루언시를 위해 최적화된다.

- [0232] 구현예 85는 구현예 63 내지 84의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 적어도 하나의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시킨다.
- [0233] 구현예 86은 구현예 85의 방법을 포함하고, 상기 산소 재순환은 단계 (a) 내지 (c) 동안 실리콘 튜브에 의해 제공된다.
- [0234] 구현예 87은 구현예 63 내지 86의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 동안 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시킨다.
- [0235] 구현예 88은 구현예 63 내지 87의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소된다.
- [0236] 구현예 89는 구현예 63 내지 88의 방법을 포함하고, 상기 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스의 재순환은 약 0.05×10^6 세포/mL 내지 약 60×10^6 세포/mL의 밀도 및 약 0.1×10^6 세포/cm² 내지 약 60×10^6 세포/cm²의 컨플루언시를 갖는 세포와 함께 균질하게 제공된다
- [0237] 구현예 90은 구현예 63 내지 89의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별을 여러 번 수행하도록 구성된다.
- [0238] 구현예 91은 구현예 63 내지 90의 방법을 포함하고, 상기 농축 단계는 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함한다.
- [0239] 구현예 92는 구현예 63 내지 91의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 단계 (a) 내지 (e)의 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행된다.
- [0240] 구현예 93은 구현예 63 내지 92의 방법을 포함하고, 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0241] 구현예 94는 구현예 63 내지 93의 방법을 포함하고, 단계 (b)에서의 형질도입 후에 백터를 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0242] 구현예 95는 구현예 63 내지 94의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 백터 및 세포 배양 배지를 함유한다.
- [0243] 구현예 96은 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법으로서, 이 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계, 활성화된 면역 세포 배양물을 백터로 형질도입하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계, 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계로, 확장 동안 형질도입된 세포 배양물을 흔들지 않는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함하고, 이 단계들은 완전 밀폐식 자동화된 세포 공학 시스템에 의해 수행된다.
- [0244] 구현예 97은 구현예 96의 방법을 포함하고, 상기 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함한다.
- [0245] 구현예 98은 구현예 97의 방법을 포함하고, 상기 항체는 표면에 고정된다.
- [0246] 구현예 99는 구현예 98의 방법을 포함하고, 상기 표면은 비드의 표면이다.
- [0247] 구현예 100은 구현예 97의 방법을 포함하고, 상기 항체는 가용성 항체이다.
- [0248] 구현예 101은 구현예 96 내지 100의 방법을 포함하고, 상기 항체는 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 및 항-CD2 항체 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0249] 구현예 102는 구현예 96 내지 101의 방법을 포함하고, 상기 방법은 약 1억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0250] 구현예 103은 구현예 102의 방법을 포함하고, 상기 방법은 약 20억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0251] 구현예 104는 구현예 96 내지 103의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 T 세포 배양물이다.
- [0252] 구현예 105는 구현예 104의 방법을 포함하고, 상기 T 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물

이다.

- [0253] 구현예 106은 구현예 105의 방법을 포함하고, 상기 벡터는 키메라 항원 수용체를 코딩한다.
- [0254] 구현예 107은 구현예 96 내지 106의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함한다.
- [0255] 구현예 108은 구현예 96 내지 107의 방법을 포함하고, 상기 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함한다.
- [0256] 구현예 109는 구현예 108의 방법에 있어서, 상기 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함한다.
- [0257] 구현예 110은 구현예 109의 방법을 포함하고, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.
- [0258] 구현예 111은 구현예 96 내지 110의 방법을 포함하고, 상기 형질도입은 바이러스 감염, 전기 천공, 막 파괴 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0259] 구현예 112는 구현예 96 내지 111의 방법을 포함하고, 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스이다.
- [0260] 구현예 113은 구현예 96 내지 112의 방법을 포함하고, 상기 형질도입은 세포 배양 배지에 벡터를 혼합하고 배지 내 벡터를 활성화된 면역 세포 배양물에 균일하게 전달하는 단계를 포함한다.
- [0261] 구현예 114는 구현예 96 내지 113의 방법을 포함하고, 상기 확장은 면역 세포 배양물을 흔들지 않고 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별 중 적어도 하나 이상을 포함한다.
- [0262] 구현예 115는 구현예 96 내지 114의 방법을 포함하고, 상기 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 면역 세포 배양물을 위해 최적화된다.
- [0263] 구현예 116은 구현예 96 내지 115의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 적어도 하나의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시킨다.
- [0264] 구현예 117은 구현예 96 내지 116의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시킨다.
- [0265] 구현예 118은 구현예 96 내지 117의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소된다.
- [0266] 구현예 119는 구현예 96 내지 118의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별을 여러 번 수행하도록 구성된다.
- [0267] 구현예 120은 구현예 96 내지 119의 방법을 포함하고, 농축 단계는 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함한다.
- [0268] 구현예 121은 구현예 96 내지 120의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 단계 (a) 내지 (e)의 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행된다.
- [0269] 구현예 122는 구현예 96 내지 121의 방법을 포함하고, 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0270] 구현예 123은 구현예 96 내지 122의 방법을 포함하고, 단계 (b)에서의 형질도입 후에 벡터를 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0271] 구현예 124는 구현예 96 내지 123의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 벡터 및 세포 배양 배지를 함유한다.
- [0272] 구현예 125는 유전적으로 변형된 면역 세포 배양물의 자동화된 제조방법이며, 세포 공학 시스템에 의해 수행되는 이 방법은 활성화 시약으로 면역 세포 배양물을 활성화하여 세포 공학 시스템의 제 1 챔버에서 활성화된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 형질도입하는 단계로, 형질도입은 활성화된 면역 세포 배양물을 제 1 챔버로부터 전기 천공부로 옮기는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 전기 천공하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 세포 공학 시스템의 제 2 챔버로 옮기는 단계; 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 면역 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 농축된 면역 세포 배양물을 수확하여 유전적으로 변형된 세포 배양물을 제조하는 단계를 포함한다.

- [0273] 구현예 126은 구현예 125의 방법을 포함하고, 상기 형질도입 단계는 활성화된 면역 세포 배양물을 제 1 멸균 폐쇄 연결을 통해 제 1 챔버로부터 전기 천공부로 옮기는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터로 전기 천공하여 형질도입된 면역 세포 배양물을 생성하는 단계; 및 형질도입된 면역 세포 배양물을 제 2 멸균 폐쇄 연결을 통해 세포 공학 시스템의 제 2 챔버로 옮기는 단계를 포함한다.
- [0274] 구현예 127은 구현예 126의 방법을 포함하고, 상기 전기 천공부는 세포 공학 시스템의 외부에 위치된다.
- [0275] 구현예 128은 구현예 125 내지 127의 방법을 포함하고, 상기 방법은 약 1억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0276] 구현예 129는 구현예 128의 방법을 포함하고, 상기 방법은 약 20억개 이상의 생존 가능한 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0277] 구현예 130은 구현예 125 내지 129의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 T 세포 배양물이다.
- [0278] 구현예 131은 구현예 130의 방법을 포함하고, T 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T (CAR T) 세포 배양물이다.
- [0279] 구현예 132는 구현예 131의 방법을 포함하고, 상기 벡터는 키메라 항원 수용체를 코딩한다.
- [0280] 구현예 133은 구현예 125 내지 132의 방법을 포함하고, 상기 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함한다.
- [0281] 구현예 134는 구현예 125 내지 132의 방법을 포함하고, 상기 세포 배양물은 하나 이상의 보조 세포를 포함한다.
- [0282] 구현예 135는 구현예 134의 방법을 포함하고, 상기 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함한다.
- [0283] 구현예 136은 구현예 134의 방법을 포함하고, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한 T 세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.
- [0284] 구현예 137은 구현예 125 내지 136의 방법을 포함하고, 상기 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함한다.
- [0285] 구현예 138은 구현예 137의 방법을 포함하고, 상기 항체는 표면에 고정된다.
- [0286] 구현예 139는 구현예 138의 방법을 포함하고, 상기 표면은 비드의 표면이다.
- [0287] 구현예 140은 구현예 137의 방법을 포함하고, 상기 항체는 가용성 항체이다.
- [0288] 구현예 141은 구현예 138 내지 140의 방법을 포함하고, 상기 항체는 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 및 항-CD2 항체 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0289] 구현예 142는 구현예 125 내지 141의 방법을 포함하고, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스이다.
- [0290] 구현예 143은 구현예 125 내지 142의 방법을 포함하고, 상기 확장은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별 중 적어도 하나 이상을 포함한다.
- [0291] 구현예 144는 구현예 125 내지 143의 방법을 포함하고, 상기 형질도입된 면역 세포 배양물의 산소 수준은 면역 세포 배양물을 위해 최적화된다.
- [0292] 구현예 145는 구현예 125 내지 144의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 중 적어도 하나의 단계 동안 산소화 성분을 통해 세포 배양 배지를 재순환시킨다.
- [0293] 구현예 146은 구현예 125 내지 145의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 단계 (a) 내지 (e) 동안 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및/또는 용해된 가스를 재순환시킨다.
- [0294] 구현예 147은 구현예 125 내지 146의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템에 의해 제공되는 이산화탄소 수준은 단계 (c) 동안 감소된다.
- [0295] 구현예 148은 구현예 125 내지 147의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 형질도입된 면역 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선별을 여러 번 수행하도록 구성된다.
- [0296] 구현예 149는 구현예 125 내지 148의 방법을 포함하고, 상기 농축 단계는 원심분리, 침강 후 상등액 제거, 또는 여과를 포함한다.
- [0297] 구현예 150은 구현예 125 내지 149의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하고, 단계

(a) 내지 (e)의 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행된다.

- [0298] 구현예 151은 구현예 125 내지 150의 방법을 포함하고, 단계 (a) 후에 활성화된 면역 세포 배양물에서 활성화 시약을 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0299] 구현예 152는 구현예 125 내지 151의 방법을 포함하고, 단계 (b)에서의 형질도입 후 백터를 제거하는 단계를 더 포함한다.
- [0300] 구현예 153은 구현예 125 내지 152의 방법을 포함하고, 상기 세포 공학 시스템은 상기 방법을 시작하기 전에 단계 (a)의 세포 배양물, 활성화 시약, 백터 및 세포 배양 배지를 함유한다.
- [0301] 구현예 154는 구현예 1 내지 153의 방법을 포함하고, 방법의 단계 (c)에서의 형질도입 효율은 세포 배양을 위해 가요성 가스 투과성 백을 이용하는 방법의 형질도입 효율보다 20% 이상 더 높다.
- [0302] 구현예 155는 구현예 1 내지 154의 방법을 포함하고, 이 방법은 가요성 가스 투과성 백에 의한 수동 세포 배양을 이용하는 방법보다 20% 이상 더 많이 유전적으로 변형된 면역 세포를 제조한다.
- [0303] 구현예 156은 구현예 1 내지 155의 방법을 포함하고, 세포 공학 시스템은 다수의 챔버를 포함하며, 단계 (a) 내지 (e)의 각각은 세포 공학 시스템의 다수의 챔버 중 상이한 챔버에서 수행되며, 단계 (a)의 활성화 시약, 백터 및 세포 배양 배지는 각각, 상기 방법을 시작하기 전에 다수의 챔버 중 상이한 챔버에 함유되고, 다수의 챔버 중 적어도 하나는 세포를 성장시키기 위한 온도로 유지되며, 다수의 챔버 중 적어도 하나는 냉장 온도로 유지된다.
- [0304] 구현예 157은 자동화된 세포 공학 시스템에서 사용하는 카세트이며, 이 카세트는 세포 배양 배지를 저장하기 위한 저온 챔버; 면역 세포 배양물의 활성화, 형질도입 및 확장을 수행하기 위한 고온 챔버로서, 고온 챔버는 열 장벽에 의해 저온 챔버와 분리되고, 세포 배양 챔버를 포함하는 고온 챔버; 및 세포 배양 챔버에 연결된 하나 이상의 유체 경로를 포함하고, 유체 경로는 세포 배양 챔버 내에서 세포를 방해하지 않고 세포 배양 챔버에 대한 폐기물의 재순환 및 제거와, 균질한 가스 교환 및 영양소 분배를 제공한다.
- [0305] 구현예 158은 구현예 157의 카세트를 포함하고, 상기 세포 배양 챔버는 평평하고 비-가요성 챔버이며, 낮은 챔버 높이를 갖는다.
- [0306] 구현예 159는 구현예 157 또는 158의 카세트를 포함하고, 상기 세포 배양 챔버는 면역 세포 배양물이 세포 배양 챔버의 바닥을 가로질러 분산될 수 있도록 배향된다.
- [0307] 구현예 160은 구현예 157 내지 159의 카세트를 포함하고, 상기 카세트는 세포 배양물, 배양 배지, 활성화 시약 및 백터로 미리 채워져 있다.
- [0308] 구현예 161은 구현예 157 내지 160의 카세트를 포함하고, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서 및/또는 광학 밀도 센서 중 적어도 하나를 더 포함한다.
- [0309] 구현예 162는 구현예 157 내지 161의 카세트를 포함하고, 하나 이상의 샘플링 포트 및/또는 주입 포트를 더 포함한다.
- [0310] 구현예 163은 구현예 157 내지 162의 카세트를 포함하고, 세포 배양 챔버는 세포 배양 챔버로부터 기포를 제거할 수 있고/있거나 재순환 포트로서 구성되는 원위 포트; 재순환 투입 포트로서 기능하게 되는 중간 포트; 및 세포 제거를 위한 배출 포트로서 기능하게 되는 근위 포트 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0311] 구현예 164는 구현예 157 내지 163의 카세트를 포함하고, 카트리지를 외부 장치에 연결하기 위한 접근 포트를 더 포함한다.
- [0312] 구현예 165는 구현예 164의 카세트를 포함하고, 상기 외부 장치는 전기 천공부 또는 추가의 배지 공급원을 포함한다.
- [0313] 구현예 166은 자동화된 세포 공학 시스템에서 사용하는 카세트이며, 이 카세트는 면역 세포 배양물의 활성화, 형질도입 및/또는 확장을 수행하고, 면역 세포 배양물을 수용하도록 구성되는 챔버 부피를 갖는 세포 배양 챔버; 면역 세포 배양물을 수용하지 않으며, 배지 및 다른 작동 유체에 대한 추가 부피를 제공함으로써 챔버의 작업 부피를 증가시키는 위성 부피를 포함하고, 상기 위성 부피는 하나 이상의 유체 경로를 통해 세포 배양 챔버에 유체 연결되어, 면역 세포 배양물을 방해하지 않고 배지가 배양 챔버와 교환된다.

- [0314] 구현예 167은 구현예 166의 카세트를 포함하고, 위성 부피는 백(bag)이다.
- [0315] 구현예 168은 구현예 166의 카세트를 포함하고, 상기 위성 부피는 비수확 챔버(non-yielding chamber)이다.
- [0316] 구현예 169는 구현예 166 내지 168의 카세트를 포함하고, 상기 위성 부피는 추가로, 면역 세포 배양물에서 세포의 손실 없이 배지 제거가 가능하도록 구성된다.
- [0317] 구현예 170은 구현예 166 내지 169의 카세트를 포함하고, 직교류 리저버를 더 포함한다.
- [0318] 구현예 171은 구현예 166 내지 170의 카세트를 포함하고, 상기 세포 배양 챔버는 약 0.50 ml 내지 약 300 ml의 부피를 갖는다.
- [0319] 구현예 172는 구현예 171의 카세트를 포함하고, 상기 세포 배양 챔버는 약 50 ml 내지 약 200 ml의 부피를 갖는다.
- [0320] 구현예 173은 구현예 172의 카세트를 포함하고, 상기 세포 배양 챔버는 약 180 ml의 부피를 갖는다.
- [0321] 구현예 174는 구현예 166 내지 173의 카세트를 포함하고, 상기 위성 부피는 약 0.50 ml 내지 약 300 ml이다.
- [0322] 구현예 175는 구현예 174의 카세트를 포함하고, 상기 위성 부피는 약 150 ml 내지 약 200 ml이다.
- [0323] 구현예 176은 구현예 166 내지 175의 카세트를 포함하고, 상기 직교류 리저버는 약 0.50 ml 내지 약 300 ml의 부피를 갖는다.
- [0324] 구현예 177은 구현예 176의 카세트를 포함하고, 상기 직교류 리저버는 약 100 ml 내지 약 150 ml의 부피를 갖는다.
- [0325] 구현예 178은 구현예 166 내지 177의 카세트를 포함하고, 상기 작업 부피는 약 180 mL 내지 약 1L이다.
- [0326] 구현예 179는 구현예 178의 카세트를 포함하고, 상기 작업 부피는 약 180 mL 내지 약 460 mL이다.
- [0327] 구현예 180은 구현예 157 내지 179의 카세트를 포함하고, 상기 유체 경로 중 하나 이상은 실리콘계 튜브 구성요소를 포함하여, 튜브 구성요소를 통한 산소화가 가능하다.
- [0328] 실시예
- [0329] 실시예 1 - COCOON 시스템을 이용한 CAR T 세포의 자동화 제조
- [0330] 이 실시예에서, GFP 및 HER-2 렌티바이러스를 사용하고 다음의 공정 파라미터를 이용하여 T 세포를 형질도입했다: 6천만개의 말초 혈액 단핵세포 (PBMC)의 접종 시작, 및 CD3/CD28 활성화 후, IL-2 및 IL-7을 배양 확장용 T-세포 성장 배지에 보충했다. 일회용(disposable) 카세트의 단일 용도 센서를 사용하여 온도, pH 및 광학 밀도(optical density, OD)를 실시간으로 모니터링했다. 유체 채널을 통해 연결된 다중 카세트 챔버는 공정 구성요소의 자동 공급 및 추가를 가능케 했다. 일부 챔버는 배지 및 시약 저장을 위해 4°C의 온도로 제어하는 한편, 다른 챔버는 세포를 가운, 혼합, 세척 및 농축하기 위한 요소를 포함하여, 완전 밀폐식 공정을 가능케 했다. 세포 계수 및 생존을 평가를 위해 공정 중 샘플을 채취했다. 수확 공정의 마지막에, CD4, CD8, NGFR, IFN- γ , TNF- α 등의 패널을 사용하여 FACS 분석을 수행했다. 이 실시예에서 사용한 COCOON 시스템의 개요가 도 6에 도시되어 있다. 도 6a는 외부 사용자 제어 디스플레이와 함께, 폐쇄된 구성의 COCOON 시스템을 나타내며, 이는 파라미터를 조정하거나 세포 배양물을 모니터링하는데 사용할 수 있다. 멸균한 단일 용도 세포 배양 "카세트"를 COCOON에 로딩할 수 있다(도 6c). 카세트의 상세도에 도시한 바와 같이(도 6b), 각 카세트는 세포 성장을 위해 37°C로 유지되는 상부 챔버, 및 배지, 바이러스 벡터 및 그 밖의 온도-민감성 시약을 저장하기 위해 4°C로 유지되는 하부 챔버를 포함한다. 카세트는 유체가 내부 유체 경로를 통해 교환될 수 있고, 또한 카세트로 또는 카세트로부터 펌핑될 수 있도록 구성된다. 카세트에 설치된 센서는, 가령 세포 배양물의 pH 및 광학 밀도를 모니터링할 수 있다.
- [0331] 결과는 도 7-10에 도시되어 있다. 도 7a, 7b 및 7c는 각각 대조군으로서 G-REX (WilsonWolf) 세포 배양 플랫폼을 사용하는 세포의 수동 조작 및 확장과 비교하여, 자동화 COCOON 시스템을 사용한 GFP 형질도입에 대한 평균 수확량, 평균 수확 생존율 및 평균 형질도입 효율을 나타낸다. G-REX 플랫폼은 가스 투과성 바닥을 가지며, G-REX를 사용하는 경우, 배지 교환은 전형적으로 4 내지 5일마다 사용자가 수행한다.
- [0332] 도 8a 및 8b는 각각 HER-2 CAR-T 형질도입에 대한 생존 가능한 세포와 생존율 및 형질도입 효율을 나타낸다. 10 일째 배양에서, HER-2 CAR-T 세포는 COCOON 시스템에서 97%의 생존율 및 65% (n=4)의 형질도입으로 약 22억개

에 도달했다.

[0333] 또한, 자동화 COCOON 시스템의 성능은 대조군으로서 PERMALIFE 세포 배양 백 (Origen)을 사용한 세포의 수동 조작 및 성장과 비교했다. PERMALIFE 백은 불활성 불소화 에틸렌 프로필렌(fluorinated ethylene propylene, FEP)으로 제조된 밀봉 및 가스 투과성 세포 배양 백으로, 사용자에게 의한 세포 공급 및 수확을 용이하게 하는 밸브를 갖고 있다. 도 9a는 CD3+ 세포의 백분율로 평가한 바와 같이, PERMALIFE 백과 비교하여 COCOON 시스템을 사용한 상대적인 T 세포의 순도 수준을 나타낸다. 도 9b는 PERMALIFE 백 대조군과 비교하여 COCOON 시스템에서 배양된 CD8+ 세포의 백분율이 더 높은 것을 나타낸다. 도 9c 및 9d는 각각 형질감염된 세포가 TNF- α 및 INF- γ 를 생성하는 것을 나타낸다.

[0334] 도 10a 및 10b는 각각 COCOON 시스템 및 PERMALIFE 백에서 배양된 CAR T 세포에 의한 표적 종양 세포의 효과적이고 특이적인 사멸을 나타낸다.

[0335] 결론적으로, 완전 밀폐식 세포 공학 시스템인 COCOON 시스템은 노동 집약적인 CAR T 공정을 완전 자동화 및 고도로 제어된 시스템으로 전환함으로써, 확장성, 높은 수율, 제조 비용 절감을 가능케 하고, 더 우수한 공정 제어를 얻어 고품질의 CAR-T 세포를 제조하는 실행가능한 해결책이다.

[0336] 실시예 2-COCOON 시스템에서 활성화 방법 비교

[0337] 이 실시예는 COCOON 자동화 제조 시스템 및 PERMALIFE 백에서 CAR T 세포의 임상 규모 제조에 있어서 상이한 활성화 방법을 이용하여 세포 배양 성능을 비교한다.

[0338] 자기 항-CD3/항-CD28 DYNABEAD 액티베이터(activator) 비드를 사용하여 T 세포를 활성화할 수 있다. 이들 비드는 2개의 필요한 자극 신호를 제공하여 효과적인 T 세포 활성화를 지원한다. 나이브 T 세포를 활성화하는 또 다른 방법은 가용성 항-CD3 항체(OKT3)를 이용할 수 있다. OKT3은 원래 면역 억제제로 사용하는 단일클론 IgG2a 항체이다. 보조 세포에 의해 공동 자극 신호를 제공할 수 있다. 말초 혈액 단핵세포 (PBMC)의 혼합 개체군으로부터 T 세포 배양을 개시하면, OKT3의 사용시 필요한 보조 세포를 제공하여 T 세포 활성화를 지원할 수 있다.

[0339] OKT3과 DYNABEADS는 서로 다른 활성화 메커니즘을 사용하므로, 한가지 방법의 선택은 최종 제품의 특성; 구체적으로, T 세포 서브세트, CD4+ 헬퍼 T 세포 및 CD8+ 세포독성 T 세포의 비에 영향을 줄 수 있다. 세포독성 CD8 T 세포는 항 종양 반응에 책임이 있다. CD4 세포는 사이토카인을 생성하여 면역 반응을 조절하는 것을 돕는다. 비록 사멸이 CD8 세포에 비해 지연되지만, CD4 세포는 세포 용해를 지원하는 것도 입증되었다. CD4 세포는 APC에 신호를 보냄으로써, APC를 활성화시키고, 이어서 나이브 CD8 T 세포를 프라이밍한다. CD8 대 CD4 세포의 이상적인 표적 비는 제한된 임상 데이터로 인해 잘 이해되지 않는다. CD8 세포 단독의 전달보다 CD8 및 CD4 세포의 조합이 바람직하다는 것이 연구를 통해 밝혀졌다 (가령, Church 2014; Feldmann 2012; Reusch 2015 참조).

[0340] 시험관내 활성화의 두 가지 방법에는 장단점이 있다. 항체 결합 비드는 일관성을 제공하며, TCR/CD3 복합체의 안정적인 동시 활성화를 비롯해 CD28 공동-자극 경로를 보장한다. 비드 접근법의 주요 단점은, 이 제품과 관련된 높은 비용에 있다. 이식 전에 비드를 배양물에서 효과적으로 제거해야 한다. OKT3은 T 세포 활성화를 위한 저비용 옵션을 제공한다. 가용성 항-CD3 접근법과 관련된 주요 단점은, 보조 세포에 대한 의존성 및 배양 환경에 대한 민감성에 있다. 환자의 샘플은 매우 다양한 보조 세포, 및 이전의 자극 후에 T 세포를 기능적으로 비활성화할 수 있는 음성 상호 작용을 가질 수 있다. 세포의 성장, 표현형 및 기능성에 대한 각 활성화 방법의 영향을 이해하기 위해, DYNABEADS 및 OKT3에 의해 활성화된 T 세포를 임상 규모 자동화 플랫폼에서 배양했다.

[0341] COCOON은 가스와 온도의 환경적인 제어를 제공한다. 이는 37°C 구역을 비롯해 연결된 냉장 구역을 포함한다. COCOON과 카세트 간의 유체 접촉은 없으며, 운영들 간에 필요한 청소가 최소화된다. 집중 당일 모든 시약을 카세트에 넣고 필요할 때까지 COCOON의 냉장 구역에 저장할 수 있다. 세포에 전달하기 전에 유체를 37°C로 가열한다. 렌티바이러스의 안정성으로 인해, 이는 형질도입 당일 해동하여 멸균 커넥터를 통해 카세트에 전달할 수 있다. 가스 교환(산소화 및 CO₂ 완충)은 가스 투과성 튜브를 통한 배양물의 재순환에 의해 달성된다. 내장된 바이오센서는 용존 산소 및 pH에 대한 실시간 데이터를 제공했다. T 세포는 다른 세포 또는 활성화제와 안정적인 접촉을 필요로 하므로, 세포 교환을 위한 배지 교환, 세척 및 재순환은 세포를 방해하지 않고 관류를 통해 수행할 수 있다. 요동(Rocking)을 이용하여 효율적인 수확을 촉진할 수 있다.

[0342] 방법

[0343] **세포 배양.** 말초 혈액 단핵세포 (PBMC) (Lonza)를 DNase (Sigma)로 해동하고 2X10⁶ 세포/mL 미만의 밀도로 37°C에서 밤새 회수되도록 했다. 용액 17 (Chemometec)을 포함하는 혈액 분석 프로토콜과 함께 NUCLEOCOUNTER 200

을 사용하여 세포 계수를 수행했다. 형질도입의 마커로서, 낮은 친화성의 신경 성장 인자 수용체 (nerve growth factor receptor, NGFR)로 코딩된 3 세대 렌티바이러스 벡터를 사용하여 세포를 형질도입했다. 이 렌티바이러스는 McMaster University (캐나다 해밀턴)의 Bramson Lab에서 유래한 프로토콜과 프라이머를 기반으로, Lonza의 cGMP 바이러스 제조 시설 (텍사스 휴스턴)에서 제조되었다. 모든 조건에서는 1의 감염 다중도 (multiplicity of infection, MOI)를 사용했다. HEK293TM 세포를 이용하고 유세포 분석을 이용한 NGFR의 검출에 의해 바이러스 역가를 결정했다. 활성화 배지는 22 IU/mL IL-2 (Cedarlane) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Sigma)이 보충된 X-VIVO 15 (Lonza)로 이루어졌다. 가용성 항-CD3으로 활성화된 조건에서, OKT3 (Biolegend)을 50 ng/mL의 최종 농도로 활성화 배지에 첨가했다. DYNABEADS로 활성화된 조건에서, 1:1의 비드 대 세포의 비로 활성화 배지에 첨가했다. 확장 배지는 29 IU/mL IL-2 (Cedarlane), 수컷 AB 혈장 (Sigma)의 5% 인간 혈청, 1% GLUTAMAX (Thermo Fisher) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Sigma)이 보충된 X-VIVO 15 (Lonza)로 이루어졌다.

[0344] **자동화된 CAR T 세포 제조.** 0일에, 60×10^6 PBMC를 카세트의 투입 백에 넣었다. 항-CD3/항-CD28 비드를 사용하여 활성화된 조건에서, 60×10^6 항-CD3/항-CD28 DYNABEADS (ThermoFisher)를 1:1의 비드 대 세포의 비로 투입 백에 첨가했다. 투입 백을 카세트에 연결하고 COCOON (Octane Biotech사)으로 가져 왔다. 작업자의 로그인에 이어서, 카세트가 COCOON에 로딩되었다. 1일째에, 바이러스 (Lonza Houston)를 해동한 다음, 1의 MOI로 카세트 접근 포트를 통해 세포 배양 챔버로 옮겼다. 바이러스를 세포로 전달하기 전에, 활성화 배지를 사용하여 배지를 희석시켰다. 활성화 배지를 배양 챔버에서 제거하고 세포를 방해하지 않고 바이러스와 함께 반환했다. 4일째에 확장 배지의 추가로 총 작업 부피가 증가했다. 6일 및 8일째에 확장 배지로 부분 배지 교환을 수행했다. 확장 단계 후, 세포를 제거하기 전에 COCOON의 최종 부피 100 mL 미만으로 감소되었다. 배양 전체에 걸쳐 COCOON에 의해 데이터를 연속으로 수집했다. 여기에는 도어를 열고 닫을 때마다 모든 펌프 및 액추에이터 단계 등을 포함시켰다. 열관련 값, 가스 농도, 유체 pH 및 용존 산소를 포함한 포괄적인 센서 데이터를 수집했다. 작업자는 전화 또는 외부 컴퓨터를 이용하여 배양물의 상태를 원격으로 모니터링할 수 있었다.

[0345] **CAR T 세포의 수동 제조.** PERMALIFE 세포 배양 백에서 COCOON과 동시에 CAR T 세포의 수동 제조를 수행했다. 0일에, 60×10^6 PBMC를 0.27×10^6 세포/mL로 활성화 배지에 접종했다. 이들 배양물은 활성화 및 확장을 위해 자동화된 배양물과 동일한 공여자 세포 및 동일한 배지를 사용했다. PERMALIFE 백 (PL240, Origen)에서 배양을 개시하고, 세포가 확장됨에 따라 6일째에 더 큰 PERMALIFE 백 (PL325, Origen)으로 옮겼다. 부피가 증가함에 따라 8일째에 세포를 PL240 및 PL325 백 내로 확장시켰다. 1일째에, 렌티바이러스를 1의 MOI로 백에 첨가했다. 세포에 COCOON 배양물과 동등한 부피를 공급하되; 그러나 COCOON 조건과 달리, 배지를 폐기물로 보내지 않았다. 사용한 부피는 배양물을 2×10^6 세포/mL 미만으로 유지했다. 10일째에, 배양 부피를 질량으로 얻었고, 계수 및 분석을 위해 백에서 총 세포의 샘플을 제거했다. 기능적 분석에 사용하기 전에 세포를 원심분리하여 잔류물 및 부피를 줄였다.

[0346] **비-형질도입 및 비-활성화 조건.** 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting, FACS) 분석에서 사용한 비-형질도입 및 비-활성화 음성 대조군을 전술한 프로토콜에 따라 소규모로 배양했다. 간단히 말하면, 1×10^5 세포를 5% 인간 AB 혈청 (Sigma) 및 22 ng/mL IL-2 (Cedarlane)가 보충된 X-VIVO 15 (Lonza)와 함께 96 웰 플레이트에 접종했다. 활성화된 비형질도입 대조군은 유사한 프로토콜을 사용하여 설정했다. 세포를 접종한 후, 동일한 부피의 배지를 첨가했다. 50 ng/mL의 최종 농도를 위해, 가용성 항-CD3으로 활성화된 조건에서 100 ng/mL의 OKT3 (Biolegend)을 보충했다. 항-CD3/항-CD28 비드로 활성화된 조건에서 1:1의 비로 DYNABEADS를 첨가했다. 활성화된 배양물을 4일째에 96 웰 플레이트에서 24 웰로 확장하고, 세포의 성장을 기반으로 T25와 T75 플라스크로 옮겨 4일째부터 2일마다 공급했다.

[0347] **유세포 분석.** 표현형 시작 개체군에 대해, 다음의 1차 항체: 퍼시픽 블루 CD3 (클론 UCHT1, BD Biosciences), PE CD14 (클론 61D3, ThermoFisher), APCeFluor780 CD4 (클론 OKT4, ThermoFisher), PerCP-Cy5.5 CD8a (클론 RPA-T8, ThermoFisher), BV605 CD279 (PD-1, 클론 EH12.2H7 BioLegend) 및 LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain (ThermoFisher)으로 세포를 염색했다. HER2 형질도입의 효율을 평가하기 위해, 단핵구 (CD14)에 대한 염색 대신 세포를 상기와 같이 염색하고, 세포를 BV421 CD271 (C40-1457 NGFR, BD Biosciences) 및 LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain (ThermoFisher)으로 염색했다. 다음에, 세포를 고정시키고 세척했다. SA3800 Sony 스펙트럼 분석기에서 조건당 20,000개가 넘는 이벤트를 수집했다. FlowJo 10.4.2를 사용하여 FACS 분석을 수행했다. 비형질도입 및 비활성화 조건을 사용하여 fluorescence minus one (FMO) 대조군과 함께 게이트를 설정했다.

- [0348] **종양 세포주.** 전이성 무색소 흑색종에서 유래된 HER2 음성 종양 세포, LOX-IMVI 세포 (National Cancer Institute)를 전술한 바와 같이 10% FBS (Sigma)로 RPMI (Sigma)에서 확장시켰다. 난소 장액성 낭선암종에서 유래된 HER2 양성 종양 세포, SKOV-3 (ATCC) 세포를 전술한 바와 같이 10% FBS와 함께 McCoy의 5a (변형된) 배지 (ThermoFisher)에서 확장시켰다. 세포를 5 내지 10 분 동안 0.25% 트립신을 사용하여 컨플루언스 전에 계대시켰다. ALAMARBLUE 또는 ICS 분석에 사용하기 전에 낮은 계대수를 동결 보존하고 종양 라인을 2 내지 3회 계대시켰다.
- [0349] **사이토카인 분비 분석.** 전술한 바와 같이 (가령, Atkuri 2005; Avgoustiniatos 2008), 50,000개의 LOX IMVI 또는 SKOV-3 종양 세포를 배양 조건별로 둥근 바닥 96 웰 플레이트에 3회 접종했다. 다음날, T 세포를 37°C에서 4 시간 동안 단백질 운반 억제제 브레펠딘 A (Golgi Plug, BD Biosciences)와 함께 종양 라인의 웰당 8:1로 접종했다. 세포를 4°C에서 밤새 저장했다. 다음에, 세포를 염색 및 분석을 위해 모았다. 전술한 바와 같이, 표면 표현형 CD3, CD4, CD8a, NGFR 및 LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain으로 세포를 염색했다. 세포 내 사이토카인 염색 (intracellular cytokine staining, ICS)은 BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit (554714, BD Biosciences)를 사용한 고정 및 투과 후에 완료되었다. 시험한 활성화된 사이토카인은 APC IFN γ (클론 B27, BD Biosciences) 및 PE TNF α (클론 MAb11, BD Biosciences)를 포함한다. ICS 분석을 위해 Sony SA3800에서 230,000개 이상의 이벤트 (최대 500,000개)를 수집했다. SKOV-3 및 LOX-IMVI 종양 라인에서 사이토카인의 제조 차이는 TNF α 또는 IFN γ 를 분비하는 개체수의 백분율로 보고했다. 비형질도입 및 비활성화 조건을 이용하여 FMO 제어와 함께 게이트를 설정했다.
- [0350] **세포독성 분석.** 전술한 바와 같이 세포독성을 시험했다 (가령, Atkuri 2005; Avgoustiniatos 2008). 부작성 종양 세포주는 96-웰 평탄 바닥 조직 배양 처리 플레이트에서 밤새 2×10^4 세포/웰 (SKOV-3 또는 LOX-IMVI)로 도말했다. COCOON 및 대조군 조건으로부터의 CAR T 세포를 다양한 이펙터 (E) T 세포 대 종양 (T) E:T 비 (0.25:1 내지 8:1)에서 종양 세포의 웰에 첨가하고 37°C에서 밤새 공동 배양했다. 가온된 PBS 또는 RPMI 배지로 웰을 3회 세척하여 임의의 비부작성 세포를 제거했다. ALAMARBLUE 세포 생존능 시약 (Life Technologies)의 10% 용액 100 μ L를 첨가하고, 웰을 37°C에서 3 시간 동안 배양했다. 미토콘드리아 감소시 형광을 발하는 생존 세포의 대사 지표인 ALAMARBLUE를 Tecan Infinite M200 프로 플레이트 리더 (Tecan, Maennendorf, Switzerland) 상에서 형광 (여기 530 nm, 방출 595 nm)으로 측정했다. 미처리 표적 세포와 비교하여 실험 웰에서 형광의 손실로서 종양 세포 생존율을 계산했다. 각 조건을 3회 시험했다.
- [0351] **결과**
- [0352] 자동화 플랫폼인 COCOON을 사용하여 두 가지 다른 활성화 방법을 이용한 CAR T 세포를 임상적 규모로 제조할 수 있는 가능성을 보였다. 플랫폼은 단일 용도 일회용 COCOON 카세트 (도 11a, 11e)와 COCOON 제어 시스템 (도 11b)으로 구성된다. 도 11f는 주사기(1170) 또는 백(1172)이 카세트(602) 샘플링을 위해 어떻게 사용될 수 있는지를 나타낸다. 카세트는 다수의 시약 백으로 설계되어 배양 구역에서 일어나는 세포 처리로 공정에 필요한 모든 시약을 카세트의 냉장 구역에 미리 넣어 저장할 수 있다. 카세트는 세포 활성화, 형질도입, 확장, 실시간 용존 산소 및 pH 모니터링, 세척 및 세포 농도를 포함하여, 폐쇄 시스템으로서 연결된 여러 단위 작업을 지원한다. 카세트의 하부에는 다수의 백이 들어 있어 배양에 필요한 다양한 시약과 폐기물을 보관한다. COCOON은 카세트용 제어 시스템을 제공한다. 여기에는 유체 및 세포 이송 제어를 비롯해, 제어 센서의 요동, 교반 및 원격 모니터링이 포함된다. 액추에이터는 유체 접촉 없이 자동화 밸브의 제어를 가능케 한다. 액추에이터의 상호 작용이 없으면, 밸브는 닫힌 상태로 유지되어 제어되지 않는 유체의 움직임을 방지하면서 카세트를 실내 또는 현미경으로 이동할 수 있다. 필요한 시약을 카세트의 유체 리저버에 넣은 후, 이를 다양한 단위 작업이 일어나는 카세트의 배양 구역에 스냅 고정한다. 멸균 시료 제거 또는 바이러스 주입은 ICU Spiros 커넥터를 사용한다. 샘플 제거 또는 바이러스 추가 전에, 미리 프로그래밍된 프로토콜에 정의된 바와 같이, 특정 시간에 작업자에게 통지된다. 작업자가 들어와서 통지를 승인하면, COCOON이 자동으로 열려 샘플을 제거하거나 바이러스를 추가할 수 있다. 작업자는 도어가 자동으로 닫히고 환경 제어가 재개되기 전에 작업이 완료되었음을 인지한다. 카세트가 COCOON에 로딩되고 (도 11c) 외부 셸이 닫히면 (도 11d), 카세트의 하부는 열 장벽에 의해 상부와 분리된다. 하부는 냉장 온도로 유지되고 상부는 37°C로 유지된다. 닫힌 COCOON은 가스 및 열 제어를 가능케 한다. 세포는 37°C로 유지되는 한편, 시약은 저온 구역에서 유지되어 안정성을 연장시킨다. 불투명 셸은 배지 구성요소의 고장과 관련이 있는 광 유발 독성을 방지한다. 37°C 구역에는 예열 챔버가 위치되어 있어, 배지를 세포로 옮기기 전에 이를 가온한다. 모든 배양 단계는 PBMC 로딩부터 최종 농도 및 세포 수집까지 자동화할 수 있다. 도 11a에 도시한 바와 같이, 카세트는 활성화 후에 바이러스를 로딩하는데 사용할 수 있는 일련의 접근 포트를 갖고 있다. 카세트에는 실시간 용존 산소 및 pH 센서가 통합되어 있어 COCOON 소프트웨어에 피드백을 제공한다.

실시간 데이터 및 히스토리 그래프를 모니터링하여, 이들 인자가 표적 범위 내에서 유지될 수 있게 한다.

- [0353] COCOON 공정 단계의 개요는 도 12a에 도시되어 있다. 가스 투과성 PERMALIFE 백을 병렬 제어 배양 및 CAR T 세포의 확장(가령, Lu 2016)에 사용했다. 도 12b (COCOON) 및 12c (PERMALIFE 백)는 카세트의 상부 챔버에서 배양된 COCOON의 세포와 함께 세포 분포를 두 가지 형식으로 나타낸다. 동일한 부피의 배지가 양 시스템에서 사용되었다. PERMALIFE 세포 배양 백은 통상적으로 수행되는 바와 같이, 총 부피가 증가됨에 따라 면적이 확장되는 유가식(fed batch) 공정을 이용했다. COCOON 카세트는 고정된 영역을 이용하고 초기 유가식 공급 전략을 채용한다. 배양 6일 및 8일째에 부분 배지 교환을 사용했다.
- [0354] 활성화 방법의 영향 및 자동화된 플랫폼의 성능을 평가하기 위해, 생존율, 세포 수, 표현형, 소진, 형질도입 효율, 기능적 세포내 사이토카인 분비 및 세포독성 같은 기준을 사용했다. 결과는 도 16에 요약되어 있고 이를 본원에서 논의한다.
- [0355] 공여자 2로서 달리 나타내지 않는 한, 모든 조건에서 동일한 공여자 세포를 사용했다. 모든 조건에서 60×10^6 PBMC를 접종하고, 동일한 배지 부피 및 조성으로 공급했다. 출발 세포 개체군은 66.6%의 CD3+ T 세포 및 12.0%의 CD14+ 세포를 함유했다. CD3+ 세포 중에서, 71.2%는 CD4+ 세포였고 28.1%는 CD8+ 세포였다. 제 2 공여자를 이용하여 공여자 대 공여자 변동성의 영향을 결정했다. 이러한 PBMC의 제 2 개체군은 원래 75.0%의 CD3+ T 세포 및 4.5%의 CD14+ 세포를 함유했다. CD3+ 세포 중에서, 65.0%는 CD4+ 세포였고 32.9%는 CD8+ 세포였다.
- [0356] OKT3 및 DYNABEADS로 활성화된 COCOON 배양물로부터 10일째 생존 세포 수율은 각각 $2.55 \times 10^9 \pm 0.1 \times 10^9$ 및 $2.15 \times 10^9 \pm 0.1 \times 10^9$ 였다. OKT3 및 DYNABEADS로 활성화된 PERMALIFE 백 배양물로부터의 생존 세포 수율은 각각 $2.08 \times 10^9 \pm 0.1 \times 10^9$ 및 $1.53 \times 10^9 \pm 0.1 \times 10^9$ 였다 (도 13a). 모든 조건에서 생존율은 95%보다 컸다 (도 13a). 개체수 배가 수준 (population doubling level, PDL)은 COCOON (36-43 배(fold))에서 5.2-5.4이고, PERMALIFE 백 (25-35 배)에서 4.7-5.1이었다 (도 13b).
- [0357] 모든 조건에서 CD3을 발현하는 생존 세포의 88% 넘게 높은 수준 순도의 T 세포를 나타냈다. PERMALIFE 백에서 성장한 비드 활성화된 PBMC를 제외하고 10일 동안 생성된 총 생존 T 세포는 20 억개가 넘었다 (도 13c). 활성화 방법에 관계 없이, 총 T 세포 수율은 백과 비교하여 COCOON 조건에서 더 컸다. 10일째 COCOON 카세트 T 세포 수율은 $2.0-2.4 \times 10^9$ 였다. PERMALIFE 백은 $1.5-2.0 \times 10^9$ T 세포를 제조했다 (도 13c). 동일한 공여자 세포를 사용한 경우, CD3+ 세포의 PDL은 DYNABEADS 또는 OKT3을 각각 사용하여 활성화된 COCOON에서 5.7 및 5.9 (51 및 60 배)였다 (도 13d). CD3+ 세포의 PDL은 DYNABEADS 및 OKT3을 각각 사용하여 활성화된 PERMALIFE 백에서 5.2 및 5.6 (38 및 49 배)였다.
- [0358] 헬퍼 또는 세포독성 T 세포를 각각 나타내는 CD4 및 CD8 당단백질을 발현하는 CD3+ T 세포의 백분율이 도 13e에 도시되어 있다. T 세포 서브개체군과 관련된 가장 중요한 결과는 DYNABEAD 활성화 세포와 비교하여 OKT3으로 활성화된 조건에서 CD8 세포의 증가된 수에 있었다. OKT3 활성화는 83-86%의 CD8+ 세포 및 6-11%의 CD4+ 세포를 생성하는 반면, DYNABEAD 활성화 조건은 48-56%의 CD8+ 세포 및 41-48%의 CD4+ 세포의 서브개체군을 생성했다. 동일한 공여자를 갖는 모든 배양물에서, 소진 관련 마커인 PD-1은 10% 미만이었으며, 이는 낮은 세포 소진 수준을 나타낸다 (도 13f). DYNABEADS로 COCOON에서 배양한 경우, 제 2 공여자는 세포의 21%에서 PD-1을 발현했다. 도 13g 및 13h는 OKT3 활성화 조건과 비교하여 DYNABEAD 활성화 조건에서 CD8+ 세포의 상당한 차이를 강조하는 대표적인 윤곽 플롯을 나타낸다.
- [0359] COCOON에서 62-78%의 CD3+ 세포 및 NGFR을 발현하는 PERMALIFE 백에서 42-60%의 CD3+ 세포로 T 세포 HER2 특이성에 대한 대응 표면 마커 CD271 (NGFR)의 발현에 의해 높은 형질도입 효율이 결정되었다 (도 14a). 백 배양물과 비교하여 COCOON에서의 형질도입 효율이 더 컸다. 높은 형질도입 및 확장으로, 생존 CAR T 세포의 총 수는 COCOON에서 $1.26-1.66 \times 10^9$ 범위 및 PERMALIFE 백에서 $0.62-1.20 \times 10^9$ 범위였다 (도 14b). CD4 및 CD8 서브개체군에서 CAR T 세포의 백분율 및 총 수는 각각 도 14c 및 14d에 도시되어 있다. 형질도입된 CD4 세포의 백분율은 COCOON에서 75.4-80.9%의 CD4 세포 및 64-73.2%의 CD8 세포가 NGFR을 발현하여, CD8 세포보다 컸다. PERMALIFE 백에서, CD4 세포의 54.7-79.9% 및 CD8 세포의 36.1-58.9%가 NGFR을 발현했다. CD8 세포의 확장이 CD4 세포보다 상당히 더 크기 때문에, CD8+ 형질도입된 세포의 총 수는 DYNABEAD-활성된 백 배양물을 제외한 모든 조건에서 CD4+ 형질도입된 세포보다 상당히 더 컸다 (도 14d). COCOON에서는, $0.25-0.64 \times 10^9$ 형질도입된 CD4 세포 및 $0.66-1.43 \times 10^9$ 형질도입된 CD8 세포가 있었다. PERMALIFE 백 조건에서는, $0.09-0.41 \times 10^9$ 형질도입된 CD4 세포

및 $0.25-1.06 \times 10^9$ 형질도입된 CD8 세포가 있었다. COCOON 조건 및 PERMALIFE 백 조건에서 형질도입 효율의 대표적인 등고선 선도가 각각 도 14e 및 14f에 도시되어 있다.

[0360] 세포 내 사이토카인 분비 분석 및 ALAMARBLUE 사멸 분석 (Nociari 1998 참조)을 이용하여 세포의 기능성 시험을 수행했다 (도 15). 모든 경우에, 세포는 유형 1 T 헬퍼 CD4+ 세포 및 세포독성 CD8+ 세포의 특징인 TNF α 및 IFN γ (도 15a 및 15b)의 제조를 보였다 (가령, Romagnani 1991 참조). 더 높은 비의 CD4+ 세포는 TNF α 를 분비했다. TNF α 분비 세포의 생성은 동일한 공여자 세포에 대한 백 배양물과 비교하여 COCOON 조건에서 더 컸다. DYNABEAD 활성화 조건에서 OKT3 활성화 조건보다 높은 비의 TNF α 및 IFN γ 분비 형질도입 세포를 생성했다. ALAMARBLUE 사멸 분석에서는 CAR T 세포에 의한 난소 암종 세포주 SKOV-3 HER2 + 종양 세포의 효과적인 사멸을 보였다 (도 15c 및 15d). 사멸 효과의 경향은 PERMALIFE 및 COCOON 발생 세포 모두로부터 강한 반응으로 이펙터 T 세포의 연속 희석을 따랐다. HER2-종양 세포, LOX IMVI 역시 T 세포에 노출되어 HER2 특이성을 보였다. CAR T 세포에 대응하여 HER2 음성 배양에서는 사멸 경향이 확인되지 않았다.

[0361] 논의

[0362] **활성화 방법.** CAR T 세포 제조의 평가에는 가용성 항-CD3 (OKT3) 및 비드 결합 항-CD3/항-CD28 DYNABEADS를 사용하는 활성화가 포함되었다. OKT3으로 활성화된 배양물은 DYNABEAD 활성화된 배양물보다 19-36%의 향상된 성장을 보였다 (도 13a). 또한, 활성화 방법은 최종 표현형에서 상당한 차이를 만들었다 (도 13e). DYNABEAD 활성화 조건에서 84.5%의 CD3+ 및 CD8+ 세포를 가진 OKT3 활성화 조건과 비교하여 평균 52.7%의 CD3+ 및 CD8+ 세포를 가졌다. 이는 OKT3으로 활성화된 경우, 9.8:1과 비교하여 DYNABEAD 활성화 조건에 대해 대략 1.2:1의 CD8+ 대 CD4+ 비를 나타낸다. 세포가 백에서 또는 COCOON 조건에서 배양되는지에 관계 없이 증가된 수의 CD8+ 세포가 발견되었다.

[0363] OKT3 활성화에 의한 향상된 수율은 예상치 못한 결과였다. DYNABEADS는 CD28 공동 자극 수용체뿐만 아니라, TCR/CD3 복합체에 결합함으로써, T 세포를 활성화시킨다. 공동 자극에 대한 항-CD28 항체를 갖는 DYNABEADS와는 달리, 가용성 항-CD3에 의한 활성화는 단핵구에 의존하여 CD28에 대한 리간드인 B7 수용체, CD80 및 CD86을 제시한다 (가령, Fleischer 1996 참조). 그러나, B7 수용체 역시 CTLA-4에 결합되고, 이 억제 경로를 자극함으로써, T 세포 성장을 억제할 수 있다. 세포가 백에서 또는 COCOON 조건에서 배양되는지에 관계 없이 활성화 방법에 기반하여 향상된 총 세포 수율이 발견되었다. 비드 결합 항-CD3/항-CD28 항체는 헬퍼 T 세포 (CD4+ 세포)의 확장을 촉진할 수 있는 한편, OKT3은 세포독성 T 세포 (CD8+ 세포)의 확장을 촉진할 수 있다 (가령, Fleischer 1996; Laux 2000; Li 2010; Zhu 2007 참조).

[0364] 더 높은 세포 수율, 및 구체적으로, CD8+ 세포의 우세는 OKT3 및 단핵구를 사용하여 활성화된 경우, 추가 수용체의 자극에 기인할 수 있다. CD4+ T 세포의 95%가 CD28을 발현하는 한편, CD8 세포의 50%만이 CD28을 발현하는 것으로 보고되었다 (Ledbetter 1990 참조). 결과적으로, DYNABEADS는 CD8+ 세포의 최대 50% 만 활성화시킬 수 있다. OKT3으로 활성화된 배양물은 비드가 아닌 단핵구 상에 존재하는 다른 공동 자극 리간드로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0365] 예를 들어, 단핵구는 CD2 및 CD40L에 대한 리간드인 CD58 (LFA-3) 및 CD40 수용체를 발현한다. 이들 수용체의 자극은 T 세포 성장을 촉진하는 것으로 공지되어 있다. 또한, 이들 보조 세포는 CD137L을 발현할 수 있으며, 이는 CD137과 상호 작용하여 CD8+ 세포 확장을 자극할 수 있다. 이들 다른 수용체와의 상호 작용은 DYNABEAD 활성화와 비교하여 보다 생리학적인 항원 제시를 나타낼 수 있다.

[0366] OKT3 활성화는 다른 세포에 의존하므로, 공여자 변동성의 영향은 DYNABEADS로의 활성화보다 중요할 수 있다. 이 연구에서 출발 세포 개체군은 0일에 12.0%의 CD14+ 세포 및 66.6%의 CD3+ 세포로 이루어졌다. 용량 연구를 수행하여 최종 수율 및 표현형에 대한 단핵구 민감도의 영향을 결정할 수 있었다.

[0367] **자동화.** COCOON은 OKT3 또는 DYNABEADS로 활성화된 경우, 수동 조건과 비교하여 생존 CAR T 세포의 더 큰 수율을 생성했다. DYNABEADS로 활성화된 경우, COCOON 배양물이 백 배양물보다 40% 더 많은 성장을 가져왔다. OKT3 배양물로, COCOON은 백 배양물보다 23% 더 많은 세포를 생산했다. 또한, COCOON 조건에서 더 큰 형질도입 효율 및 결과적으로 더 큰 CAR T 세포의 총 수율을 보였다 (도 14). DYNABEAD 활성화 조건으로, COCOON에서 총 CAR T 세포의 수율은 백의 수율보다 2배 더 많았다. OKT3 활성화 조건으로, COCOON에서 CAR T 세포의 수율은 백보다 대략 40% 더 많았다.

[0368] PERMALIFE 백보다 향상된 COCOON에서의 수율로 인해 활성화가 증가될 수 있다. 이는 배양 영역에 걸친 분포로 인한 것일 수 있다. COCOON은 단단한 비수확 챔버를 사용하는 반면, 백은 가요성이다. 세포 침강 후, 백의 곡률

은 세포의 불균일한 분포를 야기하는 것이 관찰되었다. 이는 활성화제 및/또는 세포의 불균일한 분포를 초래할 수 있다. 또 다른 가능한 원인은 활성화 위상 동안 교반 양과 관련될 수 있다. 활성화 다음날 세포가 형질도입됨에 따라, 활성화는 여전히 진행 중이거나 활성화제가 세포에 의해 흡수되지 않았을 수 있다. 형질도입 단계 동안, 배양물은 인큐베이터로부터 생물 안전 캐비닛으로 이동되고, 멸균 기술을 이용하여 세포를 전달한다. 배의 이동은 배에서 바이러스의 분포를 촉진하지만; 배를 인큐베이터로 및 그로부터 옮기는 동안 세포는 방해받기도 한다. 안정적인 접촉이 세포 활성화에 중요할 수 있으므로, 이 같은 이동은 세포에 부정적인 영향을 줄 수 있다. COCOON 배양물 내의 세포는 활성화 또는 형질도입 단계 사이에서 방해받지 않는다. COCOON에서, 활성화에 사용한 배지는 형질도입 전에 배양물에서 제거된다. 챔버에는 소량의 배지가 남겨져, 세포는 챔버의 바닥에 남아 있어 부피를 옮기는 동안 방해받지 않을 수 있다. 챔버에서 제거된 배지는 바이러스를 희석 및 혼합하는데 사용된 다음, 세포 개체군으로 다시 옮겨진다. 이 공정 동안, 세포는 방해받지 않고 남아 있다.

[0369] 효율적인 활성화는 보다 효율적인 형질도입과 관련이 있을 수 있다. 즉, 세포가 활성화되고 활발히 분열되면, 렌티바이러스는 보다 효과적으로 통합될 수 있다. 이를 평가하기 위해, 형질도입 전에 샘플을 채취하여 활성화 효율을 결정할 수 있다. 향상된 형질도입 효율 역시 세포에 대한 바이러스의 균질한 분포와 관련이 있을 수 있다. COCOON 배양물에서, 바이러스는 배지와 혼합되어 세포에 균일하게 분포된다. 평평한 비-가오성 용기를 사용하면, 세포 개체군 사이에서 바이러스의 균질한 분포 및 결과적으로 균질한 노출을 향상시키는데 도움을 준다.

[0370] 성능 향상에 대한 또 다른 이유는 가스 교환과 관련이 있을 수 있다. 증가된 산소 수준은 증가된 증식을 지원할 수 있다. 실리콘 가스 교환 라인을 통한 배양 상등액의 재순환을 이용하여, 자동화된 플랫폼에서 높은 산소 수준을 유지했다. 가스 교환은 배의 재질인 플루오르화 에틸렌 프로필렌 (FEP)을 통한 확산에 의해 배 조건에서 달성된다. 실리콘의 투과 계수는 FEP의 투과성보다 상당히 크다 (가령, Avgoustiniatos 2008 참조). COCOON 프로토콜을 만들어 충분한 산소 농도를 보장했다. 이는 배양 기간 전체에 걸쳐서 생성된 바이오센서 데이터에 의해 확인했다.

[0371] 실리콘 튜브를 통한 가스 교환 역시 pH 수준을 지원한다. 즉, 배양 초기에 배지는 CO₂ 농축 환경과의 가스 교환에 의해 표적 pH를 유지한다. 배양물 내의 세포 수가 증가함에 따라, 세포는 젖산과 CO₂를 생성하여 CO₂ 환경에 대한 필요성을 없앤다. COCOON 환경에서 CO₂는 배양 기간 동안 감소하여 pH를 유지하는데 도움을 준다. PERMALIFE 배는 배양 과정 전체에 걸쳐서 5% CO₂ 환경에서 저장되는 기존의 프로토콜을 따랐다.

[0372] 세포를 방해하지 않으면서 연속적으로 재순환시키는 추가의 장점은 양성 및 음성 인자의 보다 균질한 분포에 있다. 이는 영양소, 폐기물, 분비된 사이토카인 및 용해된 가스를 포함한다. 연속적인 재순환은 인자들의 균일한 분포에 의해 국소화 영향을 줄이고 배지 효율성을 향상시키는데 도움을 줄 수 있다.

[0373] **자동화 전환.** 이 실시예에서, 폐쇄 및 자동화된 제조 시스템인 COCOON을 사용하여 비드 결합 항체 또는 가용성 OKT3에 의해 활성화된 CAR T 세포를 제조했다. 결과는 저농도의 바이러스를 사용하여 높은 형질도입 효율로 COCOON에서 임상적으로 관련된 수율이 생성될 수 있음을 보인다. 또한, 세포의 표현형은 활성화 방법에 의해 만들어질 수 있다.

[0374] 결과는 주로 단일 공여자로부터 생성되었고 활성화 방법의 영향을 비교했다. 조건들 간의 변동성은 매우 낮았다. 다른 공여자로 시험을 반복한 경우에, 공여자들 간의 결과는 동일한 활성화 방법을 이용하는 경우와 비슷했다. 이 연구는 임상적으로 관련되고 확장 가능하며 사용하기 쉬운 방법으로 CAR T 세포의 제조를 효과적으로 자동화하는 효율적인 방법임을 입증한다.

[0375] 실시예 3 - 세포 공학 시스템으로 전기 천공을 통한 형질도입

[0376] **배경**

[0377] Octane Cocoon™ 시스템은 세포 요법 제품의 제조를 위한 자동화된 폐쇄형 엔드-투-엔드 생물반응기 시스템이다. Octane의 자동 세포 및 조직 조작 시스템 (Automated Cell & Tissue Engineering System, ACTES)은 3개의 주요 구성요소, 즉: 기본 기구, 소프트웨어 및 맞춤형 일회용 카세트로 구성된다. Cocoon™ 시스템은 상류 및 하류 세포 배양 공정 모두에 대한 자동화된 분리, 확장, 농축 및 완충액 교환이 가능하다.

[0378] 전기 천공부는 전기 천공 및 일차 세포, 줄기 세포, 뉴런, 휴지 또는 비-증식 세포를 포함하여, 다른 비-바이러스적인 방법을 통해 낮은 형질감염 효율을 갖는 것으로 전통적으로 공지된 세포의 형질감염을 가능케 한다. 이 시스템은 전기 천공부, 전기 천공 용액, 전기 천공 카트리지와 최적화된 전기 천공 프로토콜을 포함한다. 전기

천공부는 코어부 및, 상이한 요구를 해결하는 1개 내지 3개의 추가 기능 애드-온부(additional functional add-on unit)로 구성된다. 예를 들어, 전기 천공부를 사용하여 20 μL - 100 μL로 다양한 세포 수 및 1 mL - 20 mL 부피으로 1X10⁷ 내지 1X10⁹ 개를 형질감염시킬 수 있다.

[0379] 본원에서는 전기 천공부 및 Octane CocoonTM 시스템을 사용하는 자동화된 완전 폐쇄형의 강력한 멸균 형질감염 및 세포 확장 절차를 설명한다. 개념 입증 (proof-of-concept, PoC) 평가에서, 각각의 전기 천공 소프트웨어 및 Octane CocoonTM ACTES 소프트웨어는 서로 독립적으로 작동하게 된다. 다른 구현예에서, 소프트웨어는 시스템들 사이에 완전히 통합된다.

[0380] **방법**

[0381] 전기 천공부 및 CocoonTM 시스템을 이용한 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC) 형질감염 및 확장에 대한 평가는 다음의 3 가지 주요 초점 영역으로 나누어 행했다:

[0382] CocoonTM 카세트 내의 세포 농도, Octane CocoonTM과 전기 천공부 간의 세포 이송, CocoonTM과 전기 천공부 간에 이송된 형질감염 세포의 확장 및 CocoonTM 카세트 내의 세포 농도.

[0383] CocoonTM ACTES 카세트는 그의 배양 챔버에서 약 450 mL의 배양 배지를 재순환시킨다. 세포 증식 챔버는 전형적으로 260 cm² 면적에서 최대 180 mL의 배지를 일정하게 유지한다. 260 cm² 증식 챔버의 180 mL 용량을 초과하는 추가 배지 용량은 CocoonTM 카세트의 다양한 위성 리저버 및 챔버로부터 제공된다. 이들 위성 리저버로부터의 추가 배지는 일회용 CocoonTM의 배양 부분 내에서 재순환되어 260 cm² 증식 챔버에 신선한 영양소를 제공하고 세포로부터의 폐기물을 제거할 수 있다.

[0384] 전기 천공부가 형질감염시킬 수 있는 예시적인 부피는 20 mL이다. 20 mL 부피는, 적절하게는 90% 이상의 적합한 전기 천공 용액으로 구성되어야 한다. 그러므로, PoC 연구를 위해, 원래의 배양 부피를 10 mL로 감소시킨 다음, 90 mL의 보충된 추가 P3 일차 세포 전기 천공 용액으로 희석하고, 10 mL - 18mL의 최종 부피으로 농축시켰다.

[0385] 설명한 개념 증명 연구는 다음을 이용했다.

[0386] Nordson EFD로부터의 20 게이지, 0.024" I.D./0.036" O.D. 유량 제한기, 이는 투과 라인 끝에 추가했다.

[0387] 1X10⁸ PBMC를 1X10⁸ CD3+:CD28+ Dynabeads (Invitrogen)로 자극하고, 다양한 GREX 100 (Wilson Wolf) 배양 용기를 사용하여 최대 10일 동안, 5% 인간 혈청 A/B (Sigma) 및 10 ng/mL IL-2 (Peprotech)가 보충된 X-VIVO 15 배지 (Lonza)로 구성된 완전한 T-세포 배지에서 확장했다. 세포의 시험 농축물을 250 mL 원뿔형 바이알로 옮기고 2-4 시간 동안 가습된 공기 중에서 5% CO₂와 함께 37°C의 인큐베이터에서 침전되도록 했다. 침전된 세포 현탁액의 상등액을 10 mL로 감소시키고, 과량의 상등액을 폐기했다. 100 mL의 최종 부피를 위해, 보충한 P3 일차 세포 전기 천공 용액 (Lonza) 90 mL를 농축된 세포 현탁액에 첨가했다. 다음에, 세포 현탁액 100 mL를 10 mL의 부피으로 농축시켰다. 세포의 대조군 샘플을 37°C에서 배양했다.

[0388] 미리 희석된 세포 배양물, 희석된 배양물 및 최종 농축된 세포 현탁액에서 Nucleocounter NC-200 (Chemometec)을 사용하여 계수를 이중으로 수행했다. 혈청학적 피펫과 KrosFlo 스케일을 사용하여 부피를 측정했다. 초기 배양 사전 희석액, 상등액 및 최종 농축 세포 현탁액으로부터 잔류 시험 샘플을 얻었다. 인간 혈청 ELISA 키트 (Bethyl Laboratories)를 사용하여 희석 및 농축 후 남아 있는 혈청의 백분율을 측정했다. CD4+ 및 CD8+ 발현을 위한 대조군 세포 및 농축 세포 현탁액에서 FACS 분석을 수행했다.

[0389] CocoonTM 형질도입 프로토콜에 대한 부피 감소의 성공적인 입증은 다음과 같이 정의되었다: 85% 이상(≥)의 세포 회수, 10% 이하(≤)의 세포 생존을 감소 및 10% 이하(≤)의 초기농도 잔류 인간 혈청.

[0390] Octane CocoonTM과 전기 천공부 간의 세포 이송

[0391] CocoonTM과 전기 천공부 간의 세포 이송에는 몇 가지 일회용 소모품, 즉: CocoonTM 카세트, 전기 천공 카트리지, 2개의 개조된 전기 천공 리저버 및 2개의 연결 튜브 세트가 필요하다 (도 17 참조).

[0392] 개조된 전기 천공 리저버는 루어 락(luer lock) 연결 단부를 지닌 용접가능한 투입 및 배출 튜브, 리저버 내부

로 멸균 세포 이송하기 위한 외부 투입 리저버 튜브에 연결된 리저버 하우징 내의 세포 입구 포트, LV 리저버의 투입 튜브 상에 있는 루어 락 기관 추가 포트, 및 부피 이송 동안 공기 배출을 위한 캡의 통기 필터를 포함한다. Cocoon™ 카세트는 배양물의 무균성 또는 세포의 건강을 손상시키지 않으면서, 제어된 방식으로 유체 및 세포 현탁액을 Cocoon™ 외부로 자동 이송할 수 있는 포트에 설계된다.

[0393] Cocoon™ 과 전기 천공부 간에 세포의 무균 이송에 대한 성공적인 시연은: 이송된 형질감염 세포의 상등액이 무균 시험을 통과했고, 전- 및 후-형질감염 배양 샘플에서 검출된 마이코플라스마는 없었으며; 후-형질감염 Cocoon™ 카세트 및 Cocoon™ 카세트 증식 챔버로의 전달에서 90% 이상(\geq)의 전-형질감염 세포/부피의 회수; 5% 이하(\leq)의 Cocoon™ 과 전기 천공부 간의 세포 이송 이동 중에 형질감염되지 않은 세포의 생존율 변화; 및 Cocoon™ 과 전기 천공부 간에 자동화 이송이 있거나 없는 형질감염된 세포와 비교시, 20% 이하(\leq)의 CD3+, CD4+ 및 CD8+ 세포의 변화를 보였다.

[0394] Cocoon™ ACTES 카세트는 BD Q-Syte 암형 루어 락 단부(female luer lock ending)를 지닌 2개의 샘플링 포트를 비롯해, Cocoon™ 카세트 밖으로의 세포 현탁액의 자동 이송 및 연결 튜브 세트를 통한 이들 위치에 대한 무균적인 연결을 가능케 하는 캐놀라(cannula)를 지닌 입구 및 출구 포트를 갖고 있다. PoC 연구 동안, Cocoon™ 카세트, 전기 천공 리저버, 전기 천공 카트리지가 및 연결 튜브 세트 간의 접속은 무균적으로 연결되어, 다음과 같이 Cocoon™ 과 전기 천공 시스템 간에 멸균 루프를 생성했다.

[0395] ICU medical Spiros® 수형 루어 락 단부 커넥터(male luer lock ending connector)를 지닌 연결 튜브 세트는 Cocoon™ 의 2개의 BD Q-Syte 암형 루어 락 샘플링 포트에 연결되었다. Cocoon™ 카세트부터 전기 천공 리저버까지 멸균 경로를 만들기 위해, 연결 튜브 세트의 다른 Spiros® 수 루어 락 연결 (ICU medical)을 전기 천공 리저버의 암형 루어 락 투입 튜브에 연결했다. 개조된 전기 천공 리저버를 전기 천공 카트리지에 연결하기 위해, 개조된 전기 천공 리저버 배출 라인의 암형 루어 락 단부를 전기 천공 카트리지 투입구의 Spiros® 수 루어 락 연결 (ICU medical)에 부착했다. 형질감염된 세포의 수집을 위해, 전기 천공 카트리지의 Spiros® 수형 루어 락 배출 연결을 제 2 전기 천공 리저버의 암형 루어 락 커넥터 투입구에 연결했다. 제 2 전기 천공 리저버 배출 라인의 암형 루어 락 단부는 Cocoon™ 카세트의 제 2 자동 샘플링 포트에 있는 연결 튜브 세트의 Spiros® 수형 루어 락 커넥터에 연결했다.

[0396] 구현예에서, Cocoon™ 펌프는 형질감염된 세포를 Cocoon™ 증식 챔버로 옮기고, 세포의 무균 이송이 가능한 제 2 전기 천공 리저버 또는 다른 수집 용기를 이용하여 Cocoon™ 카세트의 증식 챔버로 전달하기 전에 새로 형질감염된 세포를 수집한다. 개조된 전기 천공 리저버의 투입구와 배출구 PVC 튜브 라인들 간의 무균 루어 락 연결 대신에 멸균 용접 기술을 사용할 수 있어, PVC 튜브를 지닌 연결 튜브 세트가 실현 가능하다.

[0397] 또한, 본원에서 설명한 세포 공학 시스템(Cocoon)은 Cocoon™ 기구의 중공축을 통해 내부 Cocoon™ 환경으로부터 안내된 튜브를 경유하여, Cocoon™ 카세트와 전기 천공부 간의 멸균된 폐쇄 연결을 가능케 한다. "트럼펫 암 (Trumpet Arm)"이라고 부르는 이 중공축은 주요 공정 파라미터에 걸친 제어 손실 없이 외부 환경으로부터 Cocoon™ 배양 챔버의 내부 환경에 대한 접근을 제공한다. Cocoon™ 과 전기 천공부 간의 세포 이동은 연동 펌프와 2개의 개별 제어 시스템의 소프트웨어를 사용했지만, 결합된 시스템의 소프트웨어를 사용하여 별도의 펌핑 시스템을 제어할 수도 있다.

[0398] 형질감염 전에, 세포/유체를 멸균 전기 천공 리저버까지 수동으로 옮겨 전-확장 (0일) 형질감염 절차를 모방하거나, Cocoon™ 펌프, 소프트웨어 및 (전술한) 연결 튜브 세트를 이용하여 Cocoon™ 카세트 증식 챔버로부터 옮겨 멸균 전기 천공 리저버에 대한 후-확장 형질감염 절차를 모방했다. 다음에, Cocoon™ 펌프 및 소프트웨어에 의해, Cocoon™ 카세트에서 전기 천공 리저버의 투입구까지 세포/유체의 이송을 자동화했다. 전기 천공 시스템은 전기 천공 카트리지를 통해 전기 천공 리저버로부터 제 2 전기 천공 리저버까지 최대 20 mL의 미리 프로그래밍된 펌프 이동을 수행했다. 이어서, Cocoon™ 펌프에 의해 수집된 형질감염 세포/완충액을 제 2 전기 천공 리저버

로부터 Cocoon™ 카세트의 증식 챔버로 옮겼다.

- [0399] 제 2 전기 천공 리저버를 통합하여 형질감염된 세포를 수집하고, Cocoon™ 펌프에 의해 Cocoon™ 증식 챔버로 옮길 준비가 될 때까지 세포를 유지했다. 전기 천공부 펌프만 사용하여 형질감염된 세포를 전기 천공부로부터 Cocoon™ 증식 챔버로 옮기기 위해서, "연결 튜브 세트 클리닝 (Connection Tubing Set Clearing)" 프로그램을 사용할 수 있다. 또한, 연결 튜브 세트의 길이는 일정하게 유지해야 한다.
- [0400] 전술한 Cocoon™ 카세트, 연결 튜브 세트 및 개조된 전기 천공 리저버 연결 (도 17)을 사용하고, 11 mL의 인산염 완충액 용액 (Lonza)을 Cocoon™ 펌프를 사용하여 Cocoon™ 카세트로부터 개조된 전기 천공 리저버로 옮겼다. 전기 천공 프로그램을 사용하여 PBS 용액의 모의 형질감염을 수행하고, 11 mL 부피를 개조된 제 2 전기 천공 리저버로 이동시켰다. 다음에, Cocoon™ 펌프 및 소프트웨어를 사용하여 11 mL 부피를 개조된 제 2 전기 천공 리저버로부터 Cocoon™ 카세트의 배출 백으로 옮겼다. Cocoon™ 리저버로부터 위성 백으로 옮겨진 부피는 운영당 11 mL로 추정되었다. 개조된 제 1 전기 천공 리저버, 개조된 제 2 전기 천공 리저버 및 Cocoon™ 배출 백으로 옮긴 후, 혈청학적 피펫을 사용하여 실제 부피를 측정했다. 통과 기준은 개조된 제 1 전기 천공 리저버로부터 Cocoon™ 배출 백으로 90% 이상(≥)의 유체 회수율로 설정했다.
- [0401] 세포 현탁액 시험
- [0402] 1×10^8 및 5×10^8 총 생존 가능한 PBMC를, 멸균 Cocoon™ ACTES 카세트 내에서 5% 인간 혈청 A/B (Sigma) 및 10 ng/mL IL-2 (Peprotech)가 보충된 X-VIVO 15 배지 (Lonza)로 구성된 450 mL의 완전한 T-세포 배지에서 확장하게 된다. 3일째에, 440 mL의 배양 상등액을 제거하고, 멸균 및 마이코플라즈마 시험을 위해 유지하게 된다. 세포는 90 mL의 보충된 P3 전기 천공 용액 (Lonza)에 희석하게 된다. 다음에, 세포를 Cocoon™ 카세트에서 약 10 mL의 세포 현탁액으로 농축시키고 Cocoon™ 위성 백으로 옮기게 된다. 10 mL의 보충된 추가 P3 전기 천공 용액으로 증식 챔버를 세척하고 Cocoon™ 위성 백의 세포 현탁액에 첨가하는 옵션을 평가하게 된다. Nucleocounter NC-200 (Chemometec), 마이코플라즈마 및 무균 보유물을 이용하여 중복 세포 계수를 위해 위성 백 내의 농축된 세포에서 샘플을 제거하게 된다. 다음에, 세포는 전술한 바와 같이, Cocoon™ 펌프 및 연결 튜브 세트를 통해 개조된 전기 천공 리저버로 옮기게 된다. 전기 천공부 펌프 및 EO-210 프로그램을 사용하여 pmax GFP 벡터 (Lonza)로 T-세포를 형질감염시키고, 형질감염된 세포를 개조된 제 2 전기 천공 리저버로 옮기게 된다. 다음에, Cocoon™ 펌프에 의해 세포를 개조된 전기 천공 리저버로부터 Cocoon™ ACTES 카세트의 증식 챔버로 옮기게 된다. 중복 세포 계수, 마이코플라즈마 및 무균 시험을 위해 세포의 샘플을 ACTES 카세트 증식 챔버에서 제거하게 된다. 이 절차는 세포가 형질감염되지 않고 대신에 모의 전기 천공 프로그램 CA-100을 이용하여 전기 천공부를 통과하는 대조군 배양물로 반복하게 된다. 이 절차는 3개의 상이한 공여자를 이용하여 모두 새로 분리되고 동결 보존된 PBMC 로트에서 평가하게 된다.
- [0403] 형질감염되지 않은 세포 배양물에서 세포 생존율의 변화를 측정하게 된다. 모든 배양물에서 세포 회수, 무균 및 마이코플라즈마 로딩을 평가하게 된다. 유세포 분석을 이용하여 GFP, CD3+, CD4+, CD8+ 및 추가 마커 발현을 평가하게 된다.
- [0404] Cocoon™ 과 전기 천공부 간의 세포 현탁액의 무균 이송은: 무균 및 마이코플라즈마가 없는 상등액 전- 및 후-이동; Cocoon™ 카세트 후-형질감염 및 Cocoon™ 카세트 증식 챔버로의 전달에서 90% 이상(≥)의 전-형질감염 세포의 회수; 5% 이하(≤)의 형질감염되지 않은 세포의 생존율 변화; 및 20% 이하(≤)의 CD3+, CD4+ 및 CD8+ 세포비 후-형질감염의 변화를 제공한다.
- [0405] Cocoon™ 과 전기 천공부 간에 이송된 형질감염 세포의 확장
- [0406] 1×10^8 및 5×10^8 총 생존 PBMC는, "옥탄(Octane) Cocoon™ 과 전기 천공 LV부 간의 세포 이송, 세포 현탁액 시험"에 관한 방법 섹션에 기재되어 있는 바와 같이, Cocoon™ 카세트에서 확장 및 농축되고, 전기 천공 LV부에서 멸균 연결을 통해 형질감염된 후, Cocoon™ 에 멸균적으로 옮겨진다. 형질감염된 세포는 가장 적절하고 최적화

된 자동화 Cocoon™ 프로토콜을 사용하여 Cocoon™ 카세트 증식 챔버에서 최대 15일 동안 배양하게 된다. 대조군은 3일 동안 T-225 플라스크(Corning) 또는 GREX 100 (Wilson Wolf) 배양 용기에서 확장하게 된다. 3일째에, 대조군 배양물을 무균 및 수동으로 농축시키고, 전기 천공 LV부 EO-210 프로그램을 통해 형질감염시킨 후, 최대 15 일간의 연속적인 확장을 위해 원래의 용기로 다시 옮기게 된다. 이 절차는 3개의 상이한 공여자를 이용하여 새로 분리되거나 동결 보존된 PBMC 로트에서 평가하게 된다.

[0407] Cocoon™ 과 전기 천공부 간에 이송된 형질감염 세포의 확장은 형질감염 24 시간 후 및 수확 일에 대조군 배양물과 비교시, 형질감염 효율에서 ±10%의 변동성, 대조군 배양물과 비교시, 80% 이상(≥)의 대조군 배양물의 최종 세포 농도, ±5%의 최종 세포 생존율의 변동성, FACS를 통해 측정된 바와 같이, 대조군 배양물과 비교시, ±10%의 GFP +, CD3+, CD4+ 및 CD8+ 발현의 변동성을 제공하였으며, 이송된 형질감염 세포의 상등액은 무균 시험을 통과하였고, 형질감염 전- 및 후-배양 샘플에서 마이코플라즈마는 검출되지 않았다.

[0408] **결과**

[0409] Cocoon™ 카세트의 세포 농도

[0410] 두 명의 공여자로부터의 세포를 총 생존 세포 4.4×10^8 및 4.2×10^8 로 10 mL 부피으로 침전하여 농축시켰다. 이어서, 이들 2개의 세포 현탁액을 90 mL의 보충된 전기 천공 용액(NFS)으로 희석하고 농축시켰다. 농축 후 세포 회수는 92% 및 87%였다. 형질감염 전의 세포 생존율은 92% 및 74%였고, 5% 미만 감소했다. 두 번의 운영에서, 초기 배양 상등액의 6% 및 8%가 최종 농축 세포 현탁액에서 검출되었다.

표 3

[0411] 원래의 배양 상등액, 희석 및 농축 후 투과액 및 최종 세포 현탁 상등액에서 검출 가능한 인간 혈청 A/B의 백분율

샘플 ID	초기 배양액의 인간 혈청 농도	농축 전 인간 혈청	농축 전 인간 혈청	농축 후 인간 혈청	농축 후 인간 혈청
	(ng/mL)	(ng/mL)	(초기 대비 %)	(ng/mL)	(초기 대비 %)
공여자 1	4.98E+06	2.19E+05	4%	2.84E+05	6.00%
공여자 2	4.28E+06	3.48E+05	9%	3.30E+05	8.20%

[0412] 농축되지 않은 대조군 배양물과 비교하여 농축 후 CD4+:CD8+ 프로파일에서는 차이가 없었다.

[0413] 결과는 Cocoon™ 위성 백으로부터 Cocoon™ 배출 백으로의 유체 회수를 보였다. Cocoon™ 과 전기 천공부 간에 형질감염된 세포의 확장에서 이동이 있었다. 전기 천공부에서 성공적인 전기 천공이 수행되어 형질도입된 세포가 생성된다.

[0414] 본원에서는 전기 천공부와 Cocoon™ 시스템 간의 폐쇄 루프를 사용하는 자동화된 완전 폐쇄 형질감염이 제공된다. 상기 방법들은 Cocoon™ 시스템에서 세포의 농축에 사용할 수 있다.

[0415] 실시예 4 - 조혈 줄기 세포의 확장

[0416] CD34+는 제대혈의 확장에 중점을 두었다. 이것의 특정 적용은 잘 일치된 하나의 뱃줄을 성인의 치료에 사용하기 위해, 낮은 CD34+ 번호를 포함한 제대혈 샘플로부터 CD34+를 확장하는데 있었다. 그러므로, 시작 세포 수 및 농도는 일부 다른 프로토콜과 비교하여 매우 낮았다. 시작 수 및 농도가 클수록 세포 확장은 더 낮아질 것으로 예상된다.

[0417] CD34+ 세포 선별 및 확장

[0418] 시간 경과에 따른 총 유핵 세포 (total nucleated cell, TNC) 추적

[0419] 출발 세포 농도는 다른 많은 프로토콜 (0.1 M 세포/ml)보다 낮았다.

[0420] 세포 확장은 수집 프로토콜에 기반하여 변하는 것으로 밝혀졌다 (도 19).

[0421] 배양 기간 동안 세포 표현형의 변화를 추적한다.

- [0422] TNC의 25.3%는 확장 12일 후에 CD34+이다 (도 20).
- [0423] 분화된 세포 표현형이 도 21에 도시되어 있다. 도 22는 단일 콜로니가 다중 계통 분화를 형성할 수 있음을 보인다.
- [0424] 참조문헌
- [0425] FDA, Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation. (2017). Available at: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ucm537670.htm>. (Accessed: 8th August 2017)
- [0426] Wang, X. & Riviere, I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. - Oncolytics* 3, 16015 (2016).
- [0427] Jones, S. D., McKee, S. & Levine, H. L. Emerging challenges in cell therapy manufacturing. *BioProcess Int* 10, S4--S7 (2012).
- [0428] Trainor, N., Pietak, A. & Smith, T. Rethinking clinical delivery of adult stem cell therapies. *Nat Biotech* 32, 729-735 (2014).
- [0429] Nilsson, C. et al. Optimal Blood Mononuclear Cell Isolation Procedures for Gamma Interferon Enzyme-Linked Immunospot Testing of Healthy Swedish and Tanzanian Subjects. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 585-589 (2008).
- [0430] Bohnenkamp, H., Hilbert, U. & Noll, T. Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale. *Cytotechnology* 38, 135-145 (2002).
- [0431] Lu, F. et al. Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 191-205 (2013).
- [0432] Hollyman, D. et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J. Immunother.* 32, 169-180 (2009).
- [0433] FDA, Sepax Cell Separation System and single use kits. (2011). Available at: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/SubstantiallyEquivalent510kDeviceInformation/UCM278385.pdf>. (Accessed: 8th November 2017)
- [0434] Wegener, C. Cell Washing with the LOVO Cell Processing System. *BioProcess Int Industry Y*, p78 (2014).
- [0435] Trickett, A. & Kwan, Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* 275, 251-255 (2003).
- [0436] Hasegawa, K. et al. 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. *Clin. Cancer Res.* 12, 1921-1927 (2006).
- [0437] Odeleye, A. O. O., Marsh, D. T. J., Osborne, M. D., Lye, G. J. & Micheletti, M. On the fluid dynamics of a laboratory scale single-use stirred bioreactor. *Chem. Eng. Sci.* 111, 299-312 (2014).
- [0438] Grishagin, I. V. Automatic cell counting with ImageJ. *Anal. Biochem.* 473, 63-65 (2015).
- [0439] Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K. & Keir, C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 4, 92-101 (2017).
- [0440] Locke, F. L. et al. 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). *Cancer Res.* 77, CT019 LP-CT019 (2017).
- [0441] 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. Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor

targeting the cancer germline antigen MAGE-A3. *Journal of Clinical Oncology* (2017) 35: 29, 3322-3329.

- [0442] FDA, Available online at: <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM566166.pdf>
- [0443] 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. First-in-human multicenter study of bb2121 anti-BCMA CAR T-cell therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results. *Journal of Clinical Oncology* 2017 35:15_suppl, 3010-3010
- [0444] Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figiolo 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. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest.* 2016 Sep 1; 126(9): 3363-3376.
- [0445] Morrissey JB, Shi Y, Trainor N. End-to-end cell therapy automation: an immunotherapy case study. *BioProcess International* (2017) 10-18.
- [0446] Lafferty KJ, Cunningham AJA. New analysis of allogeneic interactions. *J. Immunol.* (1975) 112: 436-437.
- [0447] Harding F, McArthur J, Gross J, Raulet D, Allison J. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones (1992) *Nature* 356: 607-609.
- [0448] Clavreul A, Fisson S, D'hellencourt CL, Couez D. Interrelationship between CD3 and CD28 pathways in a murine T cell thymoma. *Mol Immunol.* (2000) 37(10): 571-7.
- [0449] Charron L, Doctrinal A, Choileain SN, Astier AL. Monocyte:T cell interaction regulates human T cell activation through a CD28/CD46 crosstalk. *Immunol Cell Biol.* (2015) 93(9): 796-803.
- [0450] Fathman CG1, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol.* (2007) 7(8): 599-609.
- [0451] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology* (2005) 23(1): 515-548.
- [0452] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of Clinical Oncology* (2015); 33(6): 540-549.
- [0453] Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine* (2011) 3(95): 95ra73.
- [0454] Riddell SR, Greenberg PD. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* (1990) Apr 17; 128(2): 189-201.
- [0455] Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods.* 275 (2003) 251-255.
- [0456] Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures for Use in Adoptive Transfer Therapy for Melanoma Patients. *Journal of immunotherapy* (2003) 26(4): 332-342.
- [0457] Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother.* (2003) 26(4): 332-342.
- [0458] Manger B, Weiss A, Weyand C, Goronzy J, Stobo JD. T cell activation: differences in the signals

required for IL 2 production by nonactivated and activated T cells. *J Immunother.* (1985) 135 (6) 3669-3673.

- [0459] Ceuppens J, Bloemmen FJ, Van Wauwe JP. T cell 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. *J Immunol* (1985) 135 (6) 3882-3886.
- [0460] Van Wauwe JP, De Mey JR, Goossens JG. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol.* (1980)124(6): 2708-13.
- [0461] Carpenter PA, Pavlovic S, Tso JY, Press OW, Gooley T, Yu XZ, Anasetti C. Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells. *J Immunol* (2000) 165 (11) 6205-6213.
- [0462] Andris F, Denanglaire S, de Mattia F, Urbain J, Leo O. Naive T cells are resistant to anergy induction by anti-CD3 antibodies. *J of Immunology* (2004) 173 (5) 3201-3208.
- [0463] Wolf H, Müller Y, Salmen S, Wilmanns W, Jung G. Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies. *Eur J Immunol.* (1994) 24(6): 1410-1417.
- [0464] Chai JG, Lechler RI. Immobilized anti-CD3 mAb induces anergy in murine naive and memory CD4+ T cells in vitro. *Int Immunol.* (1997) 9(7): 935-944.
- [0465] Verwilghen J, Baroja ML, Van Vaeck F, Van Damme J, Ceuppens JL. Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation. *Immunology* (1991) 72(2): 269-276.
- [0466] Schwartz RH. A cell-culture model for lymphocyte-T clonal anergy. *Science* (1990) 248: 1349-1356.
- [0467] Ju SW, Ju SG, Wang FM, Gu ZJ, Qiu YH, Yu GH, Ma HB, Zhang XG. A functional anti-human 4-1BB ligand monoclonal antibody that enhances proliferation of monocytes by reverse signaling of 4-1BBL. *Hybridoma and Hybridomics.* (2003) 22: 333-338.
- [0468] Baroja ML, Lorre K, Van Vaeck F, Ceuppens JL. 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. *Cell Immunol.* (1989) 120(1): 205-217.
- [0469] Austyn JM, Smith KG, Morris PJ. 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. *Eur J Immunol.* 1987 17(9): 1329-35.
- [0470] Tax WJM, Willems HW, Reekers PPM, Capel PJA, Koene RAP. Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells. *Nature* (1983) 304: 445-447.
- [0471] Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* (1996) 89(4): 592-598.
- [0472] Schwartz RH. T cell anergy. *Annual Review Immunology* (2003) 21: 305-34.
- [0473] Feldmann A, Arndt C, Töpfer K, Stamova S, Krone F, Cartellieri M, Koristka S, Michalk I, Lindemann D, Schmitz M, Temme A, Bornhöfer M, Ehninger G, Bachmann M. Novel humanized and highly efficient bispecific antibodies mediate killing of prostate stem cell antigen-expressing tumor cells by CD8+ and CD4+ T cells. *J Immunol.* (2012) 189(6): 3249-3259.
- [0474] Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH, Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenhuth V, Gall FL, et al. A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19(+) tumor cells. *MAbs.* (2015) 7: 584-604.
- [0475] Church SE, Jensen SM, Antony PA, Restifo NP, Fox BA. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and

memory tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* (2014) 44(1): 69-79.

- [0476] Feldmann A, Arndt C, Töpfer K, Stamova S, Krone F, Cartellieri M, Koristka S, Michalk I, Lindemann D, Schmitz M, Temme A, Bornhöfer M, Ehninger G, Bachmann M. Novel humanized and highly efficient bispecific antibodies mediate killing of prostate stem cell antigen-expressing tumor cells by CD8+ and CD4+ T cells. *J Immunol.* (2012) 189: 3249-3259.
- [0477] Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH, Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenthin V, Gall FL, Topp M, Little M, Zhukovsky EA. A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19(+) tumor cells. (2015) 7:584-604.
- [0478] Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, et al. Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer J.* (2014) 20(2): 141-144.
- [0479] Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *The Journal of Clinical Investigation.* (2016) 126(6): 2123-2138.
- [0480] 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, Aycok J, Wiecek J, Go WY. Phase 1 Results of ZUMA-1: A multicenter study of KTE-C19 anti-CD19 CAR T cell therapy in refractory aggressive lymphoma. *Molecular Therapy* (2017) 25(1): 285-295.
- [0481] Trainor N, Pietak A, Smith T. Rethinking clinical delivery of adult stem cell therapies. *Nature Biotech* (2014) 729-735.
- [0482] Mahdavi B, Gottschalk U, Trainor N, Smith T. The hype, hope and reality of personalization. *The Medicine Maker* (2015) 38-41.
- [0483] Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Review* (2015) 34(1): 157-164.
- [0484] Tuefferd 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. HER2 Status in Ovarian Carcinomas: A Multicenter GINECO Study of 320 Patients (2007) 2(11):e1138.
- [0485] Lu TL, Pugach M, Somerville R, Rosenberg SA, Kochendefter JN, Better M, Feldman SA. A rapid cell expansion process for production of engineered autologous CAR-T cell therapies. *Human Gene Therapy* (2016) 27: 209-218.
- [0486] Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* (1998) 213(2): 157-167.
- [0487] Romagnani S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res* (1991) 21(2): 152-158.
- [0488] Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* (1996) 89(4): 592-598.
- [0489] Laux I, Khoshnan A, Tindell C, Bae D, Zhu XM, June CH, Effros RB, Nel A. 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. *Clin Immunol.* (2000) 96: 187-197.
- [0490] Li Y, Kurlander RJ. 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. *J Transl Med.* (2010) 8: 104.
- [0491] Zhu YW, Zhu GF, Luo LQ, Flies AS, Chen LP. CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth

signal for T lymphocytes with memory phenotype. Blood (2007) 109: 4882-4889.

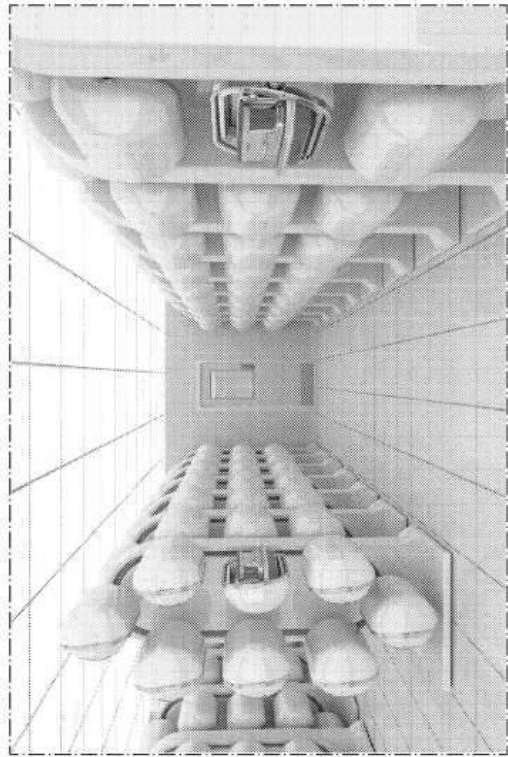
- [0492] Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, Grosmaire LS, Rabinovitch PS, Lindsten T, Thompson CB, June CH. CD28 Ligation in T-cell Activation: Evidence for Two Signal Transduction Pathways. Blood (1990) 75(7): 1531-1539.
- [0493] Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Culturing at atmospheric oxygen levels impacts lymphocyte function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2005) 102(10): 3756-3759.
- [0494] Avgoustiniatos ES, Hering BJ, Rozak PR, et al. Commercially Available Gas-Permeable Cell Culture Bags May Not Prevent Anoxia in Cultured or Shipped Islets. Transplantation proceedings. 2008; 40(2):395-400.
- [0495] Hammill JA, VanSeggelen H, Helsen CW, Denisova GF, Evelegh C, Tantaló DGM, Bassett JD, Bramson JL. Designed ankyrin repeat proteins are effective targeting elements for chimeric antigen receptors. Journal for Immunotherapy of Cancer (2015) 3:55.
- [0496] VanSeggelen H, Tantaló DGM, Afsahi A, Hammill JA, Bramson JL. Chimeric antigen receptor-engineered T cells as oncolytic virus carriers. Molecular Therapy - Oncolytics (2015) 2, 150014.
- [0497] 본원에서 설명한 방법 및 응용에 대한 다른 적절한 수정과 적응이 임의의 구현예의 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있는 것은, 관련 기술분야에 통상의 기술자에게 용이하며 명백할 것이다.
- [0498] 특정 구현예들을 본원에 도시하고 설명하였지만, 청구 범위는 설명하고 도시한 부분들의 특정 형태 또는 배열로 제한되지 않는 것으로 이해해야 한다. 본 명세서에는 예시적인 구현예가 개시되어 있고, 비록 특정 용어를 사용하였으나, 이들은 포괄적이고 설명적인 의미로만 사용되며 제한하고자 하는 목적은 아니다. 상기 교시에 비추어 구현예들의 수정 및 변형이 가능하다. 그러므로, 구현예는 구체적으로 설명한 것과 다르게 실시할 수 있음을 이해해야 한다.
- [0499] 본 명세서에서 언급한 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참조로 인용된 것으로 표시되었던 것과 동일한 정도로 본원에 참조로서 인용한다.

도면

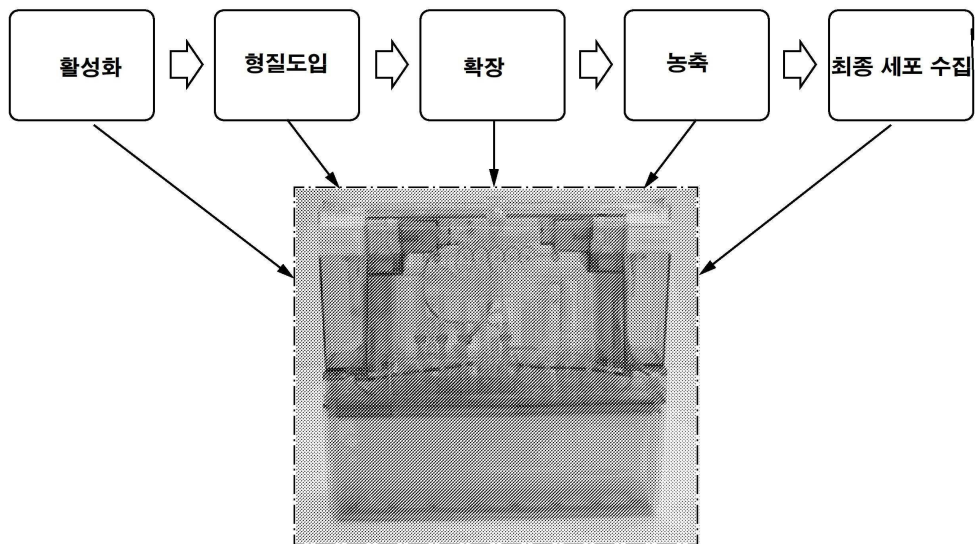
도면1



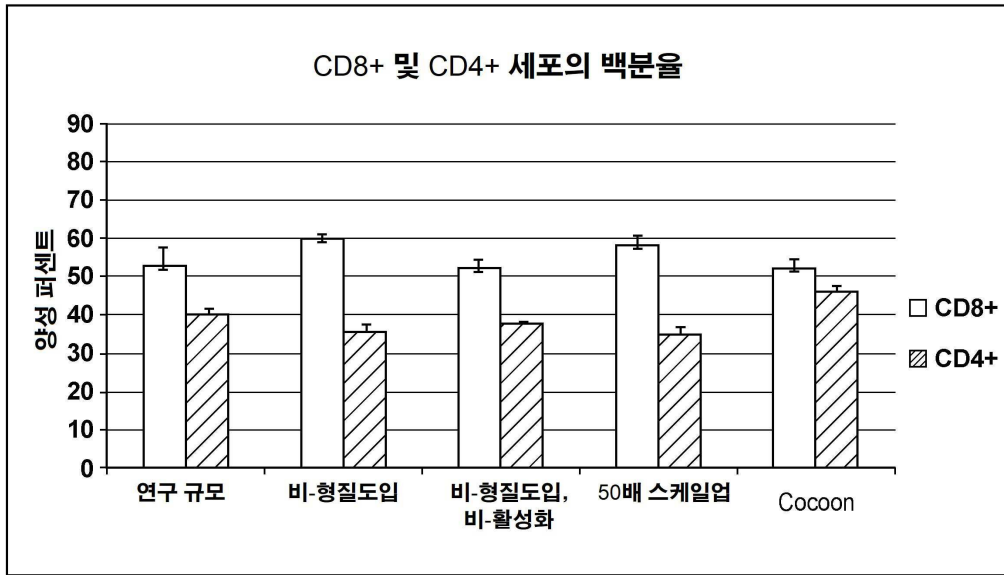
도면2



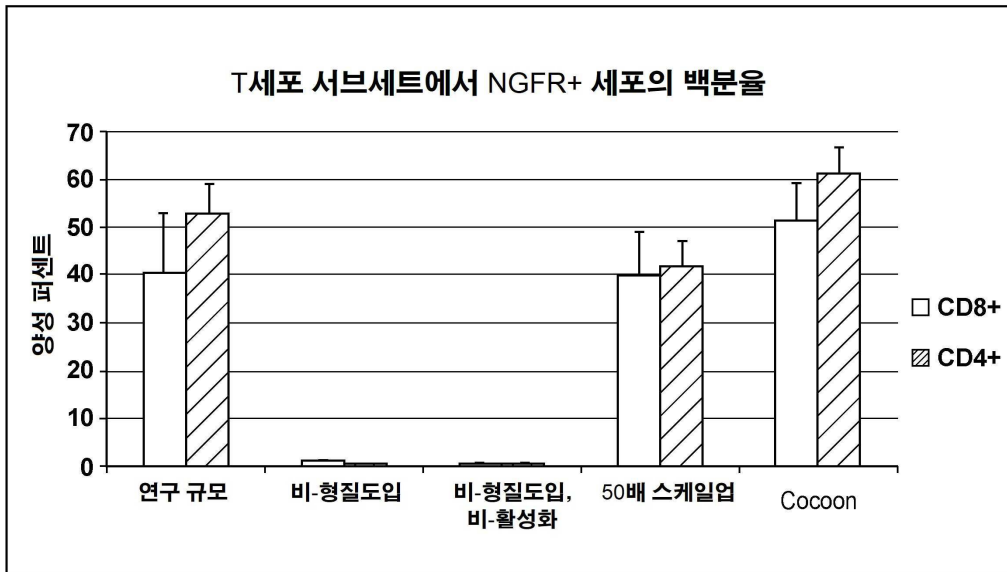
도면3



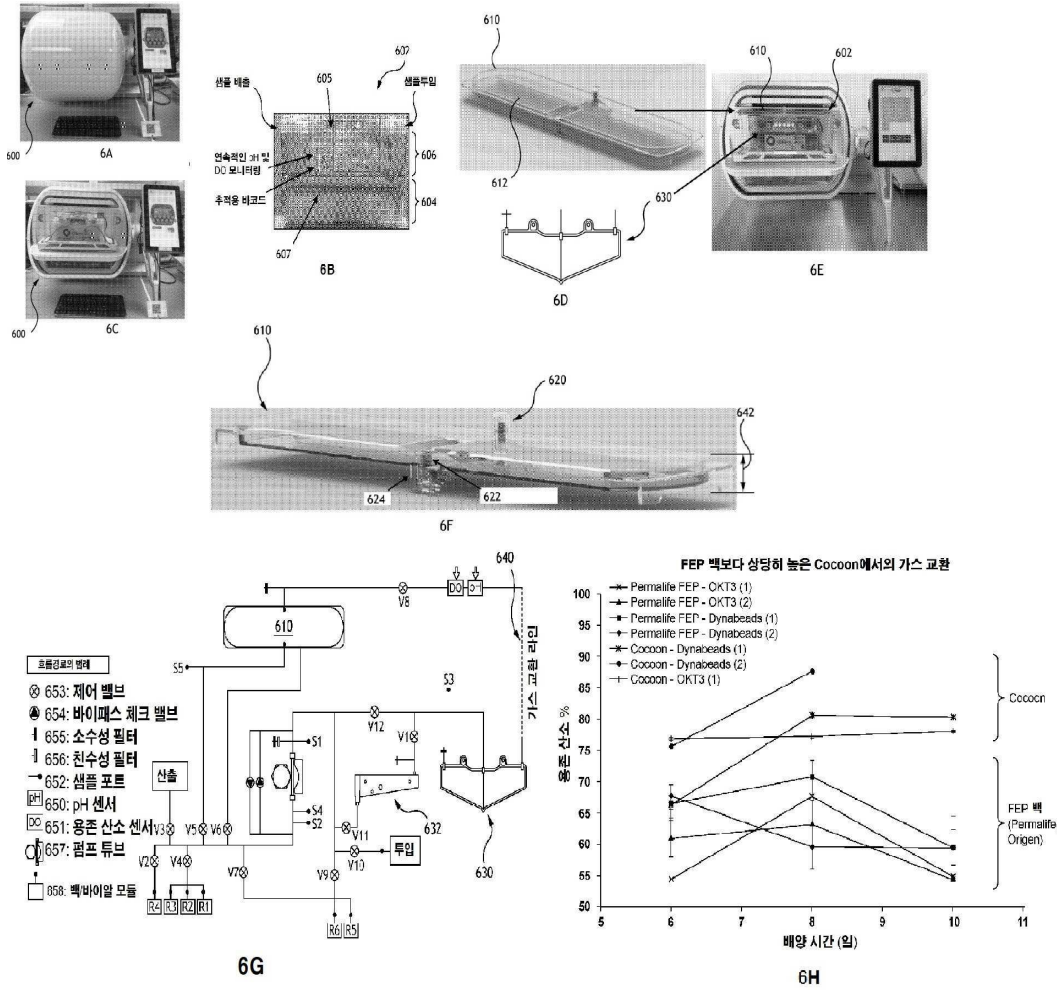
도면4



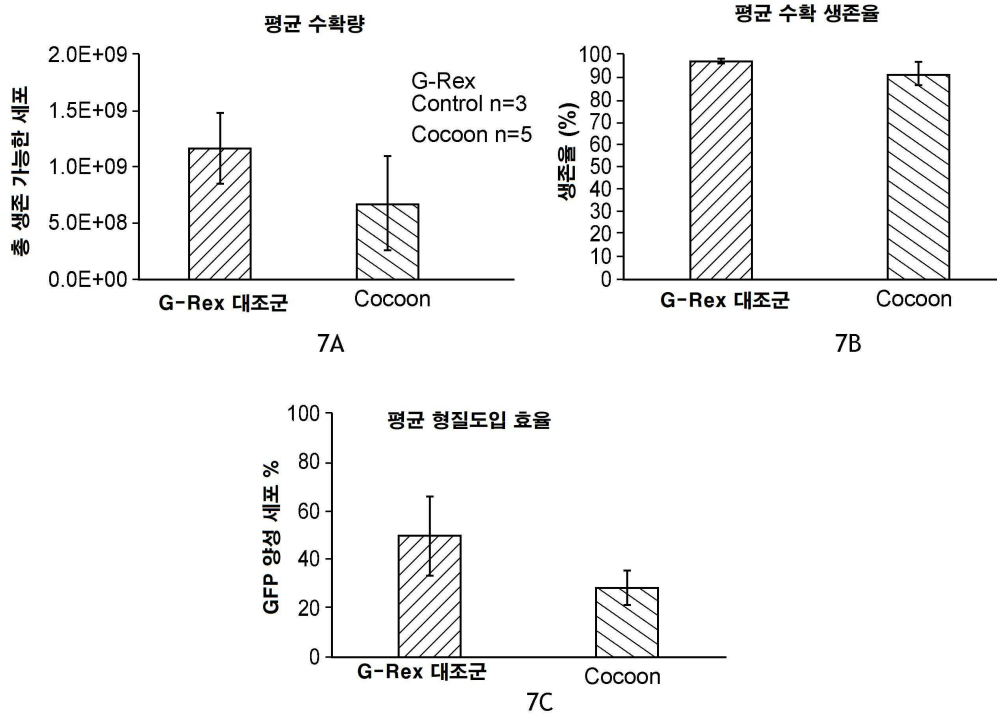
도면5



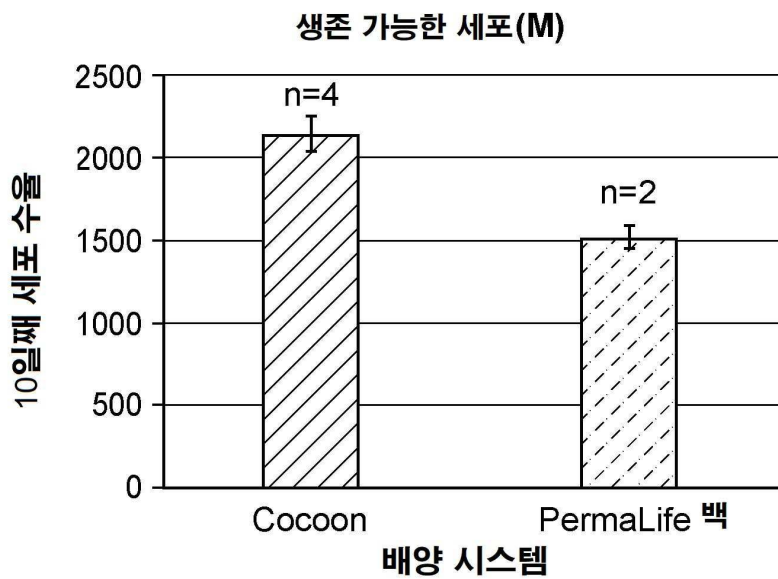
도면6



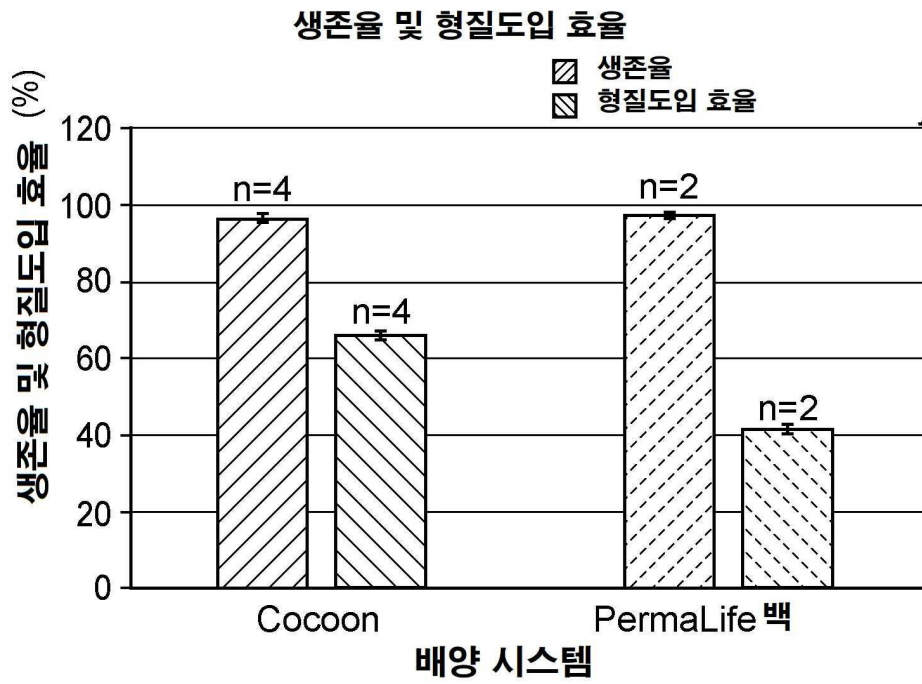
도면7



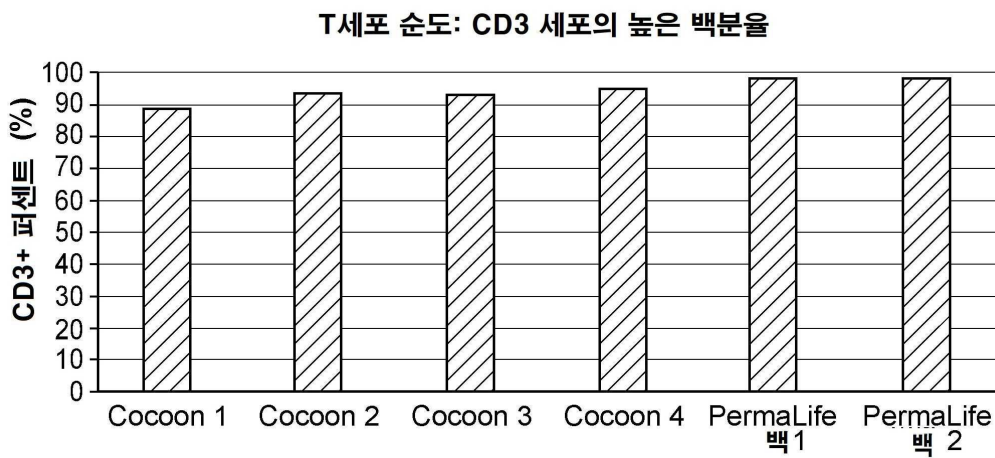
도면8a



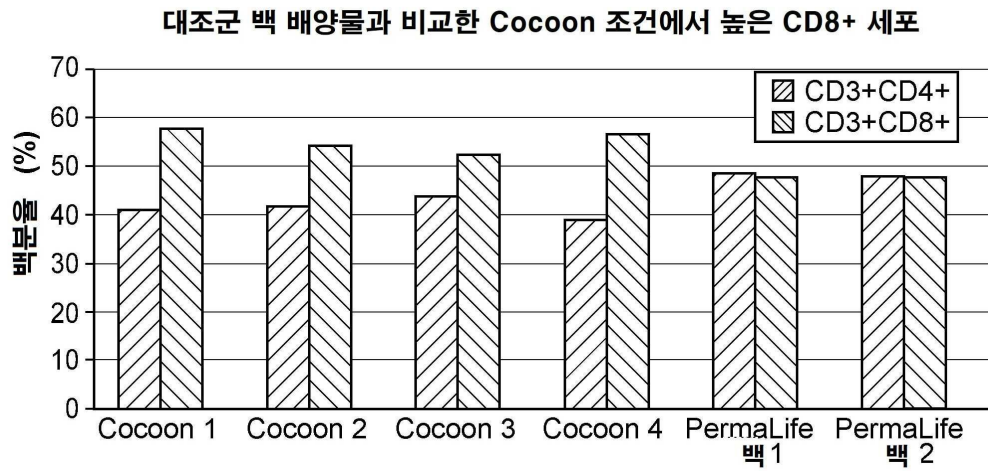
도면8b



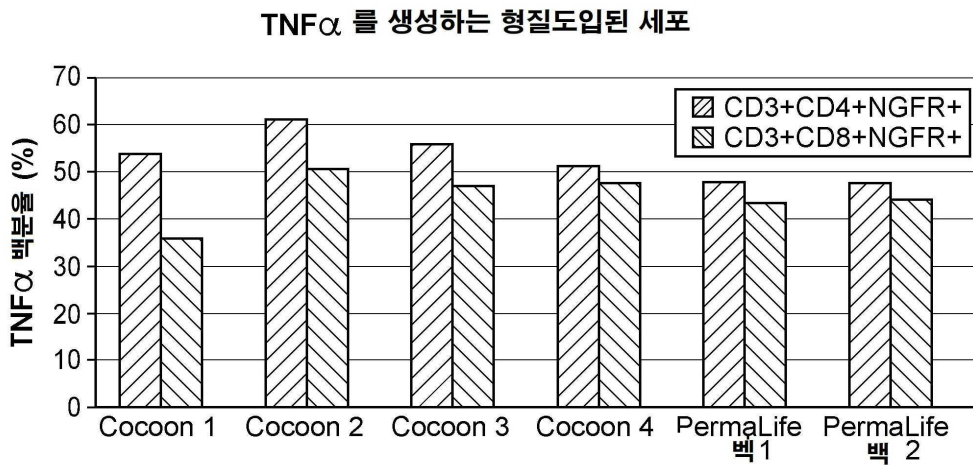
도면9a



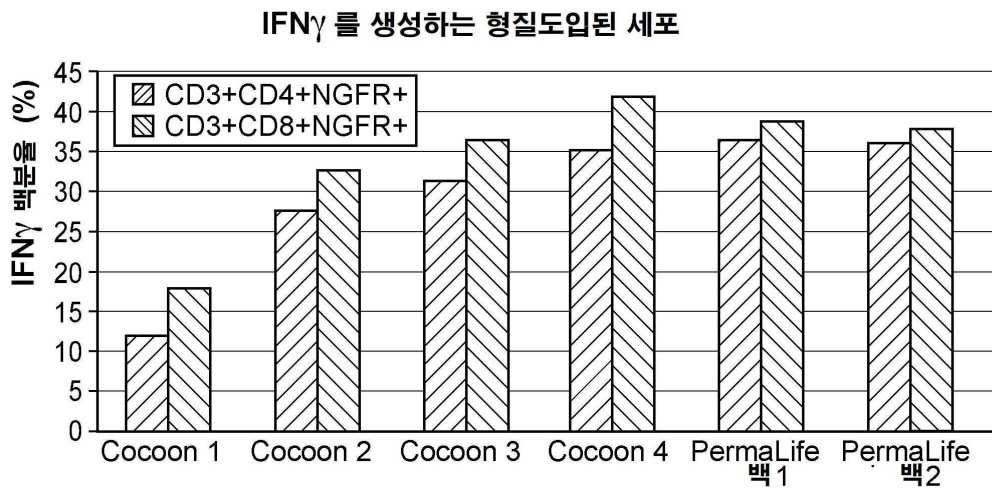
도면9b



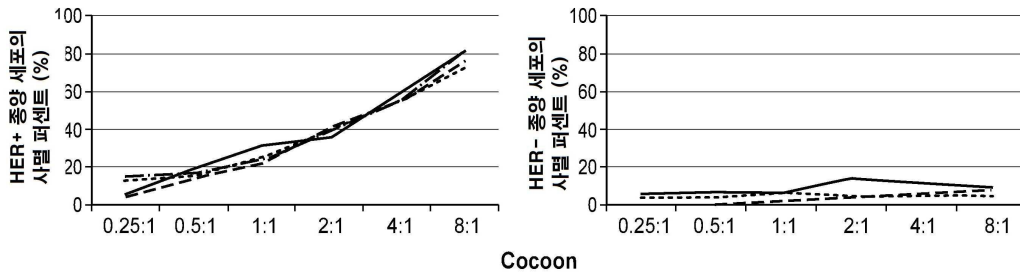
도면9c



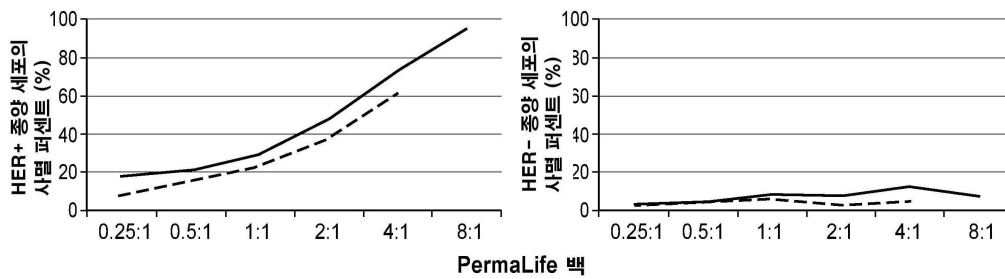
도면9d



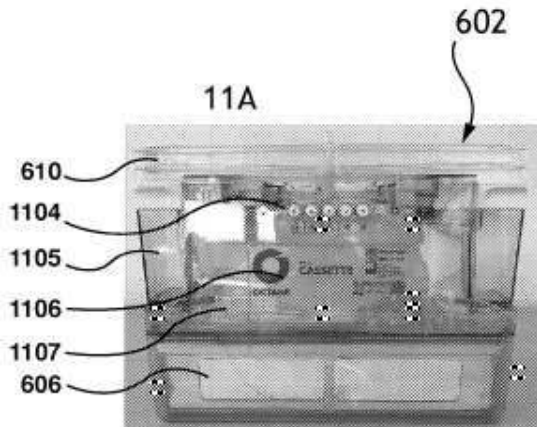
도면10a



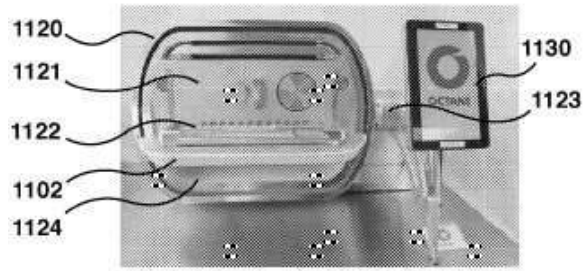
도면10b



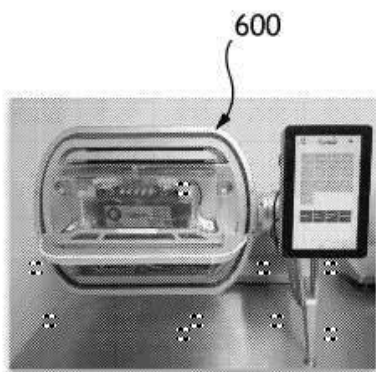
도면11a



도면11b



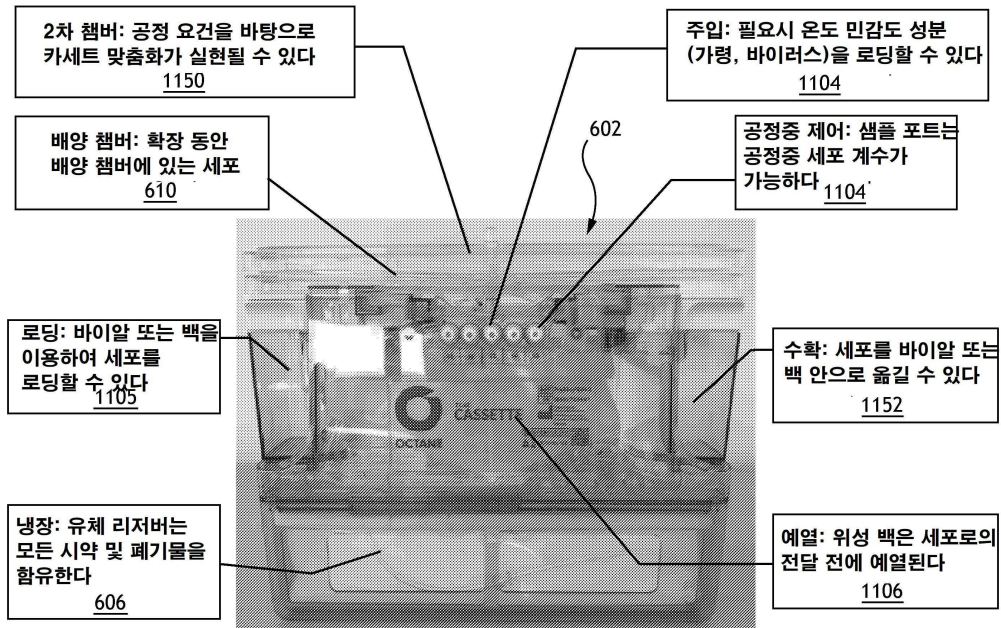
도면11c



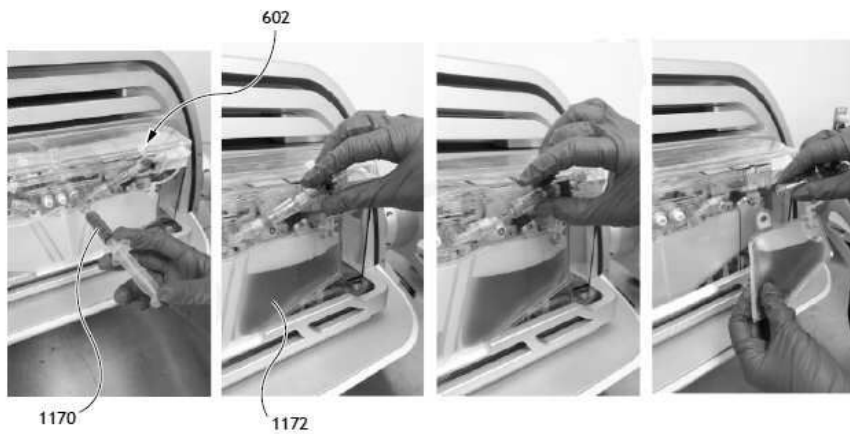
도면11d



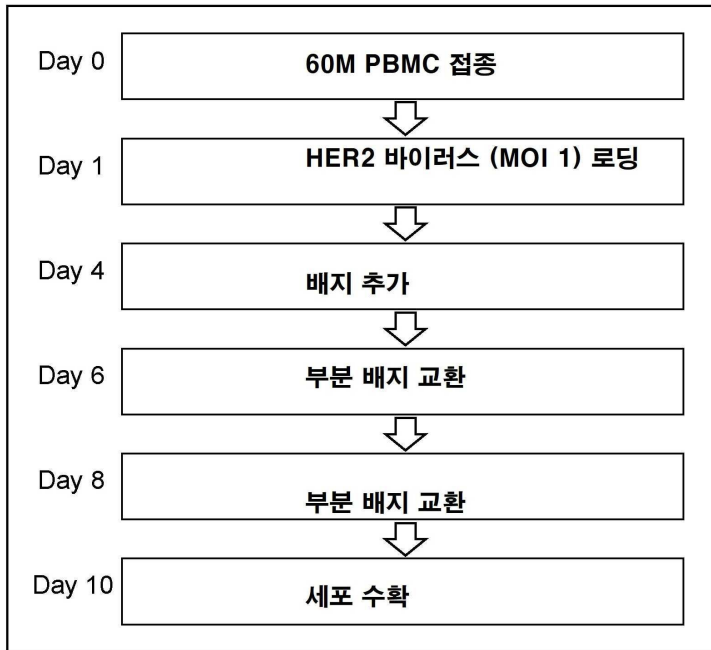
도면11e



도면11f



도면12a



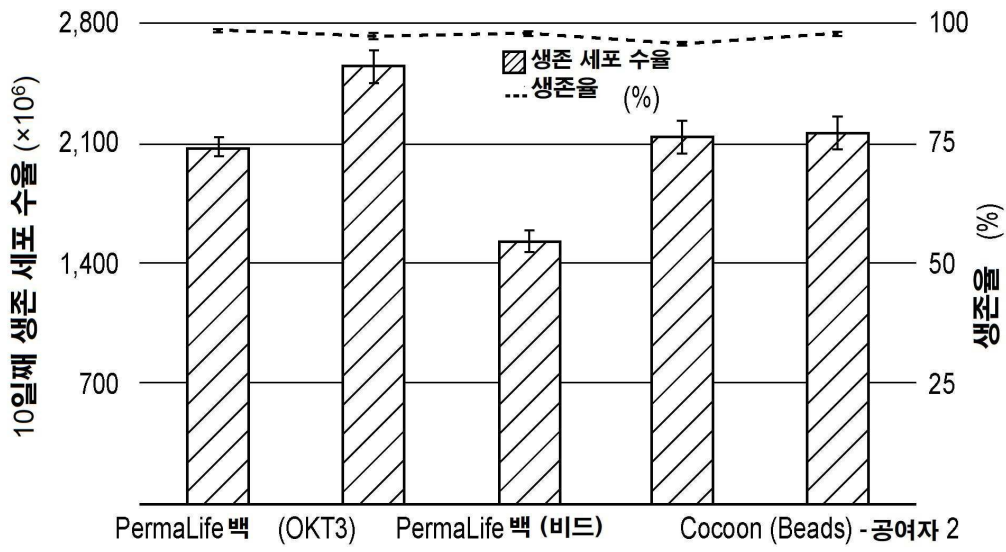
도면12b



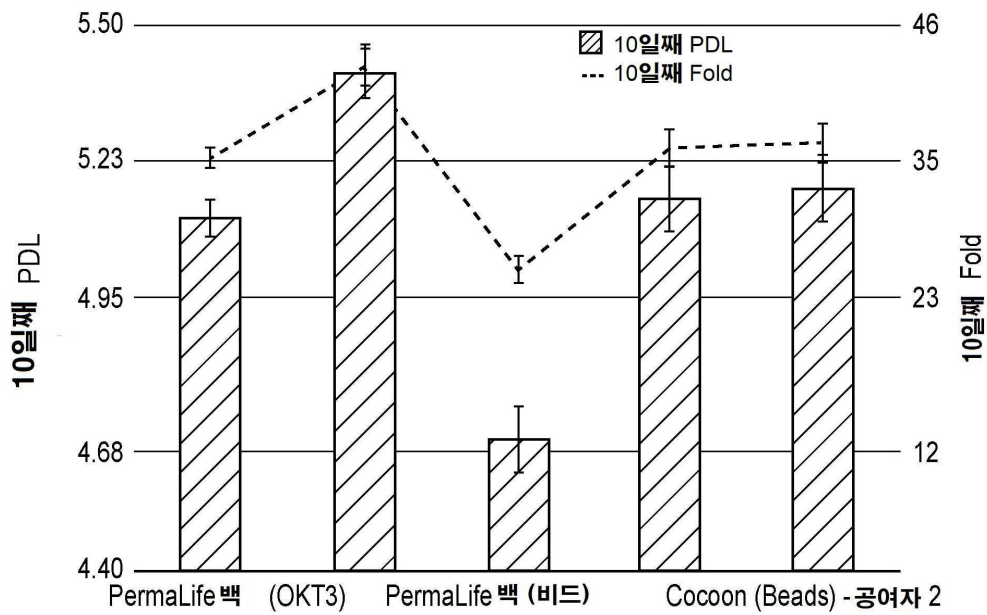
도면12c



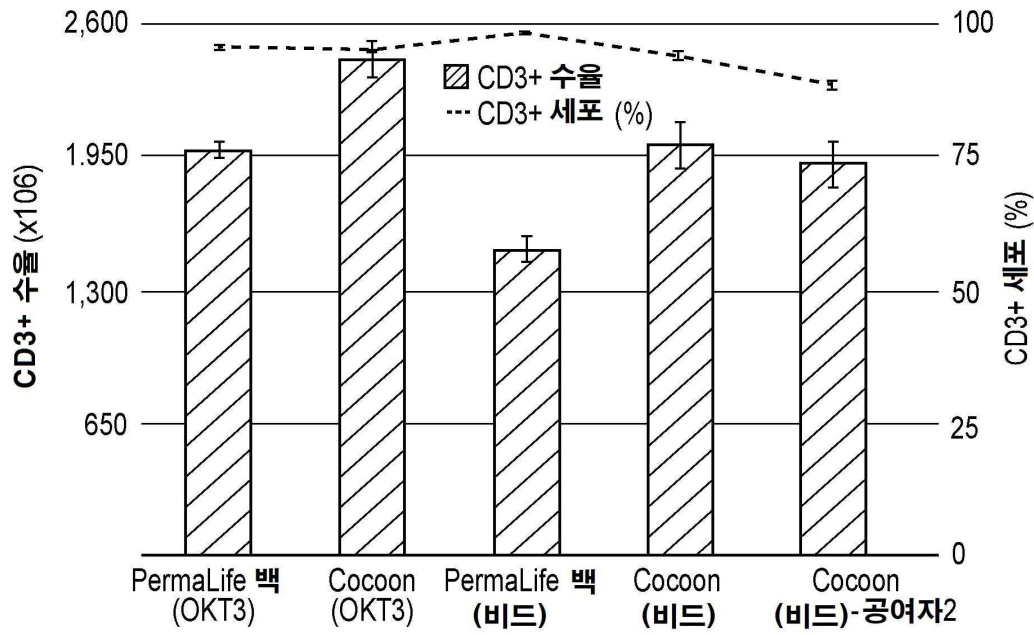
도면13a



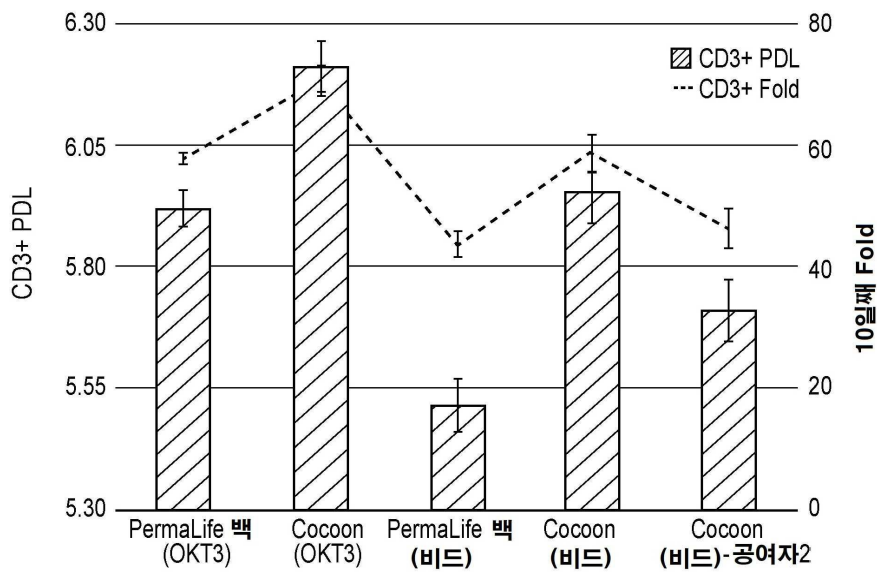
도면13b



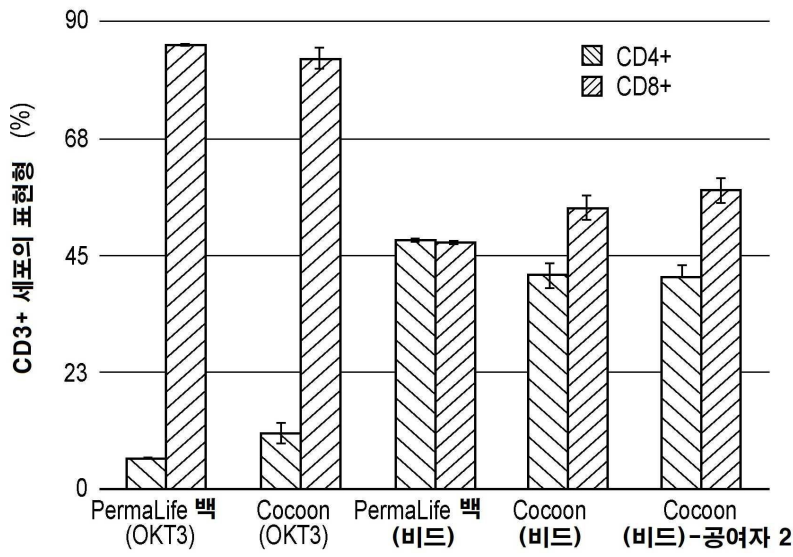
도면13c



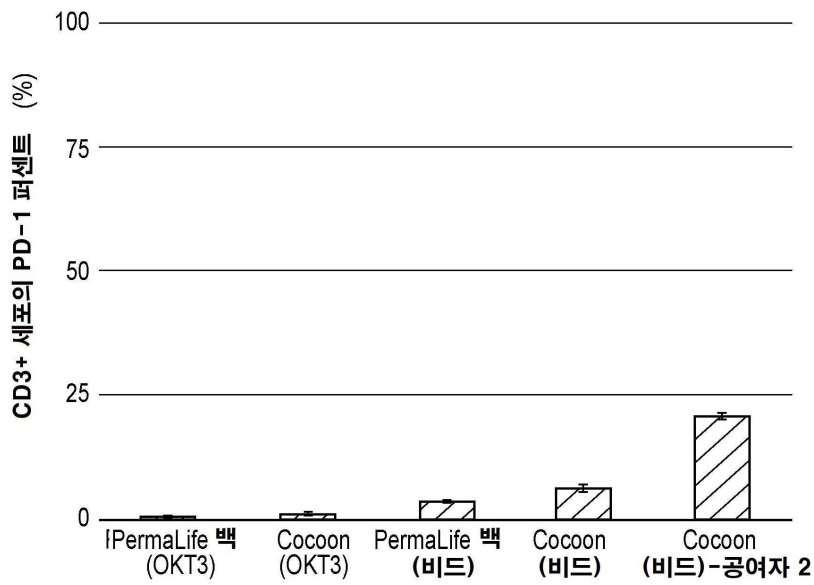
도면13d



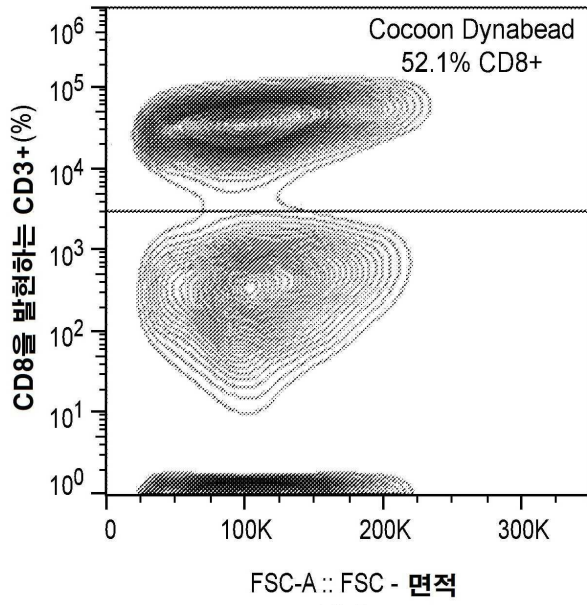
도면13e



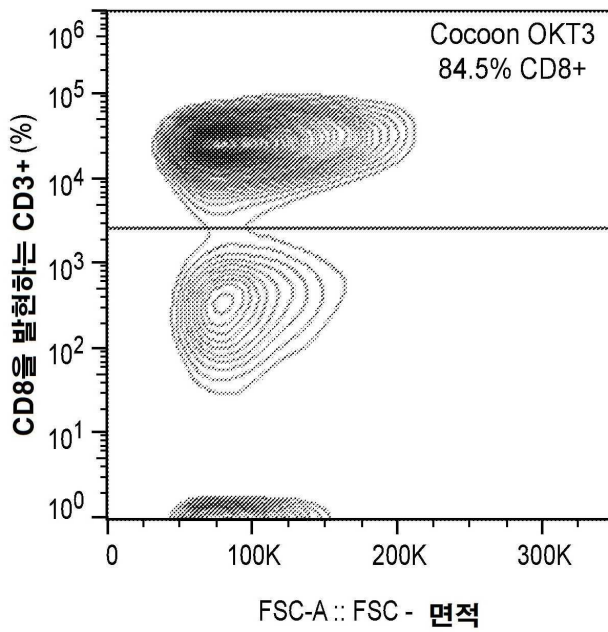
도면13f



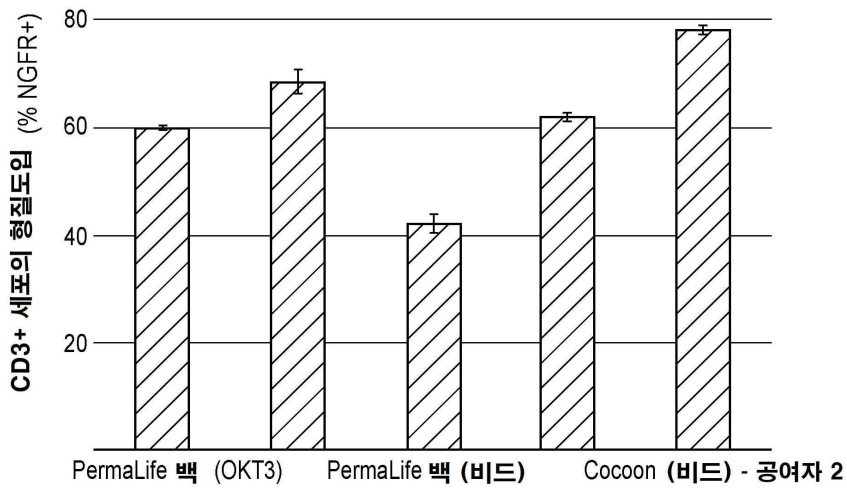
도면13g



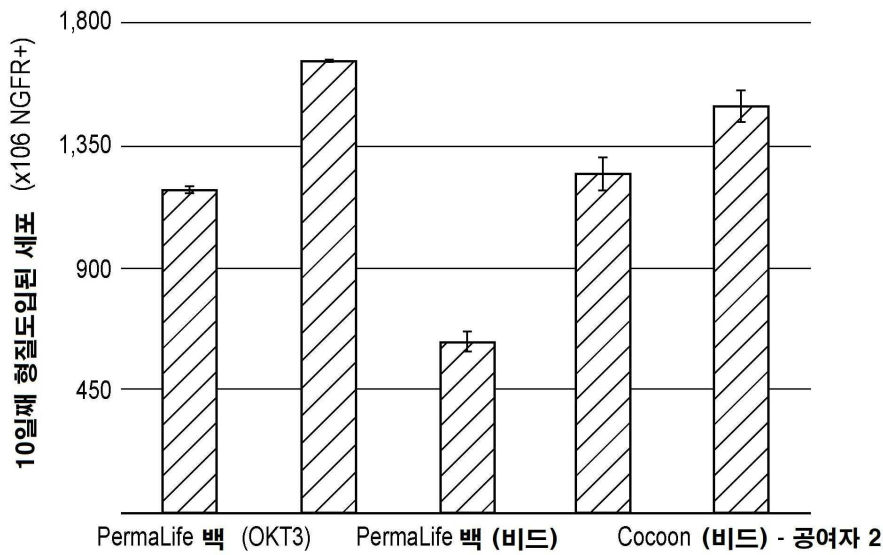
도면13h



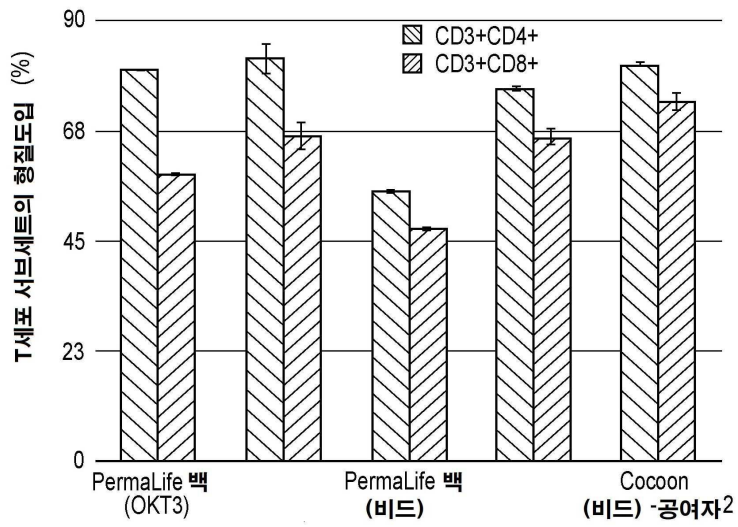
도면14a



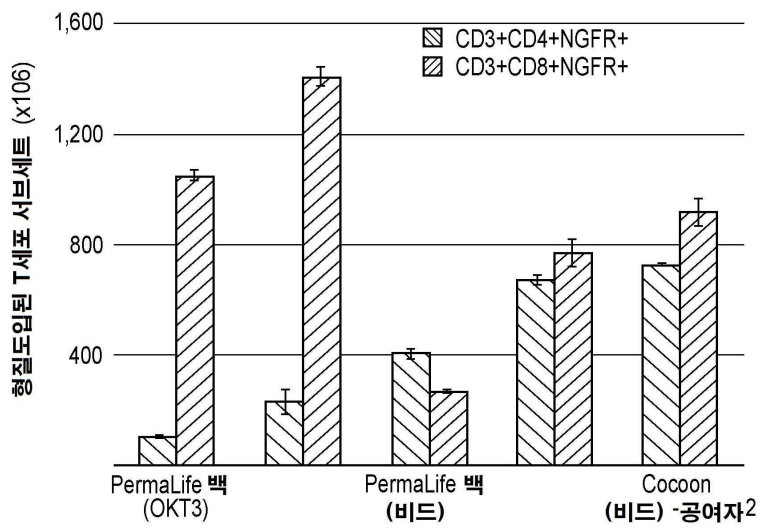
도면14b



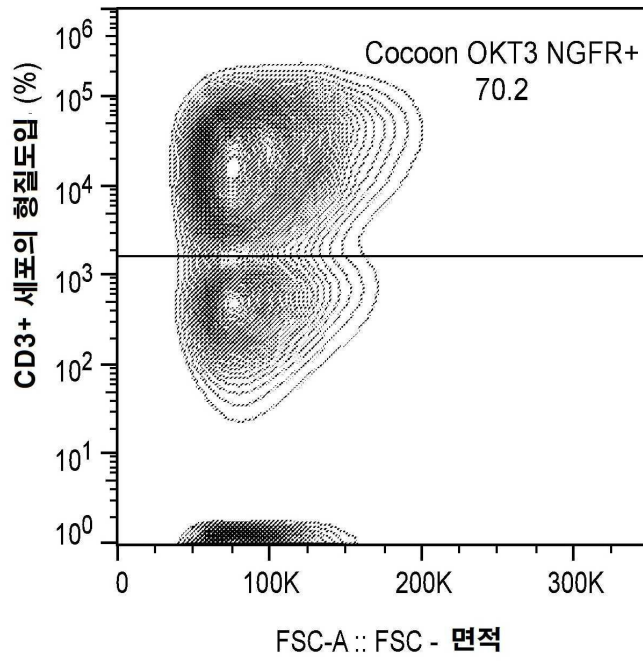
도면14c



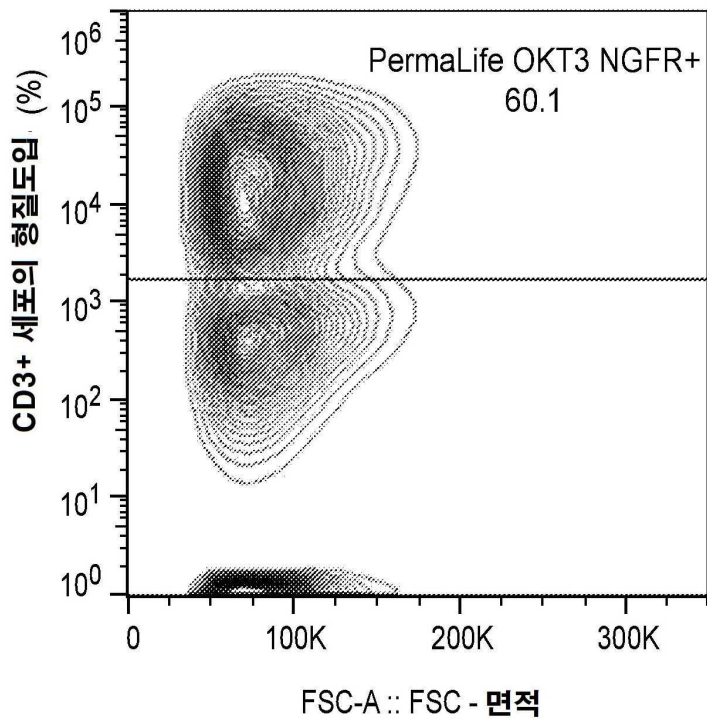
도면14d



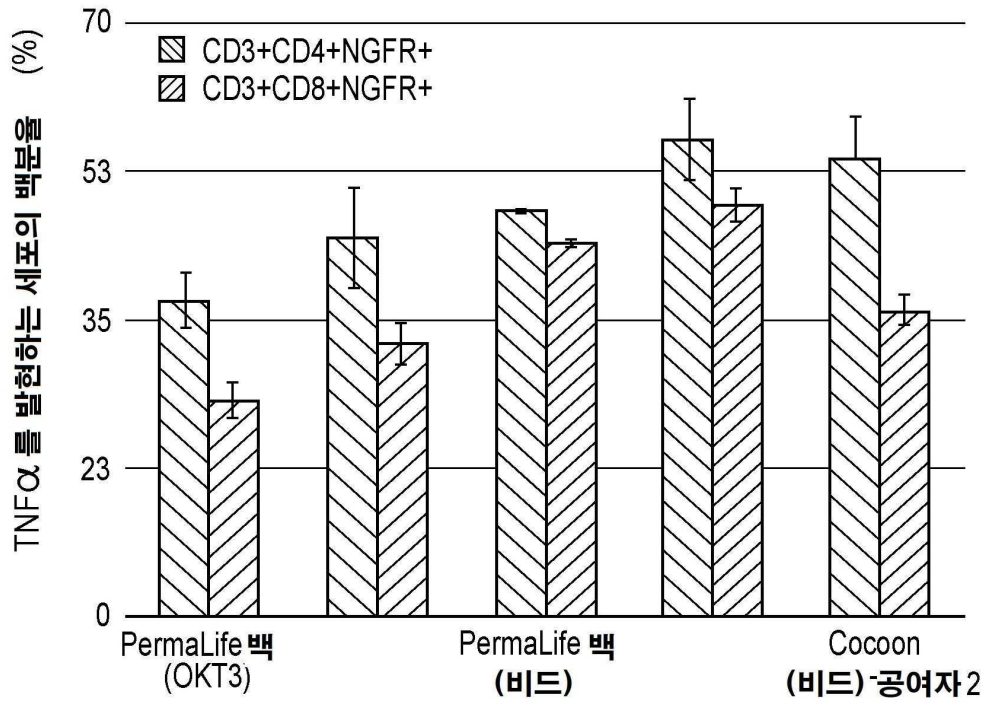
도면14e



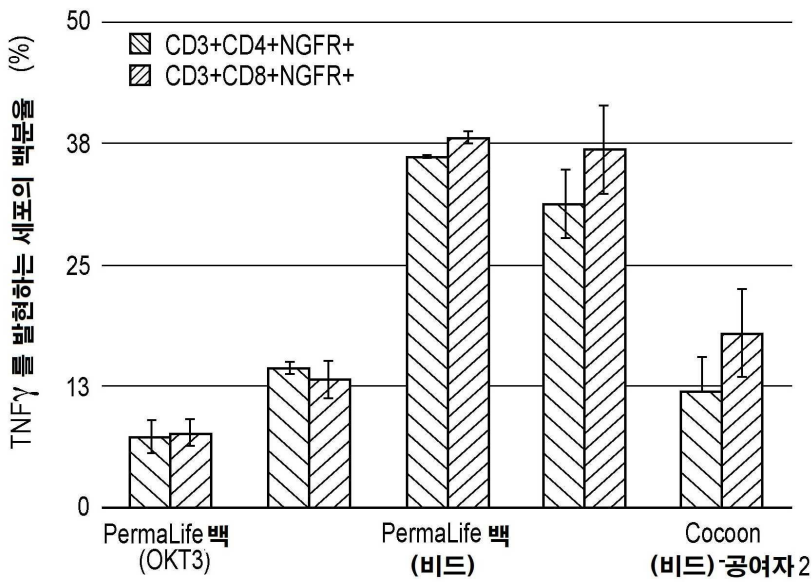
도면14f



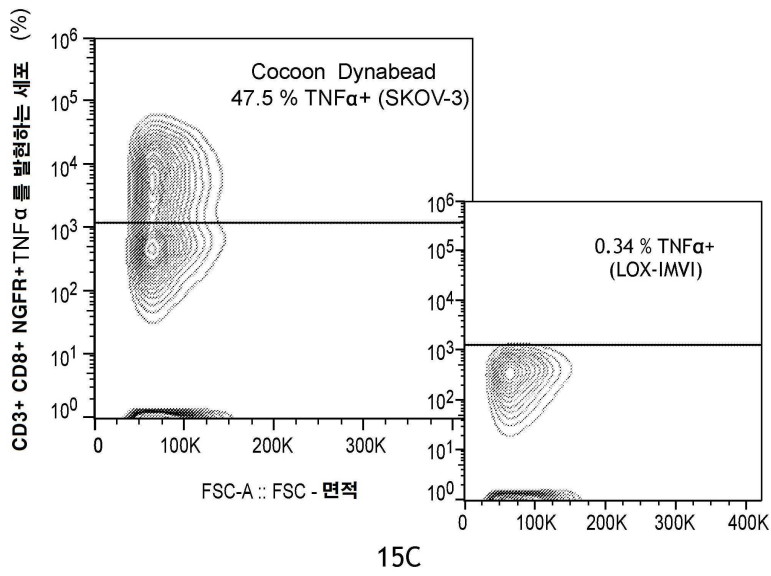
도면15a



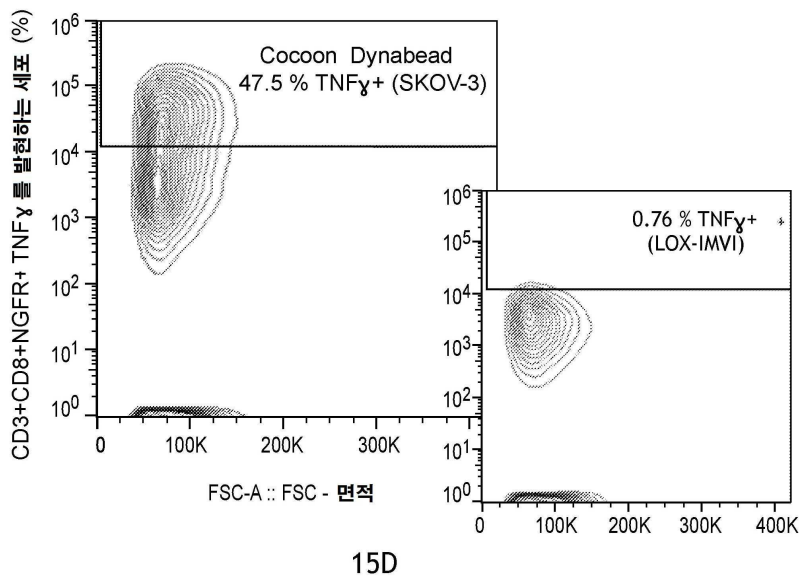
도면15b



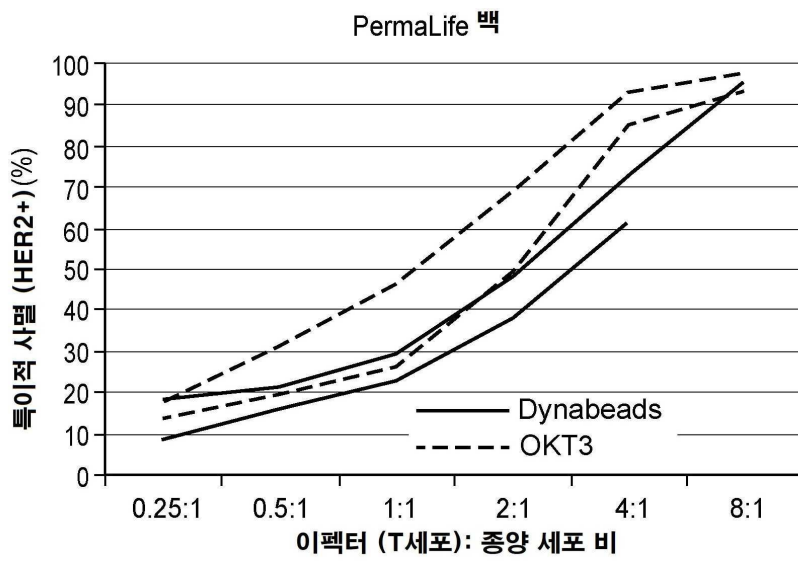
도면15c



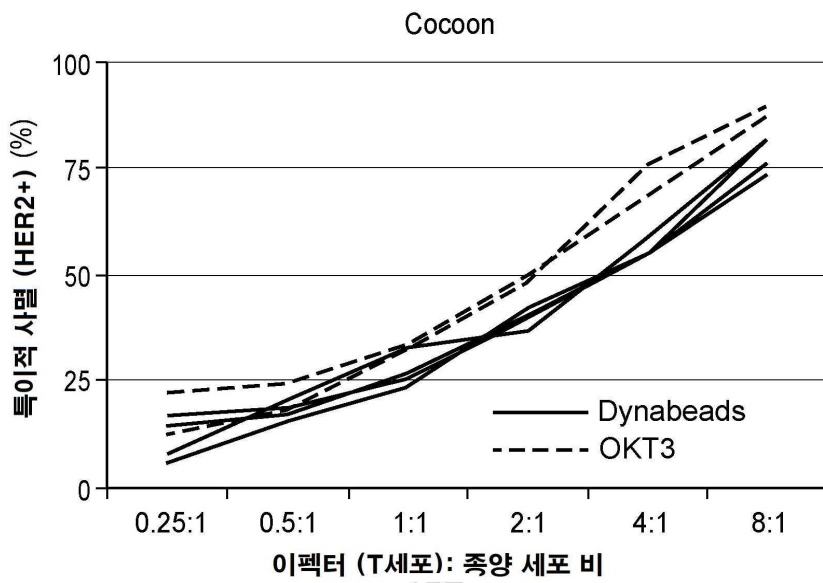
도면15d



도면15e



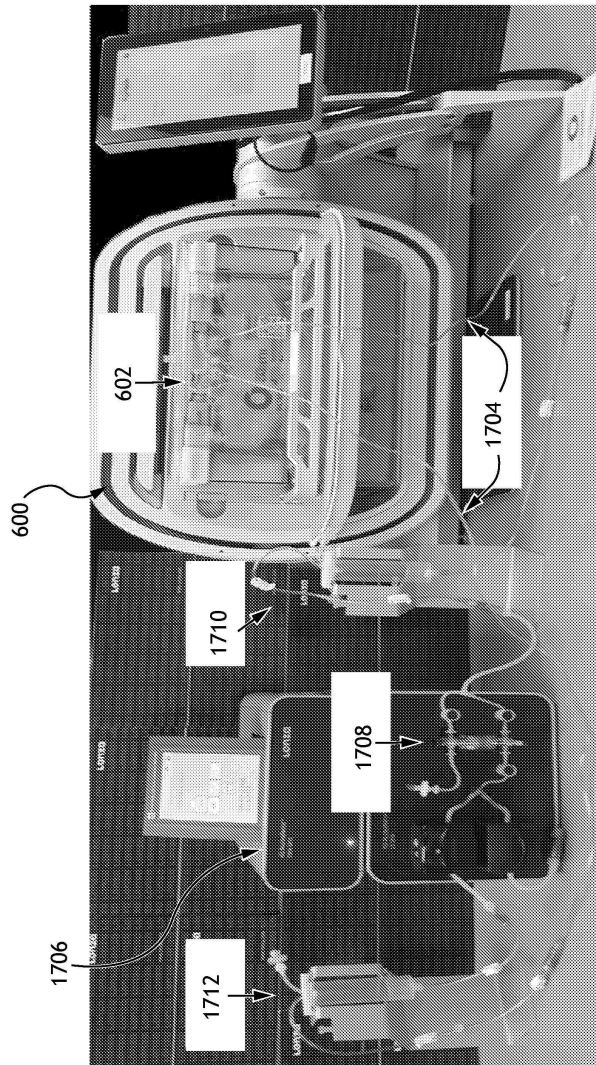
도면15f



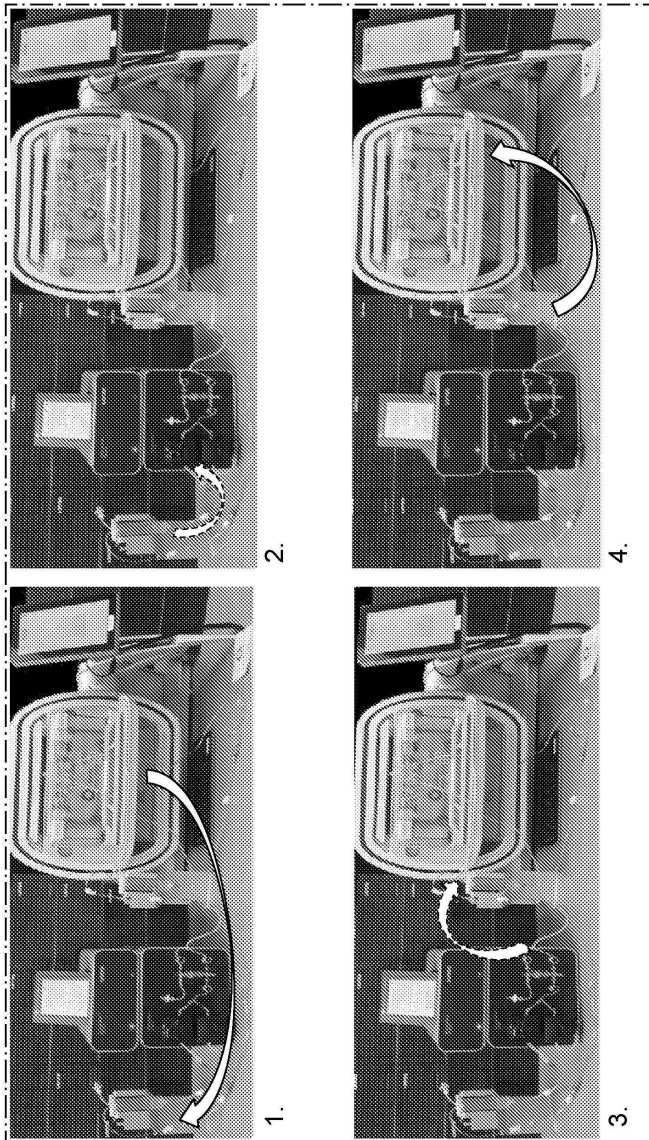
도면16

시스템	총 배지 (L)	10일째 작업 볼륨 (L)	CD3+CD4 + Cells (%)	CD3+CD8 + 세포 (%)	생존율 (%)	총 생존 세포 (x10 ⁹)	CAR T 세포 (%)	총 CAR T Cells (x10 ⁹)	CAR T 세포를 생성하는 TNF α (%)	CAR T 세포를 생성하는 IFN γ (%)
백 - Dynabead (n=2)	1.15	1.15	48.2 \pm 0.4	47.7 \pm 0.1	98.0 \pm 0.1	1.53 \pm 0.07	41.8 \pm 0.7	0.64 \pm 0.04	41.4 \pm 6.2	34.2 \pm 4.5
백 - OKT3 (n=2)	1.15	1.15	6.2 \pm 0.2	85.9 \pm 0.2	98.5 \pm 0.1	2.08 \pm 0.06	57.0 \pm 0.8	1.19 \pm 0.02	23.5 \pm 2.1	6.8 \pm 1.4
Cocoon - Dynabead (n=4)	1.15	0.46	41.3 \pm 2.0	55.1 \pm 2.5	96.5 \pm 1.0	2.14 \pm 0.08	64.6 \pm 5.8	1.39 \pm 0.13	53.1 \pm 4.8	30.1 \pm 6.9
Cocoon - OKT3 (n=2)	1.15	0.46	11.0 \pm 2.1	83.2 \pm 1.8	97.6 \pm 0.7	2.55 \pm 0.10	65.1 \pm 2.4	1.66 \pm 0.00	31.7 \pm 3.3	12.6 \pm 1.5

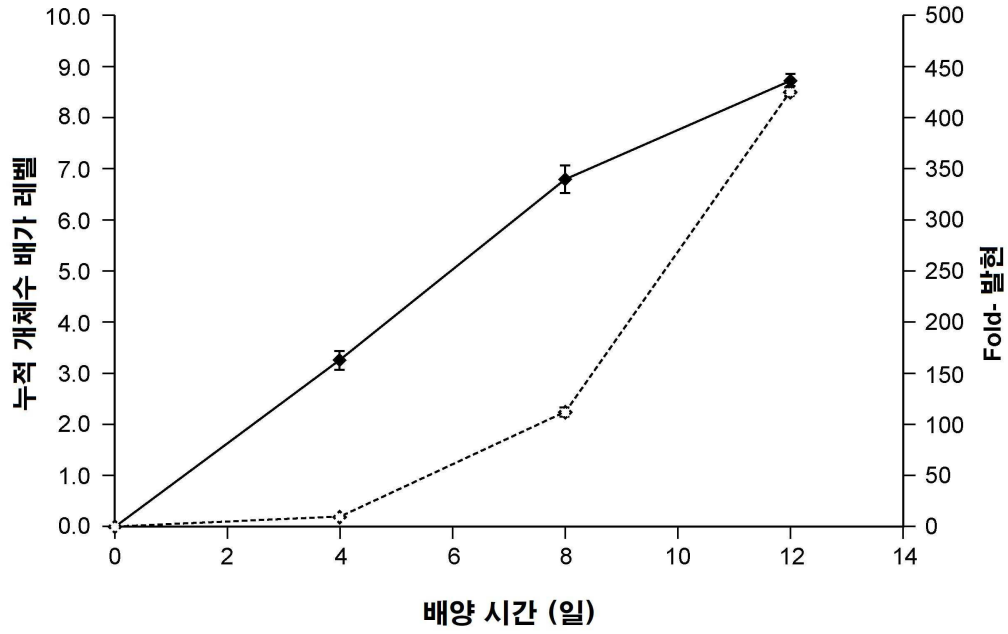
도면17



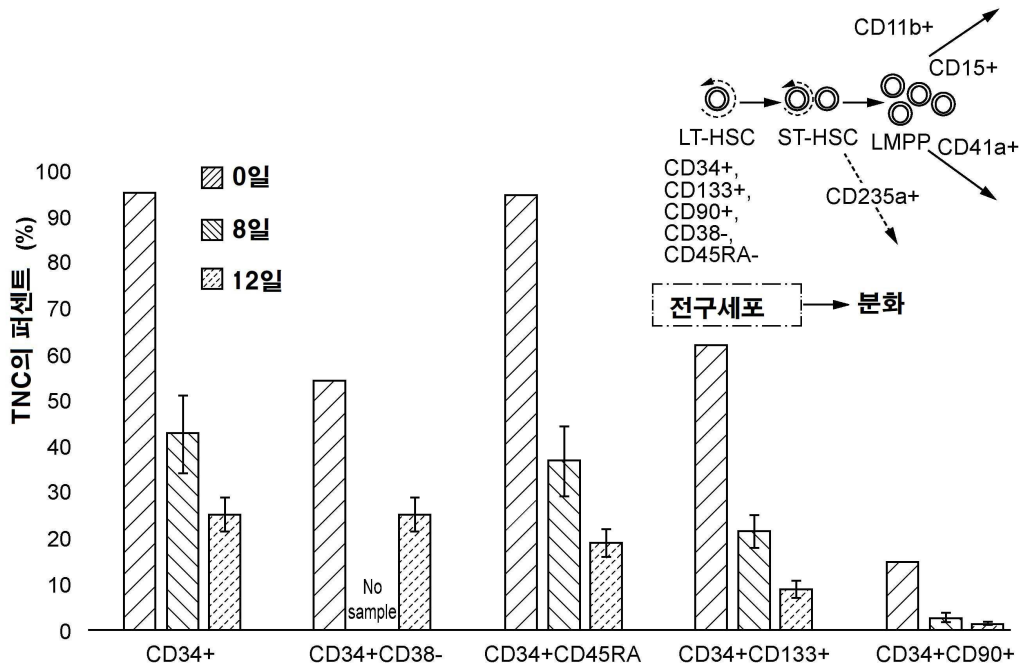
도면18



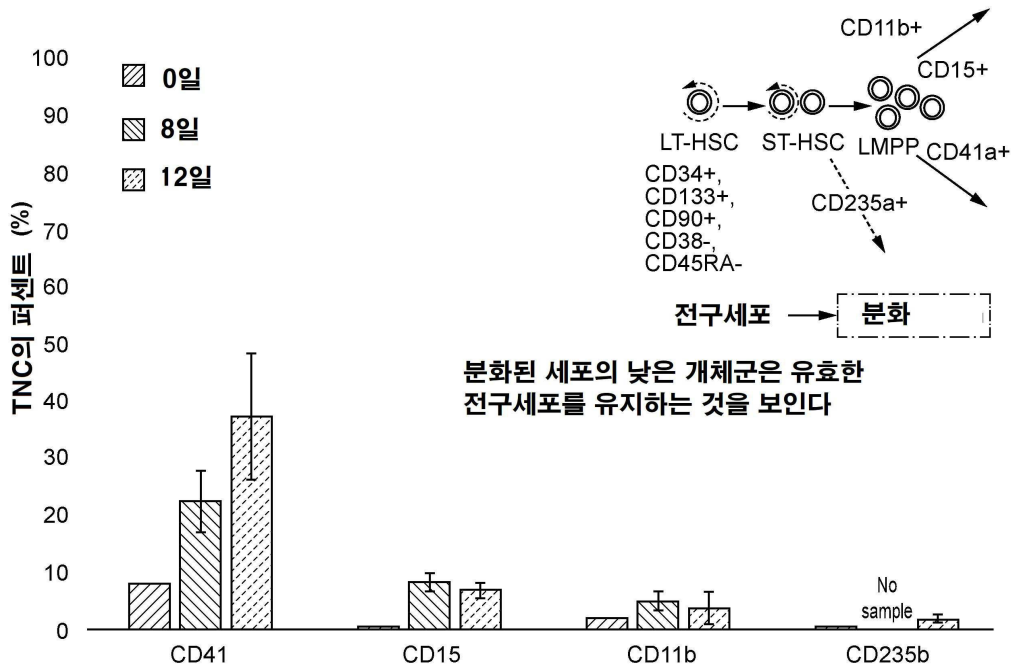
도면19



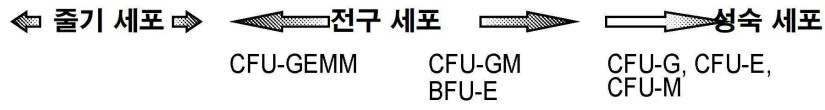
도면20



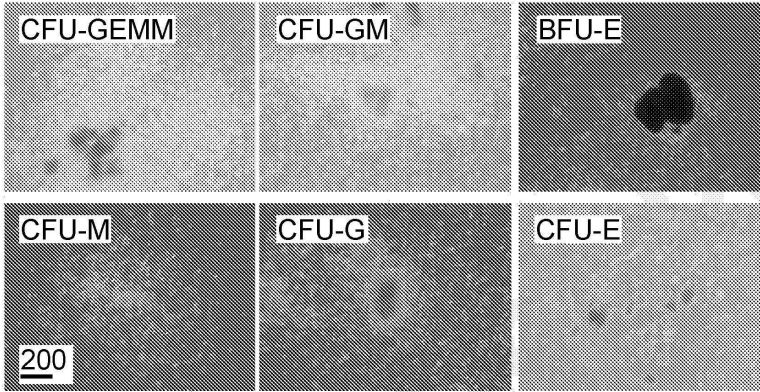
도면21



도면22



확장되지 않은 개체군의 분화 능력



확장된 개체군의 분화 능력

