



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0097457  
(43) 공개일자 2022년07월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6881 (2018.01) C12N 15/85 (2006.01)  
C12N 5/0783 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6881 (2018.05)  
C12N 15/85 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7018733
- (22) 출원일자(국제) 2020년11월10일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/059818
- (87) 국제공개번호 WO 2021/096850  
국제공개일자 2021년05월20일
- (30) 우선권주장  
62/933,575 2019년11월11일 미국(US)

- (71) 출원인  
론자 위커스빌 아이엔씨.  
미합중국 21793 메릴랜드주, 위커스빌, 빅스 포드 로드 8830
- (72) 발명자  
휴이트, 매튜  
미합중국 21793 메릴랜드주, 위커스빌, 빅스 포드 로드 8830  
아브라함 에이탄  
미합중국 21793 메릴랜드주, 위커스빌, 빅스 포드 로드 8830  
오스트라우트, 니콜라스  
미합중국 21793 메릴랜드주, 위커스빌, 빅스 포드 로드 8830
- (74) 대리인  
황이남

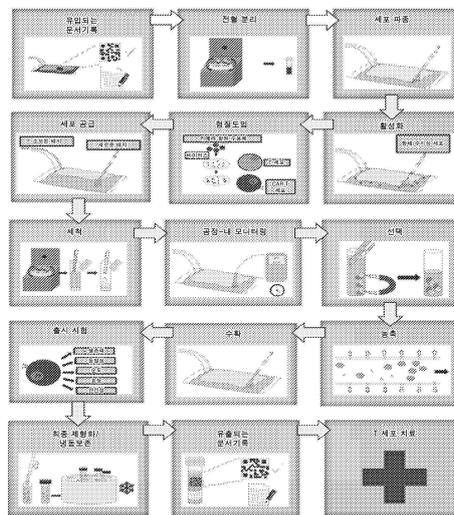
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 자동화된 세포 처리를 위한 품질 관리 방법

(57) 요약

본 개시내용은 자동화된 세포 공학 시스템에서 생산되는 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 공정 매개변수에 피드백을 제공하도록 자동화된 공정 전에, 중에 및 후에 세포의 분자 특성을 모니터링하는 것을 적절히 포함한다. 실시양태에서, 생산되는 세포는 카메라 항원 수용체(CAR) T-세포이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0636** (2013.01)

**G01N 33/5005** (2013.01)

C12N 2501/51 (2013.01)

C12N 2501/515 (2013.01)

C12N 2502/1157 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (a) 사전 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계;
- (b) 자동화된 세포 공학 시스템을 통해 세포 배양물을 유전자 변형시키는 단계;
- (c) 상기 유전자 변형 중에 그리고 후에 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및
- (d) 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 하나 이상의 분자 특성이 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 세포 배양물이 면역 세포 배양물, 자연 살해 세포 배양물, 및 신경퇴행성 치료용 세포 배양물인 방법.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 면역 세포 배양물이 T-세포 배양물인 방법.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, T-세포 배양물이 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물인 방법.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 하나 이상의 분자 특성이 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성을 포함하는 방법.

#### 청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, (d)에서의 상기 최적화 단계가 상기 유전자 변형 단계 전에, 중에 및/또는 후에 일어나는 방법.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 최적화 단계가 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 확장의 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 9

- (a) 사전 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계;
- (b) 사전 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성이 변경되도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계;
- (c) 사전-변형된 세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 세포 배양물을 생산하는 단계;
- (d) 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터를 사용하여 형질도입하여, 형질도입된 세포 배양물을 생산하는 단계;

- (e) 형질도입된 세포 배양물을 확장시키는 단계;
- (f) (e)의 확장된 세포 배양물을 농축하는 단계;
- (g) (f)의 농축된 세포 배양물을 수확하여 유전자 변형된 세포 배양물을 생산하는 단계;
- (h) 단계 (c) 내지 (g) 중 어느 하나 중에 또는 후에 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및
- (i) 단계 (c) 내지 (g) 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법.

**청구항 10**

청구항 9에 있어서, 상기 하나 이상의 분자 특성이 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 11**

청구항 9 또는 청구항 10에 있어서, 상기 세포 배양물이 면역 세포 배양물, 자연 살해 세포 배양물, 및 신경퇴행성 치료용 세포 배양물인 방법.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, 상기 면역 세포 배양물이 T-세포 배양물인 방법.

**청구항 13**

청구항 12에 있어서, T-세포 배양물이 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물인 방법.

**청구항 14**

청구항 13에 있어서, 상기 하나 이상의 분자 특성이 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성을 포함하는 방법.

**청구항 15**

청구항 9 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 최적화 단계가 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 확장의 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함하는 방법.

**청구항 16**

- (a) 사전 변형된 T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계;
- (b) 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, 사전 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계;
- (c) 사전-변형된 세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 세포 배양물을 생산하는 단계;
- (d) 활성화된 T-면역 세포 배양물을 키메라 항원 수용체를 암호화하는 벡터를 사용하여 형질도입하여 CAR T-세포 배양물을 생산하는 단계;
- (e) CAR T-세포 배양물을 확장하는 단계;
- (f) (e)의 확장된 CAR T-세포 배양물을 농축하는 단계;
- (g) (f)의 농축된 CAR T-세포 배양물을 수확하는 단계;
- (h) 단계 (c) 내지 (g) 중 어느 하나 중에 또는 후에 CAR T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및
- (i) 단계 (c) 내지 (g) 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, CAR T-세포 배양물의 하나 이상의

분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서, 상기 방법이 적어도 약 1억 개의 생존가능한 CAR T-세포를 생산하는 방법.

**청구항 18**

청구항 16에 있어서, 상기 방법이 적어도 약 20억 개의 생존가능한 CAR T-세포를 생산하는 방법.

**청구항 19**

청구항 16 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T-세포 배양물이 말초 혈액 단핵 세포 및/또는 정제된 T-세포를 포함하는 방법.

**청구항 20**

청구항 16 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T-세포 배양물이 적어도 하나의 보조 세포를 포함하는 방법.

**청구항 21**

청구항 20에 있어서, 상기 보조 세포가 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함하는 방법.

**청구항 22**

청구항 20에 있어서, 상기 보조 세포가 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한 T-세포 수용체에 대한 항원을 포함하는 방법.

**청구항 23**

청구항 16 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성화 시약이 항체 또는 수지상 세포를 포함하는 방법.

**청구항 24**

청구항 23에 있어서, 상기 항체가 표면 상에 고정되는, 방법.

**청구항 25**

청구항 24에 있어서, 상기 표면이 비드의 표면인 방법.

**청구항 26**

청구항 23에 있어서, 상기 항체가 가용성 항체인 방법.

**청구항 27**

청구항 23항에 있어서, 상기 항체가 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함하는 방법.

**청구항 28**

청구항 16 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질도입이 바이러스 감염, 전기천공, 막 파괴, 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.

**청구항 29**

청구항 16 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터가 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스인 방법.

**청구항 30**

청구항 16 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 분자 특성이 T-세포 활성화, 대사, 고갈, 및 T-세포 수용체 다양성을 포함하는 방법.

**청구항 31**

청구항 16 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 분자 특성이 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 32**

청구항 31에 있어서, 적어도 약 500개의 유전자 발현이 결정되는 방법.

**청구항 33**

청구항 31에 있어서, 적어도 약 700개의 유전자 발현이 결정되는 방법.

**청구항 34**

청구항 31에 있어서, 약 780개의 유전자 발현이 결정되는 방법.

**청구항 35**

청구항 16 내지 청구항 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 최적화 단계가 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 확장의 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함하는 방법.

**청구항 36**

- (a) 사전 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계;
- (b) 자동화된 세포 공학 시스템을 통해 세포 배양물을 유전자 변형시키는 단계;
- (c) 상기 유전자 변형 중 및 후에 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및
- (d) 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 세포 배양물의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시내용은 자동화된 세포 공학 시스템에서 생산되는 세포 기반 치료(cell-based therapy)의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 공정 매개변수에 피드백을 제공하도록 자동화된 공정 전에, 중에 그리고 후에 세포의 분자 특성을 모니터링하는 것을 적절히 포함한다. 실시양태에서, 생산되는 세포는 키메라 항원 수용체(CAR) T-세포이다.

**배경 기술**

[0002] 발전된 세포 치료의 임상적 채택이 가속화될 것으로 예상됨에 따라, 이러한 치료가 전 세계적으로 환자에게 혜택을 줄 수 있을 근본적인 제조 전략에 더 많은 관심이 집중되고 있다. 세포 치료는 임상적으로 큰 가능성을 갖고 있지만, 보상(reimbursement)에 비해 높은 제조 비용은 상용화에 막대한 장애물을 제시한다. 따라서, 비용 효율성, 공정 효율성 및 제품 일관성에 대한 요구가 수많은 세포 치료 분야, 및 특히 T-세포 면역요법에서 자동화를 위한 노력을 주도하고 있다(예를 들어, Wang 2016을 참고).

**발명의 내용**

[0003] 그러나, 자가 세포 치료의 광범위한 채택을 막고 제조 실패를 유발하는 중대한 과제(challenge)가 남아있다. 시작 세포 물질이 종종 환자에게서 유래하기 때문에, 이것은 추가 수준의 복잡성 및 변동성의 원인을 나타낸다. 현재 세포 치료로 치료된 많은 환자에게서는 질병이 진행되었고 여러 번 재발하고 여러 다른 치료에 반응하지

않는다. 결과적으로, 환자가 이러한 세포 치료로부터 혜택을 받을 수 있는 치료 범위가 좁아서, 정확하고 신뢰할 수 있는 제조 공정이 필요하다.

[0004] 세포 치료 제품을 제조한 후에, 제품을 환자에게 투여할 수 있기까지 추가적인 지연, 주로 현재 느리고 비용이 많이 드는 많은 규제 요건과 출시 시험이 있다. 현재의 세포 치료 출시 시험은, 조절자가 환자에게 편안하게 투여할 수 있게 하는데 필요한 정보를 제공하지만 임상 효능을 예측하는 데는 거의 도움이 되지 않는다.

[0005] 세포 기반 치료를 생산하기 위한 자동화된 공정에서는, 개별 환자의 요구, 및 방법 동안의 실시간 변경을 기반으로 공정의 다양한 매개변수를 최적화하고 수정하는 요구가 종종 있다. 본 발명은 적절하게는 자동화된 시스템에서 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법을 제공함으로써 이러한 요구를 충족한다.

[0006] 발명의 요약

[0007] 일부 실시양태에서, 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 자동화된 세포 공학 시스템을 통해 상기 세포 배양물을 유전자 변형시키는 단계; 상기 유전자 변형 중에 그리고 후에 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이 본원에 제공된다.

[0008] 추가 실시양태에서, 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계; 사전-변형된 세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 세포 배양물을 생산하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터를 사용하여 형질도입하여, 형질도입된 세포 배양물을 생산하는 단계; 형질도입된 세포 배양물을 확장하는 단계; (e)의 확장된 세포 배양물을 농축하는 단계; (f)의 농축된 세포 배양물을 수확하여 유전자 변형된 세포 배양물을 생산하는 단계; 단계 (c)-(g) 중 어느 하나 중에 또는 후에 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 단계 (c)-(g) 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이 본원에 제공된다.

[0009] 추가 실시양태에서, 사전-변형된 T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 사전-변형된 T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계; 사전-변형된 T-세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 T-세포 배양물을 생산하는 단계; 활성화된 T-세포 배양물을 키메라 항원 수용체를 암호화하는 벡터를 사용하여 형질도입하여, CAR T-세포 배양물을 생산하는 단계; CAR T-세포 배양물을 확장하는 단계; (e)의 확장된 CAR T-세포 배양물을 농축하는 단계; (f)의 농축된 CAR-T-세포 배양물을 수확하는 단계; 단계 (c)-(g) 중 어느 하나 중에 또는 후에 CAR T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 단계 (c)-(g) 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, CAR T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이 제공된다.

[0010] 또한, 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 자동화된 세포 공학 시스템을 통해 상기 세포 배양물을 유전자 변형시키는 단계; 상기 유전자 변형 중에 그리고 후에 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하여, 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하는 단계를 포함하는, 세포 배양물의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이 본원에 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0011] 도 1은 본원에 설명된 바와 같은 세포 기반 치료를 생산하는 일반화된 제조 공정을 도시한다.
- 도 2는 본원에서의 실시양태에 설명된 바와 같은 예시적인 세포 공학 시스템을 포함하는 실험실 공간을 도시한다.
- 도 3은 본원에서의 실시양태에 설명된 바와 같은 세포 공학 시스템에서 수행될 수 있는 세포 기반 치료 생산 공정을 도시한다.
- 도 4는 자동화된 세포 공학 시스템에 대한 공정 흐름 범례를 도시한다.
- 도 5는 자동화된 세포 공학 시스템의 카세트로부터 샘플을 채취하기 위한 주사기 및 백(bag)의 사용을

도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0012] 본 게시내용은 다양한 세포 기반 치료의 자동화된 생산을 모니터링, 평가 및 최적화하는 방법을 제공한다.
- [0013] 자동화된 세포 처리
- [0014] T-세포 치료와 같은 자가 세포 기반 치료 및 치료법에 대하여, 제조되는 마이크로-로트(로트 당 환자 1명) 배치(batch)는 동종(로트 당 여러 환자) 공정이 이용할 수 있는 규모의 경제가 부족하기 때문에, 비용 효율성, 공정 효율성 및 제품 일관성에 대한 요구가 특히 시급하다(예를 들어, Jones 2012; Trainor 2014 참고). 마이크로-로트에 필요한 더 크고 더 많은 국한된 인력과 시설은 물류, 특히 직원의 가용성 및 교육과 관련하여 수동 생산에 대한 GMP 준수에 관한 상당한 요구를 제기한다. 또한, 작업자 간 기술에서의 변동 가능성은, 출시 기준을 일관되게 충족하고 안전하고 신뢰할 수 있는 제품을 보장하는 데 바람직하지 않은 위험을 초래할 수 있다.
- [0015] 본원에 설명된 대로, 자동화된 제조의 설비 및 포괄적인 검증은 이러한 물류 및 운영 문제에 대한 해결책을 제공한다. 생산 공정에 자동화를 도입하는 중요한 접근법은, "단위 작업"이라고 하는, 작업자가 생산 재료에 물리적 또는 화학적 변화를 적용하는 중요한 모듈 단계를 확인하는 것이다. 세포 제조의 경우에, 이것은 세포 분리, 유전자 조작, 증식, 세척, 농축 및 세포 수확과 같은 단계를 포함한다. 제조업체는 종종 핵심 공정 병목현상을 자동화 도입을 위한 즉각적인 기회로 확인한다. 이것은 개별 공정 단계에 초점을 맞추는 경향이 있는 대부분의 상업적으로 입수가 가능한 생물반응기의 기술적 작업 스펙트럼에 반영된다. 세포 제조에서 공정 과제(무균 유지관에서 샘플 추적까지)는, 일관된 세포 생산량을 생성하는 동시에 불가피한 공정 변동성을 개선하는 종단 간 자동화(end-to-end automation)에 의해 본원에서 해결된다. 본원에 설명된 방법은 또한 단순화를 제공하고, 관련된 전자 기록은 GMP 표준을 준수하는 데 도움준다(예를 들어, Trainor 2014 참고).
- [0016] 단위 작업의 자동화 및 중요한 공정 감도
- [0017] 암 면역요법을 위한 변형된 자가 T-세포를 포함한 다양한 세포 기반 치료의 임상 개발의 최근 급속한 발전으로 인해 관련된 변환 및 규모 확대/축소 관련 계획이 수립되게 되었다.
- [0018] 상이한 세포 기반 치료에 따라 구체적인 프로토콜이 달라질 것이지만, 일반화된 공정이 도 1에 예시되어 있다. 도 1은 예를 들어, 자가 T-세포 치료에 대한 것을 포함한, 환자 혈액 샘플의 초기 처리에서부터 생산되는 세포의 제형화에 이르기까지 세포 기반 치료 제조의 단위 작업을 설명한다.
- [0019] 본원에 설명된 바와 같이, 세포 제조 자동화를 성취하기 위해, 본원에 설명된 방법은 각각의 전환 점에서 세포의 상태 및 세포가 특정 단위 작업에 의해 어떻게 영향을 받는 지를 이해하게 한다. 환자별 치료를 위한 마이크로-로트 생산은, 자동화 가능성에 영향을 미치는 중요한 공정 감도를 존중해야 한다. 본원에 설명된 자동화는 다양한 공정 단계를 성공적으로 포함한다.
- [0020] 아래 표 1은 T-세포 자동화를 포함한 세포 기반 치료 자동화에 대하여 확인된 일부 공정 단계의 과제를 강조하고, 자동화 전략에 대한 감도의 영향을 나타낸다. 모든 단위 작업에 대하여 각 장비 간 세포의 개방 이동은 오염의 위험으로 인해 중요한 감도이다.
- [0021] 자동화 과제 및 혜택

표 1

단위 작업	중요한 공정 단계의 과제	자동화의 이점
분류	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기증자 세포 및 작업자 기술에 따라 매우 가변됨(예를 들어, Nilsson 2008 참고)</li> <li>• 관여 불순물이 성능에 영향을 줄 수 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 표적 시작 집단의 높은 순도</li> <li>• 보다 일관되고 개선된 제품</li> </ul>
세포 파종	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 불균질한 세포 분포는 성장물에서의 가변성을 초래함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 균질한 자동화 파종 전략으로 일관성 및 효능을 개선할 수 있음</li> </ul>
활성화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포와 활성화 시약 사이의 안정적인 접촉</li> <li>• 균일한 활성화 - 균질한 분포</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 자동화된 로딩은 수동 방법으로 일관되게 성취하기 어려울 수 있는 재현가능하게 균질한 분포 및 활성화를 보장할 수 있음</li> </ul>
형질도입	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 효율성은 작업자 처리에 따라 다를 수 있는 세포-바이러스 혼합 정도에 의해 영향을 받을 수 있음</li> <li>• 증가된 노출 시간은 세포에 부정적인 영향을 미칠 수 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 바이러스 첨가 전 부피 감소로 인해 높은 정도의 세포-바이러스 접촉이 가능해짐</li> <li>• 시간 기반 작업으로 인해 시간에 관계없이 세포 이동이 가능함</li> <li>• 폐쇄형 시스템으로 작업자에 대한 위험이 감소함</li> </ul>
전기천공	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 작업자 혼합, 세척 및 농축 기술에 따라 효율성이 달라질 수 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 표준화된 프로토콜은 상류 및 하류 단계가 통합될 때 일관된 결과를 보장함</li> </ul>
공급	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 배지 교환 시기는 세포 성장에 기반한 영양 요건(예를 들어, Bohenkamp 2002 참고) 및 37°C에서 성분 안정성을 고려해야 함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 바이오퍼드백은 공급 계획을 최적화하고(예를 들어, Lu 2013 참고) 및 배지 사용을 최소화할 수 있음</li> <li>• 구성요소는 냉장 온도에서 보관되어 안정성을 연장하고, 사용 전에 자동으로 예열될 수 있음</li> </ul>
선택	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 광범위한 처리 단계로 인해 세포 손실이 발생할 수 있음</li> <li>• 작업자 변동성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 완전 자동화로 일관성 개선됨</li> </ul>
수확	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종 제형화 전에 제거할 무세포 물질(예컨대 세포 분리 비드)(예를 들어, Hollyman 2009 참고)</li> <li>• 수동 피펫팅 가변성이 최종 수율에 영향을 미칠 수 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포는 시간에 관계없이 배양 용기로부터 자동으로 이동됨</li> <li>• 수동 피펫팅보다 개선된 최종 수율 일관성</li> </ul>
세척	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 적극적인 세척은 전단 응력을 유발하거나, 상층액 제거 중 세포 손실을 유발할 수 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 배양 용기를 이동하지 않고 부드러운 세척, 여과 또는 권장법을 사용하여 세포 손실을 줄이고 잔류물을 제거할 수 있음</li> </ul>
농축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포 회수는 흡출 중 작업자에 따라 다를 수 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 자동화된 부피 감소로 작업자 변동성이 감소함</li> <li>• 여과 방법이 또한 세포 손실을 최</li> </ul>

[0022]

	소화함
제형화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품은 잘 혼합되어야 함</li> <li>• 작은 작업 부피는 부피 부정확성의 영향을 확대시킴</li> <li>• 냉동보존제에 장기간 노출되면 생존력이 감소함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 자동화된 혼합은 최종 제형 내 세포의 균질한 분포를 보장함</li> <li>• 자동화된 부피 추가로 수동 피펫팅 오류 또는 변동성의 위험이 제거됨</li> <li>• 자동화 증가로 온도에 민감한 단계에서 변동성이 감소함</li> </ul>

[0023]

[0024]

표 1에 나열된 감도를 중심으로 수동 공정의 자동화를 조정하면 세포 치료의 성능에 대한 성공적인 변환, 유지

관리 또는 개선을 지원할 수 있다.

[0025] 개별 자동화 대 완전 통합 자동화

[0026] 자동화의 가치에 대한 강력한 증거가 있지만(예를 들어, Trainor 2014; Levine 2017 참고), 자동화된 전달과 함께 이러한 자동화 단계를 중단 간 순서로 통합하는 것의 가치와 실용성에 대한 후속 분석이 필요하다. 개별 공정 자동화의 혜택과 중단 간 통합의 혜택에 대해서는 다양한 관점이 있다.

[0027] 개별 자동화에 대한 중요한 혜택은 유연성이다. 이것은 다음 영역과 관련된다:

- [0028] 1) 고유한 공정 작업의 유지관리
- [0029] 2) 개별 단위 작업 검증에 기반한 변환 활동의 가속화
- [0030] 3) 기증자 간 변동성을 수용하기 위해 처리 단계를 수정하는 능력

[0031] 증가된 유연성과 관련된 첫 번째 요점은, 작업자에게 더 많은 공정 제어를 제공한다. 이것은, 공정이 최종 제품에 영향을 줄 수 있는 매우 민감한 단계를 갖는 상황에서 중요하다. 올인원 시스템으로 전환하면 제품 결과에 영향을 미치는 제약조건이 부과될 수 있다. 개별 접근방식은 각 단계를 수행하는 방법을 선택하는 유연성을 제공한다. 이는 매우 민감한 단위 작업에서는 특히 중요할 수 있다. 개별 접근법은 또한 수동 처리로부터 자동화로 점진적으로 변환될 수 있게 하고, 이는 각 단위 작업이 독립적으로 시험될 수 있다면 동등성을 입증하는 데 도움을 준다. 또한, 특정 단위 작업을 자동화하면 세포 성능을 기반으로 결정을 내릴 수 있는 유연성을 제공한다. 예를 들어, 세포가 빠르게 성장하는 경우에, 하나의 세포 배양 백으로부터 2개로 확장해야 할 필요가 있을 수 있다. 마지막으로, 개별 시스템을 사용한 자동화에 대한 접근법은 또한 그룹이 각 단위 작업에 어느 장비를 사용할 지를 선택할 수 있게 한다.

[0032] 장비 활용도는 개별 자동화에 대한 또 다른 논쟁이다. 다른 것들보다 훨씬 더 많은 시간이 필요한 일부 단위 작업이 있을 수 있다. 중단 간 처리 시스템(end-to-end processing system)은 단일 시스템에서 모든 여러 단위 작업을 실행해야 하므로, 배양 과정이 지속되는 동안 장비를 점유해야 한다.

[0033] 개별 자동화에는 혜택이 있지만, 중단 간 접근법은 상이한 그러나 덜 강력하지 않은 혜택을 제공한다. 첫째, 완전히 통합된 시스템은 오염 위험을 크게 감소시킨다. 개별 접근법을 사용하면 출하(handling)가 증가되어야 하므로, 작업자 개입으로 인한 제품 변동성의 위험(chance)이 커진다. 둘째, 앞서 언급한 바와 같이, 이것은 필연적으로 높은 인건비로 이어진다.

[0034] 개별 접근법에 의해 제공된 유연성이 중요하다. 제품을 규정하는 데 있어 공정이 중요한 상황에서, 중단 간 시스템은 고유한 감도를 통합하는 유연성을 가져야 한다. 이것은 특정 공급 전략, 산소 수준, 표면 처리 등을 포함할 수 있다. 이러한 접근법은 소프트웨어와 일회용 구성요소 둘 모두에서 유연성이 필요하다. 시스템은 특정 단위 작업이 제품 사양 체크포인트를 충족하는 지 확인하기 위해 공정의 다양한 지점에서 세포 및 배지 샘플을 추출하는 옵션을 제공해야 한다. 수정이 필요한 경우에, 소프트웨어는 이상적인 조건을 제공하도록 이러한 변경을 구현할 수 있어야 한다. 사용하기 쉽고 유연한 소프트웨어가 변환 목적에 매우 유익하지만, 임상 표준(FDA 21 CFR Part 11)을 준수하기 위해 소프트웨어는 쉽게 잠겨질 수 있음이 중요하다. 일단 잠겨지면, 작업자가 프로토콜을 변경할 수 있는 능력이 제한되어야 한다. 그러나, 고유한 기증자-가변성 문제를 해결하기 위해서는, 세포 성장률을 기반으로 검증된 프로토콜의 범위로부터 선택할 옵션이 있어야 한다. 예를 들어, 세포가 빠르게 성장하는 경우에, 시스템은 이것에 대응하고 그에 따라 공급 또는 수확 시점을 조정할 수 있어야 한다.

[0035] 개별 자동화에 대한 중단 간 통합의 선택은 또한 임상 과정에 대한 장기적인 비전에 의존한다. 단일 올인원 시스템은 훨씬 더 큰 공간 효율성을 제공하여 값비싼 GMP 클린룸에서 필요한 공간을 최소화할 수 있다. 예를 들어, 도 2에 도시된 바와 같이, 완전히 통합된 자동화 시스템은 필요한 공간을 최대화하여 값비싼 GMP 클린룸 공간을 줄이도록 설계된다. 도 2는 표준 실험실 공간에서 실행되는 96개의 환자별 중단 간 유닛을 도시한다.

[0036] 단일 시스템은 또한 더욱 용이한 데이터 추적을 제공하는 반면, 개별 시스템은 모든 전자 데이터 파일을 함께 연결하는 호환 소프트웨어를 제공하지 않을 수 있다. VINETI(Vineti Ltd) 및 TRAKCEL(TrakCel Ltd)과 같은 소프트웨어 플랫폼을 사용하면 공급망 물류의 전자적 모니터링 및 구성이 가능해진다. 그러나, 단일 올인원 배양 시스템은, 각 단위 작업과 관련된 처리 사건 및 생물모니터링 배양 조건 둘 모두의 이력을 배치 기록(batch record)에 통합함으로써 더 나아갈 수 있다. 따라서, 중단 간 통합의 혜택은 상당한 경쟁적 우위를 제공한다.

[0037] 단위 작업의 통합을 위한 상용 플랫폼

- [0038] 다수의 자가 세포 치료, 특히 혈액 기반 암에 대한 면역 치료에서 임상 시험 성공은 예상된 임상 수요를 충족하기 위해 새로운 임상 프로토콜을 강력한 생산 플랫폼으로 변환할 수 있음의 중요성을 강조했다(예를 들어, Levine 2017; Locke 2017 참고). 자가 치료에 대하여, 각 환자별 세포 치료를 처리하는 것은 포괄적인 제조 활동 및 작업 관리를 적절히 사용한다. 본원에서의 방법은 공정 최적화, 보안 및 경제성을 성취하기 위해 턴키(turnkey) 자동화 시스템에서 단위 작업을 연결한다.
- [0039] 자가 공정을 설계함에 있어 과제는 두 가지이다. 첫째, 물리적으로 분리되고 최적화된 장비에서 별도의 처리 단계가 일어날 수 있는 동종 제조와 달리, 확장된 자가 플랫폼은 단일의 폐쇄되고 독립된 자동화 환경에서 필요한 모든 단계를 적절히 수행한다. 둘째, 알려진 품질 및 예측가능한 공정 거동을 가진, 모든 실행이 세포 은행으로부터의 고품질 바이알을 사용하여 이론적으로 시작하는 동종 공정과는 달리, 자가 공정에서의 시작 물질은 매우 가변적이며 건강이 손상된 개체로부터 일반적으로 비롯된다.
- [0040] 따라서, 물리적 교반, pH, 공급 및 가스 취급과 같은 인자를 제어함으로써 배양 조건을 감지하고 이에 따라 정교한 생물반응기로서 반응할 수 있는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 자가 치료와 관련된 기술 이전은 동종 치료와 비교하여 현저히 상이한 과제가 있다. 자가 제품은 제조 공정과 환자 치료 사이의 안정성에 대하여 더 큰 제한을 가질 수 있다. 장소는 단일 센터가 아니라 전 세계에 위치할 수 있다. 잠겨진(예를 들어, 완전히 밀폐된) 울인원 시스템을 사용하면 장소 간 기술 이전 과정이 크게 개선된다.
- [0041] 공급원 가변성을 제거할 수는 없지만, 자동화는 표준화 및 재현성을 통해 최종 자가 제품의 가변성을 제거하는데 도움을 준다. 이 실시는 활성 세포 배양물의 상태를 모니터링하는 바이오센서를 통해 세포 성능 기준점을 얻도록 주요 세포 시스템 제공업체에 의해 채택된다. 중단 간 통합에서, 공정 내 임의의 특정 단계로부터의 출력은 공정의 향후 진행을 위해 허용가능한 매개변수 내에 있어야 한다.
- [0042] 본원에 설명된 대로, 실시양태에서, 제공된 방법은 단일 턴키 플랫폼에서 다중 단위 작업을 통합하는 COCOON 플랫폼(Octane Biotech(Kingston, ON))을 사용한다. 다중 세포 프로토콜에는 매우 구체적인 세포 처리 목표가 제공된다. 효율적이고 효과적인 자동화 변환을 제공하기 위해, 설명된 방법은 여러 단위 작업을 조합하는 적용별(application-specific)/후원자별 일회용 카세트의 구상을 사용한다 - 모두는 최종 세포 치료 제품의 핵심 요건에 집중하였다.
- [0043] 본원에 설명된 방법은 완전히 통합되고 폐쇄된 자동화 시스템에서 (활성화, 바이러스 형질도입 및 확장, 농축 및 세척을 포함한) CAR T-세포를 포함한 다양한 세포 기반 치료를 확장하는 데 사용되었다(도 3).
- [0044] 자동화 이점
- [0045] 세포 치료 생산에서 단위 작업의 자동화는 동종 및 자가 세포 치료 적용에 걸친 보편적인 혜택에 대한 기회를 제공한다. 환자별, 자가 세포 제품, 및 이러한 치료의 최근의 임상 성공으로 훨씬 더 강조되는 고유한 시나리오에서, 자동화 이점은 GMP 준수하는 소규모 배치의 상당한 마이크로-로트 복잡성, 경제성, 환자 추적성 및 공정 편차의 조기 확인으로 인해 특히 강력하다. 복잡한 제조 프로토콜의 관련된 출현은, 마이크로-로트 세포 생산에서 자동화된 단위 작업의 중단 간 통합의 가치가 중요한 연구의 포인트가 아니었다는 사실에 주목한다. 그러나, 임박한 승인에 따른 이러한 치료에 대한 예상된 수요는, 완전히 폐쇄된 중단 간 시스템의 구현이 실습 시간 및 공간과 같은 제조 병목현상에 훨씬 더 필요한 해결책을 제공할 수 있음을 나타낸다.
- [0046] 고급 치료의 개발자는 임상 변환의 몰아웃 및 임상 시험 프로토콜의 확장 초기에 자동화를 고려하도록 권장된다. 초기 자동화는 프로토콜 개발에 영향을 미치고, 나중 단계에서 수동 공정에서부터 자동화된 공정으로 전환하는 경우에 비교가능성 연구에 대한 필요를 회피하고, 장기적 상업화 경로에 대한 더욱 큰 이해를 제공할 수 있다.
- [0047] CAR T-세포를 포함한 세포 기반 치료를 생산하기 위한 자동화된 시스템의 품질 조절
- [0048] 본원에 설명된 대로, 다양한 세포 기반 치료의 자동화된 생산을 모니터링하고, 평가하고 최적화하는 방법이 제공된다. 본원에 설명된 방법은 자동화 공정 전, 도중 및 후의 상이한 시간에서 다양한 분자 특성을 모니터링하고, 생산량을 최적화하도록 자동화된 시스템의 다양한 매개변수를 변경 및 조정하는 것을 포함한다. 이러한 최적화는, 특정한 치료 또는 심지어는 개별 환자에 대한 원하는 세포 수, 농도 또는 특성을 기반으로 할 수 있다.
- [0049] 따라서, 실시양태에서, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이 본원에 제공된다. 본원에 사용된 "평가하는"은, 방법에 대한 임의의 변화를 안내하는 것을 돕도록 세포의 분자적 특성을 포함한 세포의 하나 이상의 특성을 측정하거나 결정하는 행위를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 "최적화하는"은, 본원에 설명된

자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 수정하는 것을 지칭한다. 본원에 사용된 "세포 품질"은, 세포가 세포 기반 치료에서 원하는 대로 효과를 나타내게 하는 데 필요한 특성을 지칭한다. 이 품질은 막 무결성, 핵 무결성, 원하는 유전자 프로파일, 원하는 단백질 프로파일, 원하는 세포 수명, 원하는 세포 수 또는 밀도 등을 포함한다.

- [0050] 본원에 사용된 "세포 기반 치료(cell-based therapy)"는, 세포 물질을 환자에게 주사, 이식하거나 심는 치료를 지칭한다. 세포 기반 치료는 온전한 살아있는 세포를 적절히 포함한다. 세포 기반 치료는 면역 세포, 자연 살해 세포, 신경퇴행성 치료용 세포, 및 줄기세포와 같은 다양한 유형의 세포를 포함한다. 본원에 설명된 방법은 일반적으로 세포 기반 치료 또는 세포 배양물에 사용된 임의의 세포 유형에 대하여 적절히 사용될 수 있고, 이는 바이러스 벡터 또는 단백질 발현과 같은 생물학적 생산을 위한 세포 배양 및 조직 공학 적용을 포함할 수 있다.
- [0051] 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법은 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 것을 적절히 포함한다. 본원에 사용된 "분자 특성"은, 세포의 유전자 프로파일(예를 들어, 유전자 발현 프로파일), 아미노산 또는 단백질 프로파일(예를 들어, 세포 내에서 또는 세포 표면 상에서 발현된 단백질), 지질 프로파일 등의 하나 이상을 포함한다. 본원에 사용된 "세포 배양물"은, 본원에 설명된 자동화 방법에 사용하기 위한 단일 세포 뿐만 아니라 세포 집합체를 지칭한다.
- [0052] 상기 방법은 사전 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 것으로 적절히 시작된다. 이것은 본원에 설명된 자동화된 세포 공학 시스템에 아직 배치되지 않은 세포 배양물이다. 사전 변형된 세포 배양물은 환자로부터 직접 채취한 세포(예를 들어, 채혈 또는 혈장 샘플) 뿐만 아니라, 환자로부터 제거되고 일부 여과, 선택 또는 기타 변형을 거쳐 본원에 설명된 자동화된 세포 공학 시스템에서 변형될 원하는 세포 배양 집단에 도달한 세포를 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 방법은 자동화된 세포 공학 시스템을 통해 세포 배양물을 유전자 변형시키는 것을 적절히 포함한다. 본원에 사용된 "유전자 변형시키는"은, 하나 이상의 유전자를 (예를 들어, 형질도입을 통해) 세포 내로 도입하여 세포의 게놈을 적절히 변형시키는 것을 포함한다. 유전자 변형은 또한 게놈에 통합되지 않는 일시적 변형을 포함할 수 있다. 세포 배양물을 유전자 변형시키는 방법은 본원에 설명되어 있고, 세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여 활성화된 면역 세포 배양물을 생산하고, 활성화된 세포 배양물을 (예를 들어, 벡터를 사용하여) 형질도입하여 형질도입된 세포 배양물을 생산하고, 형질도입된 면역 세포 배양물을 확장하는 것을 적절히 포함한다(예를 들어, 도 1 및 3 참고). 세포 배양물을 제조, 활성화, 형질도입 및 확장하는 방법이 본원에 설명된다.
- [0054] 예시적인 실시양태에서, 세포 품질을 적절히 평가하고 최적화하는 방법은 유전자 변형 중에 그리고 후에 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 즉, 활성화, 형질도입 및/또는 확장 중 어느 하나 중의 임의의 시점에서 세포 배양물은 평가될 수 있고, 적절하게는 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성이 결정된다. 이 샘플링 및 평가는 자동화된 처리 중에 뿐만 아니라, 자동화된 처리 후의 다양한 지점에서 세포 배양물의 특성에 대한 데이터를 제공하므로, 자동화의 각 단계에서 하나 이상의 분자 특성을 추적할 수 있다.
- [0055] 세포 품질을 적절히 평가하고 최적화하는 방법은 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 것을 추가로 포함한다. 본원에 설명된 바와 같이, 최적화될 수 있는 자동화된 세포 공학 시스템의 매개변수는 처리 매개변수(예를 들어, pH, 온도, 열) 뿐만 아니라, 활성화, 형질도입 및 확장, 세포 선택 등의 품질 및 지속시간을 포함한다.
- [0056] 예시적인 실시양태에서, 상기 하나 이상의 분자 특성은 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이 중 하나 이상을 포함한다.
- [0057] 적절하게는, 상기 분자 특성은 세포 기반 치료 및/또는 세포 배양물의 RNA, DNA 및/또는 단백질 표적의 다중 분석을 위한 하나 이상의 방법에 의해 결정된다. 예시적인 다중 분석 도구는 다양한 어레이, 바코드 기술, 차세대 시퀀싱 접근법, 정량적 PCR 등을 포함한다.
- [0058] 예시적인 실시양태에서, 상기 분자 특성은 NANOSTRING®(Seattle, WA)에 의해 개발된 분자 바코드 접근법 NCOUNTER®와 같은 접근법을 사용하여 결정될 수 있다. 상기 분자 바코드 접근법은 원하는 표적(예를 들어, 핵산(RNA, DNA), 단백질 또는 펩티드)에 결합하도록 설계된 고유한 포획 프로브를 사용한다. 바코드(예를 들어, 형광 기반, 색상 기반, 또는 방사성 기반 태그)를 포함하는 리포터 프로브가 포획 프로브에 결합한다. 샘플이 정제되고 고정화된 다음, 바코드화된 표적 분자가 계수되고 분석된다. 예를 들어, 개시내용 전체가 본원에 참고

로 편입되는 문헌[Geiss, *et al*, "Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs", *Nat. Biotechnol.* 26:317-325 (2008)]을 참고한다.

- [0059] 본원에 설명된 바와 같이, 본원에 설명된 자동화된 세포 공학 시스템에서 사용될 수 있는 세포 배양물은 면역 세포 배양물, 자연 살해 세포 배양물, 및 신경퇴행성 치료용 세포 배양물을 포함한다.
- [0060] 예시적인 실시양태에서, 면역 세포 배양물은 T-세포 배양물이고, 실시양태에서 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물이다. 키메라 항원 수용체 T 세포 또는 "CAR T 세포"는, 암 세포를 보다 특이적으로 표적화하도록 키메라 항원 수용체(CAR)를 사용하여 변형되는 T 세포이다. 일반적으로, CAR은 엑토도메인, 막횡단 도메인 및 엔도도메인의 세 부분을 포함한다. 엑토도메인은 세포외액에 노출되는 수용체의 영역이며, 신호전달 펩티드, 항원 인식 영역 및 스페이서의 세 부분을 포함한다. 신호전달 펩티드는 초기 단백질을 소포체로 보낸다. CAR에서 신호전달 펩티드는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다. scFv는 짧은 링커 펩티드로 연결된 경쇄( $V_L$ ) 및 중쇄( $V_H$ )의 면역글로빈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 링커는 글리신 및 세린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 링커는 글루타메이트 및 라이신을 포함한다.
- [0061] CAR의 막횡단 도메인은 막을 가로지르는 소수성  $\alpha$ -나선이다. 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인이다. 일부 실시양태에서, CD28 막횡단 도메인은 고도로 발현된 CAR을 생성시킨다. 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD3- $\xi$  막횡단 도메인이다. 일부 실시양태에서, CD3- $\xi$  막횡단 도메인은 천연 T 세포 수용체로 통합되는 CAR을 생성시킨다.
- [0062] CAR의 엔도도메인은 수용체의 "기능적" 말단으로 일반적으로 간주된다. 엑토도메인의 항원 인식 영역에 의한 항원 인식 후에, CAR은 클러스터링되고 신호가 세포로 전달된다. 일부 실시양태에서, 엔도도메인은 3개의 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 CD3- $\xi$  엔도도메인이다. 이 경우에, ITAM은 항원 결합 후에 T 세포에 활성화 신호를 전달하여 T 세포 면역 반응을 유발한다.
- [0063] CAR T 세포를 생산하는 동안, 인간 대상체로부터 T 세포가 제거되고, 유전자 변형되고, 환자에게 다시 도입되어 암 세포를 공격한다. CAR T 세포는 환자 자신의 혈액(자가)으로부터 유래할 수 있거나, 또 다른 건강한 기증자(동종)로부터 유래할 수 있다. 일반적으로 CAR T 세포는 건강한 세포에서는 발현되지 않는 종양에 발현된 항원에 대하여 특이적이도록 개발된다.
- [0064] 예시적인 실시양태에서, 상기 하나 이상의 분자 특성은 CAR T 세포의 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이 중 하나 이상을 포함한다. 추가 실시양태에서, 상기 하나 이상의 분자 특성은 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성과 관련된다.
- [0065] 적절하게는, 상기 분자 특성은 CAR T 특성규명 패널과 함께 NANOSTRING®(Seattle, WA)에 의해 개발된 분자 바코드 접근법 NCOUNTER®를 사용하여 결정된다. CAR T 특성규명 패널의 예시적인 특성은 약 700개, 약 750개, 약 760개, 약 770개, 약 780개, 약 790개, 약 800개 또는 약 850개의 인간 유전자를 포함한 약 500-1000개 유전자, 적절하게는 약 700-800개 유전자의 발현을 검토하는 능력을 포함한다. 유전자는 T 세포 활성화, 대사, 고갈, TCR 수용체 다양성 및 이식유전자 발현을 포함한 CAR T 세포 생물학의 8가지 구성요소를 포함한다.
- [0066] 분자 특성은 최대 6로그의 동적 범위를 사용하여 분자를 직접 디지털 검출할 수 있는 비효소, 비증폭 바코드화된 기술(예를 들어, NCOUNTER®)을 사용하여 적절히 결정된다. 단지 15분의 총 실험 시간과 24시간 미만에서의 데이터를 사용하는 경우에, 워크플로(workflow)는 차세대 시퀀싱(NGS) 또는 정량적 PCR(qPCR) 접근법과 비교할 때 생산성에서의 증가를 제공한다. 이 둘 모두는 몇 일에서 몇 주가 더 걸릴 수 있으며, 라이브러리 제조, DNA 합성 및 증폭을 포함할 수 있고, 이것들 모두는 추가 실험 시간, 잠재적인 사용자 오류, 및 효소의 사용을 통해 도입된 재현성 과제를 필요로 한다. 바코드화된 기술로부터 생성된 데이터는 분자를 직접 계수하고, 전문 생물정보학자가 필요하지 않으며, 다양한 분석 소프트웨어를 통해 또는 기타 맞춤형 보고서를 통해 간단한 분석 시각화 및 보고서로 수정될 수 있다.
- [0067] nCounter 플랫폼에서 유전자 발현을 측정하는 nCounter CAR-T 특성규명 패널은 특성화, 최적화 및 시그니처 개발을 추가로 가능하게 하여 제조에서의 다양한 단계를 프로파일링하고 공정을 보다 잘 제어할 수 있도록 하기 위해 세포 치료 분야에서 특별히 사용하기 위해 만들어졌고, 이는 차례로 세포 치료의 일관되고 재현가능한 제조에 관한 과제를 해결할 수 있다. nCounter CAR T 특성규명 패널은 CAR T 치료 분야에서 8개 주요 센터와 협력하여 만들어졌고 CAR T 작업 흐름 전체에 걸쳐 사용하도록 설계되어, 백혈구 성분채집술, 제조된 제품 및 주입 후 CAR T-세포의 균일하고 강력한 프로파일링을 가능하게 한다. 맞춤형 780 유전자 발현 패널은, 이식유전자 발현 측정을 위한 선택적인 맞춤화와 함께, T 세포 활성화, 대사, 고갈 및 TCR 수용체 다양성을 포함한 CAR T 세포

포 생물학의 8가지 필수 구성요소를 측정하기 위한 콘텐츠를 통합하고 있다.

[0068] 다음 표는 CAR T 특성규명 패널로부터 얻을 수 있는 예시적인 정보를 제공한다(nanostring.com; car-t-characterization panel 참고):

CAR-T 생물학	설명	경로 또는 과정
표현형	사이토카인, 및 이것의 활성을 유지, 촉진 및 조절하는 경로.	Notch, Wnt 신호전달, Tfh, TGF-베타, Th1, Th17, Th2, Th9, Treg, 선천성 T 세포, 비타민 A (RA) 신호전달
세포 유형	오염되는 세포 유형의 확인.	면역 세포 프로파일링
TCR 다양성	백혈구 성분채집술, 제조 및 주입 후 존재하는 클론의 수.	TCR 함량
활성화	항원에 의해 TCR 복합체에 제시되고 공동자극 분자에 의해 조절됨.	케모카인 신호전달, 공동자극 분자, 인터루킨 신호전달, TCR 신호전달, JAK-STAT, MAPK 및 PI3K 신호전달, Myc 표적, NFAT, 항원 처리 및 제시, T-세포 활성화 마커
대사	탄수화물 및 지방산 대사를 포함한 대사 경로.	해당과정, 미토콘드리아 생합성, 지방산 대사 글루타민 대사, 24시간 주기 시계, 1탄소 대사, 산화적 인산화, mTOR, 세포 주기, 자가포식
지속	T 세포 이동에 참여한 분자	T-세포 이동, T-세포 세포 유형 프로파일링
고갈	T-세포 고갈은 공동자극 분자, 기타 세포-세포 상호작용, 및 세포자멸사를 통한 세포 사멸에 의해 유도될 수 있음.	T-세포 고갈 마커, 세포자멸사, 비림프성 세포와의 상호작용, 공동자극 분자

[0069]

독성	CAR-T 치료의 표적 외 독성에 대한 가능성.	NK 세포 세포독성, MKT 수용체, NF-κB, I형 인터페론 신호전달 II형 인터페론 신호전달, 인터루킨 신호전달, 케모카인 신호전달
----	----------------------------	---

[0070]

[0071] CAR T 특성규명 패널에 포함된 유전자는 다음의 것들을 포함할 수 있다(nanostring.com; car-t-characterization panel 참고):

세포 유형	패널 유전자
B 세포	BLK, CD19, CD20, TNFRSF17
T 세포	CD3D, CD3E, CD3G, CD6, SH2D1A
TH1	TBX21
조절 T 세포 (Treg)	FOXP3
CD8+ T 세포	CD8A, CD8B
고갈된 CD8+ T 세포	CD244, ECM3, CD223
세포독성 세 포	CTSW, GNLY, GZMA, GZMB, GZMH, CD161, CD94, KLRK1,

[0072]

	PRF1
수지상 세포	CCL13, CD209, HSD11B1
대식세포	CD163, CD68, CD84
비만세포	MS4A2, TPSAB1
호중구	CSF3R, CD16, S100A12
자연 살해 (NK) 세포	NKP46, XCL2
NK CD56dim 세포	IL21R, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2

[0073]

[0074]

CAR T 특성규명 패널에 대하여, 샘플 입력은 분류된 T-세포(예를 들어, 유전자 변형 단계 전), CAR-T 세포(예를 들어, 자동화된 공정의 최종 단계 후), CAR-T 제조 제품(예를 들어, 자동화된 공정의 상이한 단계 동안의 세포), 전혈 또는 핵산을 포함할 수 있다.

[0075]

분자 특성으로부터 얻은 정보를 기반으로, 자동화된 공정에서 하나 이상의 최적화가 일어날 수 있다. 이러한 최적화는 자동화된 공정의 유전자 변형 단계 전에, 중에 및/또는 후에 나타날 수 있다.

[0076]

최적화는 세포 배지의 유량(flow rate) 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 팽창의 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0077]

자동화된 공정을 최적화하는 방법은, 분자 특성에 관해 수집된 정보와 함께, 성장 조건(예를 들어, 가스 농도, 배지 조건, 온도, pH, 폐기물 및 영양소 농도 등)에 대한 실시간 수정을 지원하기 위해 자동화된 방법을 시작하기 전에 세포 배양 조건을 최적화하고 다양한 센서 등으로부터의 피드백을 사용하는 것을 포함한다.

[0078]

본원에 설명된 대로, 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하면 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성이 적절히 변경된다. 즉, 자동화된 세포 공학 시스템에 대하여 행해진 변경(예를 들어, 가스 농도, 배지 조건, 온도, pH, 폐기물 및 영양소 농도 등의 변경)은 최적화된 세포 배양물이 개선된 특성을 갖도록 세포 배양물의 분자 특성을 변경시킨다. 이러한 개선된 특성은 예를 들어, 더 높은 항원 농도, 더 효율적이거나 완전한 형질도입, 또는 더 높은 세포 밀도 또는 더 높은 세포 수를 포함할 수 있다. 예를 들어, 수명이 연장된 세포 또는 특정한 환자에 대한 개선된 특성 등을 포함한 추가적인 개선된 특성이 유전적 수준에서 나타날 수 있다.

[0079]

실시양태에서, 최적화 공정은 자가-조정 공정, 즉, 외부(인간) 사용자로부터의 입력을 필요로 하지 않는 공정이

고, 다양한 컴퓨터 프로그램 및 조건을 통해 세포 배양물, 또는 자동화된 공정을 최적화하는 기타 특성에 필요한 변형을 결정할 수 있는 공정이다. 실시양태에서, 자가-조정 공정은 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 사용하여 모니터링하는 것을 포함한다. 이러한 자가-조정 공정은 또한 본원에 설명된 바와 같이 하나 이상의 분자 특성을 모니터링하여, 자동화된 공정이 시작되기 전, 자동화 공정 동안, 또는 상기 공정이 종료된 후에 자동화된 시스템에 실시간 피드백을 제공할 수 있다.

[0080] 본원에 설명된 바와 같이, 완전히 밀폐된 세포 공학 시스템에서 이러한 다양한 센서를 사용하는 것은 이 시스템 내 다양한 시간과 위치에서 나타나고, 최적화를 제공하도록 일제히 함께 작동한다. 예를 들어, 자가-조정 공정은 모니터링을 기반으로 형질도입된 T 세포 배양물의 온도, pH 수준, 포도당 수준, 산소 수준, 이산화탄소 수준 및 광학 밀도 중 하나 이상을 조절할 수 있다(예를 들어, 높이거나 낮출 수 있다).

[0081] 도 4는 다양한 센서(예를 들어, pH 센서(450), 용존 산소 센서(451)) 및 샘플링/샘플 포트(452) 및 다양한 밸브(제어 밸브(453), 바이패스 체크 밸브(454)) 뿐만 아니라, 구성요소를 연결하는 실리콘계 배관 구성요소를 적절히 포함하는 하나 이상의 유체 경로(440)의 배치를 포함한 자동화된 세포 공학 시스템에 대한 공정 흐름 범례를 도시한다. 또한 도 4에는 펌프 튜브(457) 및 백/밸브 모듈(458)과 함께 카세트(402)의 흐름경로에서 하나 이상의 소수성 필터(455) 또는 친수성 필터(456)를 사용하는 것이 도시되어 있다. 또한, 상기 유로 내 세포 배양 챔버(410)의 배치가 도시되어 있다.

[0082] 최적화 공정은 또한 예를 들어, 총 세포 수, 세포 공급원, 세포 밀도, 세포 나이 뿐만 아니라, 본원에서 설명된 바와 같이 결정된 (CAR T-세포를 포함한) 세포의 분자 특성을 포함한, 시작 세포 집단의 고유한 특성을 기반으로 할 수 있다. 이러한 시작 세포 집단 특성은 자동화된 방법을 시작하기 전에 컴퓨터 제어 시스템에 입력될 수 있고, 이 시스템에서 방법을 최적화하도록 다양한 초기 수정, 예를 들어, 산소 및 이산화탄소 농도, 유량, 배양 시간, pH 등이 행해질 것이다. 대안적으로, 세포 과정의 모니터링을 통해 시작 집단으로부터 세포 배양 시퀀스의 진행상황을 자동으로 특성화하여, 최적화된 최종 세포 배양물 특성에 대한 조건을 사례별로 조절할 수 있다.

[0083] 본원에 설명된 최적화 매개변수 및 수정은 COCOON<sup>®</sup> 자동화된 세포 공학 시스템에 일반적으로 적용할 수 있지만, 이러한 최적화는 다른 자동화된 세포 공학 시스템에 적용될 수 있음이 이해되어야 한다. 일반적으로, 배지 유량, 가스 농도 및 pH 등의 제어는, 사용된 자동화된 세포 공학 시스템의 유형에 관계없이 제어되고 최적화될 수 있는 모든 매개변수이다.

[0084] 예시적인 실시양태에서, 본원에 설명된 방법은 적어도 약 5천만 개의 생존가능한 유전자 변형된 면역 세포를 생산한다. 적합한 실시양태에서, 설명된 방법은 적어도 약 1억 개의 생존가능한 유전자 변형된 면역 세포, 또는 적어도 약 2억 개의 세포, 적어도 약 3억 개의 세포, 적어도 약 4억 개의 세포, 적어도 약 5억 개의 세포, 적어도 약 6억 개의 세포, 적어도 약 7억 개의 세포, 적어도 약 8억 개의 세포, 적어도 약 10억 개의 세포, 적어도 약 11억 개의 세포, 적어도 약 12억 개의 세포, 적어도 약 13억 개의 세포, 적어도 약 14억 개의 세포, 적어도 약 15억 개의 세포, 적어도 약 16억 개의 세포, 적어도 약 17억 개의 세포, 적어도 약 18억 개의 세포, 적어도 약 19억 개의 세포, 적어도 약 20억 개의 세포, 적어도 약 21억 개, 적어도 약 22억 개, 적어도 약 23억 개, 적어도 약 24억 개, 적어도 약 25억 개, 적어도 약 26억 개, 적어도 약 27억 개, 적어도 약 28억 개, 적어도 약 29억 개, 또는 적어도 약 30억 개의 유전자 변형된 면역 세포를 생산한다. 일부 측면에서, 상기 방법은 약 30억 개 초과 유전자 변형된 면역 세포, 예를 들어, 100억 개 세포, 120억 개 세포 또는 150억 개 세포를 생산하는데 사용될 수 있다. 적절하게는 그러나 제한 없이, 이들 유전자 변형된 면역 세포는 CAR T 세포이다.

[0085] 본원에 설명된 바와 같이, 상기 방법에 의해 생산된 유전자 변형된 면역 세포 배양물은 적절하게는 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물을 포함하는 T-세포 배양물이다. 이러한 실시양태에서, 이러한 CAR T-세포를 생산하는 데 사용된 박터는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 박터이다. 적절하게는, 상기 면역 세포 배양물은 말초 혈액 단핵 세포 및/또는 정제된 T 세포를 포함한다. 실시양태에서, 상기 면역 세포 배양물은 적어도 하나의 보조 세포, 적절하게는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함한다. 본원에 설명된 바와 같이, 실시양태에서, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한, T-세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.

[0086] 본원에 설명된 방법은 또한 유전자 변형 전에, 중에 또는 후에, 낮거나 높은 효능, 또는 낮거나 높은 독성 또는 부작용과 상관관계가 있는 것으로 밝혀진 세포 기반 치료의 분자 특성에 관한 정보를 제공할 수 있다. 따라서, 이 방법은 자동화된 공정 전에, 중에 또는 후에, 세포 기반 치료가 환자에게 투여되어야 하는지 또는 대신에 이러한 세포 집단이 사용되는 경우에 문제의 가능성이 더 높은 지를 결정하는 데 사용될 수 있는 품질 관리 정보를 제공할 것이다.

- [0087] 추가 실시양태에서, 세포-기반 치료의 분자 특성에 관한 정보는 또한 제조된 세포-기반 치료가 환자에게 투여된 후에 결정될 수 있다. 예를 들어, 환자의 혈액이 채취될 수 있고 원하는 세포 유형(들)의 분자 특성이 결정될 수 있어서, 효능의 모니터링을 개선시키고, 임상 결과를 세포 특성 및 자동화된 세포 공학 공정과 연결시키는 방법에 대한 통찰력을 높일 수 있다.
- [0088] 추가 실시양태에서, 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계; 사전-변형된 세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 세포 배양물을 생산하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터를 사용하여 형질도입하여, 형질도입된 세포 배양물을 생산하는 단계; 형질도입된 세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 세포 배양물을 농축하는 단계; 및 농축된 세포 배양물을 수확하여 유전자 변형된 세포 배양물을 생산하는 단계를 포함하는, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0089] 본원에 설명된 바와 같이, 상기 방법은 활성화, 형질도입, 확장, 농축 또는 수확 단계 중 어느 하나 중에 또는 후에 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 이들 단계 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계를 적절히 포함한다.
- [0090] 본원에 설명된 바와 같이, 상기 하나 이상의 분자 특성은 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이를 적절히 포함한다.
- [0091] 예시적인 세포 배양물은 면역 세포 배양물, 예컨대 자연 살해 세포 배양물, 및 신경퇴행성 치료를 위한 세포 배양물을 포함한다. 적합한 실시양태에서, 면역 세포 배양물은 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물을 포함한 T-세포 배양물이다. 그러한 실시양태에서, 상기 하나 이상의 분자 특성은 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성을 포함한다.
- [0092] 도 5는 다양한 세포 치료를 생산하기 위해 본원에 설명된 방법을 포함한 자동화된 세포 공학 시스템의 세포에 접근하는 방법을 도시한다. 표시된 바와 같이, 다양한 공정(형질도입, 확장 등)이 실시되고 있는 카세트(402)가 주사기(502)에 부착될 수 있다. 이 주사기는 공정의 임의의 단계 중에(예를 들어, 활성화, 형질도입, 확장 및/또는 수확 중 하나 중에 또는 후에) 세포의 샘플을 추출하는 데 사용될 수 있다. 그런 다음, 이 샘플은 본원에 설명된 다양한 분자 특성을 분석하는데 사용될 수 있다. 또한 도 5에는 더 큰 세포 샘플이 요구되거나 필요한 경우에 카세트에 연결될 수 있는 백(504)이 도시되어 있다.
- [0093] 다양한 최적화 방법이 본원에 설명되어 있고, 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 팽창의 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0094] 예를 들어, 세포 배양물의 분자 특성이, 상기 배양물이 원하는 세포 배양물 크기에 필요한 성장을 이루지 않을 것임을 입증하는 경우에, 세포 공학 시스템은 예를 들어, 산소첨가된 세포 배양 배지를 도입함에 의해, 세포 배양 배지를 산소첨가된 세포 배양 배지로 교체함에 의해, 또는 세포 배양 배지를 산소첨가된 구성요소(즉, 실리콘 배관)를 통해 흐르게 함에 의해 세포 배양물의 산소 수준을 자동으로 증가시킬 수 있다.
- [0095] 또 다른 예에서, 분자 특성이 세포 배양물이 너무 빠르게 성장하고 있음을 나타내는 경우에(예를 들어, 가능한 세포 과밀로 인해 바람직하지 않은 특성이 나타날 수 있음), 세포 공학 시스템은 꾸준한 성장률(또는 원하는 경우 지수 성장률)을 유지하도록 세포 배양물의 온도를 자동으로 낮출 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 분석된 분자 특성에 기반하여, 세포 공학 시스템은 분자 특성에 기반하여 세포 공급(즉, 새로운 배지 및/또는 영양소를 세포 배양물에 제공) 일정을 자동으로 조절할 수 있다.
- [0096] 추가 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이 본원에 제공된다. 상기 방법은 사전-변형된 T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 사전-변형된 T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계; 사전-변형된 T-세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 T-세포 배양물을 생산하는 단계; 활성화된 T-세포 배양물을 키메라 항원 수용체를 암호화하는 벡터를 사용하여 형질도입하여 CAR T-세포 배양물을 생산하는 단계; CAR T-세포 배양물을 확장하는 단계; 확장된 CAR T-세포 배양물을 농축하는 단계; 및 농축된 CAR T-세포 배양물을 수확하는 단계를 포함한다.

- [0097] 적절하게는, 상기 방법은 활성화, 형질도입, 확장, 농축 또는 수확 단계 중 어느 하나 중에 또는 후에 CAR T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 CAR T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 이들 단계 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계를 포함한다.
- [0098] 본원에 설명된 바와 같이, 적절하게는 상기 하나 이상의 분자 특성은 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성을 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 상기 하나 이상의 분자 특성은 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이를 포함한다.
- [0099] CAR T 특성규명 패널에 대하여 본원에 설명된 바와 같이, 적절하게는 상기 방법은 약 700-800개의 유전자 발현이 결정되는 경우를 포함하여 적어도 약 500개의 유전자 발현, 적절하게는 적어도 약 700개의 유전자 발현(약 750, 760, 770, 780, 790 또는 800개의 유전자 발현)의 결정을 포함한다.
- [0100] 본원에 설명된 바와 같이, 자동화된 공정의 최적화는 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 팽창의 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 적절히 포함한다.
- [0101] 본원에 설명된 방법은 적어도 약 1억 개의 생존가능한 CAR T-세포, 예컨대 적어도 약 20억 개의 생존가능한 CAR T-세포를 생산하도록 적절하게 최적화된다.
- [0102] 본원에 설명된 바와 같은 예시적인 시작 T-세포 배양물은 말초 혈액 단핵 세포 및/또는 정제된 T-세포를 적절히 포함한다.
- [0103] 예시적인 실시양태에서, 상기 T-세포 배양물은 단핵구 또는 단핵구 유래 세포일 수 있는 적어도 하나의 보조 세포를 포함한다.
- [0104] 적절하게는, 상기 보조 세포는 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한 T-세포 수용체에 대한 항원을 포함한다.
- [0105] 본원에 설명된 바와 같이, 실시양태에서, 활성화 시약은 항체 또는 수지상 세포를 포함한다. 적절하게는, 상기 항체는 표면 상에 고정된다. 이 표면은 비드의 표면을 포함한다. 적절하게는, 상기 항체는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함한 가용성 항체이다.
- [0106] 예시적인 실시양태에서, 형질도입은 바이러스 감염, 전기천공, 막 파괴, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0107] 적합한 실시양태에서, 형질도입에 사용된 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스이다.
- [0108] CAR T 생산을 평가하고 최적화하는 예시적인 공정 흐름
- [0109] 건강한 기증자 및 환자의 백혈구 성분채집술이 자동화된 세포 공학 시스템에서 CAR-T-세포를 제조하는 데 사용된다.
- [0110] 세포 치료 제조 전반에 걸친 여러 지점에서, 세포 샘플이 채취되고 CAR-T 세포 패널에 의해 특성규명된다.
- [0111] 모든 시험으로부터의 데이터를 분석하여, 감지 패널(잠재적 감지 패널 변경)을 지속적으로 개선시키고, 세포 특성을 추가 제조 공정 최적화를 허용하는 수단으로 변환하는 방법을 이해하기 위한 지식을 생성한다.
- [0112] 의료 센터와의 협력을 통해, 임상 효능을 개선하고 치료 부작용을 줄이는 목표를 갖는 개선된 제조 공정과 함께, 임상 결과가 세포 특성과 어떻게 연결되는 지에 대한 통찰력을 얻도록 데이터베이스가 생성될 수 있다.
- [0113] 자동화된 제조 공정을 최적화하도록 변환되는 세포 특성과 조합된 개선된 CAR-T-세포 패널이, 제공될 수 있는 분석 패키지를 제공할 것이다.
- [0114] 다음 섹션에서는 CAR T 세포의 생산을 위한 자동화된 세포 공학 시스템에 사용된 방법에 대한 설명을 제공한다.
- [0115] **T 세포의 활성화.** 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 방법에 의해 생산된 면역 세포 배양물은 CAR T 세포 배양물이다. CAR T 세포는 활성화된 T 세포 배양물을 형성하도록 활성화될 수 있다. 생체 내에서, 항원 제시 세포(APC), 예컨대 수지상 세포는 T 세포 수용체(TCR)와 APC 주 히스톤 적합성 복합체(MHC)의 상호작용을 통해 T 세포 활성화를 위한 자극제로 작용한다. TCR은 세포독성 T 세포(예를 들어, CD8+ 나이브 T 세포)와 T 헬퍼 세포(예를 들어, CD4+ 나이브 T 세포) 둘 모두를 활성화하는 데 도움주는 T 세포 공동 수용체인 CD3과 연관된다. 일반적으로, T 세포 활성화는 TCR/CD3 복합체와 공동-자극 수용체의 자극을 필요로 하는 2-신호 모델을 따른다. T

세포의 활성화는 예를 들어, 문헌[Kochenderfer 2015; Kalos 2011]에 추가로 설명되어 있다.

- [0116] 공동-자극 신호가 없으면, 세포가 무감각해지고 무반응이 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 상호작용하는 활성화된 T 세포 상에서 발현된 CD28 슈퍼패밀리 분자인 CD278 또는 ICOS(유도성 T-세포 공동자극제)를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 공동-자극 분자는 CD28이다. 다른 실시양태에서, 공동-자극 분자는 ICOS이다. 생체 내에서, 공동-자극 신호는 T 세포 상의 CD28 수용체에 결합하는 APC 상의 B7 분자에 의해 제공될 수 있다. B7은 T 세포 상의 CD28 또는 CD152 표면 단백질과 상호작용하여 공동-자극 신호를 생성할 수 있는 활성화된 APC 상에서 발견된 말초 막횡단 단백질이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 공동-자극 분자는 B7이다. 공동-자극 수용체는 예를 들어, 문헌[Lafferty 1975; Harding 1992; Clavreul 2000; Charron 2015; Fathman 2007; Greenwald 2005]에 추가로 설명되어 있다. 공동-자극은 예를 들어, 문헌[Carpenter 2000; Andris 2004]에 추가로 설명되어 있다. B7 분자는 예를 들어, 문헌[Fleischer 1996; Schwartz 2003]에 추가로 설명되어 있다.
- [0117] 다양한 활성화 방법이 T-세포 활성화를 시뮬레이션하도록 시험관 내에서 사용된다. 실시양태에서, T-세포 배양물은 활성화 시약을 사용하여 활성화된다. 추가 실시양태에서, 활성화 시약은 항원 제시 세포(APC)이다. 또 다른 추가 실시양태에서, 활성화 시약은 수지상 세포이다. 수지상 세포는 항원을 처리하고 이것을 세포 표면 상에서 T-세포에 제시하는 APC이다. 일부 실시양태에서, 활성화 시약은 T-세포 배양물과 함께 공동-배양된다. 공동-배양은 제 2 세포 유형의 별도의 정제 및 배양을 필요로 할 수 있으며, 이는 노동 요구량 및 가변성의 원인을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 대안적인 활성화 방법이 사용된다.
- [0118] 일부 실시양태에서, 활성화 시약은 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포 배양물은 비드를 포함한 중합체 표면을 포함한 표면에 결합된 항체를 사용하여 활성화된다. 추가 실시양태에서, 하나 이상의 항체는 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체이다. 예를 들어, 비드는 항-CD3 및 항-CD28로 코팅된 예를 들어, DYNABEADS®와 같은 자기 비드일 수 있다. 항-CD3 및 항-CD28 비드는 T-세포 활성화를 지원하는 자극 신호를 적절히 제공할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Riddell 1990; Trickett 2003]을 참고한다.
- [0119] 다른 실시양태에서, 세포 배양물은 가용성 항체를 사용하여 활성화된다. 추가 실시양태에서, 상기 가용성 항체는 가용성 항-CD3 항체이다. OKT3는 면역글로불린 IgG2a 이소타입의 쥐 단일클론 항체이며 CD3을 표적으로 한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 가용성 항-CD3 항체는 OKT3이다. OKT3은 예를 들어, 문헌[Dudley 2003; Manger 1985; Ceuppens 1985; Van Wauwe 1980; Norman 1995]에 추가로 설명되어 있다.
- [0120] 일부 실시양태에서, T-세포 활성화를 위한 공동-자극 신호는 보조 세포에 의해 제공된다. 보조 세포는 예를 들어, T-세포 상의 TCR/CD3 복합체와 CD3 항체의 가교를 가능하게 하는 Fc 수용체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 배양물은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 혼합 집단이다. PBMC는 T-세포 활성화를 지원할 수 있는 보조 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, CD28 공동-자극 신호는 PBMC 내 단핵구 상에 존재하는 B7 분자에 의해 제공될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 보조 세포는 단핵구 또는 단핵구 유래 세포(예를 들어, 수지상 세포)를 포함한다. 추가 실시양태에서, 보조 세포는 B7, CD28, 및/또는 ICOS를 포함한다. 보조 세포는 예를 들어, 문헌[Wolf 1994; Chai 1997; Verwilghen 1991; Schwartz 1990; Ju 2003; Baroja 1989; Austyn 1987; Tax 1983]에 추가로 설명되어 있다.
- [0121] 본원에 설명된 바와 같이, 활성화 시약은 생성된 CAR T-세포의 표현형을 결정하여, 원하는 표현형의 촉진(promotion)을 허용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화 시약은 T 세포 아집단(subset), 즉, CD4+ 헬퍼 T 세포 및 CD8+ 세포독성 T 세포의 비를 결정한다. 세포독성 CD8+ T 세포는 전형적으로 암 세포(즉, 항종양 반응), (예를 들어, 바이러스) 감염되는 세포 또는 다른 방식으로 손상되는 세포를 죽이는 것을 담당한다. CD4+ T 세포는 전형적으로 사이토카인을 생성하고 면역 반응을 조절하는 데 도움 되며, 일부 경우에는 세포 용해를 지원할 수 있다. CD4+ 세포는 APC를 활성화한 다음, 항종양 반응을 위해 미경험(naive) CD8+ T 세포를 준비시킨다. 따라서, 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 미리 규정된 표현형의 CAR T 세포를 생성하는 단계(즉, 원하는 표현형의 세포를 촉진하는 단계)를 추가로 포함한다. 미리 규정된 표현형은, 예를 들어 CD4+ 세포에 대한 CD8+ 세포의 미리 규정된 비율 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR T 세포 집단에서 CD4+ 세포에 대한 CD8+ 세포의 비는 약 1:1, 약 0.25:1, 또는 약 0.5:1이다. 다른 실시양태에서, CAR T 세포 집단에서 CD4+ 세포에 대한 CD8+ 세포의 비는 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 또는 약 5:1이다.
- [0122] 미리 규정된 표현형이 생성되는 방법은 하나 이상의 분자 특성, 즉 CD8 및 CD4의 수준을 결정하는 것을 적절히 포함하고, 이러한 세포를 선택하거나 이러한 세포의 생성을 촉진하기 위해 생산 매개변수를 수정함에 의해 최적

화된다.

[0123] 실시양태에서, 활성화 시약은 활성화 단계 후에 활성화된 T 세포 배양물로부터 제거된다. 활성화 시약, 예를 들어, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체가 세포 배양 배지에 존재할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 활성화 시약, 예를 들어, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체를 함유하는 세포 배양 배지는 활성화 단계 후에 활성화된 T 세포 배양물로부터 제거된다. 일부 실시양태에서, 활성화 시약의 제거는 가용성 항체의 제거를 포함한다. 예를 들어, 가용성 항체는 세포 배양 배지를 교환함에 의해 제거될 수 있다. 가용성 항체는 또한 가용성 항체에 대하여 특이적인 친화성 방법에 의해 제거될 수 있다. 다른 실시양태에서, 활성화 시약의 제거는 항체를 함유하는 비드를 제거하는 것을 포함한다. 비드 제거는 예를 들어, 비드 필터링 또는 자석에 의한 제거를 포함할 수 있다.

[0124] **활성화된 T-세포의 형질도입.** 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 면역 세포 배양물은, 키메라 항원 수용체를 암호화하는 벡터를 사용하여 형질도입되어 형질도입된 T-세포 배양물을 생산하는 활성화된 T-세포 배양물이다. 일부 실시양태에서, 형질도입은 바이러스 감염, 전위유전단위(transposon), mRNA 형질감염, 전기천공 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질도입은 전기천공을 포함한다. 따라서, 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 전기천공 시스템 또는 전기천공 유닛을 포함한다. 추가 실시양태에서, 형질도입은 바이러스 감염을 포함한다. 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터, 감마레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 또는 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 실시양태에서, 형질도입은 바이러스 벡터를 세포 배양물의 활성화된 T 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 추가 실시양태에서, 벡터는 바이러스 입자로서 전달된다.

[0125] 일부 실시양태에서, 형질도입 단계는 활성화된 T 세포를 렌티바이러스 벡터를 사용하여 형질도입하는 것을 포함하며, 여기서 상기 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 50, 약 0.5 내지 약 30, 또는 약 0.5 내지 약 20의 감염 다중도(MOI)로 도입된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 8의 MOI로 도입된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 6의 MOI로 도입된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 4의 MOI로 도입된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.5 내지 약 2의 MOI로 도입된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.6 내지 약 1.5의 MOI로 도입된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.7 내지 약 1.3의 MOI로 도입된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 약 0.8 내지 약 1.1의 MOI로 도입된다. 일부 실시양태에서, 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.

[0126] 일부 실시양태에서, 활성화 단계 후, T세포 배양물로부터 세포 배양 배지를 제거하고, 이어서 상기 배지를 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)와 혼합하고, 세포에 균일하게 분포시킨다. 일부 실시양태에서, 제거된 세포 배양 배지를 사용하여 벡터를 희석하고, 활성화된 T-세포 배양물에 균일하게 전달한다. T 세포 배양물 내 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)의 균일한 분포 및 그에 따른 균질한 노출은 형질도입 효율을 개선시킨다. 일부 실시양태에서, 세포 배양물의 부피는 활성화 후 그리고 벡터의 첨가 전에 감소된다. 부피 감소는 더 높은 정도의 세포-벡터 접촉을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포 배양물은 형질도입 중에 실질적으로 방해받지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포 배양물은 활성화 및 형질도입 단계 동안 실질적으로 방해받지 않는데, 즉, 활성화 시약 또는 벡터가 세포에 제공되는 동안 세포는 일반적으로 챔버의 동일한 영역(예를 들어, 세포 배양 챔버의 바닥)에 남아 있다. 이것은 세포에 대한 활성화 시약 및/또는 벡터의 균일한 분포 및 균질한 노출을 촉진할 수 있고, 따라서 활성화 및/또는 형질도입 효율을 개선할 수 있다.

[0127] **형질도입된 T-세포의 확장.** 일부 실시양태에서, 형질도입된 T-세포 배양물(또는 다른 세포 치료 또는 면역 세포 배양물)은 미리 규정된 배양물 크기(즉, 세포의 수)로 확장된다. 미리 규정된 배양물 크기는 임상 사용, 즉 환자로의 수혈, 연구 및 개발 작업 등에 적합한 충분한 수의 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자에게 투여하기 위한 CAR T 세포의 임상 또는 치료 용량은 약  $10^5$  개 세포, 약  $10^6$  개 세포, 약  $10^7$  개 세포, 약  $10^8$  개 세포, 약  $10^9$  개 세포, 또는 약  $10^{10}$  개 세포이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 또는 적어도 100개의 임상 용량의 CAR T 세포를 생산한다. 일부 실시양태에서, 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 부피로 확장된다. 일부 실시양태에서, 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 부피로 확장된다. 상기 부피는 또한 세포 생산 공정의 단계에 기반하여 필요에 따라 공정을 통해 변경될 수

있다. 일부 실시양태에서, 미리 규정된 배양물 크기는 세포 공학 시스템 사용자에게 의해 입력된다. 사용자는 미리 규정된 배양물 크기를 생성하고자 하는 원하는 세포 수(예를 들어,  $10^{10}$  개 CAR T 세포)로 입력할 수 있거나, 미리 규정된 배양물 크기는 생성될 원하는 수의 임상 또는 치료 용량(예를 들어, 10 임상 또는 치료 용량의 CAR T 세포)으로 입력될 수 있다. 실시양태에서, 본원에 설명된 방법에 의해 생산된 CAR T 세포의 수는 적어도 약 1억 개(즉,  $1 \times 10^8$  개) 세포, 또는 적어도 약 3억 개, 적어도 약 5억 개, 적어도 약 6억 개, 적어도 약 7억 개, 적어도 약 8억 개, 적어도 약 9억 개, 적어도 약 10억 개(즉,  $1 \times 10^9$  개), 적어도 약 11억 개, 적어도 약 12억 개, 적어도 약 13억 개, 적어도 약 14억 개, 적어도 약 15억 개, 적어도 약 16억 개, 적어도 약 17억 개, 적어도 약 18억 개, 적어도 약 19억 개, 적어도 약 20억 개(즉,  $2 \times 10^9$ ), 예컨대 적어도 약 21억 개, 적어도 약 22억 개, 적어도 약 23억 개, 적어도 약 24억 개, 적어도 약 25억 개, 적어도 약 26억 개, 적어도 약 27억 개, 적어도 약 28억 개, 적어도 약 29억 개, 또는 적어도 약 30억 개의 CAR T 세포이다.

[0128] 일부 실시양태에서, 형질도입된 T 세포 배양물의 확장은 적어도 1 라운드의, 형질도입된 T 세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및 선택을 포함한다. 세포 배양물 공급은 세포 배양물에 배지 및/또는 추가 영양소를 보충하는 것을 포함할 수 있다. 세포 배양물 세척은 소모된 배지(즉, 영양소가 고갈되고/거나 세포 폐기물을 함유하는 배지)를 제거하고 세포 배양물을 새로운 배지로 보충하는 것을 포함할 수 있다. 세포 배양물 모니터링은 세포 배양물의 온도, pH, 포도당, 산소 수준, 이산화탄소 수준 및/또는 광학 밀도를 모니터링하는 것을 포함할 수 있다. 세포 배양물 선택은 예를 들어, 생존율, 유형 및/또는 형태와 같은 원하는 특성을 갖는 세포를 선택하고, 원하는 특성을 갖지 않는 세포를 제거하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 미리 규정된 배양물 크기를 성취하도록 여러 라운드의, 형질도입된 T-세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링 및/또는 선택을 수행하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 미리 규정된 배양 크기를 성취하도록 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 적어도 100회 라운드의, 형질도입된 T-세포 배양물의 공급, 세척, 모니터링, 및/또는 선택을 수행한다.

[0129] 실시양태에서, 공급, 세척 및 모니터링 중 하나 이상이 제거될 수 있거나, 사건 순서는 원하는 세포 표현형 또는 세포 수 등에 따라 변경될 수 있다.

[0130] 실시양태에서, 모니터링은 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및 광학 밀도 센서를 사용하여 모니터링하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 온도 센서, pH 센서, 포도당 센서, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 및 광학 밀도 센서 중 하나 이상을 포함한다. 추가 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 미리 규정된 배양물 크기에 기반하여 세포 배양물의 온도, pH, 포도당, 산소 수준, 이산화탄소 수준, 및/또는 광학 밀도를 조정하도록 구성된다. 예를 들어, 세포 공학 시스템이, 세포 배양물의 현재 산소 수준이 원하는 세포 배양물 크기에 필요한 성장을 성취하기에 너무 낮을 것임을 검출하는 경우에, 세포 공학 시스템은 예를 들어, 산소첨가된 세포 배양 배지를 도입함에 의해, 세포 배양 배지를 산소첨가된 세포 배양 배지로 교체함에 의해, 또는 세포 배양 배지를 산소화 구성요소(즉, 실리콘 배관)를 통해 흐르게 함에 의해 세포 배양물의 산소 수준을 자동으로 증가시킬 것이다. 또 다른 예에서, 세포 공학 시스템이 세포 배양물의 현재 온도가 너무 높음을 그리고 세포가 너무 신속하게 성장함을 검출하는 경우에(가능한 세포 과밀이 바람직하지 않은 특성을 초래할 수 있음), 세포 공학 시스템은 꾸준한 성장률(또는 원하는 경우 지수 성장률)을 유지하도록 세포 배양물의 온도를 자동으로 낮출 수 있다. 또 다른 추가 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 세포 성장률 및/또는 세포 수, 또는 다른 모니터링 인자, 예컨대 pH, 산소, 포도당 등에 기반하여 세포 공급(즉, 새로운 배지 및/또는 영양소를 세포 배양물에 제공) 일정을 자동으로 조정한다. 세포 공학 시스템은 저온 챔버(예를 들어, 4°C 또는 -20°C)에 배지(및 세척액 등과 같은 기타 시약)를 저장하고, 가온된 배지를 세포 배양물로 도입하기 전에 실온 챔버 또는 고온 챔버(예를 들어, 각각 25°C 또는 37°C)에서 배지를 가온하도록 구성될 수 있다.

[0131] 실시양태에서, 세척은 여과 또는 침강에 의한 세포 세척을 포함한다. 실시양태에서, 선택은 세포 배양물을 하나 이상의 선택 시약과 혼합하는 것을 포함한다. 선택 시약은 원하는 세포 유형에 대하여 특이적인 비드, 예를 들어, 자기 비드일 수 있으며, 그 후 비드에 결합된 세포는 예를 들어, 자기 챔버를 통과함으로써 비결합 세포로부터 분리된다. 예를 들어, 선택 비드는 원하는 세포 유형에 대하여 특이적인 항체, 예를 들어, 항-CD8 항체 또는 항-CD4 항체를 포함한다. 크기에 기반하여 특정 세포 유형을 제거하거나 선택하도록 여과에 의해 선택이 또한 수행될 수 있다. 플라스틱 접착에 의한 세포 선택(즉, 세포가 한 챔버에서 시작될 수 있고, 원하지 않는 세포가 표면에 달라붙은 다음, 여전히 현탁액에 있는 원하는 세포가 또 다른 챔버로 이동됨)이 또한 사용될 수 있다.

다.

- [0132] **확장된 배양물의 농축.** 일부 실시양태에서, 확장된 T 세포 배양물(또는 다른 면역 세포 배양물을 포함하는 다른 세포 치료)은 미리 규정된 농도로 농축된다. 미리 규정된 농도는 환자에게 적절히 주입될 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 실시양태에서, 농축은 원심분리에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 농축은 여과에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 여과는 한외여과 및/또는 정용여과이다. 일부 실시양태에서, 미리 규정된 농도는 세포 공학 시스템의 사용자에게 의해 입력된다. 다른 실시양태에서, 미리 규정된 농도는 사용자에게 의해 입력된 상이한 매개변수, 예를 들어, 생성될 임상 또는 치료 용량의 수 또는 부피; 또는 생산될 세포의 수에 기반하여 세포 공학 시스템에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 입력된 매개변수에 기반하여 생성된 임상 또는 치료 용량의 부피 또는 수를 자동으로 조정한다. 일부 실시양태에서, 세포 공학 시스템은 미리 규정된 농도에 기반하여 원심분리(예를 들어, 원심분리의 속도, 기간) 또는 여과(예를 들어, 필터 크기, 부피, 기간)의 매개변수를 자동으로 조정한다.
- [0133] 챔버의 포트 위치 및 설계에 기반한 침강이 또한 사용될 수 있다. 즉, 세포를 제거하지 않고 챔버 내 유체 부피를 약 0.5 mL로 줄일 수 있다.
- [0134] **CAR T 세포 배양물 수확.** 일부 실시양태에서, 농축된 T-세포 배양물(또는 다른 면역 세포 배양물을 포함한 다른 세포 치료)을 수확하여 적합하게는 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 배양물을 생산한다. 일부 실시양태에서, 수확은 CAR T 세포의 교반, 유체 흐름, 및 세척을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수확은 예를 들어, 세포 폐기물, 비드(예를 들어, 항체 함유 비드 및/또는 세포 분리에 사용된 비드)와 같은 선택 시약, 또는 과량의 바이러스 벡터를 포함하는 원하지 않는 생물물로부터 세포의 분리를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수확은 CAR T 세포를 하나 이상의 플라스크, 바이알 또는 용기 내로 균일하게 분포시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수확은 제형화 시약, 예를 들어, 장기 저장을 위해 CAR T 세포를 안정시키는 용액에 CAR T 세포를 재현탁시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수확은 CAR T 세포의 냉동보존을 포함한다.
- [0135] **추가 하류 공정.** 일부 실시양태에서, CAR T 세포(또는 다른 면역 세포를 포함한 다른 세포 치료)는 환자에서 치료적으로 사용하기 전에 추가 하류 처리를 겪는다. 예를 들어, CAR T 세포는 멸균 여과에 의해 여과되어 잠재적인 바이러스 입자 잔류물이 제거될 수 있다. 멸균 여과 후, CAR T 세포는 하나 이상의 바이알, 플라스크, 용기 또는 컨테이너에 포장되기 전에 하나 이상의 농축 단계를 거칠 수 있다. 포장된 CAR T 세포는 본원에 설명된 바와 같이 품질 평가 및/또는 품질 관리 시험을 받을 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR T 세포는 환자에게 투여하기 전에 최소의 하류 처리를 거친다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 수확된 CAR T 세포는 동결보존되지 않고, 수확 후 짧은 기간 내에 환자에게 전달된다. 냉동보존 단계를 회피하면 세포의 생존력을 증가시킬 수 있다.
- [0136] 추가 예시적인 실시양태
- [0137] 실시양태 1은, 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 자동화된 세포 공학 시스템을 통해 세포 배양물을 유전자 변형시키는 단계; 상기 유전자 변형 중에 그리고 후에 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계를 포함하는, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이다.
- [0138] 실시양태 2는, 상기 하나 이상의 분자 특성이 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이로 구성되는 군으로부터 선택되는 실시양태 1의 방법을 포함한다.
- [0139] 실시양태 3은, 상기 세포 배양물이 면역 세포 배양물, 자연 살해 세포 배양물, 및 신경퇴행성 치료용 세포 배양물인 실시양태 1 또는 실시양태 2의 방법이다.
- [0140] 실시양태 4는, 상기 면역 세포 배양물이 T-세포 배양물인 실시양태 3의 방법을 포함한다.
- [0141] 실시양태 5는, T-세포 배양물이 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물인 실시양태 4의 방법을 포함한다.
- [0142] 실시양태 6은, 상기 하나 이상의 분자 특성이 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성을 포함하는 실시양태 5의 방법을 포함한다.
- [0143] 실시양태 7은, (d)에서의 상기 최적화 단계가 유전자 변형 단계 전에, 중에 및/또는 후에 일어나는 실시양태 1

내지 6 중 어느 하나의 방법을 포함한다.

- [0144] 실시양태 8은, 상기 최적화 단계가 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 확장 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함하는 실시양태 1 내지 7 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0145] 실시양태 9는, 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계; 사전-변형된 세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 세포 배양물을 생산하는 단계; 활성화된 면역 세포 배양물을 벡터를 사용하여 형질도입하여, 형질도입된 세포 배양물을 생산하는 단계; 형질도입된 세포 배양물을 확장하는 단계; (e)의 확장된 세포 배양물을 농축하는 단계; (f)의 농축된 세포 배양물을 수확하여 유전자 변형된 세포 배양물을 생산하는 단계; 단계 (c)-(g) 중 어느 하나 중에 또는 후에 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 단계 (c)-(g) 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계를 포함하는, 세포 기반 치료의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이다.
- [0146] 실시양태 10은, 상기 하나 이상의 분자 특성이 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이로 구성되는 군으로부터 선택되는 실시양태 9의 방법을 포함한다.
- [0147] 실시양태 11은, 상기 세포 배양물이 면역 세포 배양물, 자연 살해 세포 배양물, 및 신경퇴행성 치료용 세포 배양물인 실시양태 9 또는 실시양태 10의 방법을 포함한다.
- [0148] 실시양태 12는, 상기 면역 세포 배양물이 T-세포 배양물인 실시양태 11의 방법을 포함한다.
- [0149] 실시양태 13은, T-세포 배양물이 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물인 실시양태 12의 방법을 포함한다.
- [0150] 실시양태 14는, 상기 하나 이상의 분자 특성이 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성을 포함하는 실시양태 13의 방법을 포함한다.
- [0151] 실시양태 15는, 상기 최적화 단계가 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 확장 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함하는 실시양태 9 내지 14 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0152] 실시양태 16은, 사전-변형된 T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 사전-변형된 T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계; 사전-변형된 T-세포 배양물을 활성화 시약을 사용하여 활성화하여, 활성화된 T-세포 배양물을 생산하는 단계; 활성화된 T-세포 배양물을 키메라 항원 수용체를 암호화하는 벡터를 사용하여 형질도입하여 CAR T-세포 배양물을 생산하는 단계; CAR T-세포 배양물을 확장하는 단계; (e)의 확장된 CAR T-세포 배양물을 농축하는 단계; (f)의 농축된 CAR-T-세포 배양물을 수확하는 단계; 단계 (c)-(g) 중 어느 하나 중에 또는 후에 CAR T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 CAR T-세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 단계 (c)-(g) 중 어느 하나의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체 T(CAR T) 세포 배양물의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이다.
- [0153] 실시양태 17은, 상기 방법이 적어도 약 1억 개의 생존가능한 CAR T-세포를 생산하는 실시양태 16의 방법을 포함한다.
- [0154] 실시양태 18은, 상기 방법이 적어도 약 20억 개의 생존가능한 CAR T-세포를 생산하는 실시양태 16의 방법을 포함한다.
- [0155] 실시양태 19는, 상기 T-세포 배양물이 말초 혈액 단핵 세포 및/또는 정제된 T-세포를 포함하는 실시양태 16 내지 19의 방법을 포함한다.
- [0156] 실시양태 20은, 상기 T-세포 배양물이 적어도 하나의 보조 세포를 포함하는 실시양태 16 내지 19 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0157] 실시양태 21은, 상기 보조 세포가 단핵구 또는 단핵구 유래 세포를 포함하는 실시양태 20의 방법을 포함한다.

- [0158] 실시양태 22는, 상기 보조 세포가 CD28, CD40, CD2, CD40L 및/또는 ICOS를 포함한, T-세포 수용체에 대한 항원을 포함하는 실시양태 20의 방법을 포함한다.
- [0159] 실시양태 23은, 상기 활성화 시약이 항체 또는 수지상 세포를 포함하는 실시양태 16 내지 22 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0160] 실시양태 24는, 상기 항체가 표면 상에 고정되는 실시양태 23의 방법을 포함한다.
- [0161] 실시양태 25는, 상기 표면이 비드의 표면인 실시양태 24의 방법을 포함한다.
- [0162] 실시양태 26은, 상기 항체가 가용성 항체인 실시양태 23의 방법을 포함한다.
- [0163] 실시양태 27은, 상기 항체가 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 중 적어도 하나를 포함하는 실시양태 23의 방법을 포함한다.
- [0164] 실시양태 28은, 상기 형질도입이 바이러스 감염, 전기천공, 막 파괴, 또는 이들의 조합을 포함하는 실시양태 16 내지 27 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0165] 실시양태 29는, 상기 벡터가 렌티바이러스 또는 레트로바이러스인 실시양태 16 내지 28 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0166] 실시양태 30은, 상기 하나 이상의 분자 특성이 T-세포 활성화, 대사, 고갈 및 T-세포 수용체 다양성을 포함하는 실시양태 16 내지 29 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0167] 실시양태 31은, 상기 하나 이상의 분자 특성이 유전자 발현, 단백질 발현, mRNA 발현, 및 복제수 변이로 구성되는 군으로부터 선택되는 실시양태 16 내지 30 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0168] 실시양태 32는, 적어도 약 500개의 유전자 발현이 결정되는 실시양태 31의 방법을 포함한다.
- [0169] 실시양태 33은, 적어도 약 700개의 유전자 발현이 결정되는 실시양태 31의 방법을 포함한다.
- [0170] 실시양태 34는, 약 780개의 유전자 발현이 결정되는 실시양태 31의 방법을 포함한다.
- [0171] 실시양태 35는, 상기 최적화 단계가 세포 배지의 유속 증가 또는 감소, 산소 농도 증가 또는 감소, 이산화탄소 농도 증가 또는 감소, 포도당 수준 증가 또는 감소, 세포 확장의 온도 증가 또는 감소, 세포 배지의 pH 증가 또는 감소, 세포 형질도입 절차 변형, 형질도입 절차에 사용하기 위한 벡터 변형, 및 세포 분리 절차 변형 중 하나 이상을 포함하는 실시양태 16 내지 34 중 어느 하나의 방법을 포함한다.
- [0172] 실시양태 36은, 사전-변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 자동화된 세포 공학 시스템을 통해 세포 배양물을 유전자 변형시키는 단계; 상기 유전자 변형 중에 그리고 후에 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 결정하는 단계; 및 변형된 세포 배양물의 하나 이상의 분자 특성을 변경하도록 자동화된 세포 공학 시스템의 하나 이상의 매개변수를 최적화하는 단계를 포함하는, 세포 배양물의 세포 품질을 평가하고 최적화하는 방법이다.
- [0173] 인용된 참고문헌
- FDA, Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation. (2017). Available at: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ucm537670.htm>. (Accessed: 8th August 2017)
- Wang, X. & Rivière, I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. - Oncolytics* 3, 16015 (2016).
- Jones, S. D., McKee, S. & Levine, H. L. Emerging challenges in cell therapy manufacturing. *BioProcess Int* 10, S4–S7 (2012).
- Trainor, N., Pietak, A. & Smith, T. Rethinking clinical delivery of adult stem cell therapies. *Nat Biotech* 32, 729–735 (2014).
- [0174] ..

- 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).
- Bohnenkamp, H., Hilbert, U. & Noll, T. Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale. *Cytotechnology* 38, 135–145 (2002).
- 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).
- 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).
- 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)
- Wegener, C. Cell Washing with the LOVO Cell Processing System. *BioProcess Int Industry Y*, p78 (2014).
- Trickett, A. & Kwan, Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* 275, 251–255 (2003).
- 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).
- 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).
- Grishagin, I. V. Automatic cell counting with ImageJ. *Anal. Biochem.* 473, 63–65 (2015).
- 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).

[0175]

- Locke, F. L. et al. Abstract CT019: Primary results from ZUMA-1: a pivotal trial of axicabtagene ciloleucl (axicel; KTE-C19) in patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Cancer Res.* 77, CT019 LP-CT019 (2017).
- 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.
- FDA, Available online at:  
<https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM566166.pdf>
- 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
- Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figioli 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 LNJ. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest.* 2016 Sep 1; 126(9): 3363–3376.
- Morrissey JB, Shi Y, Trainor N. End-to-end cell therapy automation: an immunotherapy case study. *BioProcess International* (2017) 10-18.
- Lafferty KJ, Cunningham AJA. New analysis of allogeneic interactions. *J. Immunol.* (1975) 112: 436–437.
- 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.

[0176]

- 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.
- 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.
- Fathman CG1, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol.* (2007) 7(8): 599-609.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology* (2005) 23(1): 515-548.
- 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.
- 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.
- 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.
- Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods.* 275 (2003) 251-255.
- 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.
- 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.
- 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.

[0177]

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schwartz RH. A cell-culture model for lymphocyte-T clonal anergy. *Science* (1990) 248: 1349-1356.
- 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.
- 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

[0178]

cells in T cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens. *Cell Immunol.* (1989) 120(1): 205-217.

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.

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.

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.

Schwartz RH. T cell anergy. *Annual Review Immunology* (2003) 21: 305-34.

Feldmann A, Arndt C, Töpfer K, Stamova S, Krone F, Cartellieri M, Koristka S, Michalk I, Lindemann D, Schmitz M, Temme A, Bornhäuser M, Ehninger G, Bachmann M. 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.

Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH, Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenthin 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.

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.

Feldmann A, Arndt C, Töpfer K, Stamova S, Krone F, Cartellieri M, Koristka S, Michalk I, Lindemann D, Schmitz M, Temme A, Bornhäuser M, Ehninger G, Bachmann M. 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.

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

[0179]

- tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19(+) tumor cells. (2015) 7:584-604.
- 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.
- 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.
- Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, Siddiqi T, Siddiqi T, Chavez JC, Hosing CM, Ghobadi A, Budde LE, Bot A, Rossi JM, Jiang Y, Xue AX, Elias M, Aycock J, 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.
- Trainor N, Pietak A, Smith T. Rethinking clinical delivery of adult stem cell therapies. *Nature Biotech* (2014) 729-735.
- Mahdavi B, Gottschalk U, Trainor N, Smith T. The hype, hope and reality of personalization. *The Medicine Maker* (2015) 38-41.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

[0180]

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Hammill JA, VanSeggelen H, Helsen CW, Denisova GF, Eveleigh 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.

[0181]

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.

[0182]

[0183] 본원에 설명된 방법 및 적용에 대한 다른 적절한 변형 및 개조가 임의의 실시양태의 범위를 벗어나지 않고 행해질 수 있음이 관련 기술에서의 통상의 기술자에게 용이하게 명백해질 것이다.

[0183]

[0184] 특정 실시양태가 본원에 예시되고 설명되었지만, 청구범위는 설명되고 도시된 부분의 특정한 형태 또는 배열로 제한되지 않아야 함이 이해될 것이다. 본 명세서에는 예시적인 실시양태가 개시되었고, 특정한 용어가 사용되었지만 이들은 단지 일반적이고 설명적인 의미로 사용되며 제한을 위한 것은 아니다. 상기 교시에 비추어 실시양태의 변형 및 변경이 가능하다. 따라서 실시양태는 구체적으로 설명된 것과는 다르게 실시될 수 있음이 이해될 것이다.

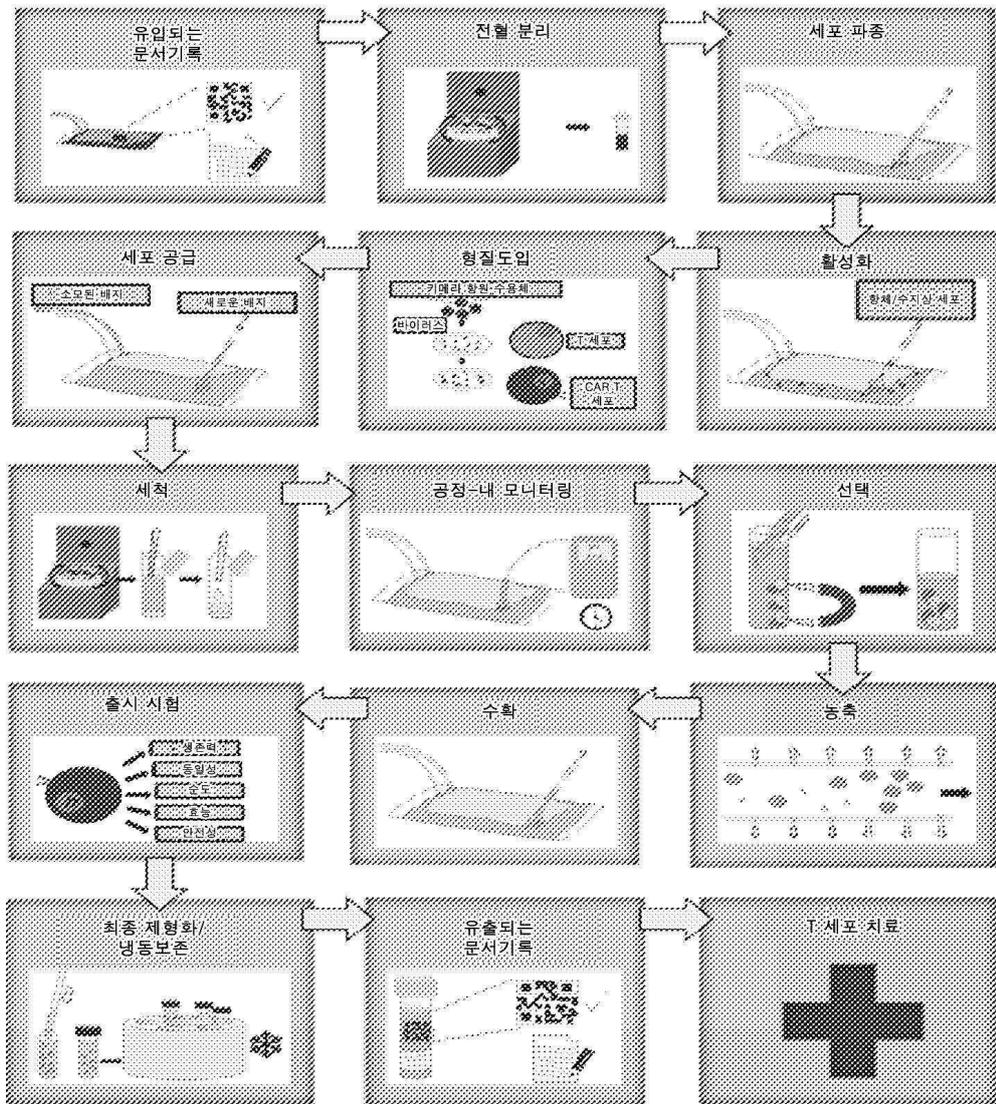
[0184]

[0185] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것처럼 동일한 정도로 본원에 참고로 편입된다.

[0185]

도면

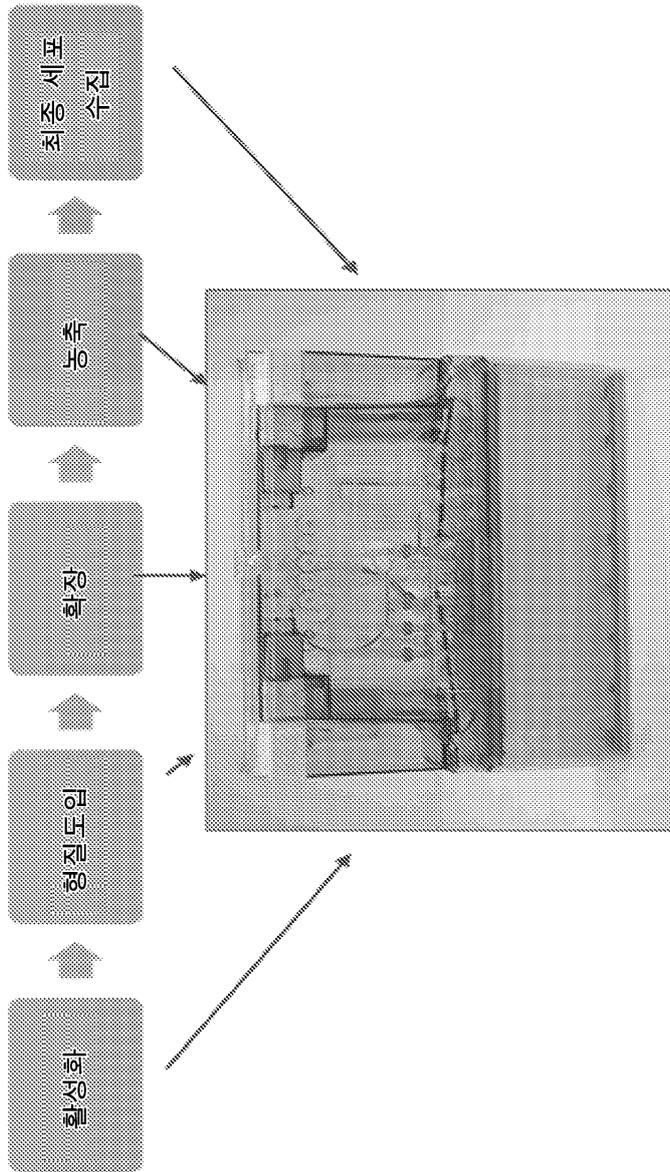
도면1



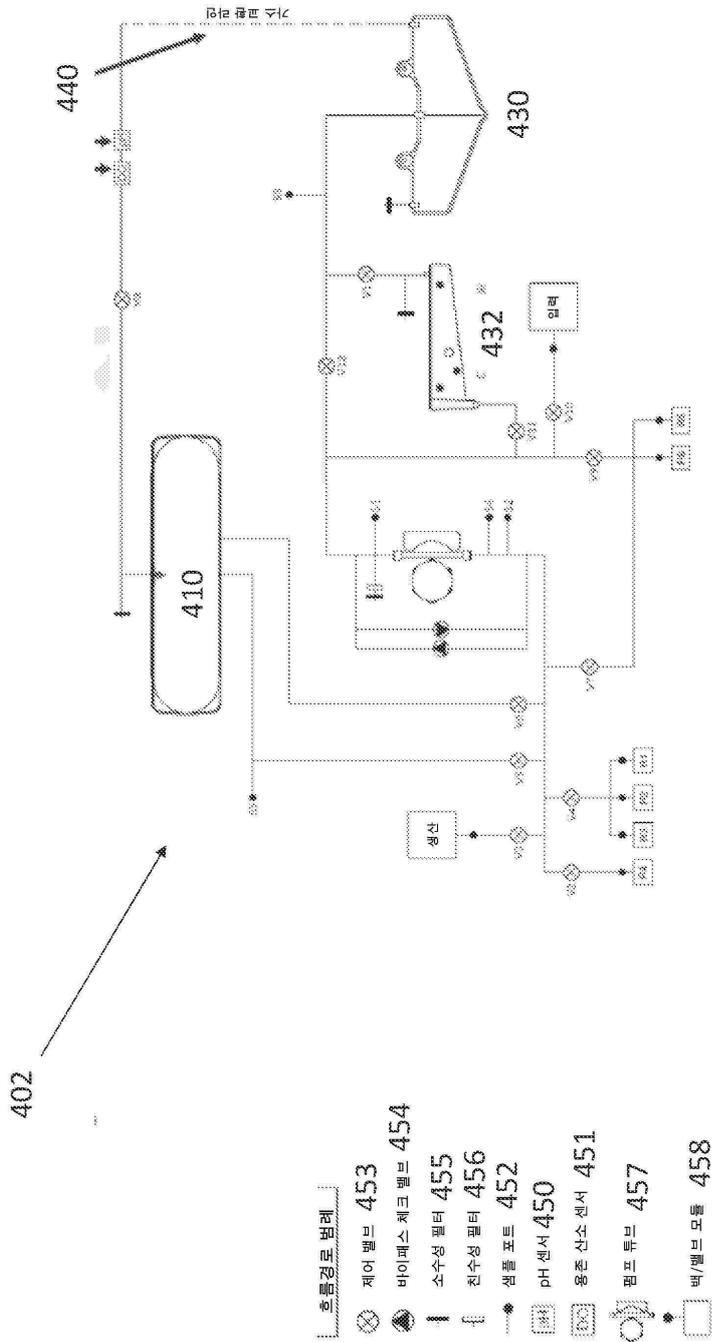
도면2



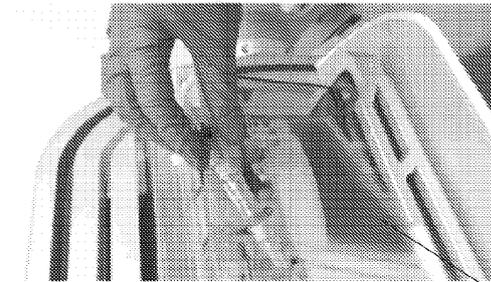
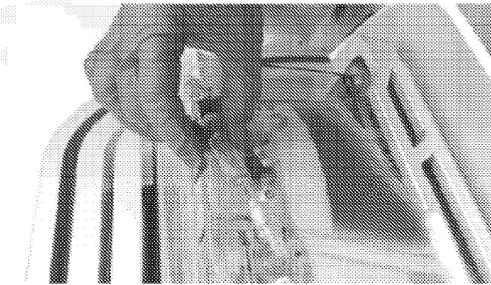
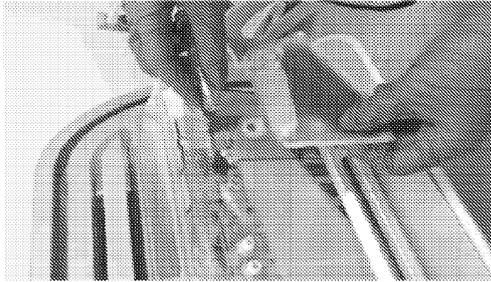
도면3



도면4

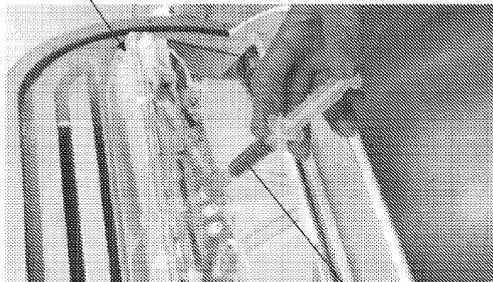


도면5



402

504



502