



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117343836 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 05

(21) 申请号 202310912295.9

(22) 申请日 2018.12.03

(30) 优先权数据

15/829615 2017.12.01 US

62/736170 2018.09.25 US

62/736151 2018.09.25 US

(62) 分案原申请数据

201880088322.2 2018.12.03

(71) 申请人 环球生命科技咨询美国有限责任公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 W.B. 格里芬 张小华 R.D. 史密斯
张呈昆 K.A. 谢赫 白焯 三根进
徐民风 K.R. 康维

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 石宏宇 朱铁宏

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

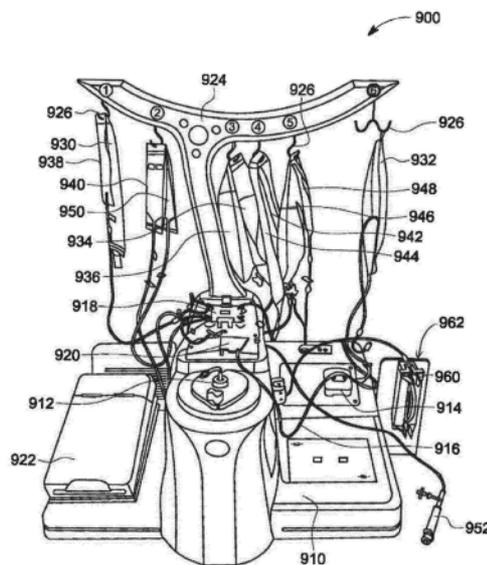
权利要求书4页 说明书47页 附图87页

(54) 发明名称

用于细胞富集和分离的方法

(57) 摘要

公开了一种生物处理的方法,该方法包括以下步骤:将包括细胞群体的悬浮液与磁珠组合,以在悬浮液中形成结合珠的细胞群体;在磁性分离柱上分离结合珠的细胞群体;以及从细胞群体收集靶细胞。收集靶细胞包括利用空气塞从分离柱移出结合珠的细胞。还公开了一种系统,其包括磁场发生器、磁性细胞分离保持器、一次性流体套件及其相关的使用方法。



1. 一种系统,包括:

磁场发生器,其配置成在磁场参数下产生磁场;

第一保持器,其配置成能够移除地联接到所述磁场发生器,所述第一保持器包括第一通道,所述第一通道配置成当所述第一保持器联接到所述磁场发生器时在第一位置处定位在所述磁场内;以及

第二保持器,其配置成能够移除地联接到所述磁场发生器,所述第二保持器包括第二通道,所述第二通道配置成当所述第二保持器联接到所述磁场发生器时在第二位置处定位在所述磁场内,

其中:

所述第一通道在所述第一位置处在所述磁场参数下产生的所述磁场内经历第一磁场强度和第一磁场梯度;并且

所述第二通道在所述第二位置处在所述磁场参数下的所述磁场内经历第二磁场强度和第二磁场梯度,并且其中,所述第二磁场强度不同于所述第一磁场强度,或者所述第二磁场梯度不同于所述第一磁场梯度,或者它们的组合。

2. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述磁场发生器联接到框架,所述框架传导磁通并形成接纳区域,所述接纳区域配置成接纳所述第一保持器或所述第二保持器。

3. 根据权利要求2所述的系统,其特征在于,所述接纳区域的尺寸设计成在给定的时间仅接纳所述第一保持器或所述第二保持器中的一个。

4. 根据权利要求2所述的系统,其特征在于,所述接纳区域配置成仅接纳所述第一保持器或所述第二保持器的部分。

5. 根据权利要求4所述的系统,其特征在于,所述部分包括所述第一保持器的所述第一通道或所述第二保持器的所述第二通道。

6. 根据权利要求2所述的系统,其特征在于,所述框架包括可缩回部分,当所述第一保持器与所述磁场发生器脱离时,所述可缩回部分减少由所述磁场发生器产生的所述磁通以免超出所述接纳区域。

7. 根据权利要求6所述的系统,其特征在于,所述可缩回部分包括弹簧,所述弹簧压缩以允许所述第一保持器进入所述框架的所述接纳区域。

8. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,当所述第一保持器不联接到所述磁场发生器时,所述第一通道不经历所述第一磁场强度。

9. 根据权利要求2所述的系统,其特征在于,所述第一保持器包括第一端部表面,所述第一端部表面配置成当所述第一保持器联接到所述磁场发生器时抵接所述框架的止动部分。

10. 根据权利要求9所述的系统,其特征在于,所述第二保持器包括第二端部表面,所述第二端部表面配置成当所述第二保持器联接到所述磁场发生器时抵接所述框架的所述止动部分,并且其中,所述第一端部表面和所述第一通道之间的第一距离不同于所述第二端部表面和所述第二通道之间的第二距离。

11. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,第一通道和所述第二通道具有不同的尺寸。

12. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述第一保持器配置成流体联接到第一

尺寸珠的第一源,并且其中,所述第二保持器配置成流体联接到第二尺寸珠的第二源。

13. 根据权利要求12所述的系统,其特征在于,所述第一尺寸珠的直径小于 $1\mu\text{m}$,并且所述第二尺寸珠的直径大于 $2\mu\text{m}$ 。

14. 根据权利要求12所述的系统,其特征在于,所述第一尺寸珠结合到第一细胞混合物内的靶细胞,并且所述第二尺寸珠结合到第二细胞混合物内的靶细胞。

15. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述第一通道或所述第二通道包括诸如多个可磁化球的磁增强器。

16. 一种磁性细胞分离保持器,包括:

主体,其配置成能够移除地联接到磁场发生器,所述主体包括第一通道和第二通道,所述第一通道配置成当所述保持器联接到所述磁场发生器时在第一位置处定位在所述磁场发生器的磁场内,所述第二通道配置成当所述保持器联接到所述磁场发生器时在第二位置处定位在所述磁场内,

其中:

所述第一通道在所述第一位置处在磁场参数下产生的所述磁场内经历第一磁场强度和第一磁场梯度;并且

所述第二通道在所述第二位置处在所述磁场参数下的所述磁场内经历第二磁场强度和第二磁场梯度,并且其中,所述第二磁场强度不同于所述第一磁场强度,或者所述第二磁场梯度不同于所述第一磁场梯度,或者它们的组合。

17. 一种系统,包括:

第一套件,其包括:

多个第一尺寸珠;以及

第一保持器,其包括配置成接纳所述多个第一尺寸珠的第一通道,所述第一通道定位在所述第一保持器内,使得当所述第一保持器能够移除地联接到产生磁场的磁场发生器时,所述第一保持器在第一位置处定位在所述磁场内;以及

第二套件,其包括:

多个第二尺寸珠;以及

第二保持器,其包括配置成接纳所述多个第二尺寸珠的第二通道,所述第二通道定位在所述第二保持器内,使得当所述第二保持器能够移除地联接到产生所述磁场的所述磁场发生器时,所述第二保持器在不同于所述第一位置的所述第二位置处定位在所述磁场内;

其中:

所述第一通道在所述第一位置处在所述磁场内经历第一磁场强度和第一磁场梯度;并且

所述第二通道在所述第二位置处在所述磁场内经历第二磁场强度和第二磁场梯度,并且其中,所述第二磁场强度不同于所述第一磁场强度,或者所述第二磁场梯度不同于所述第一磁场梯度,或者它们的组合。

18. 一种用于分离靶细胞的方法,包括:

将具有第一通道的第一保持器定位在联接到磁场发生器的框架的接纳区域内;

当所述第一保持器联接到所述磁场发生器时,由所述磁场发生器在所述接纳区域中产生第一磁场,以使所述第一通道经历第一磁场强度、第一磁场梯度或两者;

将具有第二通道的第二保持器定位在所述接纳区域内,其中,所述第一通道和所述第二通道定位在所述接纳区域内的不同位置处;以及

当所述第二保持器联接到所述磁场发生器时,由所述磁场发生器在所述接纳区域中产生第二磁场,以使所述第二通道经历第二磁场强度、第二磁场梯度或两者。

19. 根据权利要求18所述的方法,其特征在于,所述第一磁场和所述第二磁场在相同的磁场参数下产生。

20. 根据权利要求18所述的方法,其特征在于,当所述第一保持器定位在所述框架的所述接纳区域内时,所述第二保持器不定位在所述框架的所述接纳区域内,并且当所述第二保持器定位在所述框架的所述接纳区域内时,所述第一保持器不定位在所述框架的所述接纳区域内。

21. 根据权利要求18所述的方法,其特征在于,进一步包括:

将第一细胞混合物与第一尺寸珠一起孵育,并且随后将第二细胞混合物与第二尺寸珠一起孵育,使得所述第一细胞混合物中的靶细胞利用所述第一尺寸珠来标记,并且所述第二细胞混合物中的靶细胞利用所述第二尺寸珠来标记;以及

使所述第一细胞混合物穿过所述第一通道,并且随后使所述第二细胞混合物穿过所述第二通道。

22. 一种用于在生物处理系统中使用的套件,包括:

处理袋;

源袋;

珠添加容器;

处理回路,其配置成与所述处理袋、所述源袋和所述珠添加容器流体连通;

其中,所述处理回路包括配置成与泵流体连通的泵管道。

23. 根据权利要求22所述的套件,其特征在于,进一步包括:

分离柱;

废物袋;

缓冲液袋;以及

收集袋;

其中,所述处理回路配置成与所述分离柱、所述废物袋、所述缓冲液袋和所述收集袋流体连通。

24. 根据权利要求22所述的套件,其特征在于,进一步包括:

阀歧管,其能够操作以选择性地所述源袋、所述处理袋、所述珠添加容器和所述处理回路放置成流体连通。

25. 根据权利要求22所述的套件,其特征在于,进一步包括:

存储袋,其配置成与所述处理回路流体连通。

26. 根据权利要求22所述的套件,其特征在于,进一步包括:

处理室,其配置成与所述处理回路流体连通。

27. 根据权利要求22所述的套件,其特征在于:

所述珠添加容器是用于将磁性分离珠注射到所述处理回路中的注射器。

28. 根据权利要求22所述的套件,其特征在于,进一步包括:

释放缓冲液袋,其配置成与所述处理回路流体连通。

29. 根据权利要求22所述的套件,其特征在于,进一步包括:

培养基袋,其配置成与所述处理回路流体连通。

30. 一种用于生物处理的设备,包括:

套件,其包括配置成与处理回路流体连通的处理袋、源袋和珠添加容器,所述处理回路另外包括配置成与泵流体连通的泵管道;

磁场发生器,其配置成产生磁场;

多个钩子,其用于悬挂所述源袋、所述处理袋和所述珠添加容器,所述多个钩子中的每个钩子操作性地连接到称重传感器,所述称重传感器配置成感测连接到其的所述袋的重量;

至少一个气泡传感器;以及

泵,其配置成与所述处理回路流体连通。

31. 根据权利要求30所述的设备,其特征在于:

所述处理袋包括空气端口;

其中,所述泵能够操作以将空气通过所述空气端口而吸入所述系统中。

32. 根据权利要求31所述的设备,其特征在于:

所述空气端口在所述处理袋的顶部部分中,所述顶部部分在所述处理袋的流体水平上方。

33. 根据权利要求30所述的设备,其特征在于,进一步包括:

第二废物袋,其与所述阀歧管选择性地流体连通。

34. 根据权利要求30所述的设备,其特征在于:

所述废物袋包括第一废物袋和第二废物袋;其中,所述第一废物袋和所述第二废物袋与所述阀歧管流体连通。

35. 根据权利要求30所述的设备,其特征在于,进一步包括:

第一存储袋和第二存储袋,所述第一存储袋和所述第二存储袋配置成与所述阀歧管流体连通。

36. 根据权利要求33所述的设备,其特征在于,进一步包括:

释放培养基袋,其与所述阀歧管选择性地流体连通。

37. 根据权利要求30所述的设备,其特征在于,进一步包括:

第一泵管,其具有第一内径;

第二泵管,其具有大于所述第一泵管的所述内径的第二内径;

其中,所述第一泵管和所述第二泵管能够选择性地与所述泵接合,以实现针对所述泵的流速范围。

用于细胞富集和分离的方法

技术领域

[0001] 本发明的实施例大体上涉及生物处理系统和方法,并且更特别地涉及用于产生细胞免疫疗法的生物处理系统和方法。

背景技术

[0002] 多种医学疗法涉及用于在下游治疗过程中使用的细胞的提取、培养和扩增。例如,嵌合抗原受体 (CAR) T细胞疗法是一种细胞疗法,其将患者的T细胞重新定向以特异性地靶向并破坏肿瘤细胞。CAR-T细胞设计的基本原理涉及组合抗原结合和T细胞激活功能的重组受体。CAR-T细胞的一般前提是人工产生靶向癌细胞上发现的标志物的T细胞。科学家可从人体内移除T细胞,对它们进行基因改造,并且将它们放回患者体内,以用于使它们攻击癌细胞。CAR-T细胞可来源于患者自身的血液(自体),或者来源于另一个健康的供体(同种异体)。

[0003] CAR-T细胞的生产中的第一步骤涉及使用单采术(例如白细胞单采术)来从患者体内移除血液并分离白细胞。在已收获足够量的白细胞之后,将白细胞单采产物富集以用于T细胞,这涉及将细胞从白细胞单采缓冲液中洗掉。然后,使用具体的抗体缀合物或标志物从富集的亚群体中分离出具有特定生物标志物的T细胞亚群。

[0004] 在目标T细胞的分离之后,细胞在某种环境中被激活,在该环境中它们可主动增殖。例如,可使用包被有抗CD3/抗CD28单克隆抗体或基于细胞的人工抗原呈递细胞(aAPC)的磁珠来激活细胞,该磁珠可使用磁性分离从培养物中移除。然后,通过整合 γ 逆转录病毒(RV)或慢病毒(LV)载体来利用CAR基因转导T细胞。病毒载体使用病毒机制附着到患者细胞,并且在进入细胞时,载体以RNA的形式引入遗传物质。在CAR-T细胞疗法的情况下,这种遗传物质编码CAR。RNA被逆转录成DNA,并永久整合到患者细胞的基因组中;允许在细胞在生物反应器中分裂和大量生长时维持CAR表达。然后,CAR被患者细胞转录和翻译,并且CAR在细胞表面上表达。

[0005] 在T细胞被激活并利用编码CAR的病毒载体转导之后,细胞在生物反应器中大量扩增以实现期望的细胞密度。在扩增之后,细胞被收获、洗涤、浓缩和配制以用于输注到患者体内。

[0006] 用于制造可输注剂量的CAR T细胞的现有系统和方法需要涉及大量人接触点的许多复杂操作,这增加了总体制造过程的时间并增加了污染的风险。虽然最近使制造过程自动化的努力已消除一些人接触点,但是这些系统仍然存在成本高、不灵活和 workflow 瓶颈的问题。特别地,利用增加的自动化的系统是非常昂贵和不灵活的,因为它们需要消费者使他们的过程适应于系统的特定设备。

[0007] 鉴于上述情况,需要一种用于细胞免疫疗法的生物处理系统,其通过增加自动化和减少人工操作来降低污染风险。另外,需要一种用于细胞疗法制造的生物处理系统,其平衡了开发的灵活性和批量生产的一致性的需要,并且满足了不同消费者运行不同过程的期望。

发明内容

[0008] 下文概述与最初要求保护的主体范围相当的某些实施例。这些实施例不旨在限制要求保护的主体范围,而是这些实施例仅旨在提供可能实施例的简要概述。实际上,本公开可包括可与下文阐述的实施例类似或不同的多种形式。

[0009] 在一个实施例中,一种生物处理系统包括:第一模块,其配置成用于富集和分离细胞群体;第二模块,其配置成用于激活、遗传转导和扩增细胞群体;以及第三模块,其配置成用于收获扩增的细胞群体。

[0010] 在另一个实施例中,一种生物处理系统包括:第一模块,其配置成用于富集和分离细胞;多个第二模块,每个第二模块配置成用于激活、遗传转导和扩增细胞;以及第三模块,其配置成用于在扩增之后收获细胞。每个第二模块配置成支持彼此并行的不同细胞群体的激活、遗传转导和扩增。

[0011] 在另一个实施例中,一种生物处理的方法包括以下步骤:在第一模块中,富集和分离细胞群体;在第二模块中,激活、遗传转导和扩增细胞群体;以及在第三模块中,收获扩增的细胞群体。激活、遗传转导和扩增细胞群体的步骤在不从第二模块移除细胞群体的情况下执行。

[0012] 在另一个实施例中,一种用于生物处理的设备包括外壳和能够接纳在外壳内的抽屉。抽屉包括限定处理室的多个侧壁和底部以及大体上开放的顶部。抽屉能够在关闭位置和打开位置之间移动,在关闭位置,抽屉被接纳在外壳内,在打开位置,抽屉从外壳延伸,从而使得能够通过开放的顶部接近处理室。该设备还包括至少一个座板,该座板定位在处理室内并配置成接纳生物反应器容器。

[0013] 在另一个实施例中,一种生物处理的方法包括以下步骤:将具有多个侧壁、底部和大体上开放的顶部的抽屉从外壳内的关闭位置滑动到打开位置,以使抽屉从外壳延伸通过大体上开放的顶部;将生物反应器容器通过大体上开放的顶部定位在位于抽屉内的静态座板上;将抽屉滑动到关闭位置;以及控制抽屉接合致动器以将多个流体流动管线与至少一个泵和多个夹管阀线性致动器接合。

[0014] 在另一个实施例中,一种用于生物处理的系统包括:外壳;第一抽屉,其能够接纳在外壳内,第一抽屉包括限定第一处理室的多个侧壁和底部以及大体上开放的顶部;至少一个第一座板,其定位在第一抽屉的处理室内并且配置成在其上接纳或以其它方式接合第一生物反应器容器;第二抽屉,其能够以与第一抽屉的堆叠关系接纳在外壳内,第二抽屉包括限定第二处理室的多个侧壁和底部以及大体上开放的顶部;以及至少一个第二座板,其定位在第二抽屉的处理室内并且配置成在其上接纳或以其它方式接合第二生物反应器容器。第一抽屉和第二抽屉各自能够在关闭位置和打开位置之间移动,在关闭位置,第一抽屉和/或第二抽屉接纳在外壳内,在打开位置,第一抽屉和/或第二抽屉从外壳延伸,从而使得能够分别通过开放的顶部接近处理室。

[0015] 在又一个实施例中,一种用于生物处理的设备包括:外壳;抽屉,其能够接纳在外壳内,抽屉包括限定处理室的多个侧壁和底表面以及大体上开放的顶部,抽屉能够在关闭位置和打开位置之间移动,在关闭位置,抽屉接纳在外壳内,在打开位置,抽屉从外壳延伸,从而使得能够通过开放的顶部接近处理室;至少一个座板,其邻近底表面定位在处理室内;以及套件,其能够接纳在处理室内。套件包括:多个侧壁和底表面,其限定内部隔室;和大体

上开放的顶部;开口,其形成在套件的底表面中,开口具有周边;以及生物反应器容器,其在内部隔室内定位在至少一个开口上方并由底表面支承,使得生物反应器容器的部分能够通过底表面中的开口接近。套件能够接纳在处理室内,使得座板延伸通过托盘的底表面中的开口,以将生物反应器容器支承在套件的底表面上方。

[0016] 在又一个实施例中,一种用于生物处理的系统包括:托盘,其具有限定内部隔室的多个侧壁和底表面,以及大体上开放的顶部;至少一个开口,其形成在底表面中,至少一个开口具有周边;第一管道保持器块,其与托盘集成在一起,并且配置成接纳至少一个泵管并将至少一个泵管保持就位以用于选择性地与泵接合;第二管道保持器块,其与托盘集成在一起,并且配置成接纳多个夹管阀管并将多个夹管阀管中的每个夹管阀管保持就位以用于选择性地与夹管阀阵列的相应致动器接合;以及生物反应器容器,其在内部隔室内定位在至少一个开口上方,并由底表面支承,使得生物反应器容器的部分能够通过底表面中的开口接近。

[0017] 在又一个实施例中,一种用于生物处理的系统包括:处理室,其具有多个侧壁、底表面和大体上开放的顶部;座板,其邻近底表面定位在处理室内;以及托盘。托盘包括:限定内部隔室的多个侧壁和底表面;和大体上开放的顶部;以及托盘的底表面中的开口,开口具有周边。开口的周边的形状和/或尺寸设计成使得生物反应器容器可定位在开口上方并由托盘的底表面支承,同时生物反应器容器的部分能够通过底表面中的开口接近。托盘能够接纳在处理室内,使得座板延伸通过托盘的底表面中的开口,以支承生物反应器容器。

[0018] 在又一个实施例中,一种用于生物处理的系统包括托盘,该托盘具有:限定内部隔室的多个侧壁和底表面;和大体上开放的顶部;以及在底表面中的至少一个开口,开口由周边边缘界定,其中开口的形状和/或尺寸设计成使得生物反应器容器可定位在开口上方并由托盘的底表面支承在内部隔室内。

[0019] 在又一个实施例中,一种生物处理的方法包括以下步骤:将生物反应器容器放置在一次性托盘中,一次性托盘具有限定内部隔室的多个侧壁和底表面、大体上开放的顶部、形成在底表面中的开口以及从底表面延伸到开口中的多个突出部或突起;将生物反应器容器布置在托盘内,使得生物反应器容器由多个突出部支承在开口上方;以及将托盘放置到具有座板的处理室中,使得座板通过托盘中的开口而被接纳并且支承生物反应器容器。

[0020] 在又一个实施例中,一种用于生物处理系统的管道模块包括:第一管道保持器块,其配置成接纳至少一个泵管并将至少一个泵管保持就位以用于与蠕动泵选择性地接合;以及第二管道保持器块,其配置成接纳多个夹管阀管并将多个夹管阀管中的每个夹管阀管保持就位以用于与夹管阀阵列的相应致动器选择性地接合。第一管道保持器块和第二管道保持器块互连。

[0021] 在又一个实施例中,一种用于生物处理的系统包括:托盘,其具有限定内部隔室的多个侧壁和底表面以及大体上开放的顶部,托盘配置成在其上接纳、支承或以其它方式接合生物反应器容器;泵组件,其定位成邻近托盘的后侧壁;夹管阀阵列,其定位成邻近托盘的后侧壁;以及管道模块,其定位在托盘的后部处。管道模块包括:第一管道保持器块,其配置成接纳至少一个泵管并将至少一个泵管保持就位以用于与泵组件选择性地接合;以及第二管道保持器块,其配置成接纳多个夹管阀管并将多个夹管阀管中的每个夹管阀管保持就位以用于与夹管阀阵列的相应致动器选择性地接合。

[0022] 在又一个实施例中,一种生物反应器容器包括:底板;容器主体,其联接到底板,容器主体和底板在其之间限定内部隔室;以及多个凹部,其形成在底板中,多个凹部中的每个凹部配置成接纳座板上的对应的对准销,以用于将生物反应器容器对准在座板上。

[0023] 在又一个实施例中,一种用于生物处理的方法包括:将底板操作性地连接到容器主体以在其之间限定内部隔室,底板和容器主体形成生物反应器容器;将底板中的凹部与生物处理系统的对准销对准;以及将生物反应器容器安置在生物处理系统的底板上。

[0024] 在又一个实施例中,一种生物处理系统包括:第一流体组件,其具有通过第一生物反应器容器的第一生物反应器管线连接到第一生物反应器容器的第一端口的第一流体组件管线,第一生物反应器容器的第一生物反应器管线包括第一生物反应器管线阀,其用于在第一流体组件和第一生物反应器容器的第一端口之间提供选择性流体连通;第二流体组件,其具有通过第一生物反应器容器的第二生物反应器管线连接到第一生物反应器容器的第二端口的第二流体组件管线,第一生物反应器容器的第二生物反应器管线包括第二生物反应器管线阀,其用于在第二流体组件和第一生物反应器容器的第二端口之间提供选择性流体连通;以及互连管线,其提供第一流体组件和第二流体组件之间的流体连通,以及第一生物反应器容器的第二生物反应器管线和第一生物反应器容器的第一生物反应器管线之间的流体连通。

[0025] 在又一个实施例中,一种生物处理的方法包括:提供第一流体组件,第一流体组件具有通过第一生物反应器容器的第一生物反应器管线连接到第一生物反应器容器的第一端口的第一流体组件管线;提供第二流体组件,第二流体组件具有通过第一生物反应器容器的第二生物反应器管线连接到第一生物反应器容器的第二端口的第二流体组件管线;以及在第一生物反应器容器的第二生物反应器管线和第一生物反应器容器的第一生物反应器管线之间提供互连管线,互连管线允许第一流体组件和第二流体组件之间的流体连通,并且允许第一生物反应器容器的第二生物反应器管线和第一生物反应器容器的第一生物反应器管线之间的流体连通。

[0026] 在又一个实施例中,一种用于细胞疗法的生物处理方法包括:对生物反应器容器中的细胞群体进行遗传修饰,以产生遗传修饰的细胞群体;以及在不从生物反应器容器移除遗传修饰的细胞群体的情况下,在生物反应器容器内扩增遗传修饰的细胞群体,以产生足以用于在细胞疗法治疗中使用的一个或多个剂量的许多遗传修饰的细胞。

[0027] 在又一个实施例中,一种生物处理方法包括:利用试剂包被生物反应器容器以用于提高细胞群体的遗传修饰的效率;遗传修饰细胞群体的细胞以产生遗传修饰的细胞群体;以及在不从生物反应器容器移除遗传修饰的细胞的情况下,扩增生物反应器容器中的遗传修饰的细胞群体。

[0028] 在又一个实施例中,一种生物处理方法包括:使用磁珠或非磁珠来激活生物反应器容器中的细胞群体的细胞以产生激活的细胞群体;遗传修饰生物反应器容器中的激活细胞以产生遗传修饰的细胞群体;洗涤生物反应器容器中的遗传修饰的细胞以移除不需要的物质;以及扩增生物反应器容器中的遗传修饰的细胞群体以产生扩增的转导细胞群体。激活、遗传修饰、洗涤和扩增在不从生物反应器容器移除细胞的情况下在生物反应器容器中执行。

[0029] 在又一个实施例中,一种用于在生物处理系统中使用的套件包括处理袋、源袋、珠

添加容器和处理回路,处理回路配置成与处理袋、源袋和珠添加容器流体连通。处理回路另外包括配置成与泵流体连通的泵管道。

[0030] 在又一个实施例中,一种用于生物处理的设备包括:套件,该套件包括处理袋、源袋和珠添加容器,它们配置成与处理回路流体连通,处理回路另外包括配置成与泵流体连通的泵管道;磁场发生器,其配置成产生磁场;多个钩子,其用于悬挂源袋、处理袋和珠添加容器,多个钩子中的每个钩子操作性地连接到称重传感器(load cell),称重传感器配置成感测连接到其的袋的重量;至少一个气泡传感器;以及泵,其配置成与处理回路流体连通。

[0031] 在实施例中,一种生物处理的方法包括:将包含细胞群体的悬浮液与磁珠组合,以在悬浮液中形成结合珠的细胞群体;在磁性分离柱上分离结合珠的细胞群体;以及从细胞群体收集靶细胞。

[0032] 在一个实施例中,一种系统包括:磁场发生器,其配置成在磁场参数下产生磁场;第一保持器,其配置成能够移除地联接到磁场发生器;以及第二保持器,其配置成能够移除地联接到磁场发生器。第一保持器具有通道,该通道配置成当第一保持器联接到磁场发生器时在第一位置处定位在磁场内。第二保持器具有通道,该通道配置成当第二保持器联接到磁场发生器时在第二位置处定位在磁场内。第一保持器的通道在第一位置处在磁场参数下产生的磁场内经历第一磁场强度和第一磁场梯度。第二保持器的通道在第二位置处在磁场参数下产生的磁场内经历第二磁场强度和第二磁场梯度,并且第二磁场强度不同于第一磁场强度,第二磁场梯度不同于第一磁场梯度,或者它们的组合。

[0033] 在另一个实施例中,一种磁性细胞分离保持器包括配置成能够移除地联接到磁场发生器的主体。主体具有:第一通道,其配置成当保持器联接到磁场发生器时在第一位置处定位在磁场发生器的磁场内;以及第二通道,其配置成当保持器联接到磁场发生器时在第二位置处定位在磁场内。第一通道在第一位置处在磁场参数下产生的磁场内经历第一磁场强度和第一磁场梯度,并且第二通道在第二位置处在磁场参数下的磁场内经历第二磁场强度和第二磁场梯度。第二磁场强度不同于第一磁场强度,第二磁场梯度不同于第一磁场梯度,或者它们的组合。

[0034] 在另一个实施例中,一种系统包括:第一套件,其具有多个第一尺寸珠和第一保持器,第一保持器具有配置成接纳多个第一尺寸珠的通道;以及第二套件,其具有多个第二尺寸珠和第二保持器,第二保持器具有配置成接纳多个第二尺寸珠的通道。第一保持器的通道定位在保持器内,使得当第一保持器能够移除地联接到磁场发生器时,第一保持器在第一位置处定位在由磁场发生器产生的磁场内。第二保持器的通道定位在保持器内,使得当第二保持器能够移除地联接到磁场发生器时,第二保持器在不同于第一位置的第二个位置处定位在由磁场发生器产生的磁场内。第一保持器的通道在第一位置处在磁场内经历第一磁场强度和第一磁场梯度,并且第二保持器的通道在第二个位置处在磁场内经历第二磁场强度和第二磁场梯度。第二磁场强度不同于第一磁场强度,第二磁场梯度不同于第一磁场梯度,或者它们的组合。

[0035] 在另一个实施例中,一种用于分离靶细胞的方法包括:将具有通道的第一保持器定位在联接到磁场发生器的框架的接纳区域内;以及当第一保持器联接到磁场发生器时,通过磁场发生器在接纳区域中产生第一磁场,以使第一保持器的通道经历第一磁场强度、第一磁场梯度或两者。该方法还包括:将具有通道的第二保持器定位在接纳区域内;以及当

第二保持器联接到磁场发生器时,通过磁场发生器在接纳区域中产生第二磁场,以使第二保持器的通道经历第二磁场强度、第二磁场梯度或两者。第一保持器的通道和第二保持器的通道定位在接纳区域内的不同位置处。

附图说明

[0036] 通过参考附图来阅读非限制性实施例的以下描述,将更好地理解本发明,其中下文:

图1是根据本发明的实施例的生物处理系统的示意性图示。

[0037] 图2是根据本发明的另一个实施例的生物处理系统的示意性图示。

[0038] 图3是图1的生物处理系统的细胞激活、遗传修饰和扩增子系统的流体流动配置/系统的框图。

[0039] 图4是图3的框图的部分的详细视图,图示了流体流动配置/系统的第一流体组件。

[0040] 图5是图3的框图的部分的详细视图,图示了流体流动配置/系统的第二流体组件。

[0041] 图6是图3的框图的部分的详细视图,图示了流体流动配置/系统的采样组件。

[0042] 图7是图3的框图的部分的详细视图,图示了流体流动配置/系统的过滤流动路径。

[0043] 图8是根据本发明的实施例的生物反应器容器的透视图。

[0044] 图9是图8的生物反应器容器的分解视图。

[0045] 图10是图8的生物反应器容器的分解横截面视图。

[0046] 图11是图8的生物反应器容器的分解仰视透视图。

[0047] 图12是根据本发明的实施例的图1的生物处理系统的一次性插入式套件的透视俯视图。

[0048] 图13是图12的一次性插入式套件的另一个透视俯视图。

[0049] 图14是图12的一次性插入式套件的透视俯视图。

[0050] 图15是根据本发明的实施例的图12的一次性插入式套件的托盘的透视图。

[0051] 图16是根据本发明的实施例的图12的一次性插入式套件的管道模块的前透视图。

[0052] 图17是图16的管道模块的后透视图。

[0053] 图18是根据本发明的实施例的管道模块的第二管道保持器块的正视图。

[0054] 图19是图18的第二管道保持器块的横截面视图。

[0055] 图20是图12的插入式套件的另一个透视前视图,示出了集成在其中的流动架构。

[0056] 图21是图12的插入式套件的透视后视图,示出了集成在其中的流动架构。

[0057] 图22是图12的插入式套件的前正视图,示出了集成在其中的流动架构。

[0058] 图23是根据本发明的实施例的生物处理设备的透视图。

[0059] 图24是根据本发明的实施例的用于接纳图12的插入式套件的生物处理设备的抽屉的透视图。

[0060] 图25是图24的抽屉的俯视平面图。

[0061] 图26是图24的抽屉的处理室的前透视图。

[0062] 图27是抽屉的处理室的俯视平面图。

[0063] 图28是图23的生物处理设备的座板的俯视平面图。

[0064] 图28A是容纳在图28的座板底下的硬件构件的俯视平面图。

- [0065] 图29是图12的生物处理设备的侧正视图。
- [0066] 图30是图12的生物处理设备的抽屉接合致动器的透视图。
- [0067] 图31是生物处理设备的抽屉的俯视平面图,图示了抽屉接合致动器、泵组件和螺线管阵列的间隙位置。
- [0068] 图32是生物处理设备的抽屉的俯视平面图,图示了抽屉接合致动器、泵组件和螺线管阵列的接合位置。
- [0069] 图33是生物处理设备的透视图,图示了在抽屉的处理室内就位的插入式套件。
- [0070] 图34是生物处理设备的俯视平面图,图示了在抽屉的处理室内就位的插入式套件。
- [0071] 图35是生物处理设备的蠕动泵组件的透视图。
- [0072] 图36是蠕动泵组件和插入式套件的管道保持器模块的侧正视图,图示了构件之间的关系。
- [0073] 图37是形成生物处理设备的夹管阀阵列的螺线管阵列和夹管阀砧的透视图。
- [0074] 图38是生物处理设备的夹管阀阵列的另一个透视图。
- [0075] 图39是夹管阀阵列的另一个透视图,图示了插入式套件的管道保持器模块相对于夹管阀阵列在接合位置的定位。
- [0076] 图40是生物处理设备的抽屉的横截面视图,图示了生物反应器容器在座板上的安置位置。
- [0077] 图41是接纳在座板上的生物反应器的侧正视图,图示了生物反应器系统的搅拌/混合操作模式。
- [0078] 图42是接纳在座板上的生物反应器的侧视横截面视图,图示了生物反应器系统的搅拌/混合操作模式。
- [0079] 图43是生物反应器容器的示意性图示,示出了在搅拌/混合操作模式期间生物反应器容器内的流体水平。
- [0080] 图44是在搅拌/混合操作模式期间座板上的定位销和生物反应器容器上的接纳凹部之间的界面的横截面详细视图。
- [0081] 图45是根据本发明的实施例的具有向下翻转的前面板的生物处理设备的透视图,示出了生物处理设备的处于打开位置的处理抽屉。
- [0082] 图46是图45的生物处理设备的另一个透视图,示出了生物处理设备的处于打开位置的处理抽屉。
- [0083] 图47是图45的生物处理设备的辅助隔室的放大透视图,示出了处于能够接近辅助隔室的关闭位置的处理抽屉。
- [0084] 图48是图45的生物处理设备的辅助隔室的另一个放大透视图,示出了处于能够接近辅助隔室的关闭位置的处理抽屉。
- [0085] 图49是图45的生物处理设备的透视图,示出了生物处理设备的处于能够接近辅助隔室的关闭位置的处理抽屉。
- [0086] 图50是图45的生物处理设备的另一个透视图,示出了生物处理设备的处于能够接近辅助隔室的关闭位置的处理抽屉。
- [0087] 图51是根据本发明的另一个实施例的生物处理设备的辅助隔室的透视图。

- [0088] 图52是根据本发明的实施例的具有废物托盘的生物处理系统的透视图。
- [0089] 图53至图77是根据本发明的实施例的利用图3的流体流动架构的生物处理系统的自动化通用协议的示意性图示。
- [0090] 图78是根据本发明的实施例的富集和分离设备的透视图。
- [0091] 图79是图78的富集和分离设备的工艺流程图。
- [0092] 图80是用于执行细胞群体的富集和分离的图78的设备的流体流动架构的示意性图示。
- [0093] 图81是根据本公开的方面的可与磁性细胞分离保持器一起使用的基于磁性粒子的细胞选择系统的框图。
- [0094] 图82是根据本公开的方面的磁性细胞分离方法的流程图。
- [0095] 图83A图示了根据本公开的方面的相对于磁场发生器处于未装载配置的磁性细胞分离保持器的实施例的俯视图。
- [0096] 图83B图示了根据本公开的方面的相对于磁场发生器处于装载配置的磁性细胞分离保持器的实施例的俯视图。
- [0097] 图84A图示了根据本公开的方面的相对于磁场发生器处于未装载配置的磁性细胞分离保持器的实施例的透视图。
- [0098] 图84B图示了根据本公开的方面的相对于处于装载配置的磁场发生器处于装载配置的磁性细胞分离保持器的实施例的俯视图。
- [0099] 图85是根据本公开的方面的使用不同磁性细胞分离保持器的磁性细胞分离方法的流程图。
- [0100] 图86图示了根据本公开的方面的处于装载配置的磁性细胞分离保持器和磁场发生器的实施例的俯视图。
- [0101] 图87是根据本公开的方面的磁场发生器的磁场分布。

具体实施方式

[0102] 下文将详细参考本发明的示例性实施例,其示例在附图中图示。在任何可能的情况下,在所有附图中使用的相同参考字符是指相同或相似的部件。

[0103] 如本文中所使用的,用语“柔性的”或“可塌缩的”是指柔韧的或能够弯曲而不断裂的结构或材料,并且还可指可压缩或可膨胀的材料。柔性结构的示例是由聚乙烯薄膜形成的袋。用语“刚性”和“半刚性”在本文中可互换使用,以描述“不可塌缩”的结构,也就是说,在法向力下不会折叠、塌缩或以其它方式变形以显著减小其细长尺寸的结构。取决于上下文,“半刚性”还可表示比“刚性”元件柔性更大的结构,例如,可弯曲的管或导管,但仍然是法向条件和力下不会纵向塌缩的结构。

[0104] 如本文中所使用的用语“容器”是指柔性袋、柔性贮器、半刚性贮器、刚性贮器或柔性或半刚性管道,视情况而定。如本文中所使用的用语“容器”旨在包括具有半刚性或刚性的壁或壁的部分的生物反应器容器,以及在生物或生物化学处理中常用的其它贮器或导管,包括例如细胞培养/纯化系统、混合系统、培养基/缓冲液制备系统和过滤/纯化系统,例如色谱和切向流过滤器系统以及它们相关联的流动路径。如本文中所使用的,用语“袋”意指柔性或半刚性贮器或容器,其例如用作用于多种流体和/或介质的容纳装置。

[0105] 如本文中所使用的,“流体联接”或“流体连通”意味着系统的构件能够在构件之间接纳或传输流体。用语流体包括气体、液体或它们的组合。如本文中所使用的,“电通信”或“电联接”意味着某些构件配置成通过直接或间接的电连接的方式通过直接或间接地发信号来彼此通信。如本文中所使用的,“操作性地联接”是指可为直接的或间接的连接。该连接不一定是机械附接。

[0106] 如本文中所使用的,用语“托盘”是指能够至少临时地支承多个构件的任何物体。托盘可由多种合适的材料制成。例如,托盘可由适合于灭菌且单次使用的一次性产品的具有成本效益的材料制成。

[0107] 如本文中所使用的,用语“功能性封闭系统”是指组成封闭流体路径的多个构件,该流体路径可具有入口端口和出口端口,以在不损害封闭流体路径的完整性(例如,以维持内部无菌的生物学流体路径)的情况下向系统添加或从系统移除流体或空气,由此端口可包括例如在每个端口处的过滤器或膜,以在向系统添加或从系统移除流体或空气时维持无菌完整性。取决于给定的实施例,构件可包括但不限于一个或多个导管、阀(例如多端口分流器)、容器、接收器和端口。

[0108] 本发明的实施例提供了用于由生物样品(例如,血液、组织等)制造细胞免疫疗法的系统和方法。在实施例中,一种生物处理的方法包括:将包括细胞群体的悬浮液与磁珠组合,以在悬浮液中形成结合珠的细胞群体;在磁性分离柱上分离结合珠的细胞群体;以及从细胞群体收集靶细胞。收集靶细胞包括利用空气塞从分离柱移出结合珠的细胞。

[0109] 参考图1,图示了根据本发明的实施例的生物处理系统10的示意性图示。生物处理系统10配置成用于在细胞免疫疗法(例如,自体细胞免疫疗法)的制造中使用,其中,例如,人的血液、流体、组织或细胞样品被收集,并且从收集的样品或基于收集的样品产生细胞疗法。可使用生物处理系统10制造的一种类型的细胞免疫疗法是嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法,然而在不脱离本发明的更广泛的方面的情况下,也可使用本发明的系统或其方面来产生其它细胞疗法。如图1中所图示的,CAR T细胞疗法的制造大体上从收集患者的血液和通过单采术分离淋巴细胞开始。收集/单采可在临床环境中进行,并且然后将单采产物送至实验室或制造设施,以用于产生CAR T细胞。特别地,一旦单采产物被接收以用于处理,期望的细胞群体(例如,白血细胞)就被富集或从收集的血液中分离,以用于制造细胞疗法,并且从初始细胞混合物中分离感兴趣的靶细胞。然后,感兴趣的靶细胞被激活,被遗传修饰以特异性地靶向和破坏肿瘤细胞,并且扩增以实现期望的细胞密度。在扩增之后,收获细胞,并且配制一定剂量。然后,通常将制剂冷冻保存并输送到临床环境以用于解冻、制备并且最后输注到患者体内。

[0110] 进一步参考图1,本发明的生物处理系统10包括多个不同的模块或子系统,它们各自配置成以基本上自动化、功能性封闭且可扩展的方式执行制造步骤的特定子集。特别地,生物处理系统10包括:第一模块100,其配置成执行富集和分离的步骤;第二模块200,其配置成执行激活、遗传修饰和扩增的步骤;以及第三模块300,其配置成执行收获扩增的细胞群体的步骤。在实施例中,每个模块100、200、300可通信地联接到专用控制器(例如,分别联接到第一控制器110、第二控制器210和第三控制器310)。控制器110、210和310配置成提供对每个模块内的制造过程的基本上自动化的控制。虽然第一模块100、第二模块200和第三模块300被图示为包括用于控制每个模块的操作的专用控制器,但是设想到,可利用主控制

单元来提供对三个模块的全局控制。每个模块100、200、300被设计成与其它模块协同工作，以形成单个的、连贯的生物处理系统10，如下文详细讨论的。

[0111] 通过使每个模块内的过程自动化，可提高来自每个模块的产物一致性，并降低与大量人工操纵相关联的成本。另外，如下文详细讨论的，每个模块100、200、300是基本上封闭的，这有助于通过降低外部污染的风险来确保患者的安全，确保法规遵从性，并有助于避免与开放系统相关联的成本。此外，每个模块100、200、300是可扩展的，以支持低患者数量下的开发和高患者数量下的商业制造两者。

[0112] 进一步参考图1，将过程步骤划分在各自提供封闭且自动化的生物处理的不同模块中的特定方式允许在迄今为止本领域中未见的程度上高效利用资本设备。如将认识到的，在收获和配制之前扩增细胞群体以实现期望的细胞密度的步骤典型地是制造过程中最耗时的步骤，而富集和分离步骤、收获和配制步骤以及激活和遗传修饰步骤耗时少得多。因此，试图使整个细胞疗法制造过程自动化除了在后勤上具有挑战性之外，还可加剧该过程中阻碍工作流程且降低制造效率的瓶颈。特别地，在全自动化过程中，虽然细胞的富集、分离、激活和遗传修饰的步骤可相当快速地发生，但是经遗传修饰的细胞的扩增发生得非常缓慢。因此，从第一样品（例如，第一患者的血液）制造细胞疗法将快速地进行，直到扩增步骤，该步骤需要大量的时间来实现用于收获的期望细胞密度。在全自动化系统的情况下，整个过程/系统将被执行从第一样品的细胞扩增的扩增设备垄断，并且第二样品的处理可能直到整个系统被空出来以供使用才开始。在这方面，在全自动化生物处理系统的情况下，整个系统基本上是离线的，并且不可用于处理第二样品，直到对第一样品完成从富集到收获/配制的整个细胞疗法制造过程。

[0113] 然而，本发明的实施例允许并行处理多于一个的样品（来自相同或不同的患者），以提供资本资源的更高效的利用。如上文所暗指的，该优点是将过程步骤分到三个模块100、200、300中的特定方式的直接结果。特别地参考图2，在实施例中，单个第一模块100和/或单个第三模块300可与生物处理系统12中的多个第二模块（例如，第二模块200a、200b、200c）结合来利用，以提供来自相同或不同患者的多个样品的并行和异步处理。例如，可使用第一模块100来富集和分离来自第一患者的第一单采产物，以产生分离靶细胞的第一群体，并且然后可将靶细胞的第一群体转移到第二模块中的一个，例如模块200a，以用于在控制器210a的控制下激活、遗传修饰和扩增。一旦靶细胞的第一群体被移出第一模块100，第一模块就再次可用于使用以处理来自例如第二患者的第二单采产物。然后，在第一模块100中从取自第二患者的样品中产生的靶细胞的第二群体可被转移到另一个第二模块，例如第二模块200b，以用于在控制器201b的控制下激活、遗传修饰和扩增。

[0114] 类似地，在靶细胞的第二群体被移出第一模块100之后，第一模块再次可用于使用以处理来自例如第三患者的第三单采产物。然后，在第一模块100中从取自第三患者的样品中产生的细胞的第三靶群体可被转移到另一个第二模块，例如第二模块200c，以用于在控制器201c的控制下激活、遗传修饰和扩增。在这方面，例如，用于第一患者的CAR-T细胞的扩增可与用于第二患者、第三患者等的CAR-T细胞的扩增同时发生。

[0115] 该方法还允许后处理如需要那样异步发生。换句话说，患者细胞可不会全部同时生长。培养物可在不同时间达到最终密度，但是多个第二模块200没有链接，并且第三模块300可如需要那样使用。在本发明的情况下，虽然样品可被并行处理，但它们不必分批进行。

[0116] 当每个扩增的细胞群体准备好收获时,来自第二模块200a、200b和200c的扩增的细胞群体的收获同样可使用单个第三模块300完成。

[0117] 因此,通过将激活、遗传修饰和扩增(这是最耗时的,并且共享某些操作要求和/或需要类似的培养条件)的步骤分到独立的、自动化的且功能性封闭的模块中,当执行一个细胞群体的扩增时,用于富集、分离、收获和配制的另一系统设备不会被占用或离线。结果,多细胞疗法的制造可同时执行,从而使设备和占地面积的使用率最大化,并提高总体过程和设施的效率。设想额外的第二模块可被添加到生物处理系统10,以如期望那样提供任何数量的细胞群体的并行处理。因此,本发明的生物处理系统允许类似即插即用的功能,这使得制造设施能够容易地扩大或缩小。

[0118] 在实施例中,第一模块100可为能够从取自患者的单采产物中产生用于在生物过程(诸如免疫疗法的制造和再生医学)中使用的富集和分离的细胞的靶群体的任何系统或装置。例如,第一模块100可为可从GE Healthcare获得的Sefia细胞处理系统的修改版本。下文详细讨论根据本发明的一些实施例的第一模块100的配置。

[0119] 在实施例中,第三模块300可类似地是能够收获和/或配制由第二模块200产生的CAR-T细胞或其它修饰细胞以用于输注到患者体内、用于在细胞免疫疗法或再生医学中使用的任何系统或装置。在一些实施例中,第三模块300可同样是从GE Healthcare获得的Sefia细胞处理系统。在一些实施例中,第一模块100可首先用于富集和分离细胞(其然后被转移到第二模块200以用于激活、转导和扩增(以及在一些实施例中收获)),并且然后也在该过程结束时用于细胞收获和/或配制。在这方面,在一些实施例中,同一设备可用于前端细胞富集和分离步骤,以及后端收获和/或配制步骤。

[0120] 首先关注第二模块200,通过第二模块200内的构件的具体配置以及提供这样的构件之间的具体互连性的独特的流动架构,实现将细胞激活、遗传修饰和细胞扩增的过程步骤组合在提供上文所描述的工作流程效率的单个功能性封闭且自动化的模块200中的能力。下文讨论的图3至图77图示了根据本发明的多种实施例的第二模块200的多种方面。首先参考图3,示出了图示提供细胞激活、遗传修饰和扩增(以及在一些情况下收获)的第二模块200内的流体流动架构400(在本文中也可广义地称为生物处理子系统400或生物处理系统400)的示意图。系统400包括第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420。第一生物反应器容器至少包括第一端口412和与第一端口412流体连通的第一生物反应器管线414以及第二端口416和与第二端口416流体连通的第二生物反应器管线418。类似地,第二生物反应器容器至少包括第一端口422和与第一端口422流体连通的第一生物反应器管线424以及第二端口426和与第二端口426流体连通的第二生物反应器管线428。第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420一起形成生物反应器阵列430。虽然系统400被示出为具有两个生物反应器容器,但是本发明的实施例可包括单个生物反应器或多于两个的生物反应器容器。

[0121] 如下文所讨论的,第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414和第二生物反应器管线418与第二生物反应器容器420的第一生物反应器管线424和第二生物反应器管线428各自包括用于控制通过其中的流体流的相应的阀。特别地,第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414包括第一生物反应器管线阀432,而第一生物反应器容器410的第二生物反应器管线418包括第二生物反应器管线阀424。类似地,第二生物反应器容器420

的第一生物反应器管线424包括第一生物反应器管线阀436,而第二生物反应器容器420的第二生物反应器管线428包括第二生物反应器管线阀438。

[0122] 进一步参考图3,系统400还包括具有第一流体组件管线442的第一流体组件440、具有第二流体组件管线446的第二流体组件444和采样组件448。具有互连管线阀452的互连管线450提供第一流体组件440和第二流体组件444之间的流体连通。如图3中所示出的,互连管线450还提供第一生物反应器容器410的第二生物反应器管线418和第一生物反应器管线414之间的流体连通,从而允许流体沿着第一生物反应器容器的第一循环回路循环。类似地,互连管线还提供第二生物反应器容器420的第二生物反应器管线428和第一生物反应器管线424之间的流体连通,从而允许流体沿着第二生物反应器容器的第二循环回路循环。此外,如下文所讨论的,互连管线450进一步提供第一生物反应器容器410的第二端口416和第二生物反应器管线418与第二生物反应器容器420的第一端口422和第一生物反应器管线424之间的流体连通,从而允许将第一生物反应器容器410的内容物转移到第二生物反应器容器420。如图3中所图示的,在实施例,互连管线450从第二生物反应器管线418、428延伸到第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414和第一流体组件管线442的交叉点。

[0123] 如由图3图示的,第一流体组件440和第二流体组件450沿着互连管线450设置。另外,在实施例,第一流体组件分别通过第一生物反应器容器的第一生物反应器管线414和第二生物反应器容器420的第一生物反应器管线424来与第一生物反应器容器410的第一端口412和第二生物反应器容器420的第一端口流体连通。第二流体组件444经由互连管线450来与第一生物反应器容器410的第二端口416和第二生物反应器容器420的第二端口426流体连通。

[0124] 能够提供双向流体流的第一泵或互连管线泵454沿着第一流体组件管线442设置,并且能够提供双向流体流的第二泵或循环管线泵456沿着互连管线450设置,下文将讨论泵454和泵456的功能和目的。在实施例,泵454、456是高动态范围泵。如图3中还示出的,无菌空气源458通过无菌空气源管线460连接到互连管线450。沿着无菌空气源管线460定位的阀462提供无菌空气源458和互连管线450之间的选择性流体连通。虽然图3示出了连接到互连管线450的无菌空气源458,但是在其它实施例中,在不脱离本发明的更广泛的方面,的情况下,无菌空气源可连接到第一流体组件440、第二流体组件444或在第一生物反应器或第二生物反应器的第二生物反应器管线阀和第一生物反应器管线阀中间的流体流动路径。

[0125] 现在另外参考图4至图6,示出了第一流体组件440、第二流体组件444和采样组件448的详细视图。具体参考图4,第一流体组件440包括多个管道尾部464a-f,管道尾部464a-f中的每个配置成用于选择性地/能够移除地连接到多个第一贮存器466a-f中的一个。第一流体组件440的每个管道尾部464a-f包括管道尾部阀468a-f,其用于选择性地控制去往或来自第一流体组件440的多个第一贮存器466a-f中的相应的一个的流体流。虽然图4具体地示出了第一流体组件440包括六个流体贮存器,但是可如期望那样利用更多或更少的贮存器来提供多种处理流体的输入或收集。如下文所描述的,设想每个管道尾部464a-f可在流体组件440的操作期间所需的时间分别单独地连接到贮存器466a-f。

[0126] 具体参考图5,第二流体组件444包括多个管道尾部470a-d,管道尾部470a-d中的每个配置成用于选择性地/能够移除地连接到多个第二贮存器472a-d中的一个。第二流体组件444的每个管道尾部470a-d包括管道尾部阀474a-e,其用于选择性地控制去往或来自

第一流体组件444的多个第二贮存器472a-d中的相应的一个的流体流。虽然图5具体地示出了第二流体组件444包括四个流体贮存器,但是可如期望那样利用更多或更少的贮存器来提供多种处理流体的输入或收集。在实施例中,如下文所讨论的,第二贮存器中的至少一个(例如第二贮存器472d)是用于收集扩增的细胞群体的收集贮存器。在实施例中,第二贮存器472a是废物贮存器,下文讨论其目的。本发明进一步设想,一个或多个贮存器472a-d可预先连接到它们相应的尾部470a-d,其中每个额外的贮存器及时连接到其相应的尾部,以用于其在第二流体组件440内使用。

[0127] 在实施例中,第一贮存器466a-f和第二贮存器472a-d是单次使用/一次性的柔性袋。在实施例中,袋是基本上二维的袋,其具有相对的面板,面板围绕其周边焊接或固定在一起,并支承用于连接到其相应尾部的连接导管(如本领域中所已知的)。

[0128] 在实施例中,贮存器/袋可使用无菌焊接装置连接到第一管道组件和第二管道组件的管道尾部。在实施例中,焊接装置可定位在模块200旁边,并且焊接装置用于将管道尾部中的一个拼接焊接到袋上的管的尾部(同时保持无菌)。因此,操作者可在需要袋的时候提供袋(例如,通过抓住管道尾部并将其自由端插入到焊接装置中,将袋的管的自由端放置在管道尾部的端部附近,利用新的剃刀刀片切割管,并且当剃刀被拉离时对切割的端部进行加热,同时两个管端部在仍然熔化的同时被压在一起,使得它们重新固化在一起)。相反地,可通过焊接来自袋的管线并在焊缝处切割以分离两个闭合的管线来移除袋。因此,当期望时,贮存器/袋可单独连接,并且本发明不需要在协议开始时必须连接所有贮存器/袋,因为操作者将在整个过程期间能够接近适当的管道尾部,以及时连接贮存器/袋以用于其使用。实际上,虽然有可能所有贮存器/袋都预先连接,但是本发明不需要预先连接,并且第二模块200的一个优点是它允许操作者在操作期间接近流体组件/管线,使得用过的袋可以以无菌方式连接,并且断开,使得其它袋可在协议期间无菌地连接(如下文所讨论的)。

[0129] 如图6中所图示的,采样组件448包括流体连接到互连管线450的一个或多个采样管线,例如采样管线476a-476d。采样管线476a-476d中的每个可包括采样管线阀478a-d,采样管线阀478a-d能够选择性地致动以允许流体从互连管线450流过采样管线476a-476d。如图6中还示出的,每个采样管线476a-476d的远端配置成用于选择性地连接到样品收集装置(例如,样品收集装置280a和280d),以用于从互连管线450收集流体。样品收集装置可采用本领域中已知的任何采样装置的形式,诸如例如注射器、汲取管、袋等。虽然图6图示了采样组件448连接到互连管线,但是在其它实施例中,采样组件可流体联接到第一流体组件440、第二流体组件444、第一生物反应器容器410的第二生物反应器管线阀434和第一生物反应器管线阀432中间的流体流动路径和/或第二生物反应器容器420的第二生物反应器管线阀438和第一生物反应器管线阀436中间的流体流动路径。采样组件448如期望那样在系统400中的一个或多个点处提供完全功能性封闭的流体采样。

[0130] 返回参考图3,在实施例中,系统400还可包括过滤管线482,过滤管线482在沿着互连管线450的两个点处连接,并且沿着互连管线450限定过滤回路。过滤器484沿着过滤管线482定位,以用于从穿过过滤管线482的流体中移除渗透废物。如图3中所示出的,过滤管线482包括分别定位在过滤器484的上游侧和下游侧上的上游过滤管线阀486和下游过滤管线阀488。废物管线490提供过滤器484和第二流体组件444之间以及特别地与第二流体组件444的连接到废物贮存器472a的管道尾部470a的流体连通。在这方面,废物管线490将通过

过滤器484从穿过过滤管线482的流体中移除的废物输送到废物贮存器472a。如图3中所图示的,过滤管线482环绕互连管线阀452,使得通过互连管线450的流体流可被迫使通过过滤管线482(如下文所讨论的)。沿着废物管线490定位的渗透泵492能够操作以将由过滤器移除的废物泵送到废物贮存器472a。在实施例中,过滤器484合乎期望地是细长的中空纤维过滤器,然而在不脱离本发明的更广泛的方面的情况下,也可利用本领域中已知的其它切向流或横流过滤装置,诸如例如平板膜过滤器。

[0131] 在实施例中,第一流体组件440和第二流体组件444的阀以及生物反应器管线阀(即,阀432、434、436、438、无菌管线阀462、互连管线阀452和过滤管线阀486、488)是以下文描述的方式构造的夹管阀。在实施例中,管线本身不需要包括夹管阀,并且图3至图8中的夹管阀的描绘可仅仅表示夹管阀可在管线上操作以便防止流体流的位置。特别地,如下文所讨论的,流动架构400的夹管阀可由相应的致动器(例如,螺线管)提供,当流体路径/管线处于中间时,致动器抵靠对应的砧而操作/起作用,以“夹断”管线,从而防止通过其的流体流。

[0132] 在实施例中,如下文所讨论的,泵454、456和492是蠕动泵,并且泵被集成到单个组件中。合乎期望地,根据编程的协议来自动地指导这些阀和泵的操作,以便实现模块200的恰当操作。设想第二控制器210可通过模块200来指导这些阀和泵的操作。

[0133] 现在转到图8至图11,图示了根据本发明的实施例的第一生物反应器容器410的配置。由于第二生物反应器容器420合乎期望地(尽管不需要)在配置上与第一生物反应器容器410相同,故为了简单起见,下文将仅描述第一生物反应器容器410。在实施例中,生物反应器容器410、420是实现灌注的、基于硅树脂膜的生物反应器容器,其支持其中的细胞群体的激活、转导和扩增。生物反应器容器410、420可用于细胞培养、细胞处理和/或细胞扩增,以增加细胞密度,从而用于在医学治疗或其它过程中使用。虽然生物反应器容器在本文中可被公开为与特定细胞类型结合使用,但是应当理解,生物反应器容器可用于任何合适细胞类型的激活、遗传修饰和/或扩增。此外,所公开的技术可与粘附细胞(即粘附到细胞扩增表面和/或在细胞扩增表面上增殖的细胞)结合使用。在实施例中,第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420可如2018年2月9日提交的序列号为15/893336的美国专利中所公开的那样构造和起作用,该美国专利通过引用以其整体并入本文中。

[0134] 如图8和图9中所示出的,第一生物反应器容器410可包括底板502和联接到底板502的容器主体504。底板502可为用以支承细胞培养物的刚性结构。然而,如参考图9而更详细地讨论的,底板可为非实心板(例如,可为开放的和/或多孔的),以允许向细胞培养物提供氧气。在所图示的实施例中,底板502的形状是矩形的或者几乎矩形的。在其它实施例中,底板502可为可实现低轮廓容器和/或可使第一生物反应器容器可被利用或存储的位置中的空间最大化的任何其它形状。

[0135] 在实施例中,容器主体504包括刚性的、大体上凹形的结构,当联接到底板502时,该结构形成第一生物反应器容器410的空腔或内部隔室506。如其中所示出的,容器主体504可具有类似于底板502的周边形状的周边形状,使得容器主体504和底板502可彼此联接。另外,如所图示的实施例中那样,容器主体504可由透明或半透明材料制成,该材料可实现第一生物反应器容器410的内容物的视觉检查和/或可使得光能够进入第一生物反应器容器410。由底板502和容器主体504形成的内部隔室506可在使用第一生物反应器容器以用于细胞激活、遗传修饰(即转导)和/或细胞扩增期间包含细胞培养基和细胞培养物。

[0136] 如图8至图11中最佳地示出的,第一生物反应器容器410可包括通过容器主体504的多个端口,这些端口可实现内部隔室506和第一生物反应器容器410的外部之间的流体连通,以用于与细胞的激活、转导/遗传修饰和扩增相关的某些过程,诸如培养基输入和废物移除。端口可包括例如第一端口412和第二端口416。如所图示的实施例中那样,端口416可设置在容器主体504中的任何位置处,包括通过容器主体504的顶表面508和/或任何侧面510。如本文中将进一步详细地讨论的,第一生物反应器容器410的具体结构(包括端口412、416的特定数量和位置)使得第一生物反应器容器410能够用于支持细胞的激活、细胞的遗传修饰和高细胞密度扩增。

[0137] 图9是第一生物反应器容器410的实施例的分解视图。第一生物反应器容器410的底板502可为第一生物反应器容器410的底部或支承件。如前面讨论的,底板502可由非实心结构形成。在所图示的实施例中,底板502包含栅格510,栅格510可在结构上为刚性的,同时进一步提供开口以使得自由气体能够通过底板502交换到包含细胞培养物的内部隔室506。栅格510可包括限定在实心区域之间的多个孔512或栅格510的每个孔512之间的横杆514。因此,孔512可为气体交换提供开口,并且横杆514可为第一生物反应器容器410的内部隔室506内的细胞培养物和其它结构提供结构支承。

[0138] 为了为第一生物反应器容器410的内部隔室506内的细胞培养提供进一步的支持,第一生物反应器容器410可包括可设置在底板502的顶表面518上方的膜516。膜516可为气体可渗透、液体不可渗透的膜。膜516也可选择为具有实现高气体渗透性、高气体传输速率和/或对氧气和二氧化碳的高渗透性的性质。因此,膜516可支持内部隔室506内的高细胞密度(例如,高达约 $35\text{MM}/\text{cm}^2$)。膜516的气体渗透性特征可实现自由气体交换以支持细胞培养和/或细胞扩增。照此,膜516可为细胞培养表面和/或细胞扩增表面。膜516可具有相对小的厚度(例如,0.010英寸或0.02cm),这可允许膜516是气体可渗透的。此外,膜516可由气体可渗透材料(诸如硅树脂或其它气体可渗透材料)形成。

[0139] 膜516的平坦性可增加用于使细胞培养物沉降以用于激活、转导和/或扩增的表面面积。为了使膜516在第一生物反应器容器410的使用期间能够保持平坦,网状片520可设置在底板502和膜516之间。网状片520可向膜516提供结构支承,使得膜516可保持为平面的,并且在细胞培养物和/或添加到第一生物反应器容器410以用于细胞培养和/或细胞扩增的任何细胞培养基的重量下可不会下垂或变形。此外,网状片520的网状特性可实现膜516的支承,同时其多孔性仍然实现在第一生物反应器容器410的内部隔室506和紧接在第一生物反应器容器410的外部的环境之间的自由气体交换。网状片可为聚酯网,或者可向膜提供支承并实现自由气体交换的任何其它合适的网材料。

[0140] 如前面讨论的,容器主体504可联接到底板502以形成第一生物反应器容器410的内部隔室506。照此,网状片520和膜516可设置在内部隔室506内,或者至少部分地设置在内部隔室506内。当容器主体504联接到底板502时,0形环522可用于密封第一生物反应器容器410。在实施例中,0形环522可为生物相容的0形环(尺寸173,软Viton®含氟弹性体0形环)。0形环522可装配在形成于容器主体504的周边表面526中的凹槽524内。当主体504配合到板502时,周边表面526面向板502的顶表面518。照此,0形环522可在凹槽524内并抵靠板516和/或底板502的顶表面518而被压缩。0形环522的这样的压缩在没有任何化学或环氧结合的情况下合乎期望地密封第一生物反应器容器410。由于第一生物反应器容器410可用于生

物细胞的激活、转导和扩增,因此O形环522合乎期望地由合适地生物相容的、可高压灭菌的、 γ 辐射稳定的和/或ETO灭菌稳定的材料形成。

[0141] 如上文所讨论的,第一生物反应器容器410可包括多个端口,诸如第一端口412和第二端口416。端口412、416可通过容器主体504而设置,并且可实现内部隔室506和第一生物反应器容器410的外部之间的连通,以用于与细胞培养、细胞激活、细胞转导和/或细胞扩增相关的某些过程,诸如流体或培养基输入、废物移除、收集和采样。每个端口416可包括开口526和相应的配件或管道528(例如,鲁尔配件、倒钩配件等)。在一些实施例中,开口526可配置成以便允许管道直接结合并且避免对于配件(例如沉孔)的需要。

[0142] 在实施例中,除了第一端口412和第二端口416之外,第一生物反应器容器410可进一步包括设置在容器主体504的顶表面508中的空气平衡端口530。空气平衡端口530可类似于第一端口412和第二端口416而构造,其中相同的参考数字表示相同的部件。空气平衡端口530可进一步在内部隔室506和第一生物反应器容器410的外部之间提供气体交换,以用于由细胞培养物使用以用于扩增。此外,空气平衡端口530可有助于维持内部隔室506内的大气压力,以在内部隔室506内提供用于细胞培养和/或细胞扩增的环境。空气平衡端口530可通过容器主体504的顶表面508而设置(如所图示的实施例中那样),或者设置在围绕容器主体504的任何其它位置处。如下文更详细地讨论的,通过容器主体504的顶表面508的中心位置可有助于防止在通过倾斜第一生物反应器容器410来混合细胞培养物期间空气平衡端口530变湿。

[0143] 第一生物反应器容器410的每个元件(包括底板502、容器主体504、端口412、416和530、膜516、网状片520和O形环522)可由生物相容的、可高压灭菌的和 γ 辐射稳定的和/或ETO灭菌稳定的材料制成。照此,每个元件和作为整体单元的第一生物反应器容器410可用于生物细胞的激活、转导和扩增,和/或用于细胞制造过程的其它过程。

[0144] 第一生物反应器容器410可经由灌注实现细胞培养和/或细胞扩增,这可提供对于支持细胞生长来说必要的营养,并且可减少细胞培养物中的杂质。连续灌注是向生长的细胞培养物添加新鲜培养基供应物,同时移除用过的培养基(例如,使用过的培养基)。如下文所讨论的,第一端口412和第二端口416可用于灌注过程。第一端口412可实现内部隔室506和第一生物反应器容器410的外部之间的连通,并且可用于将新鲜培养基添加到第一生物反应器容器410中(诸如从第一流体组件440的培养基贮存器)。在一些实施例中,第一端口412可在第一生物反应器容器410内的细胞培养物和培养基的表面上方的任何位置处设置在容器主体504中并延伸通过容器主体504。在一些实施例中,第一端口412可设置成使得它接触或延伸通过第一生物反应器容器410内的细胞培养物和培养基的表面。

[0145] 第二端口416可设置在完全或部分地浸没在第一生物反应器容器410内的细胞培养物和培养基的表面下的任何位置处。例如,第二端口416可为通过容器主体504的侧面510中的一个而设置的几乎侧向的端口。在一些实施例中,第二端口416可设置成使得第二端口416不会到达内部隔室506的底部(例如,膜516)。在一些实施例中,第二端口416可到达内部隔室506的底部。第二端口416可为双功能端口。照此,第二端口可用于将灌注培养基拉出第一生物反应器容器410的内部隔室506,以促进细胞培养物的灌注。此外,第二端口416还可用于移除细胞培养物的细胞。如上文所注意到的,在一些实施例中,第二端口可不到达第一生物反应器容器410的内部隔室506的底表面。例如,第二端口416可定位成远离膜516大致

0.5cm。因此,在静态平面位置,第二端口416可用于在不拉出细胞培养物的细胞的情况下移除用过的细胞培养基,因为细胞可经由重力沉降到膜516(例如,细胞扩增表面)。因此,在静态平面位置,第二端口416可促进灌注过程,并且可实现第一生物反应器容器410内的生长的细胞培养物的细胞密度的增加。当期望从内部隔室506移除细胞(例如在细胞培养物的收获期间)时,为了使滞留体积最小化,第一生物反应器容器410可以下文描述的方式朝向第二端口416倾斜,从而使得能够接近细胞,以用于移除细胞。

[0146] 另外,在实施例,第二端口416可不包括过滤器,并且因此灌注过程可为无过滤器的。照此,当第二端口416用于移除培养基时,可没有对细胞进入第二端口416的物理阻碍。此外,第二端口416可倾斜,使得尽管第二端口416侧向地通过容器主体504的侧面22而设置,但是第二端口416可朝向膜516和底板502倾斜。第二端口416的倾斜特征可使得第二端口416能够定位在容器主体504上更靠近膜表面36的相对低的位置,同时使对O形环522和凹槽524的干扰最小化,以有助于在使用中时维持第一生物反应器容器410的密封。此外,在一些实施例中,当移除用过的培养基时,第二端口416的倾斜特征可降低通过第二端口416的流体流的速度。另外,端口直径与流出第二端口416的流体流速结合可使得用于将培养基拉出内部隔室506的通过第二端口416的吸入速度可使邻近第二端口416的单独细胞上的吸力最小化,使得该力低于将细胞拉向膜516的重力。因此,如上文所讨论的,第二端口416可用于移除灌注培养基以促进细胞培养物的灌注,而基本上不移除细胞培养物的细胞。随着细胞沉降时间的增加,被移除的培养基的细胞浓度可降低到由第二端口416的位置促进的不可测量的范围中。此外,内部开口540的位置可改变,以改变推荐的细胞沉降时间。更靠近膜516的位置可与更长的沉降时间相关联,而在培养基的顶部处或更接近培养基的顶部的位置与更短的沉降时间相关联,因为细胞将从生长培养基的顶部沉降并首先耗尽。

[0147] 在实施例,第二端口416因此不仅可用于在灌注过程期间移除用过的培养基,还可用于从内部隔室506移除细胞培养物的细胞(例如在细胞培养物的收获期间)。为了促进用过的灌注培养基的更大移除和细胞的移除,容器主体504可包括成角度的或人字形的侧壁532。人字形的侧壁532因此包括顶点或尖534。侧壁532的顶点534可进一步包括通过其中的第二端口416,当容器主体504联接到底板502时,容器主体504设置在尖534附近。当第一生物反应器容器410朝向第二端口416倾斜(例如以5度角)时,成角度的侧面532和尖534可使得培养基和/或细胞培养物的细胞能够更大程度地排出。

[0148] 如参考图10而更详细地讨论的,由第一端口412和第二端口416的位置促进的用以生长细胞的灌注的使用可在内部隔室506内实现低培养基高度(例如,0.3-2.0cm)。内部隔室506内相对低的培养基高度可使得第一生物反应器容器410能够成为相对低轮廓的容器,同时使得最大的可实现的细胞密度能够增加。此外,灌注与第一生物反应器容器410的一起使用可通过向内部隔室506内的细胞提供新鲜培养基来支持细胞生长,而且还实现移除细胞培养物中的杂质,使得一旦在第一生物反应器容器410内达到特定的细胞密度目标,可能就不需要在单独的装置中进行额外的细胞洗涤。例如,通过无过滤器灌注,第一生物反应器容器410可提供新鲜培养基并以每天全体积交换的速率减少细胞培养物内的杂质(例如,造成以大致每2.3天1log的速率减少杂质)。因此,第一生物反应器容器410的结构可实现使用灌注来生长第一生物反应器容器410内的细胞培养物,这因此可使得细胞培养物能够扩增到具有降低的杂质水平的高目标密度。如下文还讨论的,通过无过滤器灌注,第一生物反应

器容器410可以以每天显著更多的体积(例如,大于每天2体积)的速率提供新鲜培养基,以用于接种、冲洗、洗涤/减少残余物和/或在扩增之后排出/收获细胞。

[0149] 为了促进第一生物反应器容器410的低轮廓结构,可维持内部隔室506内的相对低的培养基高度。图10是第一生物反应器容器410的横截面视图,图示了第一生物反应器容器410内的细胞培养基538的高度536。如前面讨论的,容器主体504可联接到底板502以形成内部隔室506,在内部隔室506内,可通过灌注实现细胞培养物的扩增。照此,可通过穿过容器主体504而设置的第一端口412来提供替换或新鲜培养基538以用于细胞生长,并且可通过穿过容器主体504的侧面510而设置的第二端口416来移除现有或用过的培养基538。灌注过程可促进第一生物反应器容器410的内部隔室506内的培养基538的相对低的培养基高度536。内部隔室506内的灌注培养基538的相对低的高度536可使得第一生物反应器容器410能够成为低轮廓结构,这因此可实现整体上紧凑的细胞制造系统。

[0150] 第一生物反应器容器410的内部隔室506内的灌注培养基538的高度536可在0.3cm和2cm之间,并且顶部空间542(即在内部隔室506中的培养基538和容器主体504的顶表面508之间形成的间隙)的高度可为大致2cm。因此,每 cm^2 可存在少于2mL的培养基并且每 cm^2 可存在少于4mL的总体积(包括培养基、细胞培养物和顶部空间)。相对低的培养基高度536可使得培养基体积与膜516的表面面积的比率能够低于某个值。照此,培养基体积与膜表面面积的比率可低于阈值水平,或者在合乎期望的范围内,这通过使用灌注来生长细胞培养物的细胞来促进。例如,阈值水平可为0.3至2.0之间的比率。培养基体积与膜表面面积的低比率可使得第一生物反应器容器410能够具有低轮廓或紧凑的结构,同时仍然允许实现高细胞密度的细胞培养。

[0151] 如前面讨论的,双功能第二端口416可通过容器主体504而设置,使得第二端口416完全或部分地浸没在第一生物反应器容器410内的培养基538的表面544下。在一些实施例中,第二端口416可设置成使得第二端口416到达内部隔室506的底部(例如,膜516)。第二端口416的定位可促进培养基和杂质从内部隔室506内的细胞培养物中移除,而不移除细胞,直到期望这样的移除,例如在收获时。无过滤器的第二端口416与第一端口412一起可允许使用灌注来向细胞提供用于细胞扩增的生长培养基538,并移除用过的培养基538和其它杂质或副产物。第一端口412和双功能的第二端口416围绕容器主体504的位置促进如下的配置:在该配置中,将内部隔室506内的培养基的高度536维持在相对低的水平,并且因此允许第一生物反应器容器410成为相对低轮廓的容器,同时仍然允许产生高密度细胞培养物。

[0152] 具体参考图11,生物反应器容器410的底板502包括多种特征,这些特征实现将生物反应器容器用作更广泛的生物处理系统10的部分,并且特别地用作生物处理系统10的第二模块200的部分。如图11中所示出的,底板502包括形成在底板502的底表面中的多个凹部550,其目的将在下文中描述。在实施例中,凹部可位于底板502的拐角附近。凹部550可各自具有大体上圆柱形形状,并且终止于圆顶状或半球状的内表面处。如图11中还示出的,底板502可包括位置验证结构552,其配置成与第二模块200的传感器相互作用,以确保第一生物反应器容器410在第二模块200内的恰当定位。在实施例中,位置验证结构可为束中断器,其配置成当第一生物反应器容器410被恰当地安置在第二模块200中时中断第二模块200的光束。

[0153] 底板502还包括形成在邻近底表面上的一对平坦接合表面554,其偏离底板的中心

线(横跨底板的宽度延伸)。合乎期望地,接合表面554沿着底板502的纵向中心线间隔开,以便定位成邻近底板502的相对端部。底板502可进一步包括至少一个孔口或开口556,以允许通过接合和操作生物反应器容器的生物处理设备来感测第一生物反应器容器410的内容物。

[0154] 在实施例中,第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420和流体架构400可以下文公开的方式集成到组件或套件600中。在实施例中,套件600是单次使用的一次性套件。如图12至图14中最佳地示出的,第一生物处理容器410和第二生物处理容器420并排接纳在一次性套件600的托盘610内,并且流动架构400的多种管以下文中所描述的方式布置在托盘610内。

[0155] 另外参考图15,托盘610包括多个大体上薄的、刚性的或半刚性的侧壁,其包括前壁612、后壁614和相对的侧向侧面616、618,这些侧壁在周边上界定底表面620和大体上开放的顶部。侧壁和底表面620限定托盘610的内部隔室622。在实施例中,托盘610的开放顶部由外围凸缘624界定,外围凸缘624呈现如下的表面:该表面用于接纳包封内部隔室622的可移除盖(未示出),以及用于合乎期望地安置在生物处理设备的抽屉的上边缘上(如下文所指示的)。托盘610的底表面620包括与生物处理系统中的生物反应器容器的数量对应的多个开口。例如,托盘610可包括第一开口626和第二开口628。底表面620还可包括邻近第一开口626和第二开口628的额外的开口630,以用于下文描述的目的。在实施例中,托盘610可为热成型的、3D打印的或注射模制的,然而在不脱离本发明的更广泛的方面的情况下,也可利用其它制造技术和过程。

[0156] 如图15中最佳地示出的,第一开口626和第二开口628中的每个具有周边,该周边的形状和/或尺寸设计成使得第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420可定位在相应的开口626、628上方并由内部隔室622内的托盘610的底表面620支承,同时仍然允许生物反应器容器610、620的部分能够通过相应的开口626、628从托盘610的底部接近。在实施例中,开口的周边包括至少一个突出部或突起,其用于在相应的开口上方支承生物反应器容器。例如,每个开口626、628的周边可包括朝向开口626、628的中心向内突出的突出部632,其用于支承放置在其上的生物反应器容器410、420。如图12和图15中所示出的,托盘610还可包括在开口626、628上方向上延伸的一个或多个凸台,其用于当生物反应器容器被接纳在相应的开口626、628上方时抑制它们的侧向移动。因此,凸台用作对准装置,其促进生物反应器容器410、420在托盘610内的恰当定位,并有助于防止生物反应器容器410、420在套件600装载或定位在第二模块200中期间的意外移动(如下文所讨论的)。

[0157] 进一步参考图12和图13,托盘610可包括形成在托盘610的底表面上的一个或多个支承肋636。支承肋636可横跨托盘610的宽度和/或长度延伸,并赋予托盘610刚性和强度,从而促进套件600的移动和操纵。肋636可与托盘一体地形成,或者可经由现有技术中已知的附接手段作为辅助构件而添加(参见图13)。在实施例中,托盘610包括用于接纳通过其中的接合板的开口638,接合板在本文中也称为管道模块650,其以有组织的方式固持流体流动管线,并将它们保持就位,以用于由泵和夹管阀接合。在其它实施例中,管道模块650可与托盘610的后壁614一体地形成。

[0158] 图16和图17图示了根据本发明的实施例的管道模块650的配置。如其中所示出的,管道模块650包括第一管道保持器块652,其配置成接纳流体流系统400的第一流体组件管

线442、互连管线450和废物管线490,并将第一流体组件管线442、互连管线450和渗透废物管线490保持就位,以用于与下文结合图35和图36描述的蠕动泵组件的相应泵头454、456、492选择性地接合。在实施例中,流体组件管线442、互连管线450和废物管线490由第一管道保持器块652维持在水平延伸并且竖直隔开的取向。特别地,如图17中最佳地示出的,第一管道保持器块652在两个间隔开的位置656、658处(诸如通过夹或管与管道保持器块652中的狭槽之间的简单过盈配合)接合管线442、450、490中的每个,位置656、658在它们之间限定空隙。如图17中还示出的,第一管道保持器块652包括间隙开口660,间隙开口660配置成接纳蠕动泵组件的靴(未示出)。这种配置允许通过(一个或多个)蠕动泵的相应泵头来抵靠靴而蠕动压缩管线442、450、490,以便提供通过管线的流体的相应原动力(如下文所讨论的)。

[0159] 进一步参考图16至图18,管道模块650进一步包括第二管道保持器块654,其与第一管道保持器块652一体地形成(或以其它方式联接)。第二管道保持器块654配置成接纳与夹管阀相关联的流体流系统400的所有流体流动管线。例如,第二管道保持器块654配置成固持第一流体组件440的管道尾部464a-f、第二流体组件444的管道尾部470a-d、第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414和第二生物反应器管线418、第二生物反应器容器420的第一生物反应器管线424和第二生物反应器管线428、无菌空气源管线460、互连管线450和过滤管线482(以及在一些实施例中,采样管线476a-476d)。类似于第一管道保持器块652,第二管道保持器块654可将这些管维持在水平延伸且竖直隔开的取向。特别地,第二管道保持器块654可包括多个或竖直隔开且水平延伸的狭槽666,狭槽666配置成在其中接纳管线。图18和图19还最佳地图示了狭槽666的配置,狭槽666固持由夹管阀作用/与夹管阀对接的所有流动管线。合乎期望地,狭槽666遵循块654的轮廓,但是特别地横跨平面背板延伸,以便朝向过滤器484开放。如图18中所示出的,在实施例中,第二管道保持器块654可具有第二管道保持器块654的底部处的一个或多个窄管道狭槽682,以及废物管线管道狭槽684,窄管道狭槽682用于保持互连管线450的环,采样管线从该环延伸,废物管线管道狭槽684用于接纳连接到废物贮存器472a的管道尾部470a。

[0160] 第二管道保持器块654可包括平面背板662,其具有多个孔口664,孔口664对应于由第二管道保持器块654固持的多个流体流动管线。特别地,至少一个孔口664与每个狭槽666和固持在其中的流动管线水平对准。如图16中最佳地示出的,第二管道保持器块654包括两个间隙开口668、670,其配置成接纳通过其中的夹管阀组件的砧(未示出)。该配置允许通过夹管阀阵列的致动器的相应活塞来将第一流体组件440的管道尾部464a-f、第二流体组件444的管道尾部470a-d、第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414和第二生物反应器管线418、第二生物反应器容器420的第一生物反应器管线424和第二生物反应器管线428、无菌空气源管线460、互连管线450和过滤管线482抵靠砧而选择性地压缩,以选择性地防止或允许流体流动(如下文所讨论的)。如图18和图19中所示出的,孔口664可布置在并排定位的第一列和第二列中,其中第一列孔口中的孔口相对于第二列孔口上的孔口在竖直方向上偏移,使得第一列孔口中的孔口不与第二列孔口中的孔口水平对准。这种配置允许管道模块650、托盘610和套件600作为整体而具有低轮廓。

[0161] 在实施例中,过滤器484(在图16中示出为细长中空纤维过滤器模块)可与管道模块650集成,诸如通过将过滤器484通过使用固持夹672来安装到管道模块650。在过滤器484

是中空纤维过滤器的情况下,过滤器484可延伸管道模块650的基本上整个长度,并且可包括用于接纳来自过滤管线482的流体输入流的第一输入端674和用于在移除渗透物/废物之后将渗余物输送回到过滤管线482和互连管线450以用于循环至第一生物反应器容器410或第二生物反应器容器420中的一个的第二输出端676。过滤器484还可包括邻近第二输出端676的渗透端口678,其用于连接到废物管线490,以用于将废物/渗透物输送到渗透物/废物贮存器472a。最后,管道模块650可包括用于接纳夹并组织生物反应器管线(例如,第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414和第二生物反应器管线418和/或第二生物反应器容器420的第一生物反应器管线424和第二生物反应器管线428)的多个特征680。

[0162] 类似于托盘610,管道模块650可为热成型的、3D打印的或注射模制的,然而在不脱离本发明的更广泛的方面的情况下,也可利用其它制造技术和过程。如上文所讨论的,在实施例中,管道模块650可与托盘610一体地形成。在其它实施例中,管道模块650可为由托盘610能够移除地接纳的单独构件。

[0163] 图20至图22示出了套件600的实施例的多种视图,图示了接纳在托盘610内的第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420以及由管道模块650接纳的流动架构400的流体管线。如其中所示出的,如图20至图22中所示出的套件600不具有开口630,而是在那里包括实心地板,以便在托盘610中提供采样空间631,以用于接纳保持采样管线(例如采样管线476a、476b)的贮器。套件600提供用于细胞处理的模块化平台,该平台可容易地装配和在使用之后丢弃。第一流体组件440和第二流体组件444的管道尾部允许有即插即用功能,从而实现多种培养基袋、试剂袋、废物袋、采样袋和收集袋的快速且容易的连接,以允许在单个平台上执行多种过程。在实施例中,连接和断开可通过如上文所讨论的管段的无菌切割和焊接来完成,诸如利用TERUMO装置,或者如本领域中已知的那样通过夹紧、焊接和切割尾部段来完成。

[0164] 现在转到图23至图25,套件600具体地配置成由生物处理设备700接纳,生物处理设备700包含作为生物处理方法的部分而致动套件600所需的所有硬件(即,控制器、泵、夹管阀致动器等)。在实施例中,生物处理设备700和套件600(包含流动架构400和生物反应器容器410、420)一起形成上文结合图1和图2描述的第二生物处理模块200。生物处理设备700包括外壳710,外壳710具有能够被接纳在外壳710内的多个抽屉712、714、716。虽然图23描绘了包含三个抽屉的设备700,但是该设备可具有少至单个抽屉、两个抽屉或多于三个的抽屉,以提供将在每个抽屉内同时执行的生物处理操作。特别地,在实施例中,每个抽屉712、714、716可为独立的生物处理模块,其用于执行细胞激活、遗传修饰和/或扩增的过程(即,等同于上文结合图2描述的第二模块200a、200b和200c)。在这方面,可向设备700添加任何数量的抽屉,以提供来自相同或不同患者的多个样品的并行处理。在实施例中,不是每个抽屉共享公共外壳,而是在实施例中每个抽屉可被接纳在专用外壳内,并且外壳可彼此上下地堆叠。

[0165] 如图23和图24中所示出的,每个抽屉(例如抽屉712)包括限定处理室722的多个侧壁718和底表面720,以及大体上开放的顶部。抽屉712能够在关闭位置和打开位置之间移动,在关闭位置中,如针对图23中的抽屉714和716而示出的,抽屉完全被接纳在外壳710内,在打开位置中,如针对图23和图24中的抽屉712而示出的,抽屉712从外壳710延伸,从而实现通过开放的顶部接近处理室722。在实施例中,侧壁718中的一个或多个是温度受控的,以

用于控制处理室722内的温度。例如,侧壁718中的一个或多个可包括嵌入式加热元件(未示出),或者与加热元件热连通,使得侧壁718和/或处理室722可被加热到期望的温度,以用于将处理室722维持在如针对将由模块200执行的过程步骤而优化的期望的温度(例如,37摄氏度)。在一些实施例中,底表面720和外壳的顶表面的下侧(当抽屉关闭时在处理室上方)可以以类似的方式(例如,嵌入式加热元件)而为温度受控的。如下文详细讨论的,处理室722后面的抽屉712的硬件隔室724可容纳设备700的所有硬件构件。在实施例中,抽屉712可进一步包括邻近处理室722的辅助隔室730,其用于容纳包含培养基、试剂等的贮存器,该贮存器连接到第一流体组件440和第二流体组件444。在实施例中,辅助隔室730可被冷藏。

[0166] 每个抽屉(例如抽屉712)可能够滑动地被接纳在安装到外壳710的内部的相对导轨726上。线性致动器可操作性地连接到抽屉712,以选择性地在打开位置和关闭位置之间移动抽屉712。线性致动器能够操作以提供抽屉712在打开位置和关闭位置之间的平滑且受控的移动。特别地,线性致动器配置成以基本上恒定的速度(以及在运动停止和开始时最小的加速度和减速度)打开和关闭抽屉712,以使对一个或多个生物反应器容器的内容物的干扰最小化。

[0167] 图25是抽屉的内部的俯视平面图,示出了抽屉712的处理室722、硬件隔室724和辅助隔室730。如其中所图示的,硬件隔室724位于处理室722的后方,包括功率源732、运动控制板和驱动电子器件734,它们与第二模块控制器210、低功率螺线管阵列736、泵组件738(其包括用于泵454、456、492的泵头)和抽屉接合致动器740集成或以其它方式通信。如下文所描述的,抽屉712的硬件隔室724进一步包括泵靴742和一对夹管阀砧744,其用于分别与泵组件738和螺线管阵列736对接。在实施例中,泵靴742和螺线管砧744固定到处理室的前基板(前板)。硬件隔室(和所描述的构件)都安装到后基板。两个板都能够滑动地安装到导轨。此外,抽屉接合致动器740联接两个板,并用于将两个板(以及承载在板上的构件)带到接合位置(从而将泵滚子头带入泵靴,并且因此挤压泵管道(如果插入其之间的话))。如本文中进一步描述的,泵组件在流体路径400的管线442、450和490上提供选择性操作,从而为其提供独立的相应蠕动原动力。类似地,如将进一步描述的,托盘600的管道保持器块654将定位在螺线管阵列736和砧744之间。

[0168] 如图25中还图示的,两个座板(例如第一座板746和第二座板748)在底表面720上位于处理室722内,并从底表面720向上延伸或直立。在实施例中,处理室722可容纳单个座板,或者多于两个的座板。座板746、748配置成在其上接纳或以其它方式接合第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420。如图25中还示出的,抽屉712还包括板750,板750配置有定位成邻近处理室722内的座板746、748的称重传感器,其用于感测贮存器(例如,定位在其上的废物贮存器472a)的重量。

[0169] 图26至图28最佳地图示了座板746、748的配置,其中图28A示出了定位在座板底下的硬件构件。如本文中所使用的,座板746、748和硬件构件(即,与座板集成或如图28A中所示出的那样定位在座板底下的传感器、马达、致动器等)可统称为座板。第一座板746和第二座板748在配置和操作上基本上相同,但是为了简单起见,以下对座板746、748的描述仅参考第一座板746。座板746、748具有基本上平面的顶表面752,顶表面752的形状和表面面积大体上对应于第一生物反应器容器410的底板502的形状和面积。例如,座板的形状可为大体上矩形的。座板746、748还可包括缓冲或间隙区域758,其大体上对应于托盘610的突起或

突出部632的位置,其目的将在下文描述。座板746、748由多个称重传感器760(例如,定位在座板746的每个拐角底下的四个称重传感器760)支承。称重传感器760配置成在生物处理期间感测第一生物反应器容器410的重量,以用于由控制器210使用。

[0170] 在实施例中,座板746可包括嵌入式加热元件或者与加热元件热连通,使得放置在其上的处理室722和/或第一生物反应器容器410的内容物可维持在期望的温度。在实施例中,加热元件可与对侧壁718、顶壁和底表面进行加热的加热元件相同或不同。

[0171] 如所图示的,座板746包括多个定位销或对准销754,其突出于座板746的顶表面452上方。定位销754的数量以及定位销754的位置和间距可对应于生物反应器容器410、420的底板502的底表面中的凹部550的数量、位置和间距。如下文所指示的,当第一生物反应器容器410定位在处理室722内时,定位销754能够被接纳在第一生物反应器容器410的底板502中的凹部550内,以确保第一生物反应器容器410在第一座板746上的恰当对准。

[0172] 进一步参考图26至图28,座板746可进一步包括集成传感器756,其用于检测第一生物反应器容器410在第一座板746上的恰当对准(或未对准)。在实施例中,传感器756是红外光束,然而在不脱离本发明的更广泛的方面的情况下,也可利用诸如杠杆开关的其它传感器类型。传感器配置成当第一生物反应器容器410被恰当地安置在第一座板746上时与底板502上的位置验证结构552相互作用。例如,在传感器756是红外光束并且位置验证结构552是束中断器(即,扁平突出部)的情况下,对于基本上不透红外线的位置验证结构552,当第一生物反应器容器410被完全安置在座板746上时,束中断器将中断红外光束(即,中断束)。这将向控制器210发出信号,表明第一生物反应器容器410被恰当地安置。如果在将第一生物反应器容器410定位在第一座板746上之后控制器没有检测到传感器756的红外光束被中断,则这指示第一生物反应器容器410没有被完全或恰当地安置在座板746上,并且需要调整。因此,座板746上的传感器756和第一生物反应器容器410的底板502上的位置验证结构552确保在开始生物处理之前第一生物反应器容器410被安置在座板746上的等高位置(如由对准销确定的)。

[0173] 仍然进一步参考图26至图28A,座板746另外包括嵌入式温度传感器759,其定位成以便与第一生物反应器容器410的底板502中的孔口556对准。温度传感器759配置成测量或感测生物反应器容器410内的一个或多个参数,诸如例如生物反应器容器410内的温度水平。在实施例中,座板746可另外包括:电阻式温度检测器760,其配置成测量顶表面752的温度;以及二氧化碳传感器(位于座板下面),其用于测量生物反应器容器内的二氧化碳水平。

[0174] 如图26至图28A中进一步示出的,每个座板746、748包括致动器机构761(例如,马达),其包括例如一对相对的凸轮臂762。凸轮臂762被接纳在座板746、748中的狭槽764内,并且能够围绕凸轮销766在间隙位置和接合位置之间旋转,在间隙位置,凸轮臂762定位在座板746的顶表面752底下,在接合位置,当第一生物反应器容器410被接纳在第一座板746的顶部上时,凸轮臂762在座板的顶表面752上方延伸并接触第一生物反应器容器410的底板502的相对的平坦接合表面554。如下文详细讨论的,致动器机构能够操作以倾斜座板顶部上的生物反应器容器,以提供搅拌和/或帮助生物反应器容器的排出。

[0175] 参考图29至图32,示出了抽屉712的硬件隔室724中的抽屉接合致动器740和线性致动器768的更详细的视图。参考图29,并且如上文所指示的,线性致动器768能够操作以在打开位置和关闭位置之间移动抽屉712。在实施例中,线性致动器768电连接到外壳710的外

部的摇杆开关770,该开关允许用户控制抽屉的移动。线性致动器770提供抽屉712的受控移动,以防止抽屉712内的(一个或多个)生物反应器容器的内容物受到干扰。在实施例中,线性致动器768具有大致16”的冲程,并且具有大致每秒2英寸的最大速度。

[0176] 现在转到图30,抽屉接合致动器740包括导螺杆772和附接到抽屉712内的前板751的挂钩臂774。抽屉接合致动器操作性地连接到泵组件738和螺线管阵列736,并且能够操作以在第一间隙位置和接合位置之间移动泵组件738和螺线管阵列736。

[0177] 图31和图32更好地图示了泵组件738和螺线管阵列736的间隙位置和接合位置。如图31中所图示的,在间隙位置,泵组件738和螺线管阵列736分别与泵靴742和夹管阀砧744隔开。在致动导螺杆772时,抽屉接合机构740将泵组件738和螺线管阵列线性地向前移动到图32中所示出的位置。在该位置,泵组件738的泵头接合第一管道保持器块652中的管线442、450、490,并且螺线管阵列736定位成足够靠近夹管阀砧744,使得螺线管阵列736的活塞/致动器可将第二管道保持器块654的其相应的流体流动管线抵靠(一个或多个)夹管阀砧744而夹紧/夹持,因此防止通过该流体流动管线的流动。

[0178] 返回参考图24,并且另外参考图33至图39,在操作中,通过致动外壳710的外部的摇杆开关770,抽屉712可能控制地移动到打开位置。包含管道模块650(其保持流动架构400的所有管和管道尾部)以及第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420的一次性插入式套件600然后被降低到处理室722内的位置。当套件600被降低到处理室722中时,泵靴742通过第一管道保持器块652的间隙开口660而被接纳,使得泵管442、450、490定位在蠕动泵组件738的泵头454、456、492和泵靴742之间。图35是蠕动泵组件738的透视图,示出了泵头454、456、492相对于彼此的定位。图36图示了当套件600被接纳在处理室722内时泵头454、456、492相对于泵管442、450、490的定位。如其中所示出的,泵管442、450、490定位在泵靴742和泵头454、456、492之间。在操作中,当抽屉接合致动器740将泵组件738定位在接合位置时,泵头454、456、492能够在控制器210的控制下选择性地致动,以启动、维持和停止通过管442、450、490的流体流。

[0179] 类似地,当套件600被降低到处理室722中时,夹管阀砧744通过第二管道保持器块654的间隙开口668、670而被接纳,使得由第二管道保持器块654固持的第一流体组件440的管道尾部464a-f、第二流体组件444的管道尾部470a-d、第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414和第二生物反应器容器420的第一生物反应器管线424和第二生物反应器管线428、无菌空气源管线460、互连管线450和过滤管线482定位在螺线管阵列736和夹管阀砧744之间。这种配置在图37至图39中最佳地图示(图37和图38图示了在将第二管道保持器块654的背板662接纳在空间776内之前螺线管阵列736和夹管阀砧744之间的关系)。

[0180] 如其中所示出的,螺线管阵列736的每个螺线管778包括活塞780,活塞780能够线性地延伸通过第二管道保持器块654的背板662中的相关联的孔口(孔口664),以将相关联的管抵靠夹管阀砧744而夹持。在这方面,螺线管阵列736和砧744一起形成夹管阀阵列(其包括第一流体组件440和第二流体组件444的阀,以及生物反应器管线阀,即阀432、434、436、438、无菌管线阀462、互连管线阀452和过滤管线阀486、488)。特别地,流动架构400的夹管阀由螺线管阵列736的相应螺线管778(即,螺线管的活塞)提供,螺线管阵列736抵靠其相应的砧744而操作/起作用,同时流体路径/管线处于中间。特别地,在操作中,当抽屉接合

致动器740将螺线管阵列736定位在接合位置时,每个螺线管778能够在控制器210的控制下选择性地致动,以将相关联的流体流动管线抵靠砧744而夹持,从而防止通过其中的流体流。本发明设想每个流体管线定位在平面砧面和平面螺线管致动器头之间。备选地,螺线管致动器头可包括成形头,诸如在细长边缘处相接的两个渐缩表面(类似于Phillips头螺丝刀),其被优化以在回弹性柔性流体管线上提供期望的夹紧力。还备选地,砧面可包括细长脊或突起,其朝向每个流体管线延伸,使得平面螺线管头可将流体管线抵靠该横向延伸的脊而压缩,以便封闭管线以阻止通过其中的流体流。

[0181] 参考图33、图34和图40,当套件600被降低到抽屉的处理室中时,第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420通过开口的周边(并且特别地通过突出部/突起632)而被支承在开口626、628上方。当套件被进一步降低时,座板746、748延伸通过开口626、628,并接纳或以其它方式接合生物反应器容器410、420。一旦生物反应器容器410、420由座板746、748接纳,开口626、628的形状和座板746、748的顶表面752(例如,座板746、748的缓冲区域758,其对应于托盘610的突出部/突起632)允许托盘610继续向下行进,使得托盘610的底表面以及突出部/突起632被安置在低于座板746、748的顶表面752的位置处,使得生物反应器容器410、420可由座板746、748以与托盘610的底表面620隔开的关系支承。这确保托盘610不会干扰生物反应器容器410、420在座板746、748上的等高安置。

[0182] 当座板746、748延伸通过托盘610中的开口726、728时,座板746、748上的定位销754被接纳在生物反应器容器410、420的底板502中的对应凹部550中,从而确保生物反应器容器410、420将与座板410、420恰当地对准。当恰当地安置在座板746、748上时,束中断器552中断座板中的传感器756的光束,从而向控制器指示生物反应器容器410、420处于恰当的位置。因为座板746、748和对准销高度是等高的,所以束中断器552对传感器756的光束的中断同样确保生物反应器容器410、420是等高的。在该恰当安置的位置,座板746、748上的传感器759与底板502中的孔口556对准,以允许分别感测生物反应器容器410、420的内部隔室内的处理参数。另外,在完全安置的位置,座板746、748的凸轮臂762分别与生物反应器容器410、420的底板502上的平坦接合表面554对准。

[0183] 图40是图示第一生物反应器容器410在座板746上的该完全安置位置的横截面前视图。如图40中所示出的,呈加热垫782和加热模块784的形式的加热元件可定位在座板746下方,以用于对座板746进行加热。如图40中所示出的,二氧化碳感测模块786也可定位在座板底下,以用于感测处理室722内的二氧化碳含量。

[0184] 如图40中进一步示出的,在实施例中,抽屉712的侧壁718和底部(以及外壳的顶壁)可包括盖788、有助于使来自处理室722的热损失最小化的绝缘泡沫层790、如上文所描述的那样用于对壁进行加热的薄膜加热器792以及内金属板794。在实施例中,内金属板794可由铝形成,然而在不脱离本发明的更广泛的方面的情况下,也可利用其它导热材料。抽屉712可进一步包括有助于使来自处理室722的热损失最小化的一个或多个刷式密封件796以及使热能从抽屉712流到设备700的其它构件(诸如外壳710或其它抽屉(例如抽屉714、716))最小化或对此进行防止的热中断器798。

[0185] 再次参考图34,当套件600被接纳在处理室722中时,处理室722的底部中的邻近第二座板748的称重传感器750延伸通过托盘610中的开口730,使得废物袋472a可连接到管道尾部470a并定位在称重传感器750上。如其中所示出的,当套件600被接纳在抽屉712内时,

第二管道保持器块654固持管道,使得第一流体组件440的管道尾部464a-f和第二流体组件444的管道尾部470b-d延伸到辅助隔室730中,以用于将贮存器连接到辅助隔室730。在实施例中,采样管线476a-476d同样延伸到辅助隔室730中。

[0186] 现在转到图41至图44,图示了座板746、748的凸轮臂762的操作。如其中所示出的,凸轮臂762能够在缩回位置和接合位置之间移动,在缩回位置,凸轮臂762定位在座板746、748的顶表面底下,在接合位置,凸轮臂762围绕凸轮销766旋转,并在座板746、748上方延伸,以接合生物反应器容器410、420的平坦接合表面554,从而将生物反应器容器410、420提升离开座板746、748。因为在默认状态下凸轮臂762缩回到座板746、748的顶表面底下,并且生物反应器容器410、420被支承在等高的座板746、748(并且特别是等高的对准销754)上,所以不需要功率来将生物反应器容器维持在等高位置。特别地,当生物反应器容器410、420被接纳在座板746、748上时,它们处于等高位置。在功率中断的情况下,生物反应器容器410、420保持安置在等高的座板746、748上,并且不需要使用凸轮臂762进行任何连续调节以维持等高位置。这与一些系统形成对比,这些系统可能需要使用伺服马达来持续调节生物反应器以维持等高位置。实际上,在本发明的凸轮臂762的配置的情况下,如下文所讨论的,致动器仅需要在倾斜生物反应器容器以用于搅拌/混合时被激励,这使对处理室722的热贡献最小化。

[0187] 如图41至图43中所示出的,凸轮臂762可能够顺序操作以搅拌生物反应器容器410、420的内容物。例如,当期望搅拌生物反应器容器410的内容物时,凸轮臂中的一个将被致动,以将生物反应器容器410的一个端部提升离开座板746(并且脱离与座板746上的定位销754的接合),同时相对端部保持安置在座板上,并且非升高端部上的定位销754保持接纳在底板502中的对应凹部550中。然后,升高的凸轮臂将被旋转回到座板底下的间隙位置,并且相对的凸轮臂将被旋转回到接合位置,以将生物反应器容器的相对端部升高离开座板和定位销。

[0188] 在实施例中,凸轮致动系统可被设计成使得凸轮臂762可在不接触生物反应器容器的情况下归位,从而防止对培养物的破坏,并允许凸轮臂762在长细胞处理周期期间的任何点归位(或测试)。因此,虽然本发明设想可为生物反应器容器提供其它摇摆或搅拌装置,但是通过在座板的相对侧上具有两个凸轮臂762,混合机构的总体高度可最小化。例如,可利用中央致动器(位于座板的中央)来实现 $\pm 5^\circ$ 的运动,但是可利用由在容器的两侧上的凸轮臂驱动的容器的 $0-5^\circ$ 运动来实现容器的几乎相同的运动,从而有效地在一半高度上赋予容器 $\pm 5^\circ$ 的运动。此外,凸轮臂762的运动(例如,凸轮臂旋转的速度和相对的凸轮臂之间的正时)可被调节,以使容器中的波浪形成最大化,从而使波浪幅度最大化,并且因此(理想地)使容器内容物的均匀性和实现均匀性的时间最大化。也可基于具有给定几何形状的容器中的体积来调节正时,以使混合效率最大化。

[0189] 在实施例中,光学传感器756可用于确认第一生物反应器容器410在每次凸轮搅拌运动之后已正确地重新定位。进一步设想,甚至在交替的凸轮运动之间,也可检查和验证生物反应器容器的正确重新定位。这实现基本上实时地快速检测未对准,从而允许操作者干预以重新安置生物反应器容器,而不会显著偏离生物处理操作/协议。

[0190] 图43是示出在该搅拌过程期间生物反应器容器内的流体800的位置的示意性图示。如图42中所示出的,在实施例中,与座板746集成的归位传感器802可由控制器利用来确

定凸轮臂762何时已返回到座板746的顶表面底下的间隙位置。这在协调凸轮臂762的运动以在生物反应器容器中提供期望的混合频率方面是有用的。在实施例中,凸轮臂762配置成相对于座板746提供最大5度的倾斜角。

[0191] 参考图44,图示了在混合/搅拌期间在座板的定位销754和生物反应器容器410的底板502中的凹部550之间的界面。在实施例中,凹部550具有圆顶状或半球状内表面,并且直径 d_1 大于定位销754的直径 d_2 。如图44中所图示的,该配置在定位销754和凹部550之间提供间隙,当定位销554被接纳在凹部550中时,这允许生物反应器容器410倾斜。

[0192] 在实施例中,如图45至图50中所示出的,生物处理设备700的每个抽屉(例如,抽屉712)合乎期望地包括铰接地安装到其的向下翻转的前面板810。如图45、图49和图50中最佳地示出的,向下翻转的前面板810允许在不必打开抽屉712的情况下接近辅助隔室730。如将认识到的,该配置允许在过程中采样和更换培养基袋。结合上文,在实施例中,辅助隔室730可配置有多个伸缩滑动轨道812,伸缩滑动轨道812提供附接装置815,多种贮存器/培养基袋可从附接装置815上悬挂下来。轨道812能够在如图48中所描绘的隔室730内的缩回位置和如图49中所描绘的从隔室730出来的延伸位置之间移动。当收集袋装满或者培养基/液体袋需要替换时,轨道812可简单地向外延伸,并且袋被松开。新袋可连接到其相应的尾部,并且然后从轨道上悬挂下来,并且滑回到辅助隔室730中,而不必打开抽屉712或暂停处理。在实施例中,轨道812可安装在横向地延伸的横杆814上。因此,轨道812可能能够在杆814上侧向地滑动,并且能够从辅助隔室延伸和能够缩回到辅助隔室中。另外,当抽屉打开时(图46),轨道812可围绕后横杆旋转,使得其越过隔室730,以允许用户将管道尾部朝向隔室730的前部穿引,从而提供第三自由度。

[0193] 如图51中所图示的,在另一个实施例中,培养基/流体袋可安装在平台820上,平台820能够从收起位置到进入位置而旋转离开辅助隔室730。例如,平台820可安装成用于沿着辅助隔室730的侧壁中形成的导轨822移动。

[0194] 参考图52,在实施例中,生物处理设备700可进一步包括在每个抽屉(例如抽屉712)底下接纳在外壳710内的低轮廓废物托盘816。废物托盘816独立地安装在其抽屉上,以能够在关闭位置和打开位置之间移动。在关闭位置,托盘816合乎期望地与抽屉的前表面齐平地延伸,而在打开位置,托盘816暴露其自身的室819,以使操作者能够接近。室819提供连接到其上面的托盘600的流体路径的大废物袋的容易存储,并且在不必打开抽屉712的情况下使得能够接近废物袋。另外,在关闭位置,废物托盘816将室819定位成与其抽屉在下面对准,并且其尺寸和形状被设计成以便能够操作以包含来自处理室722或辅助隔室730的任何泄漏物。

[0195] 在实施例中,每个抽屉可包括定位在处理室上方(例如,每个生物反应器容器410、420上方)的相机,以允许在不必打开抽屉712的情况下对抽屉712的内部进行视觉监测。在实施例中,相机(或额外的相机)可与座板组件集成在一起,或者在侧向地向(一个或多个)生物反应器容器中看的侧壁上。

[0196] 因此,本发明的第二模块200在迄今为止本领域中所未见的程度上提供了细胞处理的自动化。特别地,流体流动架构400、泵组件738和夹管阀阵列736允许在生物反应器容器410、420与连接到第一流体组件740和第二流体组件744的袋之间进行自动化流体操纵(例如,流体添加、转移、排出、冲洗等)。如下文所讨论的,该配置还允许进行中空纤维过滤

器浓缩和洗涤、无过滤器灌注和管线预注。抽屉接合致动器740的使用也用于插入式套件600的自动接合和脱离,从而进一步使人接触点最小化。实际上,可能仅需要人接触点来添加和移除源/培养基袋、采样和输入数据(例如,样品体积、细胞密度等)。

[0197] 参考图53至图77,图示了使用第二模块200及其流体流动架构400的自动化通用协议,该协议用于在同一容器中进行固定化Ab包被、可溶性Ab添加、 γ -逆转录病毒载体扩增的工作流程。该通用协议以自动化且功能性封闭的方式提供细胞群体的激活(在图53至图59中图示)、转导前准备和转导(在图60至图71中图示)、扩增(图72至图76)以及对于一些实施例来说收获(图77)。在下文描述夹管阀的操作时,当阀不用于特定操作时,阀处于其关闭状态/位置。因此,在阀打开以允许进行特定的操作之后,并且一旦该操作完成,阀在进行下一操作/步骤之前关闭。

[0198] 如图53中所示出的,在第一步骤中,阀432和468f打开,并且第一流体组件管线泵454被致动,以将抗体(Ab)包被溶液从连接到第一流体组件440的贮存器466f通过第一生物反应器容器410的第一端口412泵送到第一生物反应器容器410。抗体包被溶液被孵育一段时间,并且然后通过打开阀434、474a并启动循环管线泵456而通过互连管线排出到第一流体组件440的废物贮存器472a。如本文中所描述的,可通过使用凸轮臂462倾斜生物反应器容器410来促进生物反应器容器410的排出。

[0199] 在排出抗体包被溶液之后,阀432和468e打开,并且泵454被致动,以通过第一生物反应器管线将冲洗缓冲液从连接到第一流体组件440的贮存器466e泵送到第一生物反应器容器410。然后,通过致动循环管线泵456并打开阀474a,冲洗缓冲液通过互连管线450排出到废物贮存器472a。在实施例中,该冲洗和排出程序可重复多次,以充分冲洗第一生物反应器容器410。

[0200] 转到图55,在利用缓冲液冲洗第一生物反应器容器410之后,通过打开阀468d和432并致动泵454,种子袋466d中的细胞(其先前已使用第一模块100富集并分离)被转移到第一生物反应器容器。细胞被泵送通过第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414,并通过第一端口412进入生物反应器容器410。如图56中所示出的,阀432和468a然后打开,并且泵454被致动,以将第二抗体(Ab)溶液通过第一端口412从连接到第一流体组件440的贮存器466a泵送到第一生物反应器容器410。

[0201] 在将第二抗体溶液泵送到第一生物反应器容器中之后,第二抗体溶液贮存器466a然后被冲洗,并且冲洗培养基被泵送到第一生物反应器容器。特别地,如图57中所示出的,阀474b、452和468a打开,并且使用泵454将来自第二流体组件444的冲洗培养基贮存器/袋472b的冲洗培养基泵送到第二抗体溶液贮存器466a中,以冲洗贮存器。在冲洗之后,阀432打开,并且冲洗培养基从贮存器466a被泵送到第一生物反应器容器410。在实施例中,可使用该程序来将第二抗体溶液贮存器466a冲洗多次。

[0202] 在冲洗第二抗体溶液贮存器466a之后,接种物/种子细胞袋466d也可任选地被冲洗。特别地,如图58中所示出的,阀474b、452和468d打开,并且使用泵454将来自第二流体组件444的冲洗培养基贮存器/袋472b的冲洗培养基泵送到接种物/种子细胞袋466d中,以冲洗该袋。在冲洗之后,阀432打开,并且使用泵454将冲洗培养基从袋466d泵送到第一生物反应器容器410。通过在冲洗接种物/种子细胞袋466d之后将冲洗培养基泵送到第一生物反应器容器410,第一生物反应器容器410中的细胞密度降低。此时,可在激活之前获取样品以测

量第一生物反应器容器中的溶液的一个或多个参数(例如,以确保在激活之前存在期望的细胞密度)。特别地,如图58中所示出的,阀434、452和432打开,并且泵456被致动以沿着第一生物反应器容器的第一循环回路泵送第一生物反应器容器410的内容物(即,从第二端口416出来,通过互连管线450,并且通过第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414和第一端口412回到第一生物反应器容器410)。为了获取样品,第一样品容器280a(例如,汲取管、注射器等)连接到第一样品管道尾部476a,并且阀478a打开以将一些流通过互连管线450分流到第一样品容器280a以用于分析。

[0203] 如果对所获取的样品的分析指示所有溶液参数都在预确定的范围内,则第一生物反应器容器410内的溶液被孵育预确定的时间段,以用于激活溶液中的细胞群体(如图59中所图示的)。例如,在实施例,第一生物反应器容器410中的细胞群体可被孵育大致24-48小时。

[0204] 现在参考图60,在激活之后,为了准备转导,阀438和474b可打开,并且操作泵456以将RetroNectin溶液从贮存器472b通过第二生物反应器容器420的第二端口426泵送到第二生物反应器容器420。在将RetroNectin溶液泵送到第二生物反应器容器420以用于第二生物反应器容器420的RetroNectin包被之后,溶液在第二生物反应器容器420中被孵育预确定的时间段。如图60中进一步示出的,在孵育之后,通过打开阀438和474a并致动循环管线泵456,所有RetroNectin溶液然后都从第二生物反应器容器420排出到废物贮存器472a。在这些RetroNectin包被、孵育和排出步骤(涉及第二生物反应器容器420)期间,应当注意到,激活的细胞群体保持在第一生物反应器容器410中。应当注意到,没有必要在所有过程中利用RetroNectin或用于提高遗传修饰的效率的其它试剂。

[0205] 如图61中所示出的,在RetroNectin包被之后,冲洗缓冲液袋472b连接到第二流体组件444(或者它可能已经存在并连接到管道尾部中的一个),并且阀474b和438打开并且泵456被致动以将缓冲液从袋472b泵送到第二生物反应器容器420。如上文所讨论的,备选地,可改为通过打开阀452和436来将缓冲液泵送通过第二生物反应器容器420的第一端口422。

[0206] 现在转到图62,在限定的时间段之后,通过打开阀438和474a并致动互连管线泵456,第二生物反应器容器420中的所有缓冲液被排出到第二流体组件444的废物贮存器472a。

[0207] 此时,如图63中所示出的,可从第一生物反应器容器410中的细胞中获取激活后预浓缩样品。如其中所示出的,阀434、486、488和432打开,并且泵456被致动,以使第一生物反应器容器410中的溶液进行如下循环:从第二端口434出来,通过互连管线,通过过滤管线48和过滤器484,通过第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414,并且通过第一端口412回到第一生物反应器容器410。为了获取样品,第二样品容器280b(例如,汲取管、注射器等)连接到第二样品管道尾部476b,并且阀478b打开以将一些流通过互连管线450分流到第二样品容器280b以用于分析。

[0208] 现在参考图64,并且取决于从样品获得的浓度,可通过使第一生物反应器容器410的内容物循环通过过滤器484来执行浓缩。如上文所讨论的,这通过打开阀434、486、488和432并致动泵456来完成,这使得第一生物反应器容器410中的溶液进行如下的循环:从第二端口416出来,通过第二生物反应器管线418,通过互连管线450,通过过滤管线482和过滤器484,通过第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414,并通过第一端口412回到第

一生物反应器容器410。当流体穿过过滤器484时,废物被移除,并且渗透泵492将这样的废物通过废物管线490泵送到第二流体组件444的废物贮存器472a。在实施例中,重复该程序,直到第一生物反应器容器410中的体积浓缩至预确定的体积。

[0209] 转到图65,在浓缩之后,激活容器(即,包含浓缩细胞群体的第一容器410)中的浓缩细胞群体通过灌注以恒定体积被洗涤。特别地,如其中所示出的,来自第一流体组件440的培养基袋466b的培养基通过互连管线450通过第一端口412被泵送到第一生物反应器容器410中,与此同时,培养基通过第二端口416被泵送出第一生物反应器容器410,使得第一生物反应器容器410中维持恒定的体积。当培养基被添加到容器410中和从容器410中移除时,废物可被过滤器484滤出并被引导至废物贮存器472a。

[0210] 可以以与前面针对预浓缩采样而描述的方式类似的方式来从第一生物反应器容器410中的细胞中获取洗涤后样品。特别地,如图66中所示出的,阀434、486、488和432打开,并且泵456被致动,以使第一生物反应器容器410中的流体进行如下循环:从第二端口434出来,通过互连管线,通过过滤管线48和过滤器484,通过第一生物反应器容器410的第一生物反应器管线414,并且通过第一端口412回到第一生物反应器容器410。为了获取样品,第三样品容器280c(例如,汲取管、注射器等)连接到第三样品管道尾部476c,并且阀478c打开以将一些流通过互连管线450分流到第三样品容器280c以用于分析。

[0211] 如图67中所示出的,包含解冻的病毒载体的袋连接到第一流体组件440(诸如通过管道尾部464c)。然后,阀468c和436打开,并且泵454被致动,以将病毒载体包被溶液从袋466c通过第一端口422转移到第二生物反应器容器420。然后,在预确定的时间段内执行孵育,以用于第二生物反应器容器420的病毒包被。在孵育之后,通过打开阀438和474a并致动循环管线泵456,病毒载体包被溶液从第二生物反应器容器420排出到废物贮存器472a。在实施例中,病毒和非病毒载体可作用于转导/遗传修饰的试剂。

[0212] 如图68中所图示的,在第二生物反应器容器420由病毒载体包被之后,来自第一生物反应器容器410的洗涤后细胞被转移到第二生物反应器容器420以用于转导/遗传修饰。特别地,阀434、452和436打开,并且循环管线泵456被致动,以将细胞通过第一生物反应器容器410的第二端口416泵送出第一生物反应器容器420,通过互连管线450,泵送到第二生物反应器容器420的第一生物反应器管线424,并且通过第二生物反应器容器420的第一端口422泵送到第二生物反应器容器420中。

[0213] 然后,通过打开阀468b和436并致动泵454,将来自培养基袋466b的培养基添加到第二生物反应器容器420,以将第二生物反应器容器420中的溶液的总积增加到预确定体积(如图69中所图示的)。参考图70,然后可通过以下方式来获取预转导样品:打开阀438、452和436并致动循环管线泵456,以沿着第二生物反应器容器的循环回路泵送第二生物反应器容器420中的溶液(即,从第二端口426出来,通过互连管线450,并通过第二生物反应器容器420的第一端口422和第一生物反应器管线414回到第二生物反应器容器420)。为了获取样品,第四样品容器280d(例如,汲取管、注射器等)连接到第四样品管道尾部476d,并且阀478d打开以将一些流通过互连管线450分流到第四样品容器280d以用于分析。

[0214] 如果对所获取的第四样品的分析指示所有参数都在成功转导所需的预确定范围内,则第二生物反应器容器420内的细胞群体被孵育预确定的时间段,以用于转导溶液中的细胞群体(如图71中所图示的)。例如,在实施例中,第二生物反应器容器420中的细胞群体

可被孵育24小时以用于转导。

[0215] 参考图72,在转导之后,培养基被添加到第二生物反应器容器420中,以在第二生物反应器容器420中实现预确定的扩增体积。如其中所示出的,为了添加培养基,阀468b和436打开,并且泵454被致动,以将生长/灌注培养基从培养基袋466b通过第二生物反应器容器的第一端口422泵送到第二生物反应器容器420,直到达到预确定的扩增体积。

[0216] 如图73中所图示的,然后可通过以下方式来获取预扩增样品:打开阀438、452和436并致动循环管线泵456,以如上文所指示的那样沿着第二生物反应器容器420的循环回路泵送第二生物反应器容器420中的溶液(即,从第二端口426出来,通过互连管线450,并通过第二生物反应器容器420的第一端口422和第一生物反应器管线414回到第二生物反应器容器420)。为了获取样品,第五样品容器280e(例如,汲取管、注射器等)连接到第五样品管道尾部476e,并且阀478e打开以将一些流通过互连管线450分流到第五样品容器280e以用于分析。

[0217] 如果对所获取的第五样品的分析指示所有参数都在细胞群体的成功扩增所需的预确定范围内,则第二生物反应器容器420内的细胞群体被孵育预确定的时间段,例如4小时,以让细胞沉降。

[0218] 如图74中所示出的,在该孵育期之后或在随后的预确定时间,通过将培养基从培养基袋466b通过第一端口422泵送到第二生物反应器容器420中,与此同时,将用过的/使用过的培养基通过第二端口426泵送出第二生物反应器容器420(并通过互连管线450泵送到废物贮存器472a),从而以1体积/天的速率执行灌注(1x灌注)。这种灌注通过打开阀468b、436、438和474a并致动第一泵454和循环管线泵456来完成。在这种1x灌注期间,来自培养基袋466b的培养基以与用过的培养基从第二生物反应器容器420中移除并被送至废物的速率基本上相同的速率被引入到第二生物反应器容器420中,以在第二生物反应器容器420内维持基本上恒定的体积。

[0219] 然后可如需要/期望那样执行采样,以监测扩增过程和/或确定何时达到期望的细胞密度。如上文所讨论的,可通过以下方式来获取样品:打开阀438、452和436并致动循环管线泵456,以如上文所指示的那样沿着第二生物反应器容器420的循环回路泵送第二生物反应器容器420中的溶液(即,从第二端口426出来,通过第二生物反应器管线428,通过互连管线450,并通过第二生物反应器容器420的第一端口422和第一生物反应器管线424回到第二生物反应器容器420)。为了获取样品,另一个样品容器280x(例如,汲取管、注射器等)连接到样品组件448的样品管道尾部,并且管道尾部的阀打开,以将一些流通过互连管线450分流到样品容器280x以用于分析(如图75中所示出的)。在每次采样操作之后,在预确定的时间段(例如4小时)内执行没有灌注的孵育,以允许细胞在重新开始灌注之前沉降。

[0220] 如图76中所示出的,在该孵育期之后,通过将培养基从培养基袋466b通过第一端口422泵送到第二生物反应器容器420中,与此同时,将用过/使用过的培养基通过第二端口426泵送出第二生物反应器容器420(并通过互连管线450泵送到废物贮存器472a)(如图74中所示出的),从而以1体积/天的速率执行灌注(1x灌注)。这种灌注通过打开阀468b、436、438和474a并致动第一泵454和循环管线泵456来完成。

[0221] 如图76中所示出的,当采样指示预确定阈值(例如,5MM/mL)的活细胞密度(VCD)时,通过将培养基从培养基袋466b通过第一端口422泵送到第二生物反应器容器420中,与

此同时,将用过/使用过的培养基通过第二端口426泵送出第二生物反应器容器420(并通过互连管线450泵送到废物贮存器472a),从而以2体积/天的速率执行灌注(2x灌注)。这种灌注通过打开阀468b、436、438和474a并致动第一泵454和循环管线泵456来完成。在这种2x灌注期间,来自培养基袋466b的培养基以与用过的培养基从第二生物反应器容器420中移除并被送至废物的速率基本上相同的速率被引入到第二生物反应器容器420中,以在第二生物反应器容器420内维持基本上恒定的体积。

[0222] 最后,参考图77,在实现期望的活细胞密度之后,可通过打开阀438和474d并致动循环管线泵456来收获细胞。然后,扩增的细胞群体通过第二端口426被泵送出第二生物反应器容器420,通过互连管线450,并泵送到连接到第二管道组件444的管道尾部470d的收集袋472d。这些细胞然后可以以本领域中迄今已知的方式配制,以用于输送并输注到患者体内。

[0223] 因此,生物处理系统10的第二模块200及其流动架构400和生物反应器容器410、420提供了灵活的平台,在该平台上可以基本上自动化且功能性封闭的方式执行多种生物处理操作。特别地,虽然图53至图77图示了可使用本发明的生物处理系统10(特别地,使用其第二模块200)来执行的示例性通用协议,但是该系统在这方面并不如此受限。实际上,可由本发明的系统实现多种自动化协议,包括许多特定于客户的协议。

[0224] 与现有系统相比,生物处理系统10的第二模块200是功能性封闭的自动化系统,其容纳第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420以及流体处理和流体容纳系统,它们都维持在细胞培养友好的环境条件下(即,在温度和气体受控的环境内),以实现细胞激活、转导和扩增。如上文所讨论的,该系统包括自动化套件装载和封闭采样能力。在这种配置中,该系统实现在单个系统中进行免疫细胞激活、转导、扩增、采样、灌注和洗涤的所有步骤。它还为用户提供了在单个生物反应器容器(例如,第一生物反应器容器410)中组合所有步骤或者使用生物反应器容器410、420两者进行端对端激活和洗涤的灵活性。在实施例中,单个扩增生物反应器容器(例如,生物反应器容器420)能够稳健地产生数十亿个T细胞的剂量。单剂量或多剂量可在原位产生,具有高回收率和高生存力。另外,该系统设计成赋予最终用户运行用于制造基因修饰的免疫细胞的不同协议的灵活性。

[0225] 由本发明的生物处理系统提供的一些商业优势包括通过简化工作流程、降低劳动强度、减少洁净室基础设施的负担、减少故障节点、降低成本和增加操作规模的能力来实现产品商业化的稳健且可扩展的制造技术。

[0226] 如上文结合通用工作流程所讨论的,本发明的系统、生物处理系统10以及第二模块200的流动架构400和生物反应器容器410、420使得能够以自动化且功能性封闭的方式执行培养物浓缩、洗涤、慢灌注、快速灌注和“循环”灌注过程。例如,如上文所讨论的,互连管线450上的泵456可用于在浓缩步骤中运行渗透泵492(典型地以循环泵456的百分比,诸如例如约10%)的同时使流体从生物反应器的端口中的一个循环通过过滤管线482和过滤器484,并且然后回到生物反应器上的另一个端口。浓缩可开环运行,或者可基于从生物反应器中移除的测量体积或废物中累积的测量体积而停止。在实施例中,过滤器、泵速、过滤器面积、管腔数量等都针对细胞总数和目标细胞密度而适当地调整大小,以限制污垢和由于剪切造成的过度细胞损失。

[0227] 在实施例中,并且如上文所讨论的,本发明的系统也可用于洗涤,例如,以移除残

余物,诸如孵育之后剩余的病毒载体。除了第一流体组件管线442上的泵454用于泵入额外的培养基以替换从渗透废物泵492泵送的流体之外,洗涤涉及上文针对浓缩而描述的相同的步骤。新培养基的引入速率可对应于由渗透泵492移除流体的速率。这允许在生物反应器容器中维持恒定的体积,并且只要生物反应器中的内容物充分混合(循环可足够),残余物就可随时间指数级地移除。在实施例中,该相同的过程可在激活后用于基于原位中空纤维过滤的细胞悬浮液洗涤,以移除残余物。对于包被表面和未包被表面,可溶性激活试剂的洗脱也可经由基于过滤器的灌注来完成。

[0228] 如上文还讨论的,在灌注过程中,第一流体组件管线442上的泵454可用于将培养基添加到给定的生物反应器容器,而互连管线450上的泵456用于将用过的培养基移动到第二流体组件中的废物袋。在实施例中,重力可用于沉降细胞,并且用过的培养基可以以不显著干扰生物反应器容器内的细胞的速率泵送出。该过程可涉及以相同的速率开环运行泵454和456。在实施例中,一个泵(454或456)可以以设定的速率运行,并且另一个泵的速率可基于生物反应器容器的质量/体积或废物袋的质量/体积(或测量的源袋的质量/体积)来调节。

[0229] 结合上文,设想泵控制可基于生物反应器容器的重量测量(使用来自称重传感器760的反馈)。例如,该系统的配置实现基于称重传感器读数的动态泵校准,从而允许该系统自动适应管/泵性能随时间的变化。此外,当排空或填充生物反应器容器时,该方法可用于对质量(体积)变化率的闭环控制。

[0230] 在另一个实施例中,生物处理系统允许使用流动架构400对系统中的多种生物反应器容器进行循环灌注。例如,如上文所描述的,循环泵456和沿着第一流体组件管线442的泵545用于结合适当的夹管阀状态灌注第一生物反应器容器410内的细胞。然后,可停止或暂停第一生物反应器容器410内的细胞的灌注,并且然后可致动循环泵456和泵454以及适当的夹管阀来灌注第二生物反应器容器420内的细胞。在这方面,多种生物反应器的灌注可顺序执行(即,以重复且交替的方式灌注第一生物反应器容器410一段时间,然后灌注第二生物反应器容器420一段时间)。这允许灌注系统中的任何数量的生物反应器容器,而不需要使用更多的泵、培养基袋或废物袋。

[0231] 在循环灌注的情况下,泵可连续运行,可间歇地一起运行(占空比),或者可顺序运行(源,然后废物,重复进行),以便仍然将多种生物反应器容器中的体积/质量维持在大约相同的水平。如所指示的,循环灌注(间歇地一起运行一组泵并等待一段时间间隔)也将允许使用相同的两个泵灌注多个容器。此外,即使泵没有大的低端动态范围,循环灌注也允许有较低的有效交换速率(诸如约1体积/天)。此外,循环灌注还允许如由第一流体组件440中的阀控制的那样利用不同的培养基来灌注每个容器。

[0232] 另外,在实施例中,快速灌注可用于残余物移除(例如,用于激活后Ab移除和/或转导后残余物移除)。在快速灌注过程中,上文所描述的灌注过程可比典型的1-5体积/天运行得快得多,诸如例如在约8-20体积/天之间,或大于约20体积/天,以在大约几分钟到几小时内实现1log的减少。在实施例中,灌注速率与细胞损失平衡。在一些实施例中,快速灌注可允许消除中空过滤器484,并且仍然满足在某些步骤之后快速移除残余物的生物学要求。

[0233] 如上文进一步描述的,本发明的系统促进使用第一流体组件管线442上的泵454、使用来自连接到第二流体组件444的另一个袋/贮存器的冲洗缓冲液或流体来冲洗连接到

第一流体组件440的袋/贮存器。另外,流动架构/系统400的流体管线可利用来自无菌空气源458的无菌空气清理,以防止细胞停留在管线中并死亡,或者防止培养基或试剂停留在管线中并降解或未使用。无菌空气源458也可用于从管线中清除试剂,以便确保没有比预期更多的试剂被泵送到生物反应器容器410、420。无菌空气源458同样可用于清理一直通向(第一流体组件440或第二流体组件444的)所连接的袋的管线,以清理无菌管焊接,从而限制遗留物。备选地,或者除了使用无菌空气源458清理管线之外,可使用从生物反应器容器中的一个中抽出的空气来清理管线,只要通过其抽出空气的端口没有浸没并且生物反应器容器具有空气平衡端口530。

[0234] 如上文所讨论的,该系统允许对(一个或多个)生物反应器容器的内容物进行封闭抽屉式过程中采样。在采样期间,可使用凸轮臂762来搅拌将从其抽取样品的容器,从而使用循环管线泵456循环容器的内容物,并使用采样组件448来从互连管线450抽取样品。在实施例中,仅未结合珠的细胞可被搅拌。

[0235] 如上文还讨论的,本发明的系统允许在实现目标细胞密度之后收集细胞群体。在实施例中,收集扩增的转导细胞群体可包括:使用互连管线450上的泵456来将细胞移动到连接到第二流体组件444的袋中的一个;或者利用互连泵456来循环细胞以将细胞移动到连接到第一流体组件440的袋。该过程可用于最终收集或大样品体积,或者可用于使采样过程完全自动化(即,通过将注射器或袋连接到第一流体组件440,循环生物反应器容器的内容物,并且利用流体组件泵454从循环的内容物中抽出期望的样品体积的部分并朝向注射器/袋移动)。在这样的情况下,循环泵456和阀然后可用于清理流体/细胞的循环管线。另外,第一流体组件管线442上的泵454可用于继续将所有等分的样品体积推入样品贮器,从而使用管线中的空气来完成样品向贮器的转移,而管线中没有可观数目的细胞剩余。

[0236] 虽然上文所描述的实施例公开了在第一生物反应器容器中执行细胞激活并将激活的细胞转移到第二生物反应器容器以用于转导和扩增的工作流程,但是在实施例中,本发明的系统可允许在第一生物反应器容器中执行激活和转导操作,并且在第二生物反应器容器中执行遗传修饰的细胞的扩增。此外,在实施例中,本发明的系统可允许原位处理分离的T细胞,其中激活、转导和扩增单元操作都在单个生物反应器容器内执行。在实施例中,本发明因此通过实现简化且自动化友好的“一锅”激活、转导和扩增容器而简化现有的协议。

[0237] 在这样的实施例中,T细胞激活剂可为微米尺寸的Dynabead,并且慢病毒载体用于转导。特别地,如本文中所公开的,微米尺寸的Dynabead用于分离和激活T细胞的双重目的。在实施例中,T细胞的激活(和分离)可在生物反应器容器410中的一个中以上文所描述的方式使用Dynabead执行。随后,激活的细胞被病毒转导以用于遗传修饰,诸如以上文结合图60至图71描述的方式。激活后和病毒转导后,然后可使用上文所描述的无过滤器灌注方法将病毒从生物反应器容器410中洗掉,该方法将细胞和微米尺寸的Dynabead固持在生物反应器容器410中。这使得细胞能够在用于激活和转导的同一生物反应器容器410中扩增。无过滤器灌注方法另外使得培养物洗涤能够进行,而不需要首先固定需要在扩增期间与细胞一起固持的激活珠。特别地,当病毒被洗掉时,微米尺寸的Dynabead不会在缓慢的灌注速率下被流化,而是固持在容器中。纳米尺寸的病毒粒子和残余的大分子在缓慢灌注期间被流化并被洗掉。

[0238] 在实施例中,在扩增之后,可以以上文结合图77描述的方式收获细胞。在收获之

后,可利用磁性去珠过程从收集的细胞中移除Dynabead。在其它实施例中,收获扩增的细胞群体和对细胞去珠的步骤使用灌注同时执行,由此通过生物反应器容器中的进料端口引入培养基,同时通过生物反应器容器中的排出端口从生物反应器容器中移除包括扩增的细胞群体的细胞培养基。特别地,当需要进行培养物的最终去珠时,通过利用细胞重量和细胞-Dynabead复合物重量的差异,可使用无过滤器灌注来去除微米尺寸的珠。为了对培养物去珠,生物反应器容器的全部内容物将混合(以上文所描述的方式使用例如致动器机构的凸轮臂762)。在混合/搅拌之后,重的Dynabead将在10-15分钟内下沉并沉降在硅膜516上。相比之下,细胞需要超过4小时来沉降在膜516上。在混合/搅拌后10-15分钟的保持期之后,可使用灌注缓慢抽出细胞悬浮液,而不干扰沉降的Dynabead。输入培养基管线可用于维持生物反应器容器内的培养基床高度。因此,本文中所描述的发明通过消除对于若干中间过程细胞转移和谨慎的洗涤和去珠步骤的需要而简化了当前的Dynabead协议,并且使成本和潜在风险最小化。通过在收获细胞的同时对培养物去珠,可消除对额外的磁性装置或一次性用品的需要,这些物品典型地是必要的。

[0239] 与其它静态的无灌注培养系统对比,本发明的基于气体渗透膜的生物反应器容器410支持高密度细胞培养(例如,高达35mm/cm²)。因此,使用Dynabead激活、转导、洗涤和扩增的所有四个单元过程可在同一生物反应器容器中以完全自动化且功能性封闭的方式执行。因此,本发明的生物处理系统通过消除对于中间过程细胞转移和谨慎洗涤步骤的需要而简化了当前的协议,并且使由多个人接触点导致的成本和潜在风险最小化。

[0240] 在实施例中,系统的两个生物反应器容器410、420可利用相同的起始培养物或两个同时分裂的培养物(例如,一个生物反应器容器410中的CD4+细胞和另一个生物反应器容器420中的CD8+细胞)运行。分裂培养物允许进行两种细胞类型的并行独立处理和扩增,这两种细胞类型可在输注到患者体内之前组合。

[0241] 虽然上文已描述用于使用本发明的生物处理系统产生和扩增遗传修饰的细胞的许多可能的CAR-T工作流程,但是本文中所描述的工作流程并不旨在是全面的,因为本发明的系统还实现其它CAR-T工作流程。另外,虽然已结合CAR-T细胞的制造描述了本发明的系统且特别是系统的第二模块200,但是本发明的系统也与诸如TCR-T细胞和NK细胞的其它免疫细胞的制造兼容。此外,虽然本发明的实施例公开了两个生物反应器容器410、420在两步顺序过程中的使用,其中第一生物反应器容器410的输出被添加到第二生物反应器容器420以用于额外的处理步骤(例如,在第一生物反应器容器中的激活和在第二生物反应器容器中的转导和扩增),但是在一些实施例中,两个生物反应器容器可被重复用于相同的工作流程。顺序地使用第二生物反应器容器的示例性原因可包括:不可从第一生物反应器中洗掉的残余化学修饰物(例如,包被或固定化试剂),这些化学修饰物在后面的步骤中(或者如果细胞的过度暴露发生,则在较早的步骤中)是有害的;或者需要在添加细胞之前预包被生物反应器表面(例如,RetroNectin包被)。

[0242] 由本发明的系统实现的潜在的单个生物反应器容器工作流程的额外的示例包括:(1)在单个生物反应器容器中的可溶性激活剂激活、病毒转导、无过滤器灌注和扩增;(2)在单个生物反应器容器中的基于Dynabead的激活、病毒转导、无过滤器灌注和扩增;以及(3)在单个容器中的基于TransAct珠的激活、病毒转导、无过滤器灌注和扩增。

[0243] 此外,由本发明的系统实现的潜在的多个生物反应器容器工作流程的另外的示例

包括：(1)在第一生物反应器容器410中的可溶性激活剂激活、病毒转导、无过滤器灌注和扩增,以及在第二生物反应器容器420中的可溶性激活剂激活、慢病毒转导、无过滤器灌注和扩增,在两个生物反应器容器中使用相同的细胞类型或分裂培养物；(2)在第一生物反应器容器410中的基于Dynabead的激活、病毒转导、无过滤器灌注和扩增,以及在第二生物反应器容器420中的基于Dynabead的激活、慢病毒转导、无过滤器灌注和扩增,在两个生物反应器容器中使用相同的细胞类型或分裂培养物；(3)在第一生物反应器容器410中的基于TransAct珠的激活、病毒转导、无过滤器灌注和扩增,以及在第二生物反应器容器420中的基于TransAct珠的激活、慢病毒转导、无过滤器灌注和扩增,在两个生物反应器容器中使用相同的细胞类型或分裂培养物；(4)在第一生物反应器容器410中的可溶性激活剂激活,以及在第二生物反应器容器420中的RetroNectin包被、转导和扩增；(5)在第一生物反应器容器410中的固定化激活剂激活,以及在第二生物反应器容器420中的RetroNectin包被、转导和扩增；(6)在第一生物反应器容器410中的Dynabead激活,以及在第二生物反应器容器420中的RetroNectin包被、转导和扩增；(7)在第一生物反应器容器410中的Dynabead激活和慢病毒转导,以及在第二生物反应器容器420中的扩增；(8)在第一生物反应器容器410中的TransAct激活,以及在第二生物反应器容器420中的RetroNectin包被、转导和扩增；(9)在第一生物反应器容器410中的可溶性激活剂激活,以及在第二生物反应器容器420中的异位电穿孔细胞或其它非病毒修饰细胞的扩增；(10)在第一生物反应器容器410中的TransAct激活,以及在第二生物反应器容器420中的异位电穿孔细胞或其它非病毒修饰细胞的扩增；(11)在第一生物反应器容器410中的Dynabead激活,以及在第二生物反应器容器420中的异位电穿孔细胞或其它非病毒修饰细胞的扩增；(12)在第一生物反应器容器410中的同种异体NK细胞的扩增,以及在第二生物反应器容器420中的同种异体NK细胞的扩增(基于小分子的扩增,没有遗传修饰)；(13)在第一生物反应器容器410中的同种异体NK细胞的扩增,以及在第二生物反应器容器420中的同种异体NK细胞的扩增(基于饲养细胞的扩增,没有遗传修饰)；以及(14)在第一生物反应器容器410中和/或在第一生物反应器容器410和第二生物反应器容器420中的同种异体CAR-NK或CAR-NK₉₂细胞的可溶性激活剂激活、病毒转导、无过滤器灌注和扩增(没有RetroNectin包被,并且其中聚凝胺用于辅助转导)。

[0244] 虽然上文所描述的实施例图示了与生物反应器容器和/或座板集成在一起的过程监测传感器(例如,在膜上、集成在膜中、在容器侧壁上等),但是在其它实施例中,设想可向流体架构400添加额外的传感器(例如,沿着流体流动管线本身)。这些传感器可为一次性兼容的传感器,其用于监测循环流体内的参数,诸如pH值、溶解氧、密度/浊度(光学传感器)、电导率和生存力。通过在循环回路(例如,第一生物反应器容器的循环回路和/或第二生物反应器容器的循环回路)中布置传感器,可简化容器构造。另外,在一些实施例中,沿着循环回路的传感器可提供当循环时容器内容物的更精确的表示(而不是当细胞在容器内静止时测量)。更进一步,流速传感器(例如,基于超声波的)可被添加到流动回路以测量泵送性能,并且如必要那样与算法结合使用以校正泵送参数。

[0245] 如上文所指示的,第一模块100和第三模块300可采用能够进行细胞富集和分离以及收获和/或配制的本领域中已知的任何形式的任何(一个或多个)系统或装置。图78图示了可在生物处理系统10中用作第一模块100的装置/设备900的一种可能的配置,以用于细胞富集和使用多种磁性分离珠类型(包括例如Miltenyi珠、Dynabead和StemCell EasySep

珠) 的分离。如其中所示出的, 设备900包括容纳离心处理室912的基座910、高动态范围蠕动泵组件914、由蠕动泵组件接纳的合适内径泵管916、旋塞阀歧管918、光学传感器920和加热-冷却-混合室922。如下文所指示的, 旋塞阀歧管918提供了使用例如鲁尔配件将多个流体或气体管线对接在一起的简单且可靠的手段。在实施例中, 泵914被额定为提供低至约3mL/min且高达约150mL/min的流速。

[0246] 如图78中进一步示出的, 设备900可包括大体上T形的悬挂器组件924, 悬挂器组件924从基座910延伸, 并且包括用于悬挂多个处理和/或源容器或袋的多个钩子926。在实施例中, 可存在六个钩子。每个钩子可包括集成的重量传感器, 其用于检测每个容器/袋的重量。在实施例中, 袋可包括样品源袋930、处理袋932、分离缓冲液袋934、洗涤袋936、第一存储袋938、第二存储袋940、分离后废物袋942、洗涤废物袋944、培养基袋946、释放袋948和收集袋950。

[0247] 设备900配置成与如本文中所提供的磁性细胞分离保持器960一起使用或包括磁性细胞分离保持器960。磁性细胞分离保持器960可能够移除地联接到磁场发生器962 (例如, 图80的磁场板964、966)。磁性细胞分离保持器960容纳磁性固持元件或材料968, 诸如分离柱、基质或管。在实施例中, 磁性细胞分离保持器960可如2017年12月1日提交的序列号为15/829615的美国专利申请中所公开的那样构造, 该美国专利申请通过引用以其整体并入本文中并且在下文更详细地描述。设备900可在控制器 (例如, 控制器110) 的控制下根据由处理器执行并存储在存储器中的指令进行操作。这样的指令可包括磁场参数。在实施例中, 如下文所讨论的, 设备900可进一步包括注射器952, 其可用于添加珠。

[0248] 现在转到图79, 示出了设备700的通用协议1000。如其中所图示的, 在第一步骤1010中, 通过减少样品中的血小板和血浆来执行富集。在Dynabead被用作磁性分离珠的实施例中, 然后可执行洗涤步骤1012以移除Dynabead悬浮液中的残余物。在富集之后, 在步骤1014处, 细胞然后被转移到处理袋932。在一些实施例中, 在转移到处理袋932中之前, 在步骤1016处, 可将富集的细胞的部分存储在第一存储袋938中。在步骤1018处, 诸如通过在步骤1020处使用注射器952来将磁性分离珠注射到处理袋中。在实施例中, 磁性分离珠是Miltenyi珠或StemCell EasySep珠。在利用Dynabead的情况下, 将来自步骤1012的洗涤过的Dynabead重新悬浮在处理袋932中。在实施例中, 代替利用注射器, 磁性分离珠可被容纳在连接到系统的袋或容器中, 并且珠可通过泵914而被吸入系统中。

[0249] 然后, 在步骤1020处, 处理袋932中的珠和细胞被孵育一段时间。该步骤包括流体从处理袋932中出来、通过回路、然后回到袋中的循环。在磁性分离珠是Miltenyi纳米尺寸的珠的实施例中, 在步骤1022处执行沉淀洗涤以移除过量的纳米尺寸的珠, 并且在步骤1024处将孵育的结合珠的细胞的部分存储在第二存储袋940中。在孵育之后, 在步骤1026处, 使用磁体 (例如磁性细胞分离保持器960的磁场板964、966) 来分离结合珠的细胞。然后, 在步骤1028处, 冲洗并分离残余的结合珠的细胞。最后, 在利用Miltenyi或Dynabead的实施例中, 在步骤1030处, 分离的结合珠的细胞被收集在收集袋950中。在利用StemCell EasySep珠的实施例中, 执行从珠释放细胞以移除珠的额外的步骤1032, 以及洗涤/浓缩收集的细胞的任选步骤1034。

[0250] 下文具体参考图80更详细地描述使用设备900的图79的通用协议的更详细描述, 图80是设备900的流动架构1100的示意性图示。首先, 富集过程 (步骤1010) 开始于将包含在

源袋930中的单采产物和来自洗涤缓冲液袋936的洗涤缓冲液转移到室912中,以用于使用洗涤缓冲液进行洗涤,以便减少血小板和血清的量。此时,富集的源材料位于室912中。为了开始分离过程,通过启动从分离缓冲液袋934通过歧管918并通过柱(以预注柱)而到达处理袋932的缓冲液流来预注由磁性细胞分离保持器960接纳的分离柱。

[0251] 如上文所公开的,在某些实施例中,诸如在Dynabead用作磁性分离珠的情况下,执行洗涤步骤(步骤1012)以移除珠悬浮缓冲液中的任何残余物。洗涤步骤包括:使用注射器952注射珠,同时在处理回路1110中循环(例如,从处理袋932出发,通过蠕动泵管道914,通过歧管918,并回到处理袋932);清理处理回路1110;并且然后在磁场发生器962处于“开启”状态的同时,即,在保持器与用于永磁体的有源磁场发生器962磁联接的同时或者备选地在通过使用电磁体来有源地产生电磁场的情况下(在每种情况下,在“开启”状态下捕获珠),通过从处理袋932流到分离废物袋942来捕获珠。在不期望洗涤的实施例中,从处理袋932流到分离废物袋942,以确保处理袋932是干净的。如本文中所使用的,在永磁体的情况下,“开启”意味着磁性固持元件或材料968(例如,分离柱、基质或管)处于磁场内的适当位置。“关闭”意味着管道区段从磁场移除。

[0252] 接下来,处理室912中的富集细胞被转移到处理袋932(步骤1014),并且来自分离缓冲液袋934的分离缓冲液被吸入处理室912中,以冲洗室912中的任何剩余细胞。在冲洗之后,流体被排出到处理袋932。如期望的,可重复该冲洗过程。在所有细胞都已被转移到处理袋932之后,通过将缓冲液从分离缓冲液袋934吸入室912中并将流体排出到源袋930来清洁室912。如期望的,可重复该清洁过程。

[0253] 然后,在通过使全部内容物返回到处理袋932来清理处理回路1110之前,可通过使内容物沿着处理回路1110循环来混合处理袋932的内容物。如上文所指示的,在实施例中,通过将处理袋932的内容物的部分转移到第一存储袋938,可在此时存储富集的细胞的部分(步骤1016)。然后可清理处理管线1112和第一存储袋管线1114。

[0254] 在不利用珠洗涤步骤的实施例中,然后使用注射器952将珠注射到处理回路1110中,并且处理回路1110被清理(步骤1018)。在利用珠洗涤步骤的实施例中,珠被重新悬浮并循环通过处理回路1110(步骤1018)和柱968,并且处理回路通过柱968被清理。

[0255] 如上文所讨论的,在添加磁性分离珠之后,可将细胞孵育一段时间(步骤1020)。在实施例中,在孵育之前,处理袋932的内容物可被转移到第二存储袋940,并且第二存储袋940被搅拌(诸如使用加热-冷却-混合室922)。第二存储袋940的内容物然后被转移回到处理袋932。来自分离缓冲液袋934的缓冲液然后被吸入处理室912中,并且室内内容物被排出到第二存储袋940,并且然后被转移到处理袋932以冲洗第二存储袋940。

[0256] 在任一实施例中,然后通过使细胞沿着处理回路1110循环规定的孵育时间,将细胞与磁性分离珠一起孵育。在孵育之后,处理回路1110被清理。

[0257] 如上文所讨论的,在孵育之后,可执行洗掉过量珠(例如,纳米尺寸的珠)的任选步骤(步骤1022)。洗掉过量的纳米尺寸的珠包括:启动从处理袋932到第二存储袋940的流动;将第二存储袋940的内容物吸入处理室912中;将缓冲液从分离缓冲液袋934转移到处理袋932;将处理袋932的内容物转移到第二存储袋940;以及将第二存储袋940的内容物吸入处理室中。从分离缓冲液袋934流到处理袋932并且然后流到第二存储袋940的步骤可如期望那样重复,以洗掉过量的珠。在实施例中,然后可利用来自分离缓冲液袋934的缓冲液填充

室912,启动室912的旋转,并且然后将上清液排出到废物袋742。这些步骤可如期望那样重复。在实施例中,室中的细胞被排出到处理袋932,来自分离缓冲液袋934的缓冲液被吸入室932中,并且然后从室排出到处理袋932。该过程同样可如期望那样重复。然后执行处理回路的混合和处理回路的清理。

[0258] 在一些实施例中,孵育的细胞群体的部分可存储在第二存储袋940中(步骤1024)。为此,处理袋932的内容物的部分可被转移到第二存储袋940,并且然后处理管线和第二存储管线1116被清理。

[0259] 在上文描述的任何过程中,在孵育之后,使用磁体964、966分离结合珠的细胞(步骤1026)。这通过在磁场发生器962“开启”时从处理袋932流到废物袋942来完成。然后,通过将缓冲液从分离缓冲液袋934泵送到处理袋932并且然后在磁场发生器962“开启”的情况下将缓冲液从处理袋932泵送到废物袋942来清理残余废物。

[0260] 在实施例中,通过将缓冲液从分离缓冲液袋934泵送到处理袋932,冲洗处理回路1110,清理处理回路1110,并且在磁场发生器962“开启”的情况下从处理袋932流到废物袋942,可执行没有重新悬浮的冲洗。

[0261] 在另一个实施例中,通过将缓冲液在磁场发生器962“关闭”的情况下从分离缓冲液袋934泵送到处理袋932,在处理回路1110中循环,清理处理回路,并且在磁场发生器962“开启”的情况下从处理袋932流到废物袋942,可执行经由重新悬浮的冲洗。

[0262] 在实施例中,通过将缓冲液从分离缓冲液袋934泵送到处理袋932并在磁场发生器962“开启”的情况下从处理袋932流到废物袋942,可清除残余废物。

[0263] 在冲洗并分离残余的结合珠的细胞之后,分离的结合珠的细胞然后被收集(步骤1028)。在一种方法中,在结合珠的细胞将被收集而不从珠释放细胞的情况下,来自培养基袋946的培养基在磁场发生器962“关闭”的情况下通过柱968而被简单地泵送到收集袋950。在另一种方法中,来自分离缓冲液袋934的缓冲液被泵送到处理袋932,并且然后在磁场发生器962“关闭”的情况下从处理袋932泵送到收集袋950。该第二种方法提供分离后洗涤。在第三种方法中,来自培养基袋946的培养基通过柱966而被泵送到处理袋932(如果不需要分离后洗涤)。备选地,来自分离缓冲液袋934的缓冲液通过柱966而被泵送到处理袋932(如果期望分离后洗涤)。在任一过程中,处理袋932的内容物然后在处理回路1110中循环,处理回路1110通过返回到处理袋932而被清理,并且处理袋932的内容物被泵送到收集袋950以收集结合珠的细胞。

[0264] 在结合珠的细胞在从珠释放细胞之后将被收集的情况下,可执行许多潜在的过程。例如,在实施例中,通过将释放缓冲液从袋948通过柱泵送到处理袋932,在处理回路1110中循环,并且然后通过将流体返回到处理袋932来清理处理回路,可在磁体“关闭”的情况下重新悬浮细胞/珠。然后,通过在处理回路1110中孵育,清理处理回路1110,通过从处理袋932通过柱966泵送到收集袋950来收集释放的细胞,将缓冲液从分离缓冲液袋934泵送到处理袋932,并且通过将处理袋932的内容物通过柱966泵送到收集袋950来收集残余物,从而在磁体“开启”的情况下执行孵育和收集。然后,通过磁体“关闭”的情况下将缓冲液从分离缓冲液袋934通过柱966泵送到处理袋932,在处理回路1110中循环,清理处理回路1110,并且将处理袋932的内容物泵送到废物袋942,可将释放的珠(步骤1032)丢弃。

[0265] 结合上文,在实施例中,通过将收集袋950的内容物泵送到处理室912,将缓冲液从

分离缓冲液袋934泵送到处理袋932,并且将缓冲液从处理袋932转移到处理室912,可执行洗涤/浓缩(步骤1034)。然后,通过利用来自分离缓冲液袋934的缓冲液填充处理室912,旋转室912,将上清液排出到废物袋942,并且如期望那样重复旋转和排出步骤,可执行洗涤循环。最后,通过将培养基从培养基袋946转移到收集袋950,将收集袋内容物泵送到处理室912中,将处理室912的内容物排出到收集袋950,然后人工清理处理室912和收集袋950之间的管线,可完成在洗涤/浓缩之后将细胞转移到收集袋。

[0266] 在实施例中,袋中的一个(例如处理袋932)可包括具有过滤器的顶部端口1118,使得无菌空气可被引入到系统中(当处理袋932是空的时),以用于如需要那样清理管线(诸如在上文所讨论的多种过程步骤中)。管线的清理可作为富集/分离过程中的第一步骤和/或在该过程期间完成。在实施例中,来自收集袋950的空气可用于清理系统的任何管线(例如,来自收集袋950的空气可用于清理处理管线1112,然后处理管线1112中的空气可用于清理期望的管道线路(即管线1114、1116等),从而利用来自处理袋932的液体填充处理管线1112,并最终使用来自收集袋950的空气再次清理处理管线1112)。

[0267] 在实施例中,处理袋932是吹塑模制的,并且在侧面上具有高角度(具有3D形状,其在液面上方具有有限的气穴),以限制微米尺寸的珠免于粘附到侧壁(特别是在基于循环的赋予期间的长时间促进混合期间)。

[0268] 在实施例中,注射器952允许向基于循环的流动回路1110添加小体积(诸如珠悬浮液等分试样)。此外,来自流动回路1110的流体可被抽入注射器952中,以进一步清理来自注射器952的任何残余物。

[0269] 在实施例中,传感器920中的一个可配置成测量流体的流量。例如,传感器920中的一个可为气泡检测器或光学检测器,其可用作辅助确认措施以确保精确的流量控制(除了与钩子926集成的称重传感器之外)。这可在分离期间实际使用,在分离期间,期望使处理袋中的体积流过磁体,而不将空气引入到柱中。称重传感器指示处理袋在称重传感器可变性的某个预期公差内接近排空,并且然后气泡检测器920识别拖尾液体/空气界面,以便停止流动。因此,传感器920可由控制器使用来防止空气被抽入回路中(这可产生空气塞来移出细胞,或者使细胞暴露于干燥环境)或者通过在处理袋完全排空后泵没有停止的情况下意外将材料抽入废物袋中。在实施例中,气泡检测器920因此可与与钩子集成的称重传感器组合使用,以提高体积控制精度,从而减少细胞损耗和/或防止空气进入柱管道和柱。

[0270] 如上文所暗示的,在实施例中,空气可被抽入回路中,以用于有目的地产生空气塞,该空气塞可用于移出分离柱/管内的结合珠的细胞,以进行收集。在实施例中,代替使用空气塞或除此之外,可将缓冲溶液循环通过分离柱,以从分离柱中洗脱结合珠的细胞。

[0271] 在实施例中,可采用串联连接的具有不同内径的两个或更多个蠕动泵管,以便实现扩大单个泵的流速范围。为了在管之间切换,打开泵盖,物理地移除现有的管,物理地插入期望的管,并且然后关闭泵头。

[0272] 在一些实施例中,系统900可用于分离/捕获的珠-细胞复合物的洗脱。特别地,设想空气-液体界面可用于帮助从管侧壁或柱间隙空间移除复合物。空气可循环通过或来回穿梭通过柱/管。在没有空气/液体界面的情况下,仅利用流速控制难以移除珠/结合珠的细胞的填充床,而不显著增加剪切速率(这对细胞生存力有潜在的负面影响)。结合流速,因此有可能在不从磁体移除的情况下移除珠-细胞复合物。

[0273] 结合上文,系统900支持将正选择的珠-细胞复合物直接洗脱到精选的培养基中的概念(基于下游步骤)。这消除了缓冲液交换/洗涤步骤。在实施例中,还设想直接洗脱到培养基和病毒载体中以开始孵育。该概念还可实现将病毒载体添加到最终的袋。在实施例中,可使用培养基作为洗脱流体,而不是利用缓冲液洗脱结合珠的细胞。类似地,释放缓冲液可用于洗脱StemCell珠,以用于随后从珠释放细胞。通过利用培养基替换系统900的部分中的缓冲液,稀释可最小化。

[0274] 如上文所公开的,第一模块100的设备900是单个套件,其提供血小板和血浆减少的富集,随后是靶细胞的磁性分离。设备900是自动化的,以便允许富集、分离和收集步骤以及所有介入步骤在最少人工干预的情况下执行。类似于第二模块200,第一模块100及其设备900是功能封闭的,以使污染的风险最小化,并且是灵活的,以便处理多种治疗体积/剂量/细胞浓度,并且除了CAR-T细胞之外,还能够支持多种细胞类型。

[0275] 现在特别地参考图81至图87更详细地描述磁性细胞分离保持器(图78的960)的一个实施例。基于磁珠的细胞选择涉及经由细胞表面分子与磁珠(例如,上文所描述的类型珠)的抗体或配体的靶向结合而从细胞混合物中分离某些细胞。一旦结合,联接到磁珠的细胞就能够从未结合的细胞群体中分离。例如,包括结合细胞和未结合细胞的细胞混合物可穿过定位在磁场发生器内的分离柱,该磁场发生器捕获磁珠并因此捕获相关联的结合细胞。未结合细胞通过该柱而未被捕获。

[0276] 某些磁性细胞分离技术可结合纳米尺寸的珠(例如,直径约50nm或更小的珠),而其它技术可使用更大的珠(例如,直径约2 μ m或更大的珠)。例如,较小的珠可为合乎期望的,因为较小的珠尺寸可避免靶细胞上的受体激活。此外,下游步骤可跳过珠移除,因为纳米尺寸的珠对下游处理或细胞功能可能几乎没有影响。然而,较小的纳米尺寸的磁珠可使用磁性细胞分离程序来分离,该程序涉及使用磁场梯度增强器来放大所施加的磁场梯度。相比之下,较大的珠具有较高的磁矩。因此,某些较大珠的分离可不涉及磁场梯度增强器。然而,较大的珠仍然可与额外的细胞-珠分离步骤结合使用。因此,取决于所使用的磁珠的尺寸和/或类型,工作流程、适当的磁性参数和/或分离装置本身可变化,这增加了基于磁珠的细胞分离技术的复杂性。

[0277] 特别地,因为珠的材料和磁性质(包括但不限于尺寸、磁导率、饱和磁化强度、电阻率、表面性质和质量密度)可变化,所以分离条件也可取决于珠的性质而变化,并且可涉及不同强度和/或不同梯度的磁场。换句话说,对于使用具有不同材料和磁性质的珠的磁性细胞分离程序,磁场发生器的磁场参数可变化。本方法消除了使用不同尺寸的珠在磁性细胞分离程序之间调节磁场发生器或其参数的工作流程步骤。在本文中所提供的实施例中,磁性细胞分离保持器配置成与磁场发生器结合使用,使得当与适当尺寸的珠一起使用时,磁性细胞分离保持器将珠在磁场内定位在与细胞分离的期望磁场特性相关联的位置处。磁场发生器可使用预设的(例如,固定的)磁场参数或静态磁场发生器元件来施加磁场。以这种方式,操作者可避免根据所选珠改变磁场参数的复杂性。相反,通过选择适当的磁性细胞分离保持器,细胞所经历的磁场适于分离。此外,当使用不同尺寸和/或涉及不同期望磁场特性的珠时,可选择不同的磁性细胞分离保持器,其将珠定位在与相应期望磁场特性相关联的所施加磁场内的相应位置处。

[0278] 例如,不同的磁性细胞分离保持器可根据细胞(例如,细胞混合物中的靶细胞)在

由磁场发生器产生的磁场中的期望定位来设计尺寸和形状。在一个实施例中,每个磁性细胞分离保持器包括通道或其它细胞接收器,当磁性细胞分离保持器被装载到包括磁场发生器的基于磁珠的细胞分离系统中时,磁场分离保持器中的细胞定位在磁场内具有适合于从细胞混合物中分离某种类型的磁珠(例如,基于珠材料、形状、尺寸和/或尺寸范围)的特性

[0279] 在实施例中,适当的磁性固持材料(诸如支承在分离管中的柱基质)联接到或定位在磁性细胞分离保持器的通道内,并且定位在磁场发生器内的磁场中的位置处,该位置对应于用于磁性细胞分离程序中的珠类型的期望磁场特性(即,磁场强度和磁场梯度)。如上文所描述的磁性细胞分离保持器和伴随的一组可磁化珠可以以套件提供,该套件可包括一次性或单次使用的构件。该套件还可包括多组珠或不同类型的珠和/或多个磁性细胞分离保持器,例如,针对每组珠而优化或设计的保持器。

[0280] 在另一个实施例中,可提供具有多个通道的磁性细胞分离保持器,以用于与相应的不同尺寸的珠一起使用,并且用户可选择与期望的珠类型相关联的适当的通道。例如,磁性细胞分离保持器可具有在第一位置处用于与具有第一直径的珠一起使用的通道(例如,配置成容纳第一细胞分离柱),以及在第二位置处用于与具有第二且更大直径的珠一起使用的通道(例如,配置成容纳第二细胞分离柱)。当磁性细胞分离保持器被插入到磁性细胞分离装置中并且磁场产生时,在第一位置处的通道可处于比磁性细胞分离保持器中的第二位置处的通道经历更高磁场强度的位置。

[0281] 在另一个实施例中,可在与期望的珠类型相关联的适当位置处利用磁珠-细胞混合物预填充磁性细胞分离保持器。另外,磁性细胞分离装置可为磁性分离系统的流体操纵系统的部分,或者可在功能上附接到一个或多个流体操纵系统。磁性细胞分离系统还可包括控制器,该控制器配置成自动执行磁性细胞分离程序。磁性分离系统可配置为功能性封闭系统。

[0282] 图81描绘了备选的磁性分离系统2100,其可在备选方案中并结合本文中所公开的用于基于磁珠的细胞分离系统的技术使用。系统2100包括源泵(SP) 2112、处理泵(PP) 2114和磁性分离泵(MP) 2116。系统2100还包括收集夹管阀(PV-C) 2126、废物夹管阀(PV-W) 2128、珠添加注射器(SG1) 2118和止回阀(CV1) 2120。在实施例中,止回阀2120例如被额定处于3psi的开启压力。系统2100还可包括合适的处理容器和/或源容器,例如样品源袋(SB) 2104、处理袋(PB) 2106、缓冲液袋(BB) 2108、培养基袋(MB) 2110、收集袋(CB) 2130和废物袋(WB) 2132。孵育移除器2102也可为袋或者可为适合于容纳和/或处置来自系统2100的废物材料的另一个收集容器。

[0283] 系统2100配置成与等同于上文参考图78描述的磁性细胞分离保持器960的磁性细胞分离保持器2134一起使用。磁性细胞分离保持器2134可能够移除地联接到(例如,装载到其中,相对于其定位)磁场发生器2121(例如,等同于图80中的板964和966的磁场板2122和2124)。系统2100可在控制器2150的控制下根据由处理器2152执行并存储在存储器2154中的指令进行操作。这样的指令可包括磁场参数。系统2100可包括任何或所有描绘的构件。

[0284] 图82描绘了用于基于磁珠的细胞分离的方法2200的流程图,该方法可与磁性分离系统(例如图81的系统2100)一起使用。应当理解,所描绘的方法2200是通过示例的方式,并

且本文中所公开的技术可与其它基于磁珠的细胞分离工作流程结合使用。在步骤2202中,准备源袋2104、培养基袋2110、缓冲液袋2108和珠添加注射器2118以用于与磁性分离系统一起使用。在步骤2204中,将源袋2104、培养基袋2110、缓冲液袋2108和珠添加注射器2118装载到磁性分离系统中。源袋2104流体联接到源泵2112。培养基袋2110和缓冲液袋2108流体联接到止回阀2120。珠添加注射器2118流体联接到处理袋2106。在步骤2206中,磁性细胞分离保持器2134联接到(例如,邻近其定位、插入到其中、装载到其中)磁性分离系统2100的磁场发生器2121(例如,磁场板2122和2124)。在步骤2208中,将袋2104、2110、2108和注射器2118无菌焊接到磁性分离装置。在步骤2210中,经由源泵2112来将来自源袋2104的诸如细胞混合物的源材料转移到处理袋2106。

[0285] 在步骤2212中,将珠添加注射器2118内的磁珠(例如,珠)添加到处理袋2106。在步骤2214中,将磁珠在处理袋2106中与细胞混合物一起孵育。孵育材料(例如,细胞混合物和磁珠)可经由处理泵2114来循环进出处理袋2106,以便促进靶细胞和磁珠之间的充分结合。在步骤2216中,源袋2104与源泵2112脱离,并且孵育移除器2102流体联接到源泵2112。然后,经由源泵2112来从处理袋2106移除过量的孵育材料,并将其沉积在孵育移除器2102中。在步骤2218中,对珠标记的细胞混合物执行磁性细胞分离。磁性细胞分离保持器2134联接到磁场发生器2121,然后磁场发生器2121在预确定的磁场参数下产生磁场。来自处理袋2106的珠标记的细胞混合物经由磁性分离泵2116来流过磁性细胞分离保持器2134。在实施例中,磁性细胞分离保持器2134容纳磁性固持元件或材料,诸如分离柱、基质或管。珠标记的细胞然后被磁性固持在磁性细胞分离保持器2134的管或柱基质中,并且任何未被固持的材料流过磁性细胞分离保持器2134而到达废物袋2132。在任选步骤中,缓冲液或培养基可冲洗处理袋,并且可重复磁性细胞分离程序。在步骤2220中,从磁性分离装置移除磁性细胞分离保持器2134。在步骤2222中,然后通过利用流体以高流速冲洗磁性细胞分离保持器2134来洗脱固持的细胞,使得流体的粘性力克服固持的磁珠上的任何残余磁力。流体和珠标记的细胞然后被收集在收集袋2130中。在步骤2224中,袋(例如,收集袋2130、废物袋2132、缓冲液袋2108和培养基袋2110)被密封,并且在实施例中,磁性细胞分离保持器2134然后可被处置。

[0286] 图83A和图83B图示了定位在图83A和图83B中的磁性分离装置2300内的磁性细胞分离保持器2302(例如,图81的磁性细胞分离保持器2134)的不同配置的俯视图。图83A描绘了磁性细胞分离装置2300中处于未装载配置的磁性细胞分离保持器2302。磁性细胞分离保持器2302可包括主体2301,该主体可由配置成适应细胞分离的任何合适的非磁性材料形成,并且联接到磁性分离装置2300。磁性细胞分离保持器2302可包括形成在主体2301内或通过主体2301的一个或多个通道,并且细胞混合物可流过该通道。虽然图83A示出了两个单独的通道2303和2305,但是应当理解,磁性细胞分离保持器2302可包括仅一个通道、两个或更多个通道等。转到通道2303,通道2303可配置成容纳磁性固持材料2304,磁性固持材料2304配置成在磁场下固持结合到磁珠的细胞并允许未结合的细胞穿过。类似地,通道2305也可容纳磁性固持材料2306。磁性固持材料2304、2306可相同或不同。也可能省略固持材料但提供效率较低的结果,例如通道2305可为中空管。此外,通道2303、2305可具有不同的尺寸和相对于主体2301的端部表面2307不同的位置。例如,端部表面2307和通道2303的中心点之间的距离2315可不同于主体2301的其它通道相对于端部表面2307之间的距离。以这种

方式,通道可经历与其在主体2301内的位置相关的磁场。

[0287] 端部表面2307可配置成抵接框架2319的止动部分或表面2311。框架2319可配置成传导磁通。虽然主体2301被示出为终止于端部表面2307处的一点,但是应当理解,设想其它配置。图83B示出了装载配置,其中磁性细胞分离保持器2302定位在磁场发生器2313的接纳区域2316内。装载可包括将端部表面2307朝向止动表面2311推进,直到端部表面2307抵接止动表面。在装载配置中,主体2301的部分仍然可保持在接纳区域2316之外。因此,在实施例中,当装载时,主体2301的一个或多个通道可定位成在接纳区域2316内。

[0288] 磁性分离装置2300还可包括门或其它特征,该特征配置成减少接纳区域2316之外的磁场泄漏。磁性分离装置2300的钢背衬2308和框架2319的门2318由软磁材料(例如,1018钢)制成。它们在磁场的存在下被磁化,并且在磁场被移除时被退磁。当磁性细胞分离保持器2302没有插入到磁场发生器2313的接纳区域2316中时,磁场发生器2313的门2318借助于附接到任一门的压缩的弹簧关闭间隙,从而将磁通包封在钢背衬2308和门2318内。这防止诸如洗脱的某些过程期望退磁时磁通泄漏到通道2303、2305。

[0289] 图83B描绘了磁性分离装置2300中处于装载配置的磁性细胞分离保持器2302。当磁性细胞分离保持器2302完全插入磁场发生器2313的接纳区域2316时,通道2303、2305的位置由磁性细胞分离保持器2302和磁性分离装置2300的几何形状限定。当磁性细胞分离保持器2302完全插入到磁场发生器2313中时,磁性分离装置2300的背衬2308的部分(例如,止动表面2311)可抵接磁性细胞分离保持器2302的部分。另外,尽管在图83A和图83B中磁性细胞分离保持器2302具有渐缩形状,但是可使用任何合适形状的磁性细胞分离保持器2302。

[0290] 磁场发生器2313的门2318打开,以允许磁性细胞分离保持器2302插入磁场发生器2313的磁场板2312、2314之间。例如,磁场发生器2313内的通道2303的位置可覆盖磁场中具有最高磁场强度(即,0.5T)的位置。在另一个示例中,磁场发生器2313内的通道2305的位置可覆盖磁场中具有最高磁场梯度(即,50T/m)的位置,同时满足磁珠的磁场强度要求(即,0.15T)。

[0291] 为了从磁性固持材料(例如,磁性固持材料2304、2306)洗脱固持的珠(例如,珠或结合珠的细胞),可通过将分离保持器2302缩回到脱离位置(即,图83A的未装载配置)来移除外部磁场。门关闭以确保当通道2303、2305附近不需要外部磁场时不会有磁通泄漏出以影响通道2303、2305。然后,具有高流速的流体流过通道2303、2305,这在固持的珠上产生大的剪切力。当粘性力大于固持力(即,由于剩余磁场而产生的磁力)时,珠从通道2303、2305的磁性固持材料上被洗掉并被收集。然而,在其它实施例中,施加的磁场可在控制器2150的控制下终止。

[0292] 如所讨论的,磁性细胞分离保持器2302可具有一个或多个通道,其中每个通道对应于磁性细胞分离程序中使用的珠的类型和/或尺寸。例如,磁性细胞分离保持器2302可具有三个通道:用于具有4.5 μm 直径的珠的管、用于具有3 μm 直径的珠的管,以及用于具有2 μm 直径的珠的管。每个磁性细胞分离保持器2302中的通道也可为不同的尺寸或者相同的尺寸。

[0293] 图84A和图84B图示了图83A和图83B的磁性细胞分离保持器和磁性分离装置的不同配置的等轴视图。图84A示出了在磁性细胞分离保持器2302接合在磁性分离装置2300中以用于磁性分离之前磁性细胞分离保持器2302的位置。图84B示出了在磁性细胞分离保持

器2302接合在磁场发生器2313中以用于磁性分离之后磁性细胞分离保持器2302的位置。框架2319可包括相对的导向板2330,导向板2330彼此间隔开一定距离,以允许磁性细胞分离保持器2302在其之间通过,并促进在接纳区域2316内的恰当定位。

[0294] 虽然某些公开的技术涉及将磁性细胞分离保持器如所公开的那样定位在固定位置的磁场发生器内,但是应当理解,可设想其它实施方式。例如,磁场发生器可相对于装载到固定位置的框架中的磁性分离保持器而移动。

[0295] 图85描绘了可与磁性分离装置一起使用的磁性细胞分离的方法2500的流程图。在步骤2502中,通过将细胞混合物与具有期望特性(例如,尺寸、类型、配体等)的一组磁珠一起孵育来制备第一细胞混合物。在经过足够长的时间以确保已利用磁珠标记靶细胞之后,将过量的孵育混合物移除。在另一个实施例中,孵育的混合物的部分可被移除并评估以用于质量控制的目的,即,过量的孵育混合物可被评估以评价结合特性。在步骤2504中,第一磁性细胞分离保持器2302可联接在磁场发生器2313的接纳区域2316内。在步骤2506中,磁场发生器2313在磁场发生器2313的接纳区域2316中产生磁场。在步骤2508中,第一细胞混物流过第一磁性细胞分离保持器2302中的通道(例如,通道2303或2305中的一个或多个)。细胞混合物中的磁珠标记的细胞由第一磁性细胞分离保持器2302的磁性固持材料(例如,磁性固持材料2304或2306中的一种或多种)固持在通道中,而细胞混合物材料的其余部分流过第一磁性细胞分离保持器2302的通道。在步骤2510中,通过从磁场发生器2313的接纳区域2316移除第一磁性细胞分离保持器2302(或者通过终止磁场的施加)来停止磁场的产生,这造成磁性细胞分离保持器2302的退磁。在步骤2512中,通过利用具有高流速的流体或另一种合适的方法洗脱磁性细胞分离保持器2302的通道中的磁性固持的珠或细胞来收集来自第一磁性细胞分离保持器2302的固持或分离的细胞和珠。在步骤2514中,任选地,磁性细胞分离保持器2302可被处置。步骤2522至2534镜像了步骤2502至2514,但是可改为使第二细胞混合物中利用一组不同尺寸的珠标记的细胞穿过第二(即,不同的)磁性细胞分离保持器2302中的通道或第一磁性细胞分离保持器2302的不同通道。尽管步骤2522至2534图示了使用两个不同的磁性细胞分离保持器的方法,但是应当认识到,这两个磁性细胞分离保持器可改为具有用于每种细胞混合物的不同通道的相同的磁性细胞分离保持器。另外,第二细胞混合物可为来自步骤2508的穿过第一磁性细胞分离保持器2302的所得细胞混合物,而没有固持的珠标记的细胞。

[0296] 靶细胞的磁选择可为正选择或负选择。正选择使用磁珠来标记靶细胞,并且靶细胞作为标记部分被收集。负选择或耗尽使用磁珠来标记不需要的细胞,并且靶细胞作为未标记部分被收集。

[0297] 图86图示了磁性细胞分离保持器2602相对于磁场发生器2600的永磁体2612、2614的位置的俯视图。在一个实施例中,永磁体2612、2614之间的距离为0.37英寸(10mm)左右。然而,永磁体之间的其它距离也可使用,这取决于分离装置的配置,诸如磁体的物理性质、横截面区域的纵横比和磁体约束夹具设计。在所描绘的实施例中,磁性固持材料可为用于与例如Miltenyi微珠标记的细胞一起使用的柱基质2604,并且磁性固持材料2606可为用于与例如Dynabead标记的细胞一起使用的管。对于任何单独的磁性细胞分离程序,可使用柱基质或者管。

[0298] 图87描绘了磁场发生器的永磁体和背衬钢的磁场分布,示出了在不同位置处磁场

的不同磁场特性。如所公开的,用于分离的磁场参数对于不同尺寸的珠(例如,珠)来说是不同的。较大的珠具有较高的磁动量,并且因此当与具有较低磁动量的较小珠相比时需要较低的磁场梯度来产生等量的力。磁力可表示为: $F_{mag} = M \cdot \nabla B$,其中M是磁动量,并且 ∇B 是磁场梯度。为了确保最高的磁动量,磁性材料必须被外部磁场强度饱和(即,对于本文中所讨论的Dynabead为0.15T)。当磁力大于流场中的粘性力时,磁珠将在磁力方向上移动,直到它们到达管壁或柱基质的球体。

[0299] 在某些实施例中,所公开的技术可用于分离用于嵌合抗原受体细胞疗法(或CAR-T)的细胞。CAR-T涉及从外周血单个核细胞(PBMC)中分离某些类型的白细胞,即T细胞。靶细胞(T-细胞)被受体修饰,受体使靶细胞能够识别并攻击癌细胞。此外,所公开的技术可与任何合适类型的珠结合使用,诸如,通过示例的方式,Miltenyi纳米尺寸的微珠(直径50nm)和Dynabead(直径4.5 μ m)。Miltenyi微珠是纳米尺寸的超顺磁性珠,它需要可磁化的柱基质来阻止它们进入流场。可磁化柱基质由软磁材料球构成(例如,直径0.4mm的不锈钢400系列球)。不锈钢400系列球是防锈的。球体材料的磁性质涉及当其暴露于外部磁场时的强磁化以及当外部磁场被移除时的小剩磁。磁性固持材料的柱基质的制造过程涉及使用振动器对柱基质的球填充、将漆施加到柱基质、重力排出漆、离心以除去任何剩余的漆、吹气以及再离心。吹气和离心的步骤可重复若干次,直到移除所有残余的漆。然后将柱基质放入约100摄氏度的烘箱中三天。在柱基质完全固化之后,通过施加的漆将柱基质保持在一起。填充有球的磁化柱基质可用作磁增强器,以将磁场梯度增强多达10000倍。在存在外部磁场的情况下,增强的磁场梯度有助于将纳米尺寸的珠标记的细胞吸引到球上。在移除外部磁场之后,柱基质退磁,这允许纳米尺寸的珠标记的细胞从柱基质释放。然后,将纳米尺寸的珠标记的细胞利用通过柱基质的冲洗流体流洗脱。

[0300] Dynabead是由合成聚合物制成的较大的超顺磁性珠。由于Dynabead比Miltenyi纳米尺寸的珠大得多,因此当放置在磁场中时,Dynabead具有比Miltenyi纳米尺寸的珠高得多的磁动量。因此,使用Dynabead进行磁性细胞分离不一定涉及磁增强器,诸如磁性柱基质。基于管的系统典型地与Dynabead标记的细胞一起使用,其中永磁体靠近管放置。用Dynabead标记的靶细胞被吸引到管的壁上,并且然后可用缓冲液或培养基移除未标记的细胞。除了Miltenyi纳米尺寸微珠和Dynabead之外,其它不同尺寸的珠也是可商购的。

[0301] 磁性分离装置可使用磁场发生器,例如一对永磁体,以及磁性细胞分离保持器和伴随的磁性细胞固持材料、流动管道、收集和制备容器以及所公开的系统2100的其它构件。此外,这些构件中的某些可作为单次使用构件、一次性构件来提供和/或包装为套件。

[0302] 在实施例中,可提供专用套件来实现针对特定珠类型的磁性分离。对于任何具体的分离事件,可提供针对一种或多种珠尺寸而优化的套件。套件可包括适当的磁性固持材料,其可预先装载到适当配置的磁性细胞分离保持器中。以这种方式,用户不可意外将不正确的磁性固持材料装载或联接到磁性分离保持器的通道中。在用于与Miltenyi微珠一起使用的实施例中,磁性分离保持器的通道中的磁性固持柱在被装载时可定位在磁场发生器的永磁体之间的间隙或空间的中心,并且与最高或较高的磁场强度(即,大于0.45T)相关联。在另一个实施例中,用于Dynabead的磁性固持管道可定位在永磁体中间的最高梯度区域中。Dynabead分离可与具有相对于磁场发生器定位的通道磁性分离保持器结合执行,以经历适合于固持的磁场强度(即,大于0.1T)和磁场梯度(即,大于40T/m)两者。

[0303] 当与所公开的技术结合使用时,使用磁性分离装置的CD3+的平均回收率和平均纯度对于Miltenyi纳米尺寸的珠来说各自大致大于80%。对于Dynabeads来说,使用磁性分离装置的CD3+的平均回收率为大致60%,并且使用磁性分离装置的CD3+的平均纯度大致大于70%。

[0304] 本公开的技术效果包括提供用于与磁场发生器一起使用的用于细胞的磁性分离的保持器,以实现使用不同尺寸的磁珠来进行细胞分离而无需在程序之间调整磁场参数。另外,磁性分离装置可针对不同尺寸的珠中的每个自动执行细胞制备、磁性细胞分离和细胞洗脱的方法,以消除或减少用户对源材料的相互作用和操纵。

[0305] 如本文中所使用的,以单数形式叙述并且以单词“一”或“一种”开头的元件或步骤应当被理解为不排除多个所述元件或步骤,除非明确陈述这样的排除。此外,对本发明的“一个实施例”的引用不旨在被解释为排除也结合所叙述特征的额外的实施例的存在。此外,除非明确地相反陈述,否则“包含”、“包括”或“具有”具有特定性质的元件或多个元件的实施例可包括不具有该性质的额外的这样的元件。

[0306] 本书面描述使用示例来公开本发明的若干实施例(包括最佳模式),并且还使得本领域中的普通技术人员能够实践本发明的实施例(包括制造和使用任何装置或系统以及执行任何结合的方法)。本发明的可专利性范围由权利要求书限定,并且可包括本领域中的普通技术人员想到的其它示例。如果这样的其它示例具有不异于权利要求书的字面语言的结构元件,或者如果它们包括与权利要求书的字面语言无实质性差异的等同结构元件,则这样的其它示例旨在处于权利要求书的范围内。

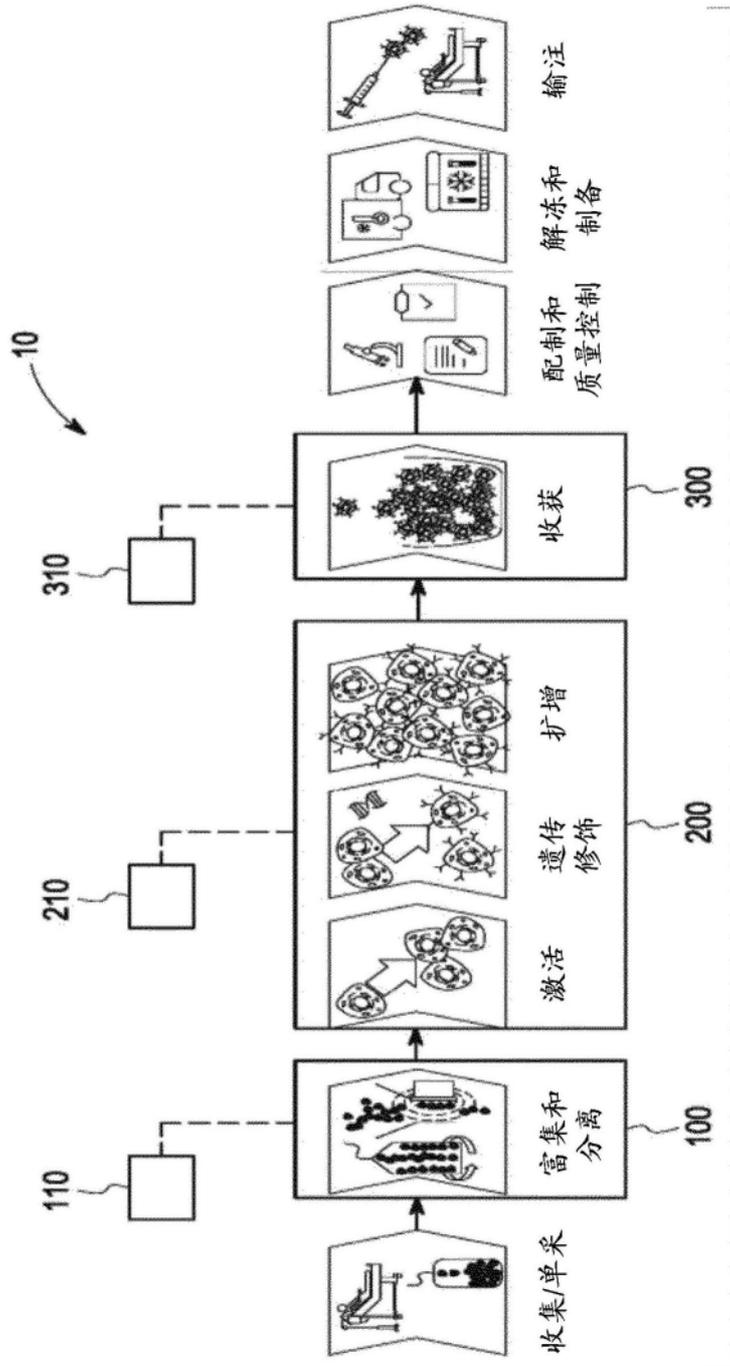


图1

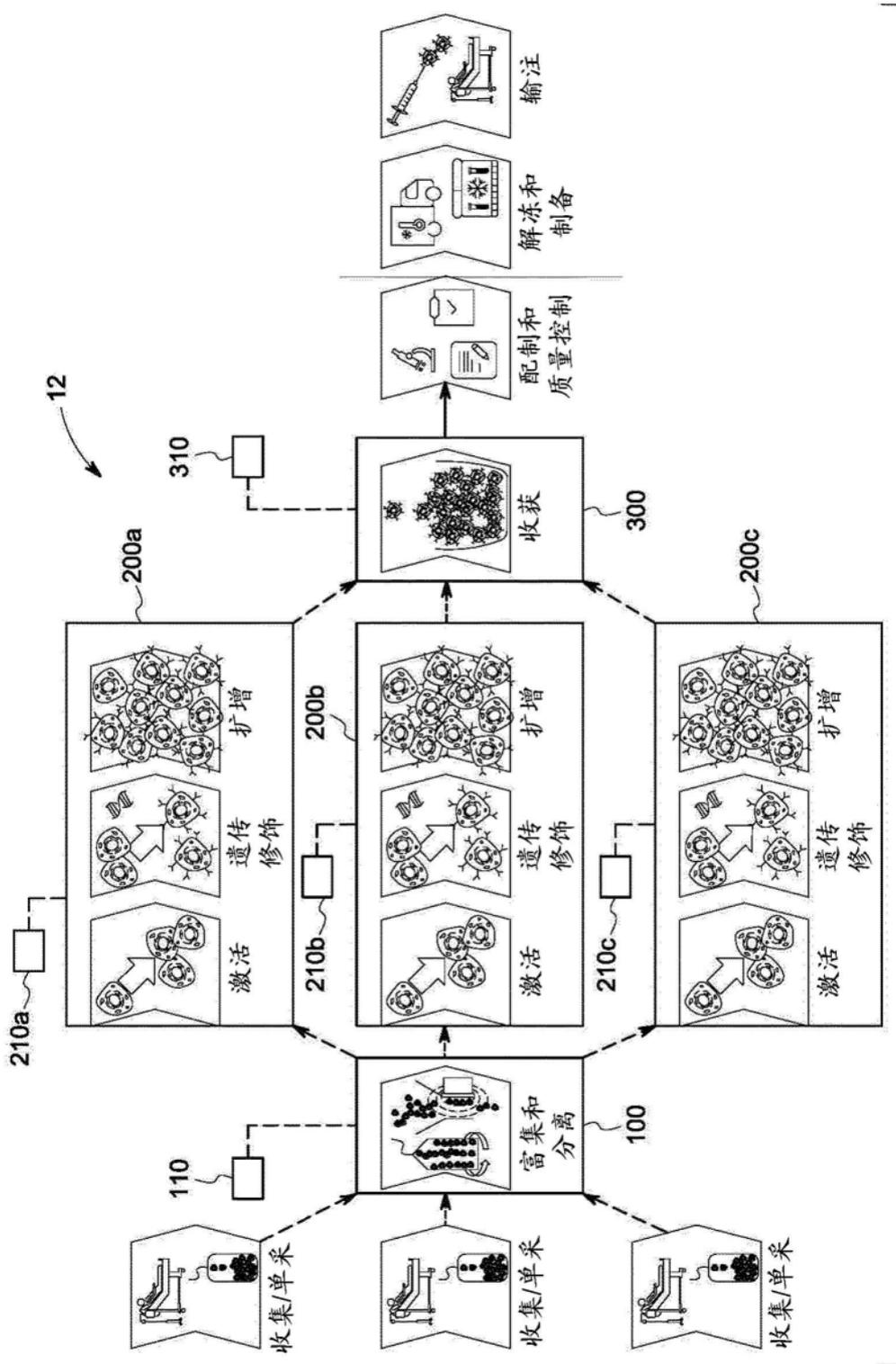


图2

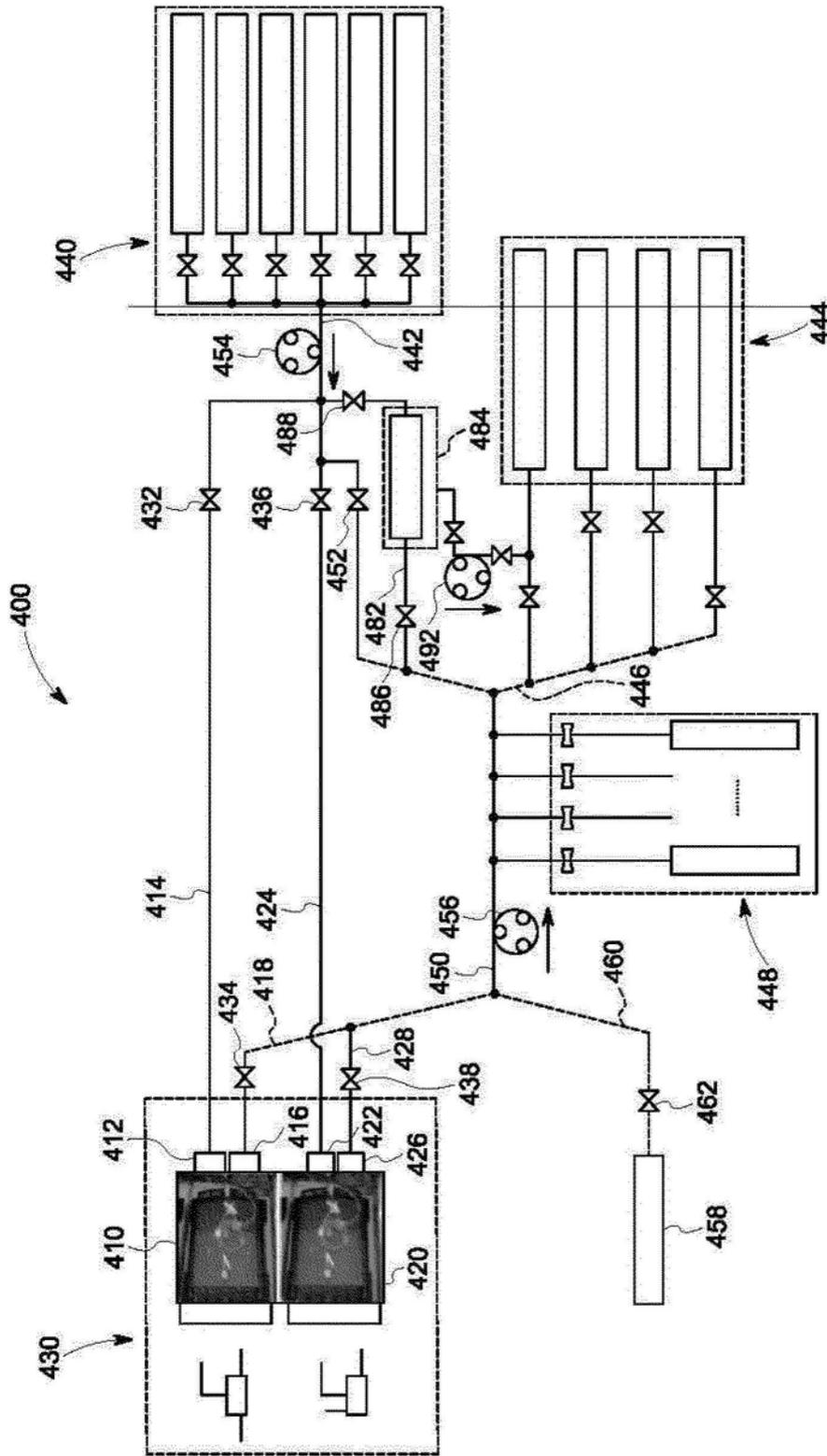


图3

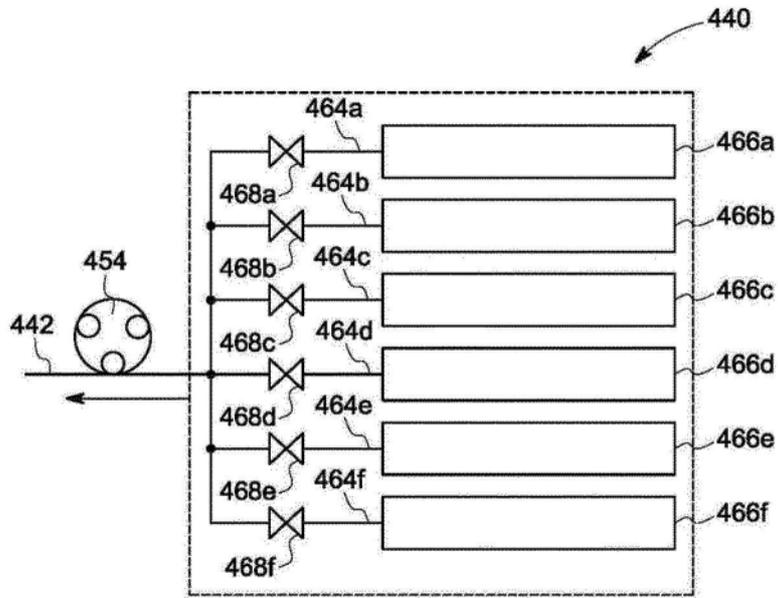


图4

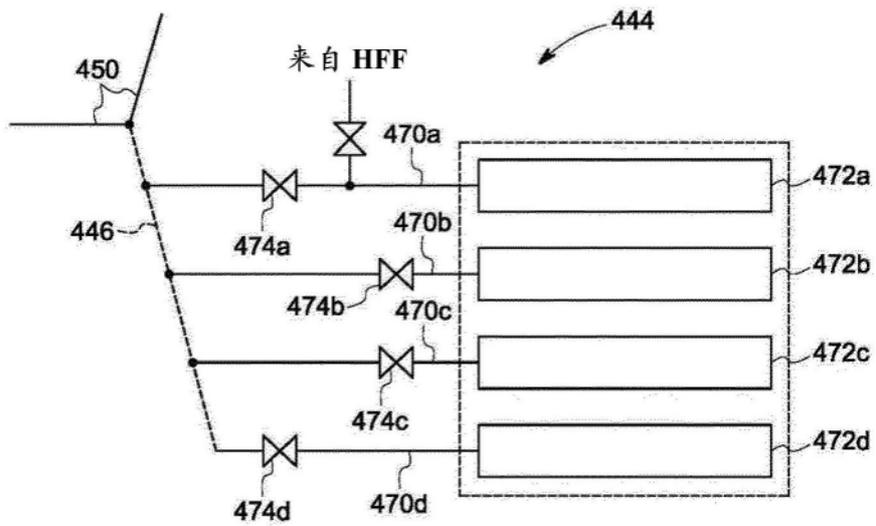


图5

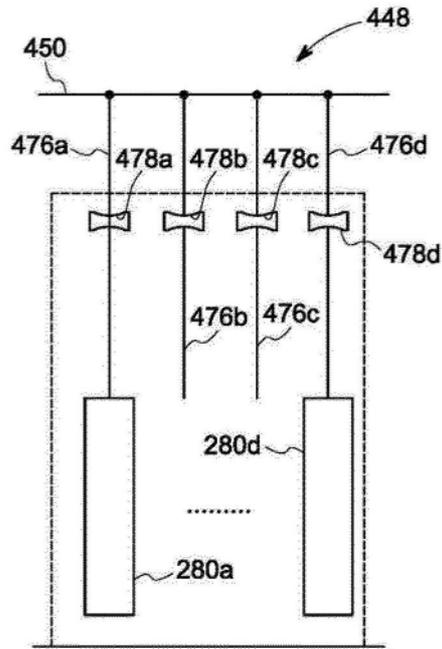


图6

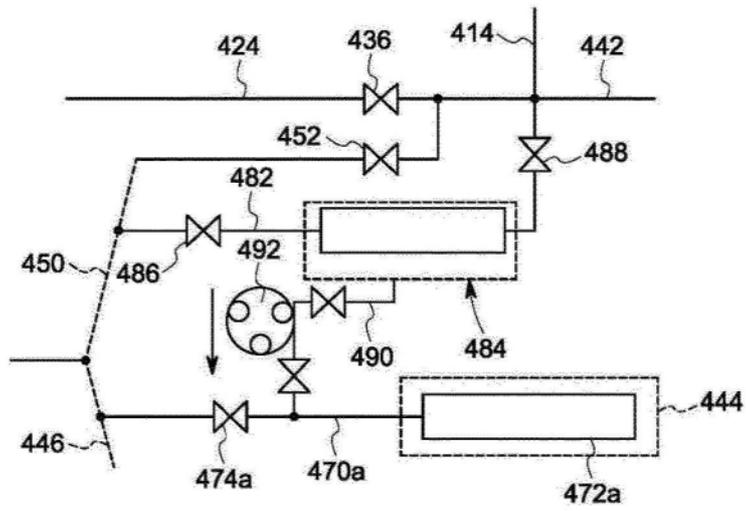


图7

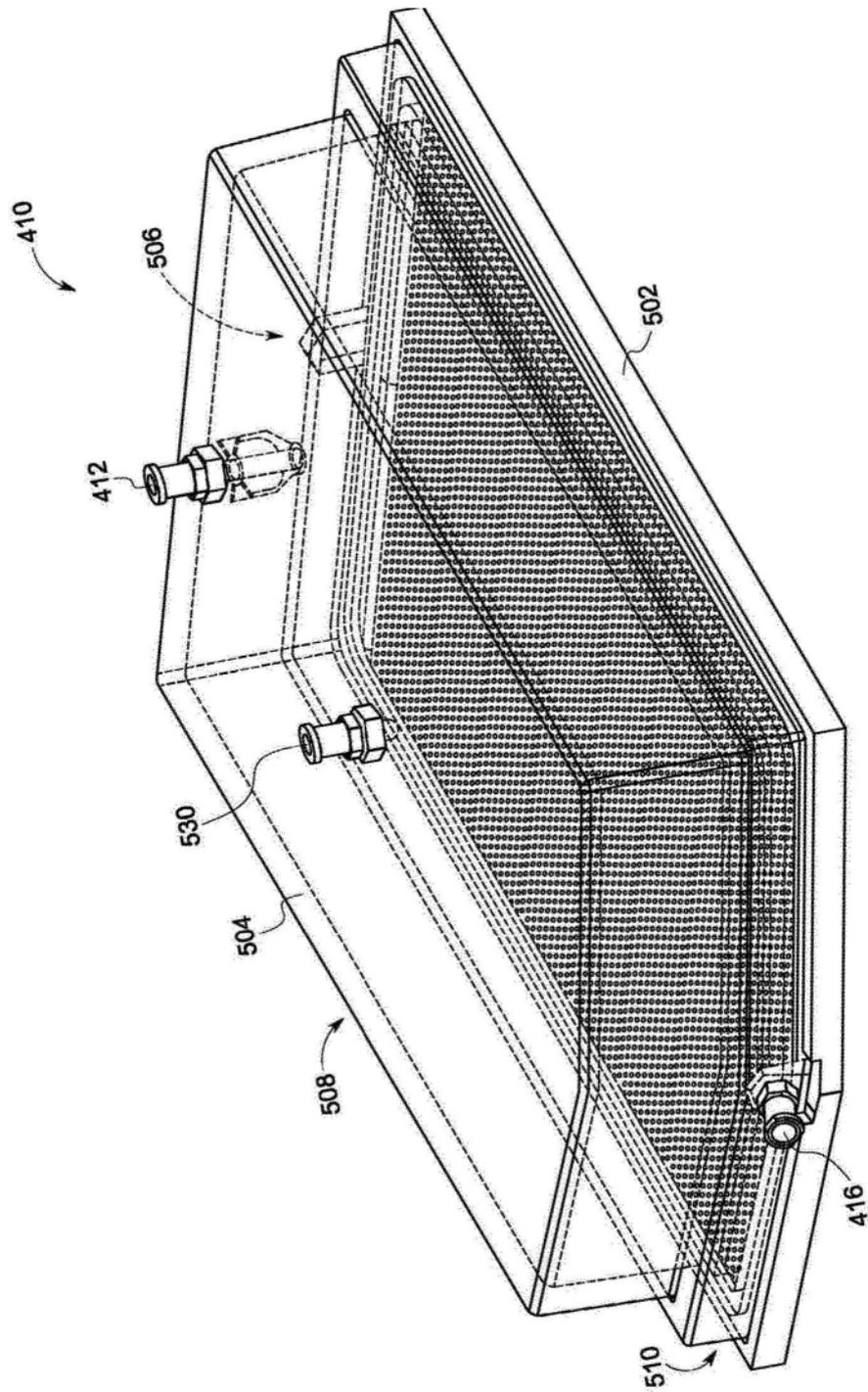


图8

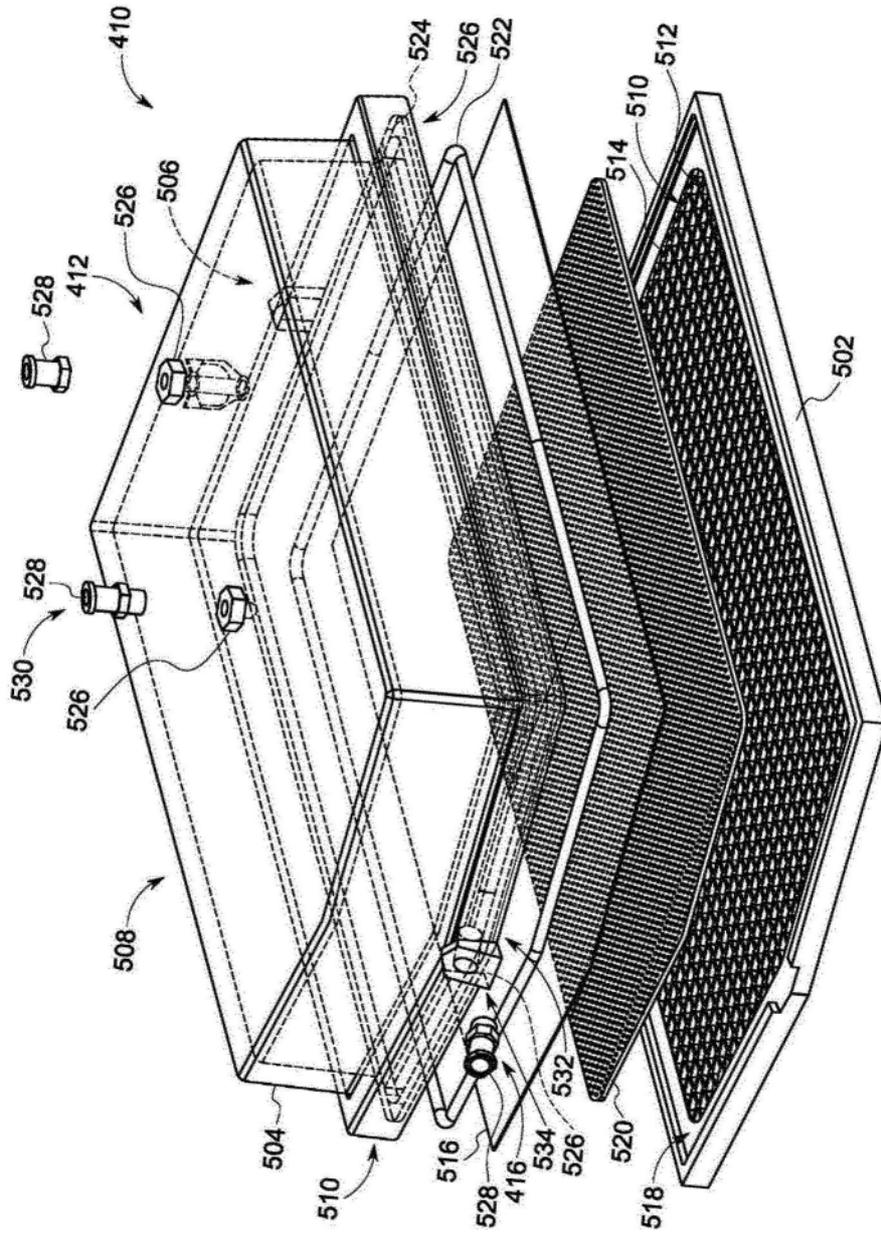


图9

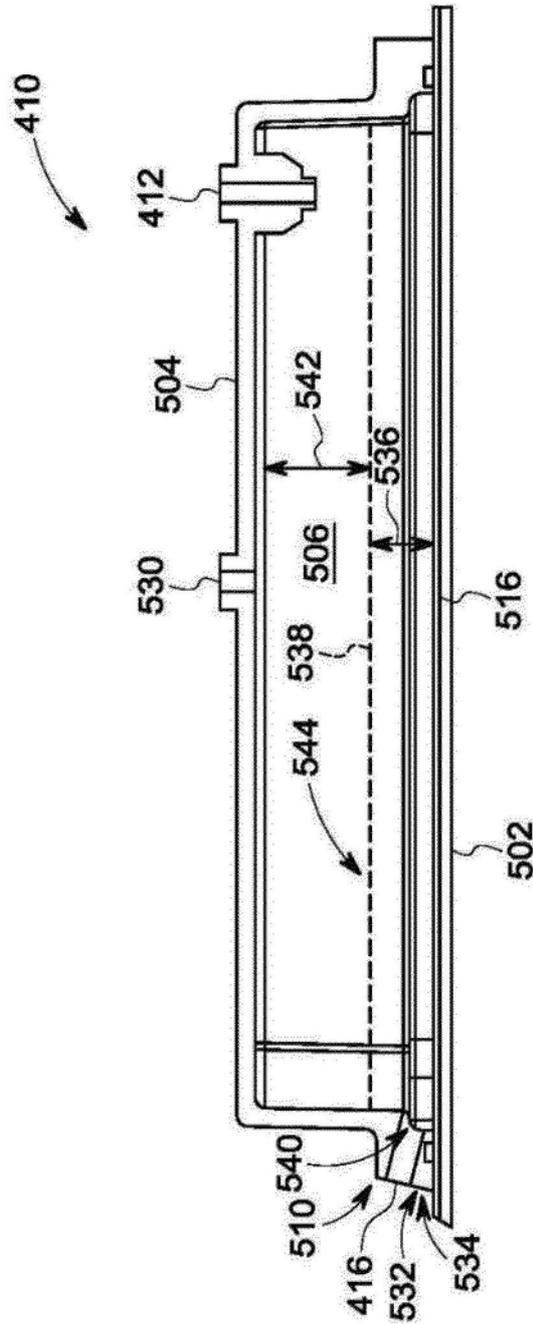


图10

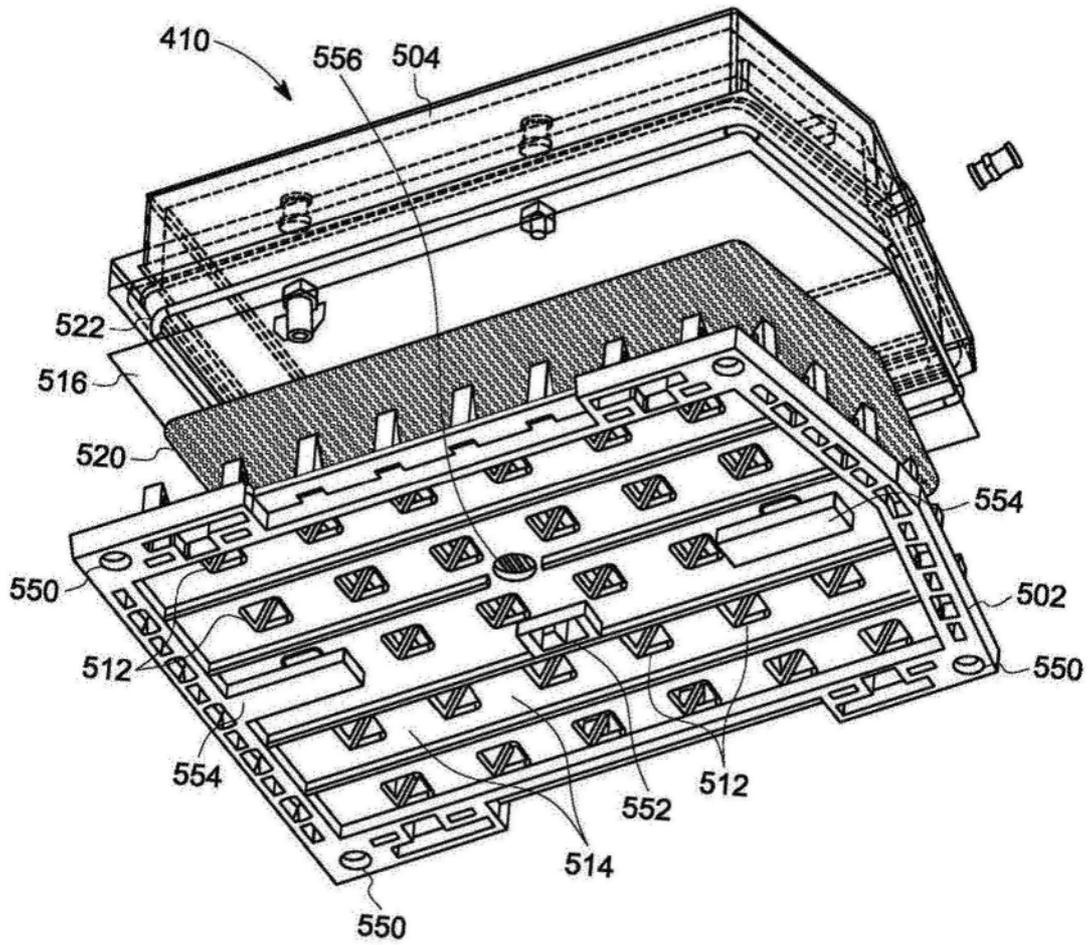


图11

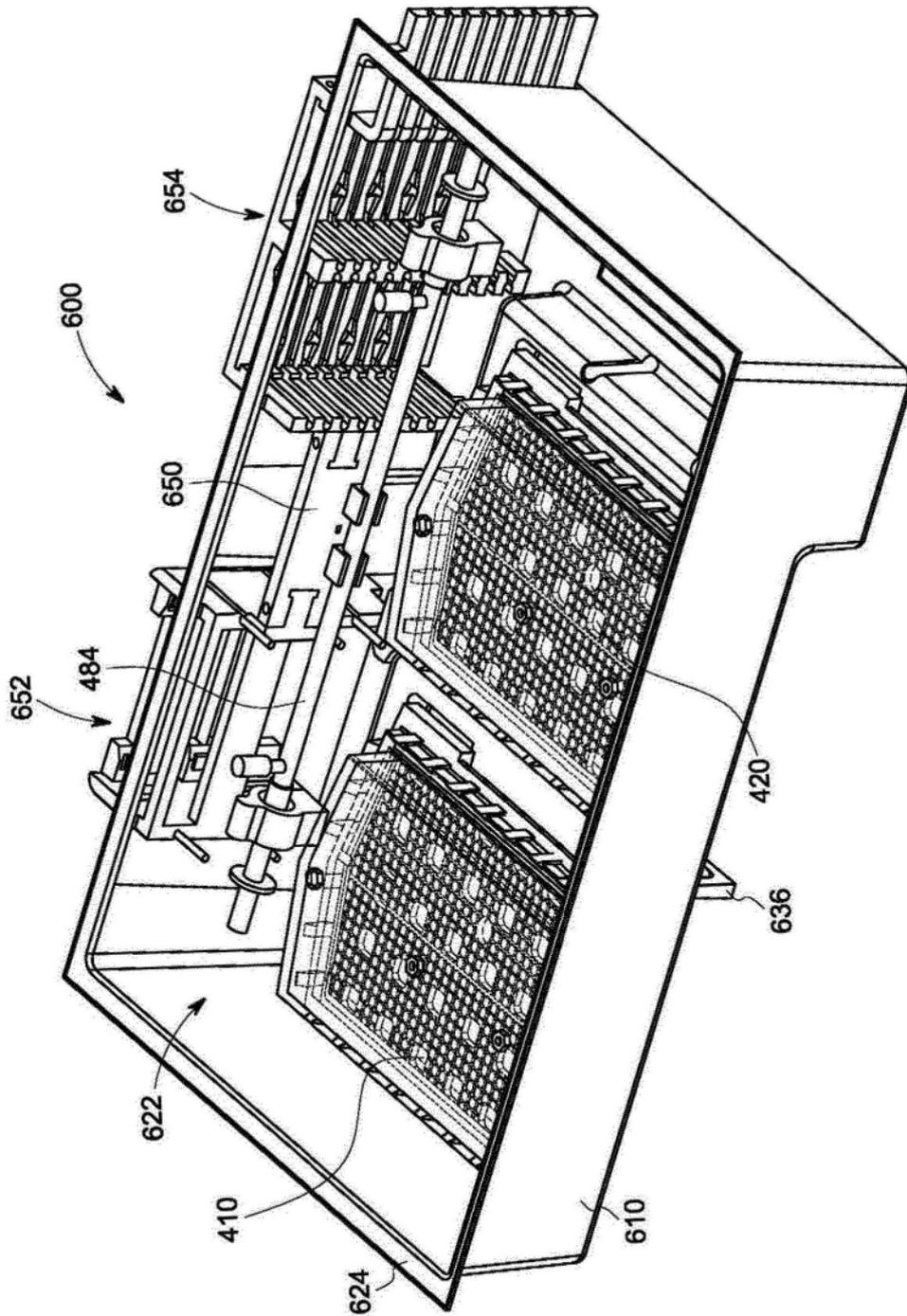


图12

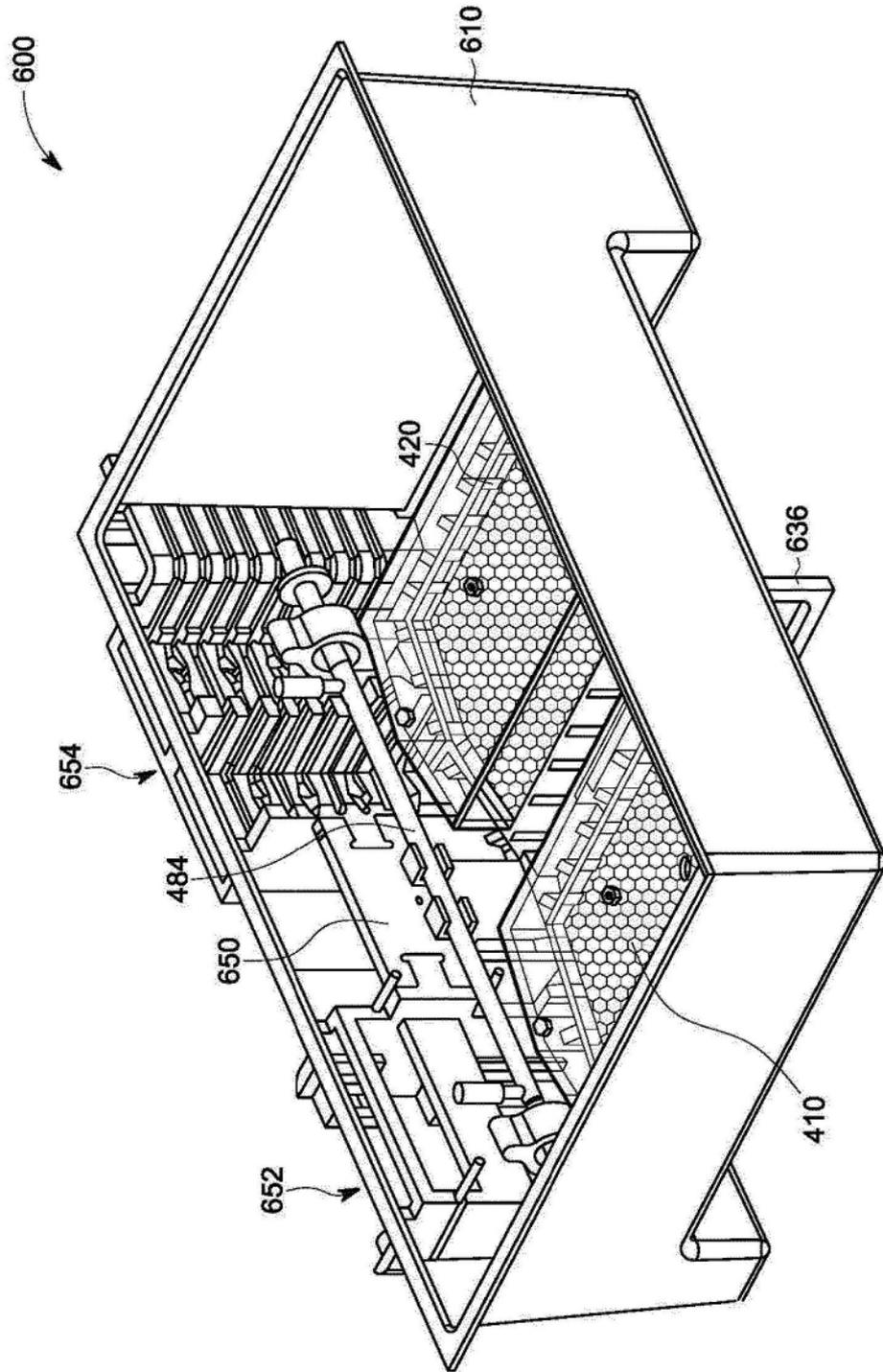


图13

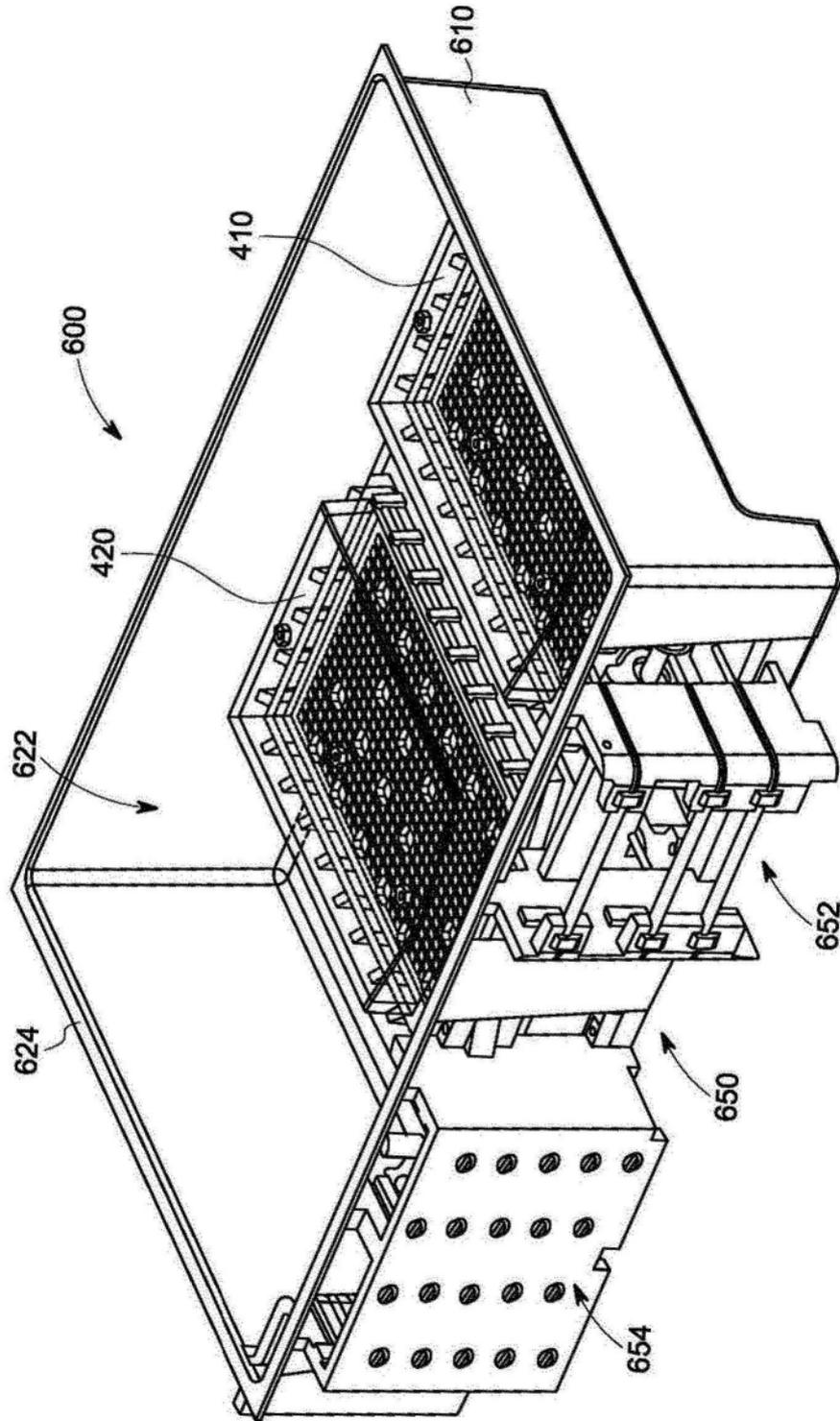


图14

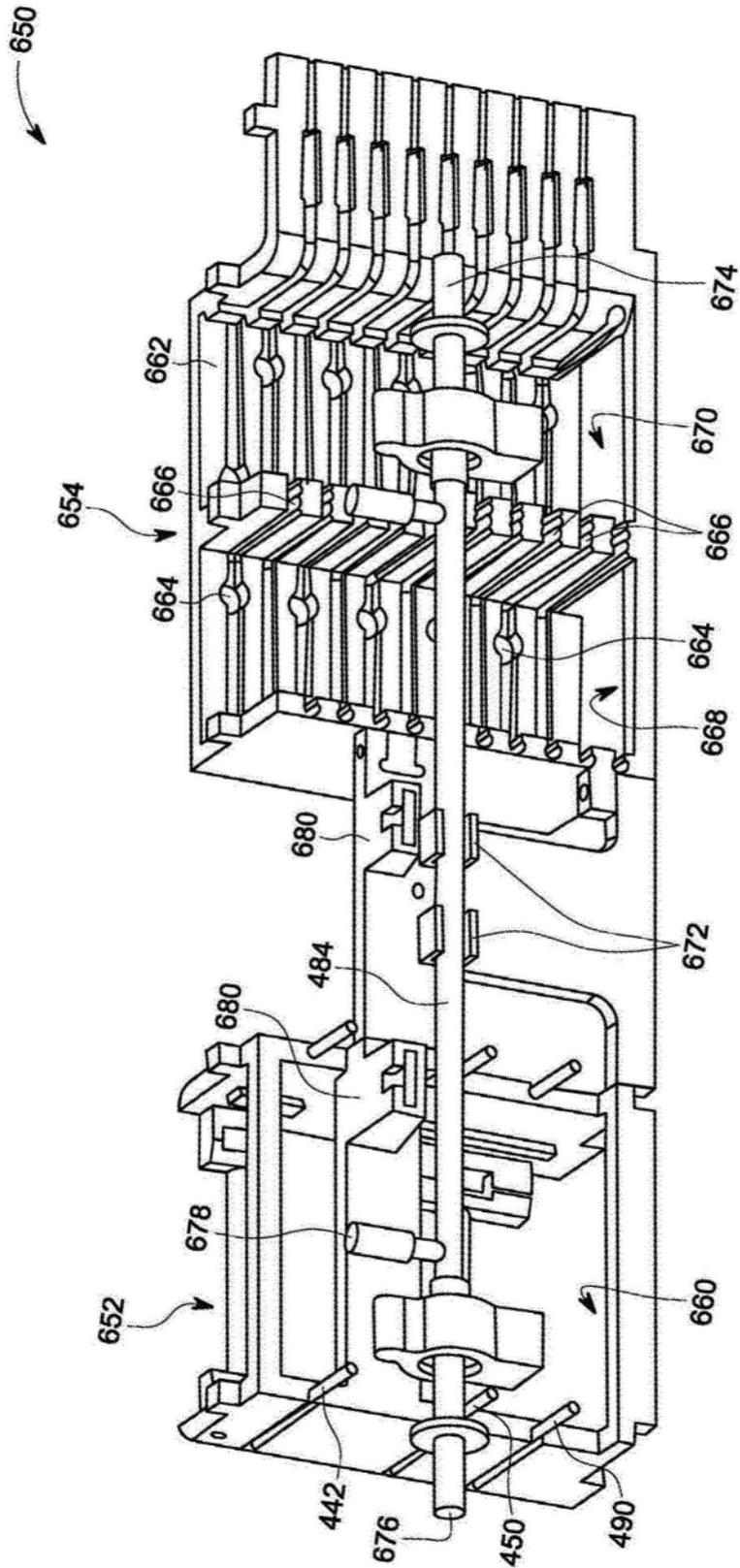


图16

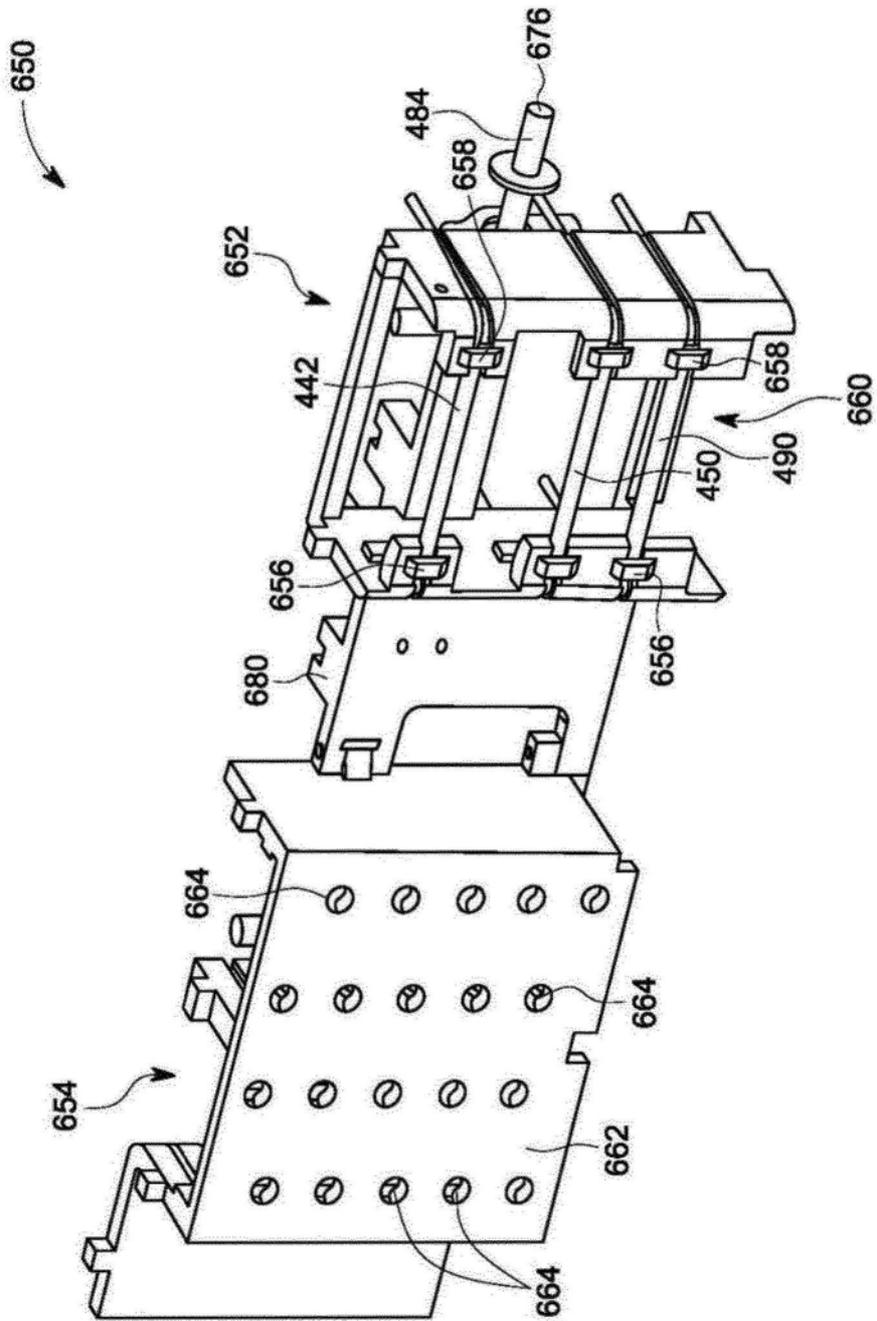


图17

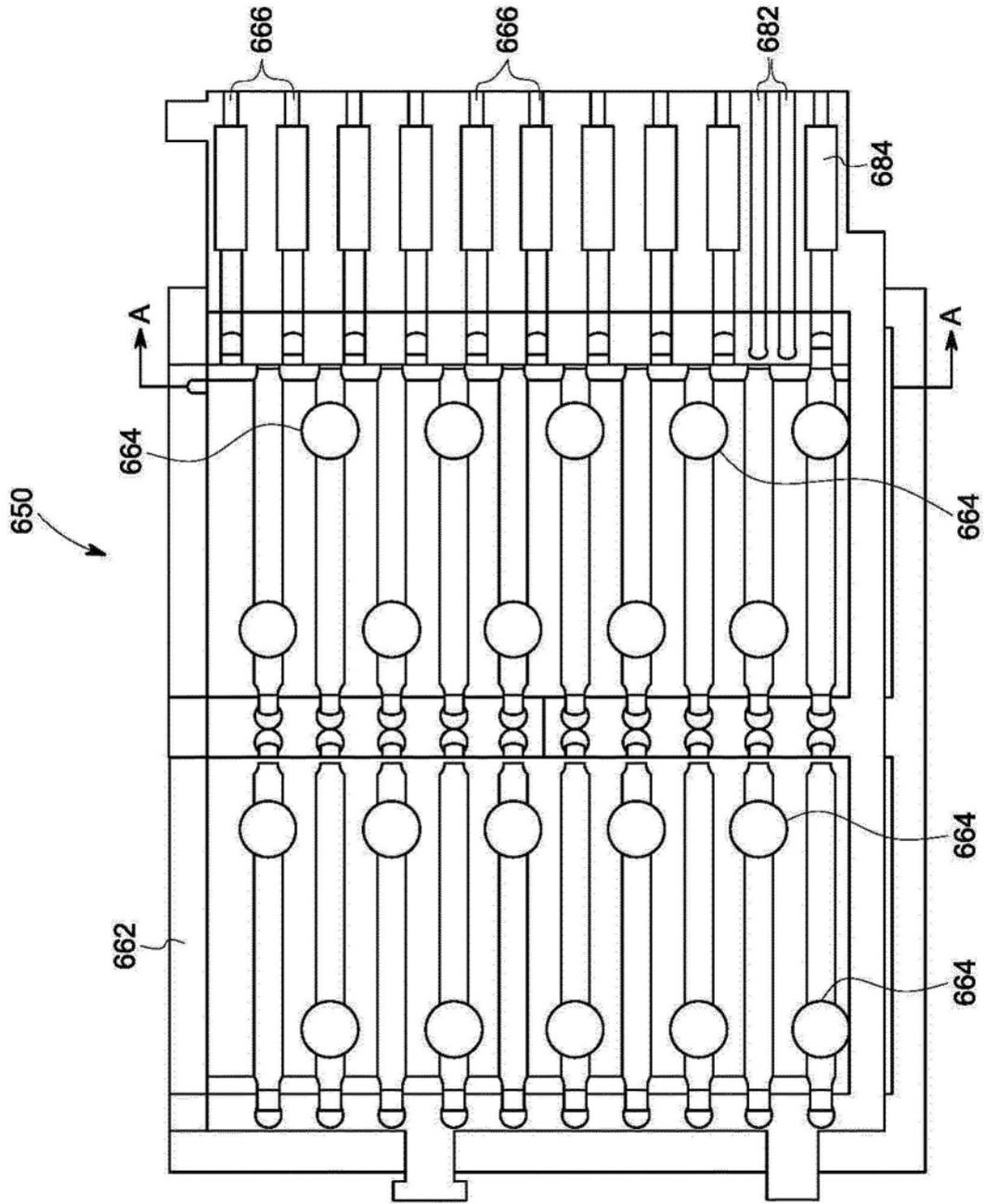


图18

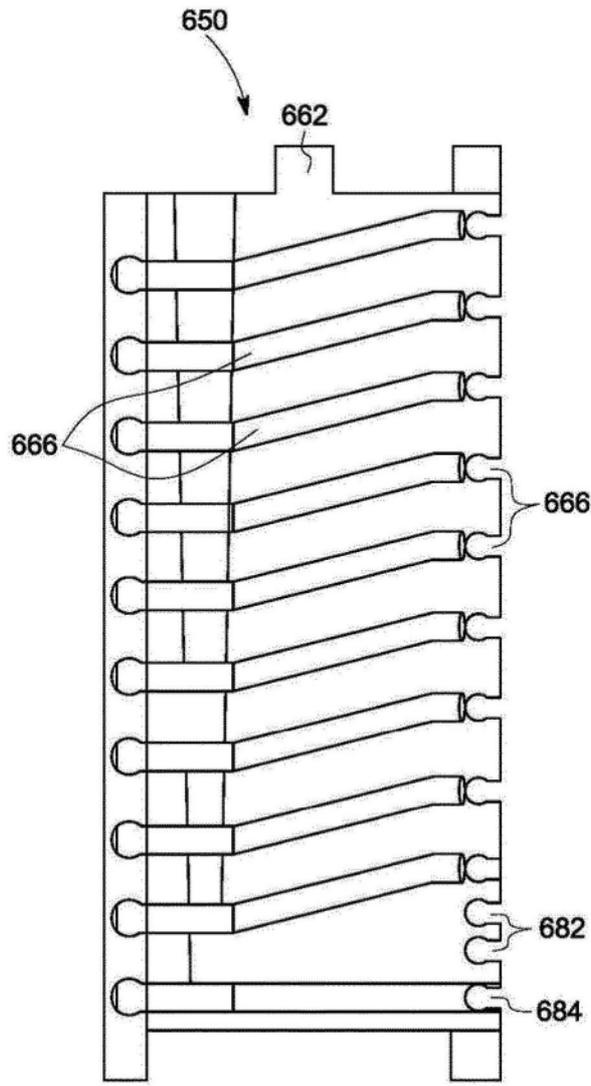


图19

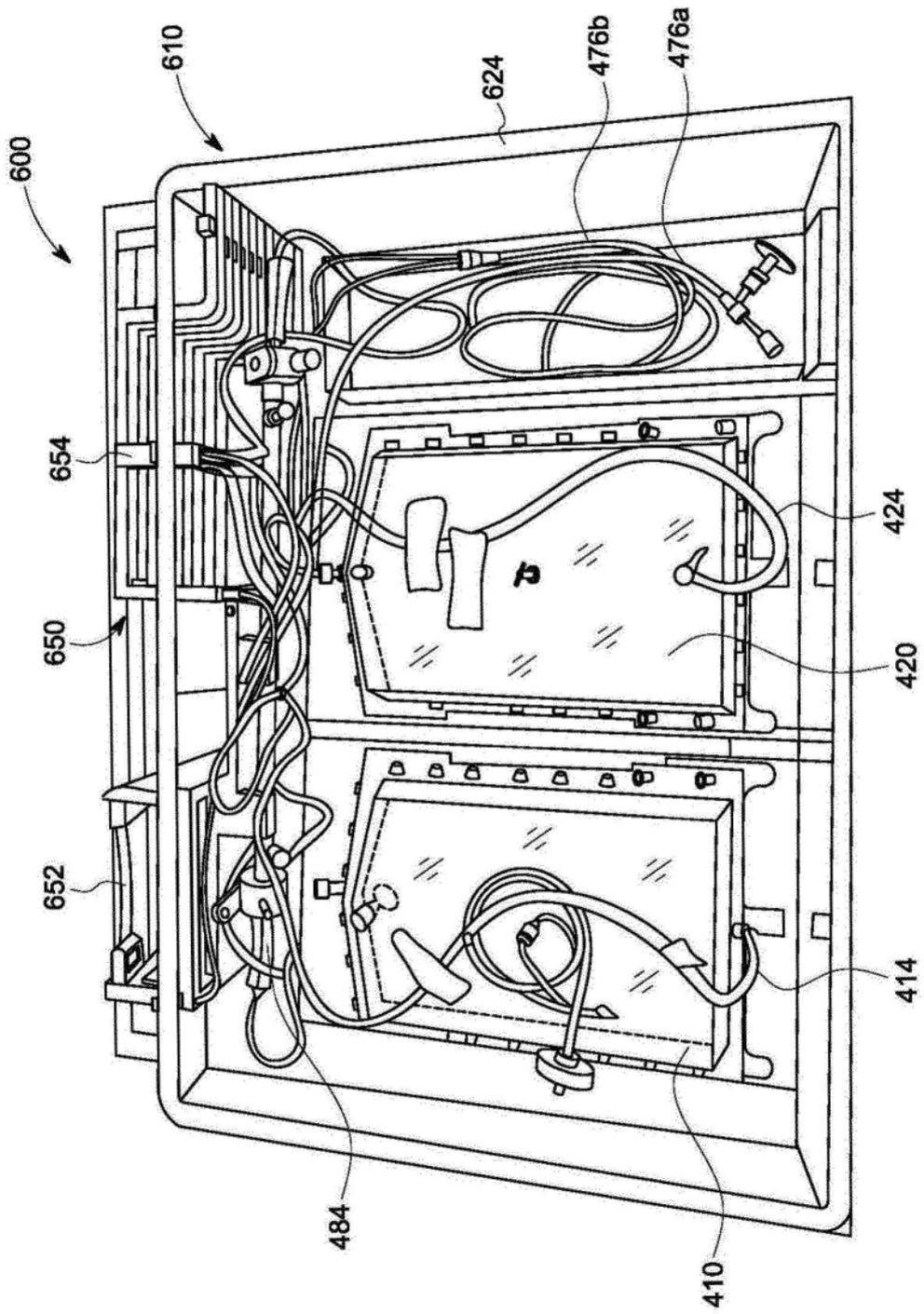


图20

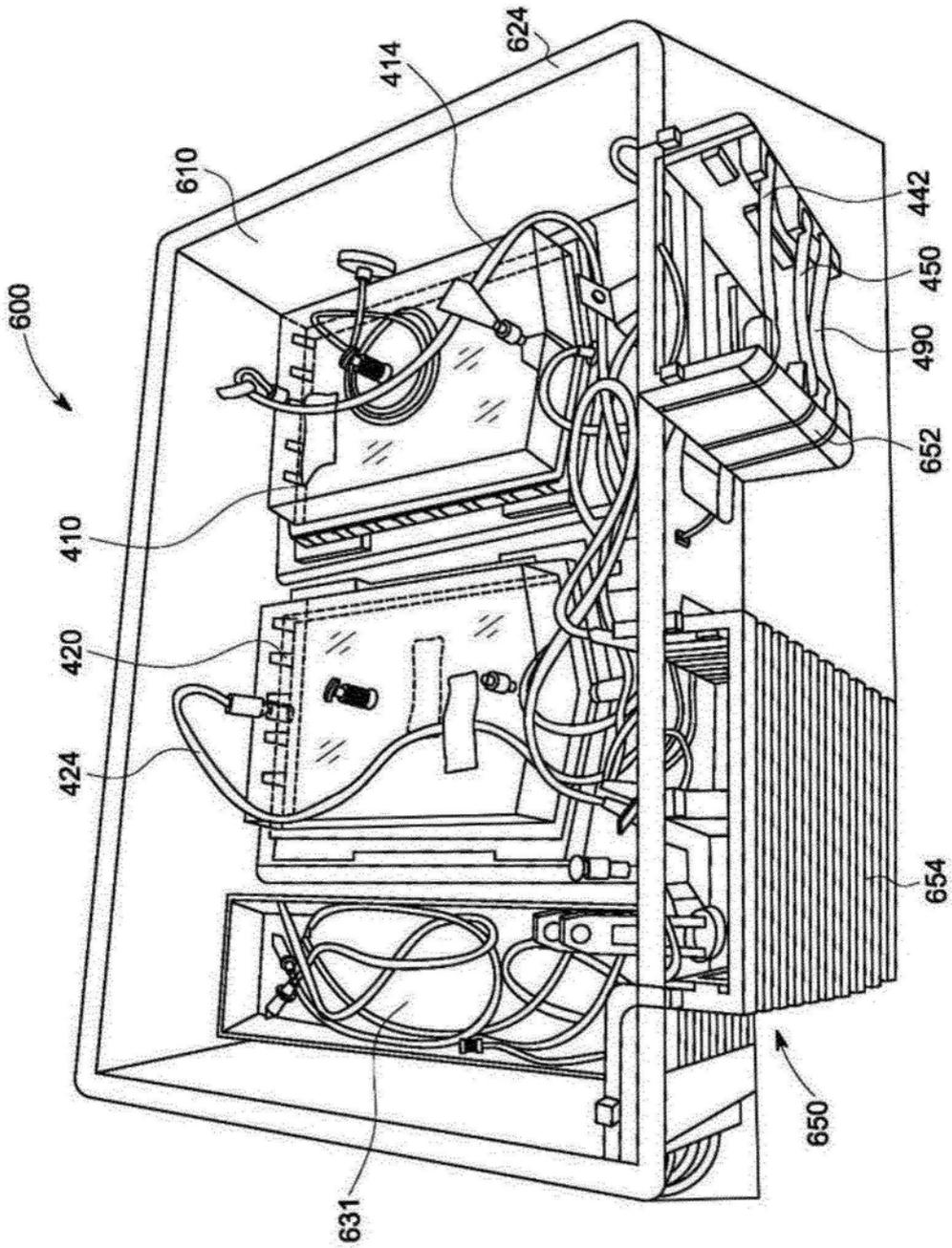


图21

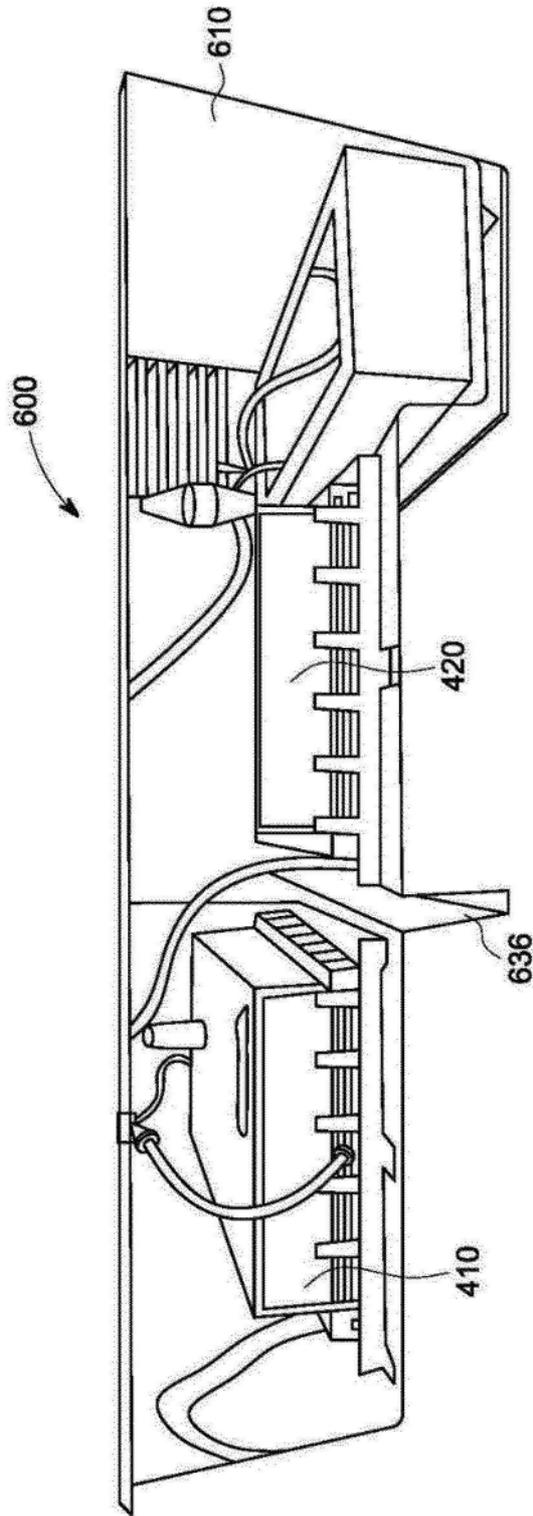


图22

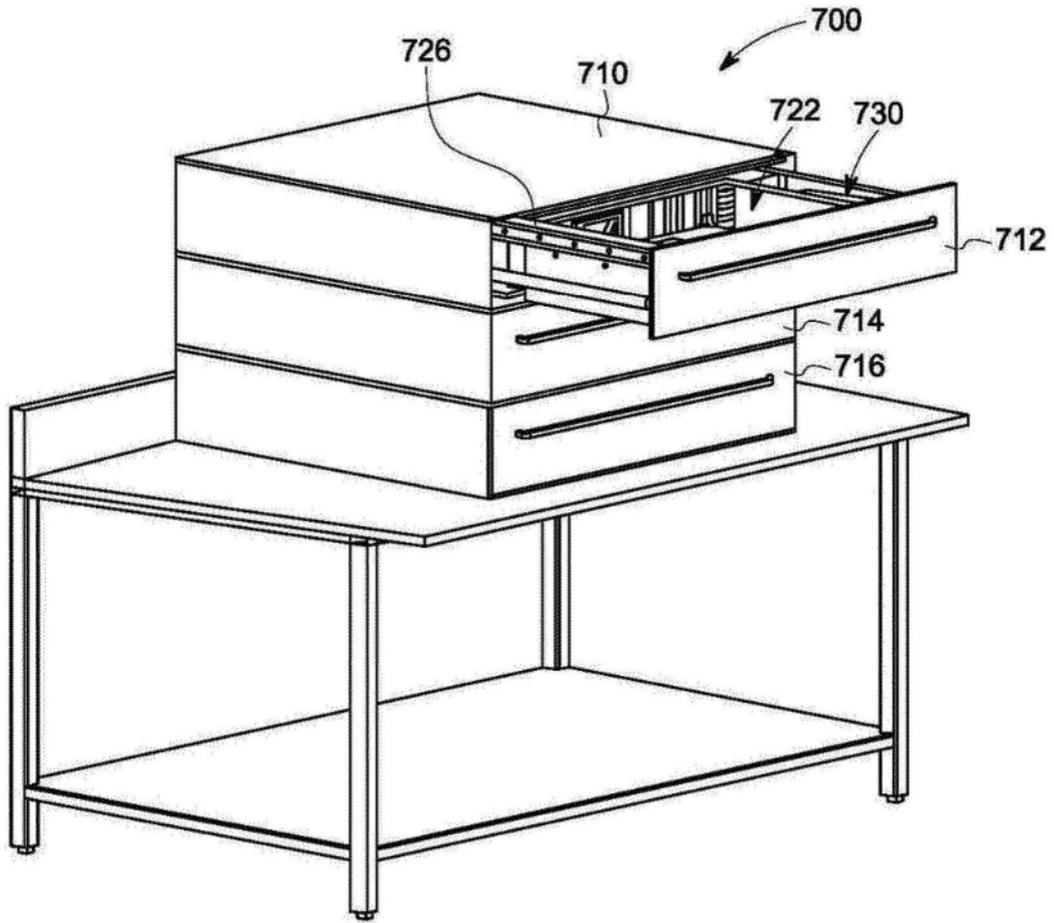


图23

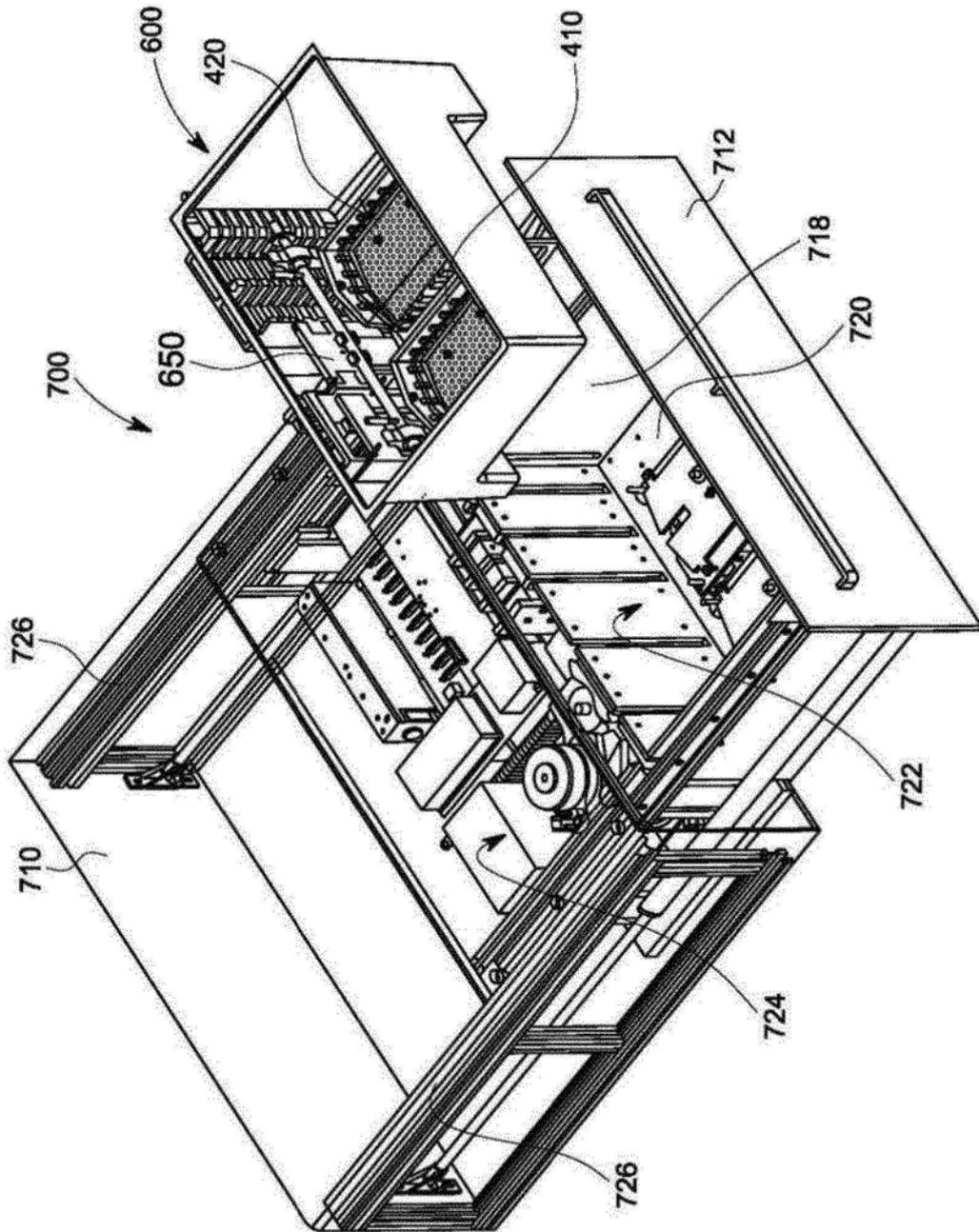


图24

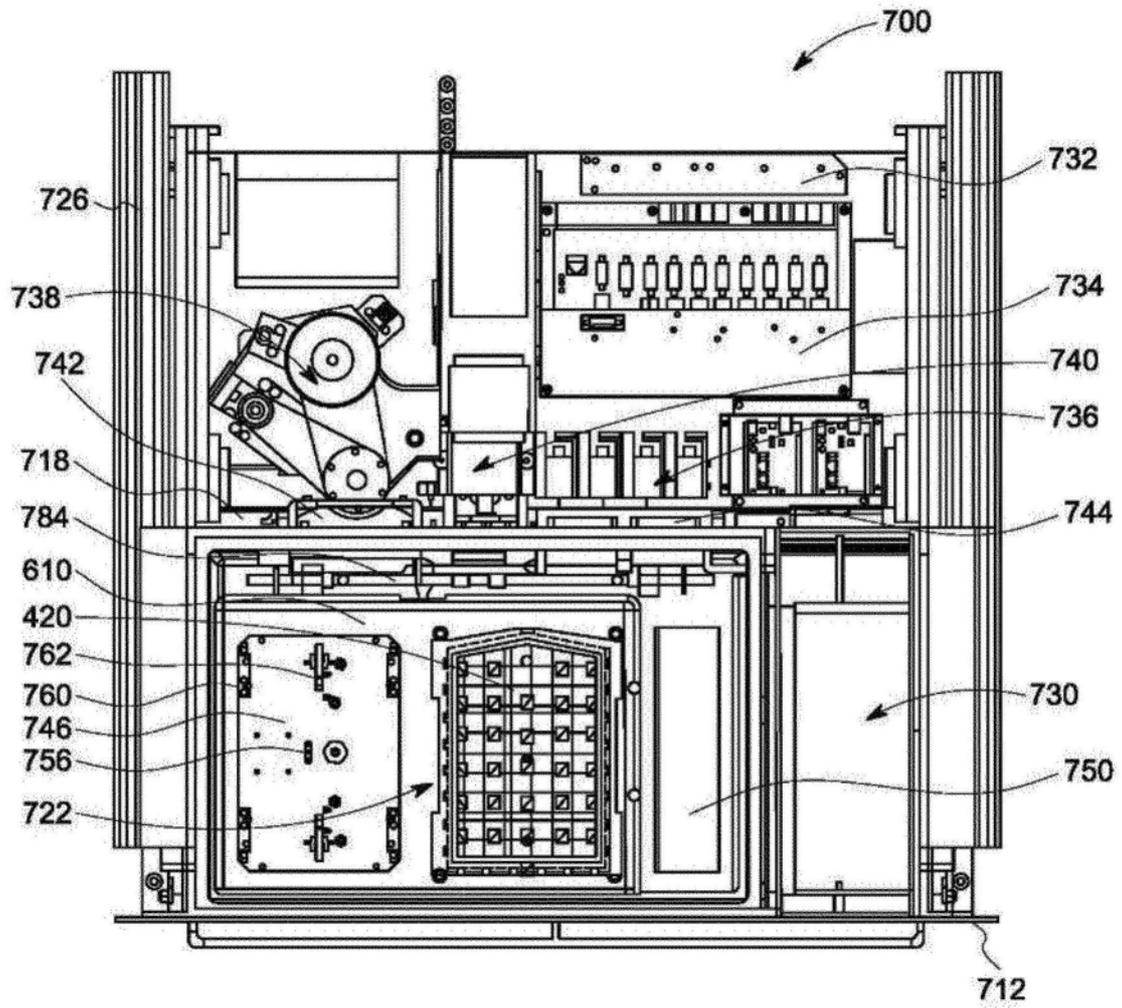


图25

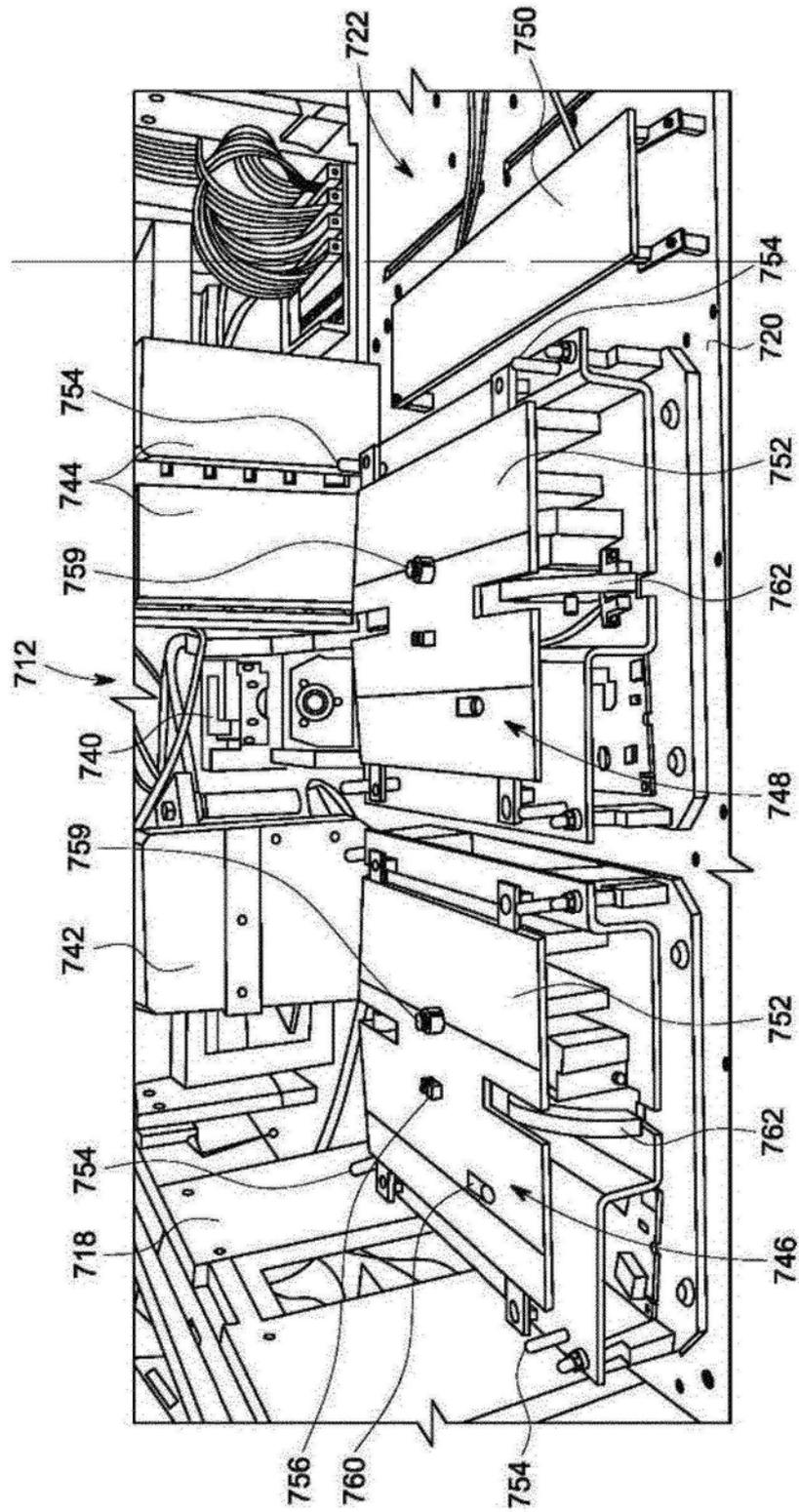


图26

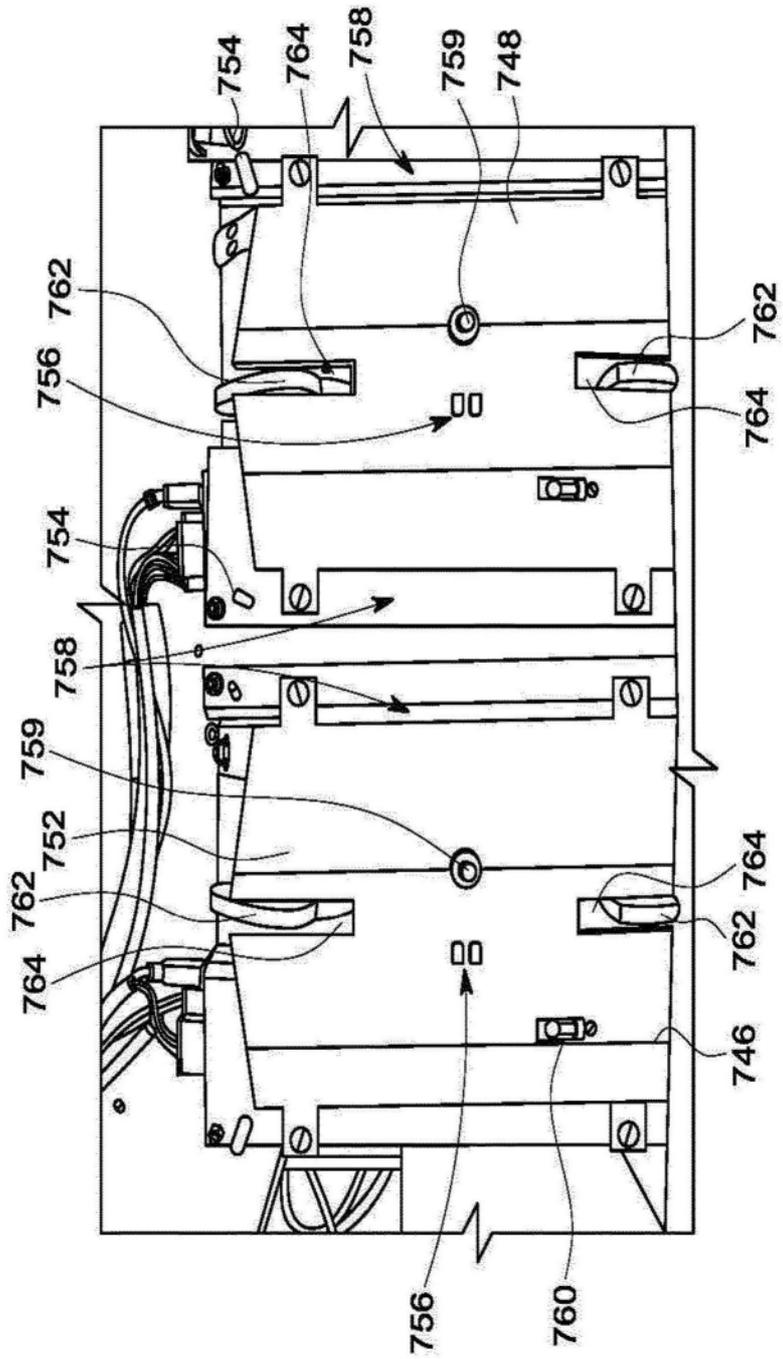


图27

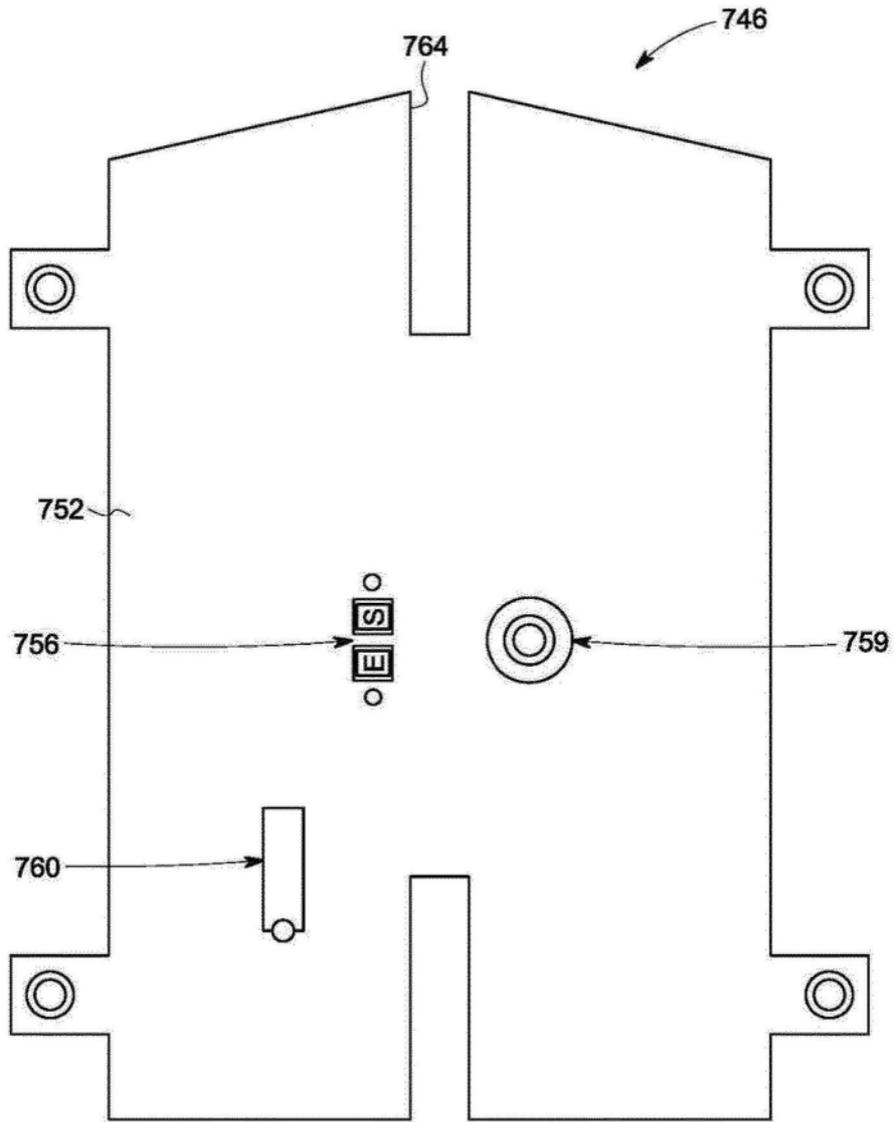


图28A

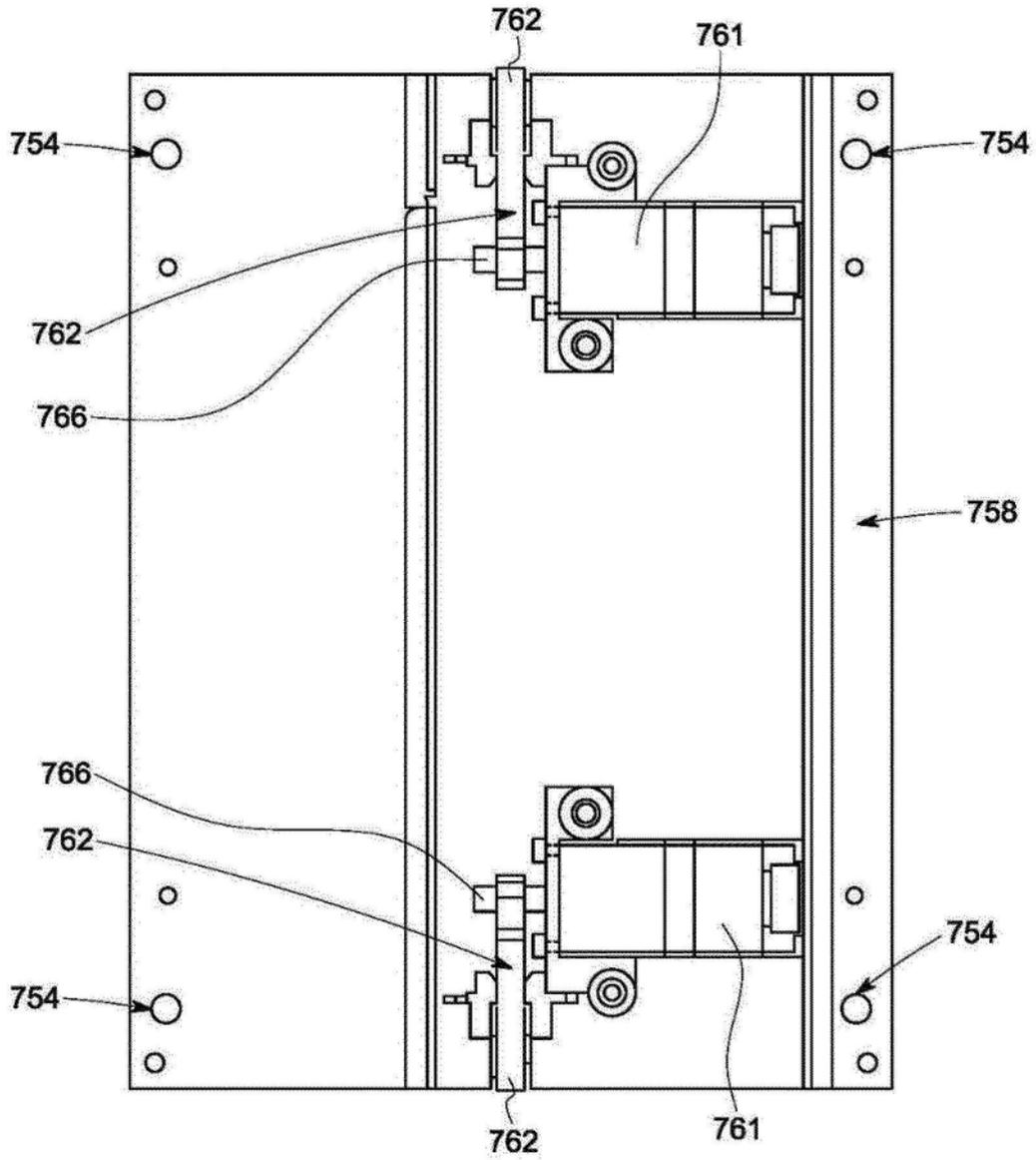


图28B

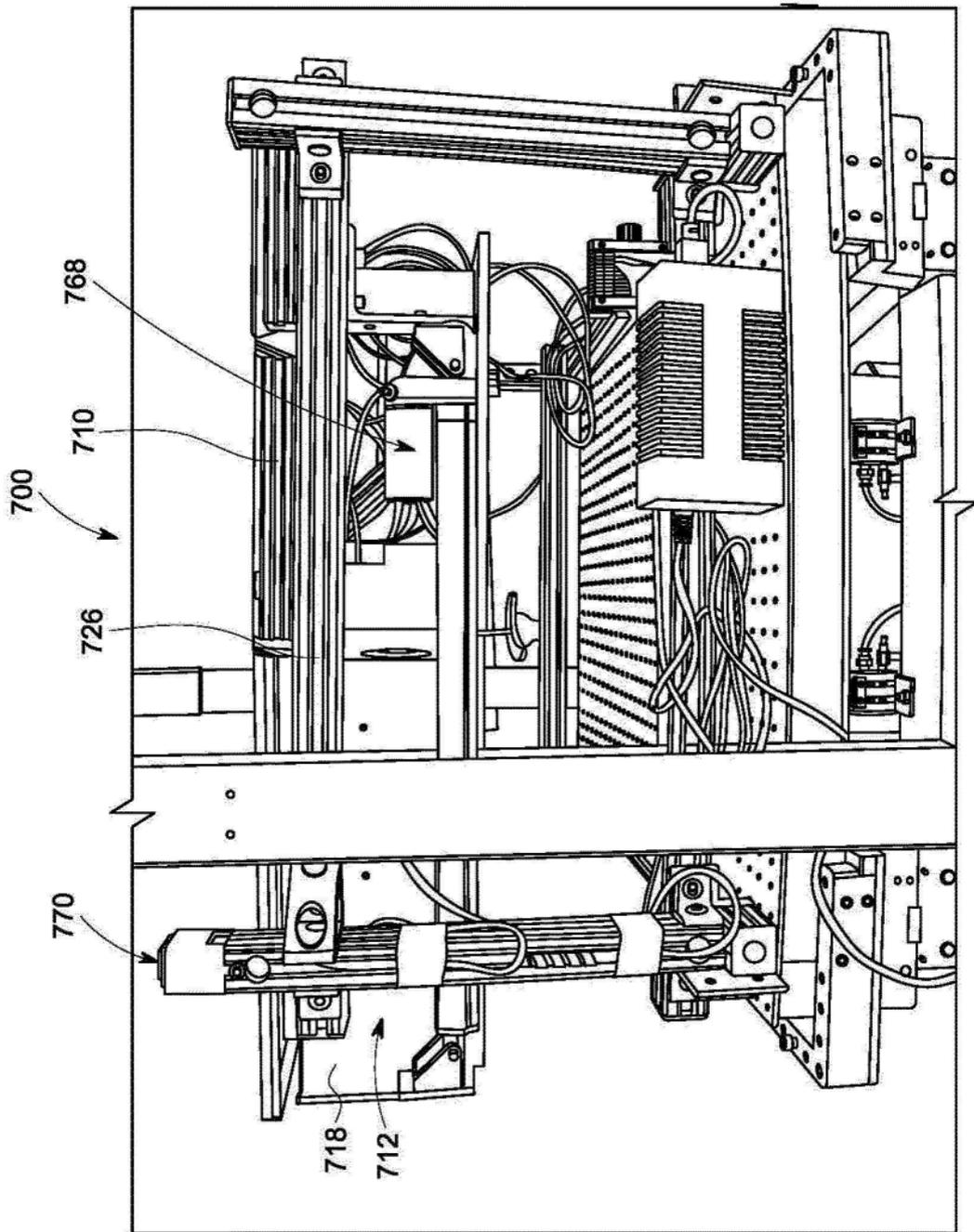


图29

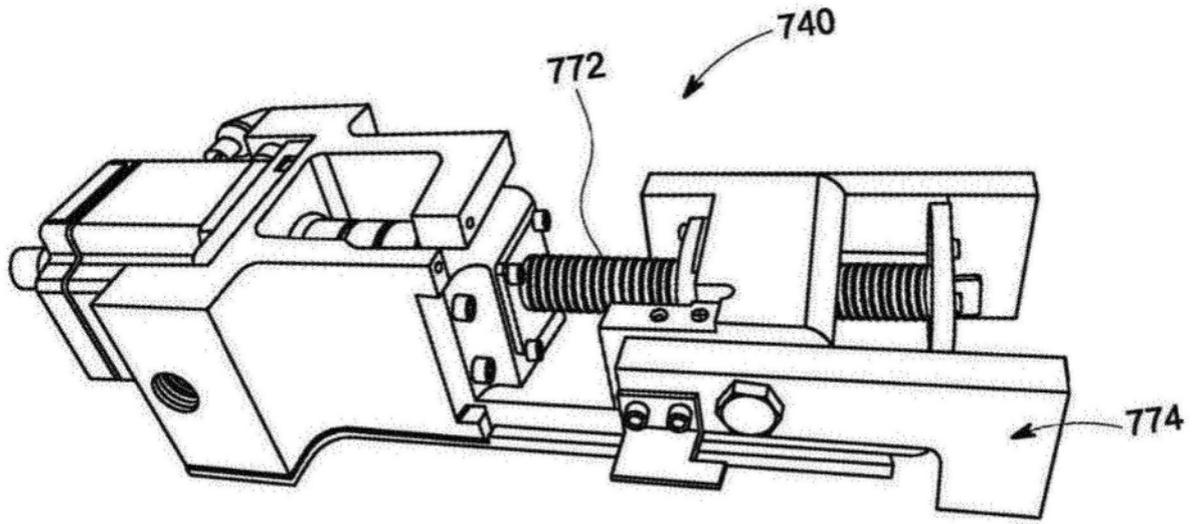


图30

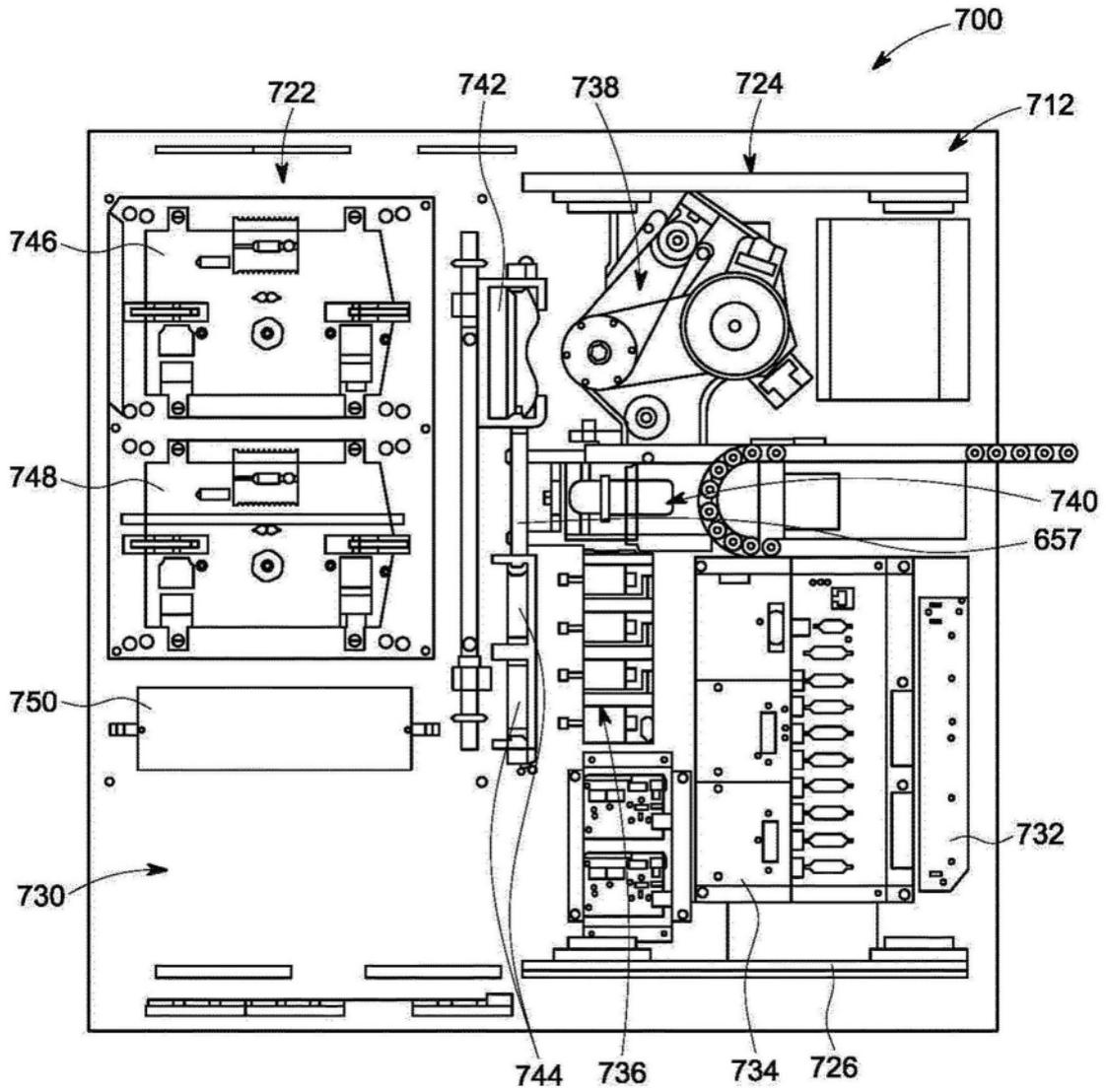


图31

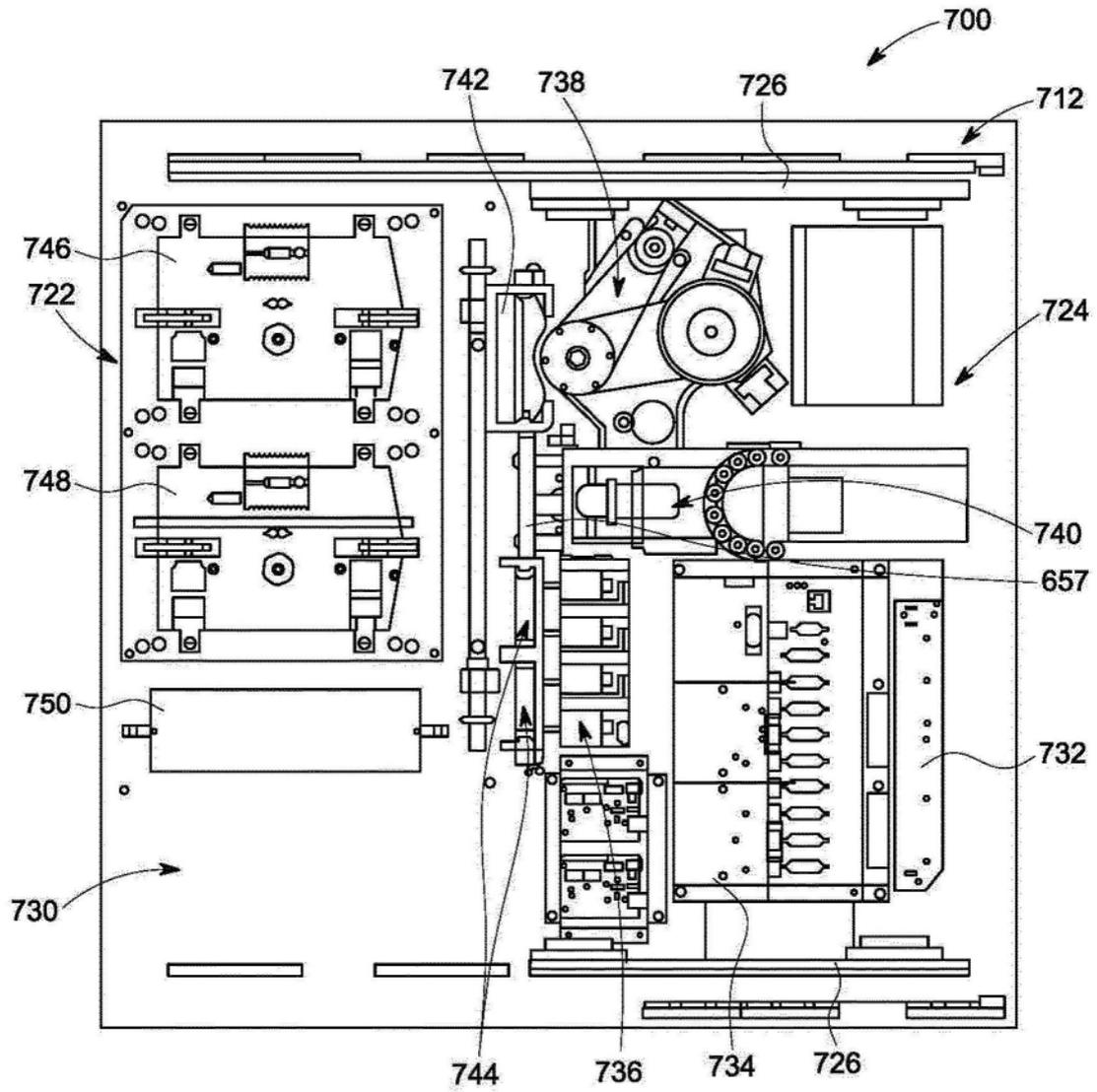


图32

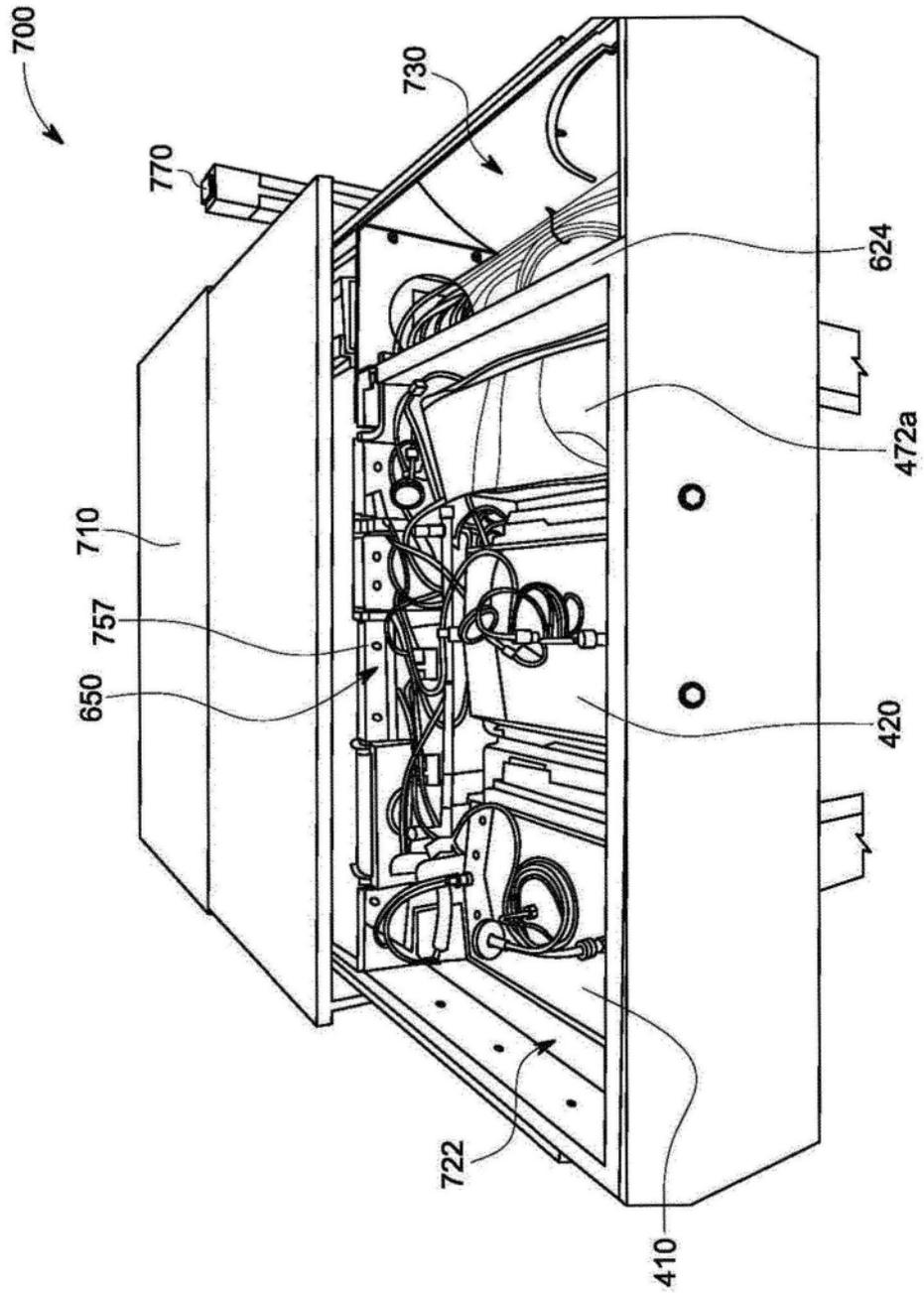


图33

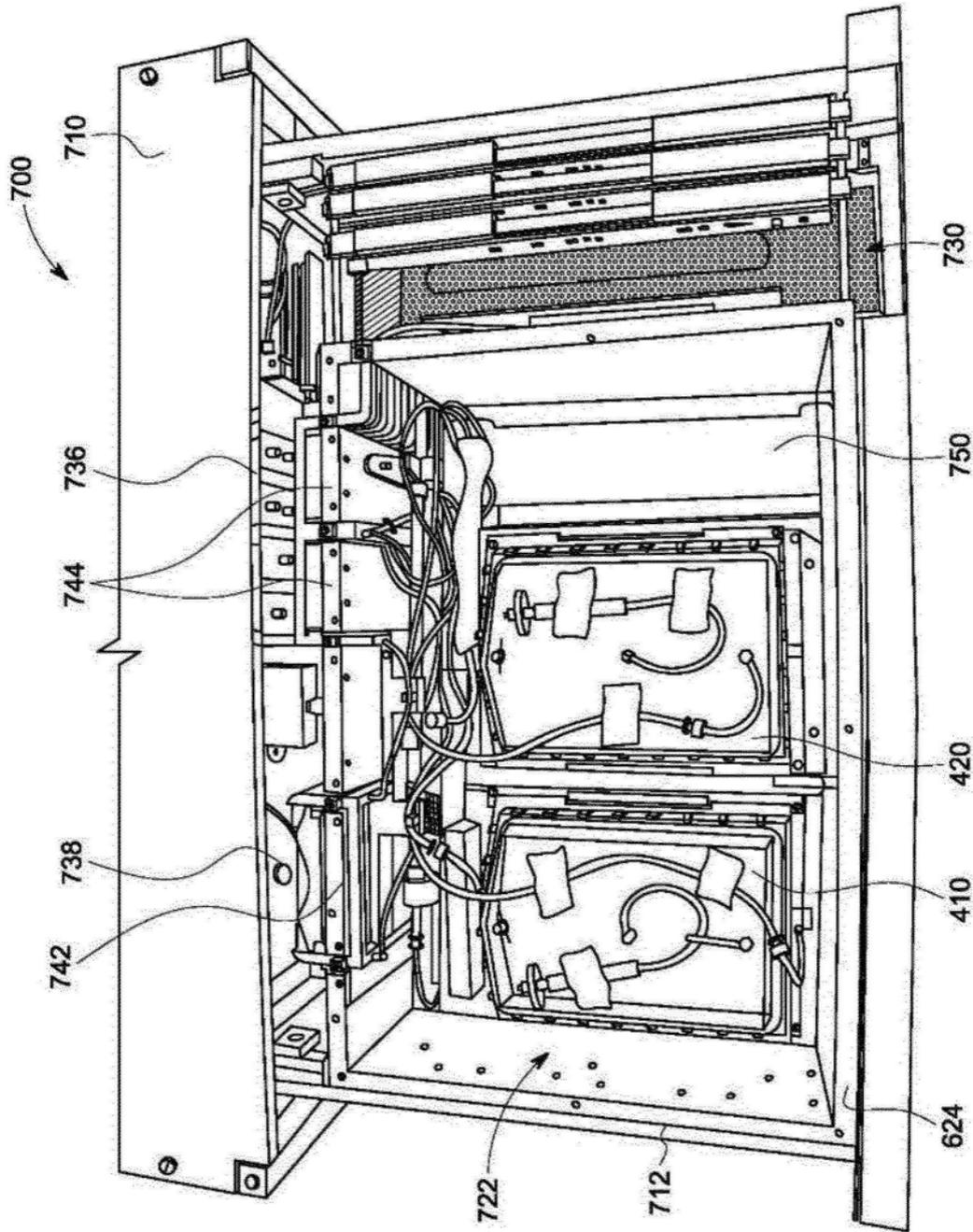


图34

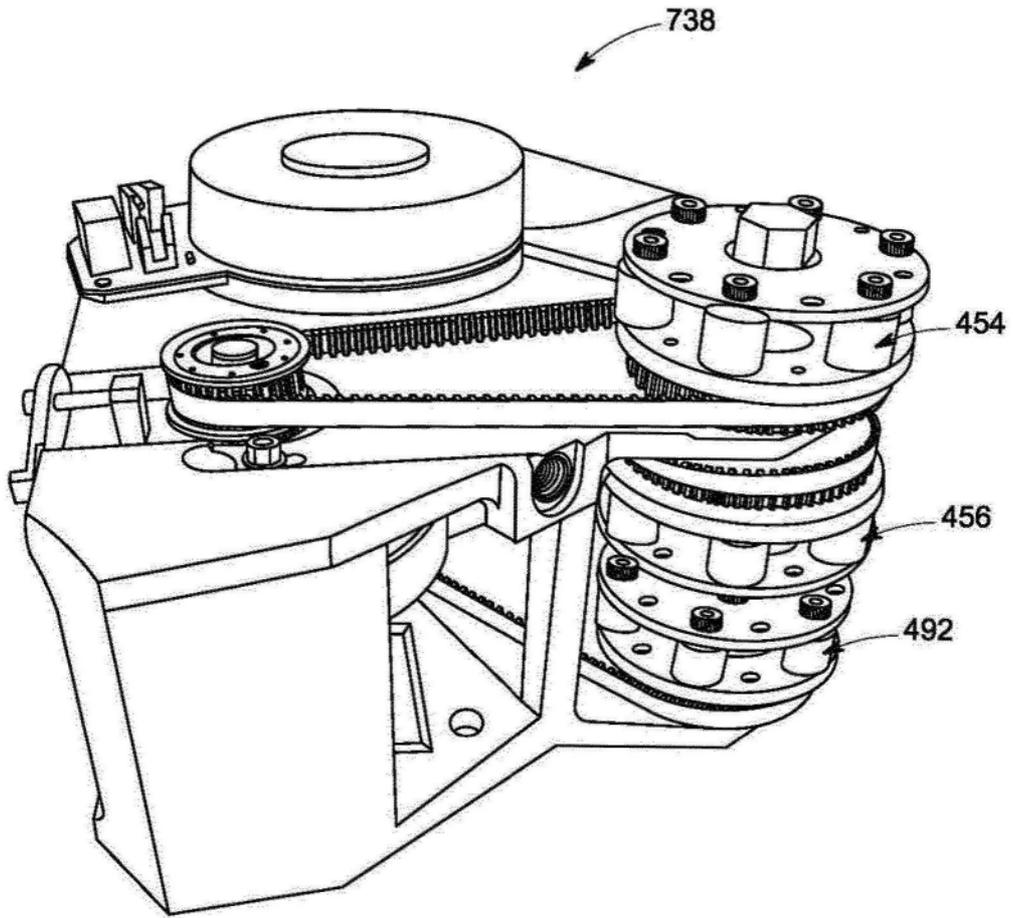


图35

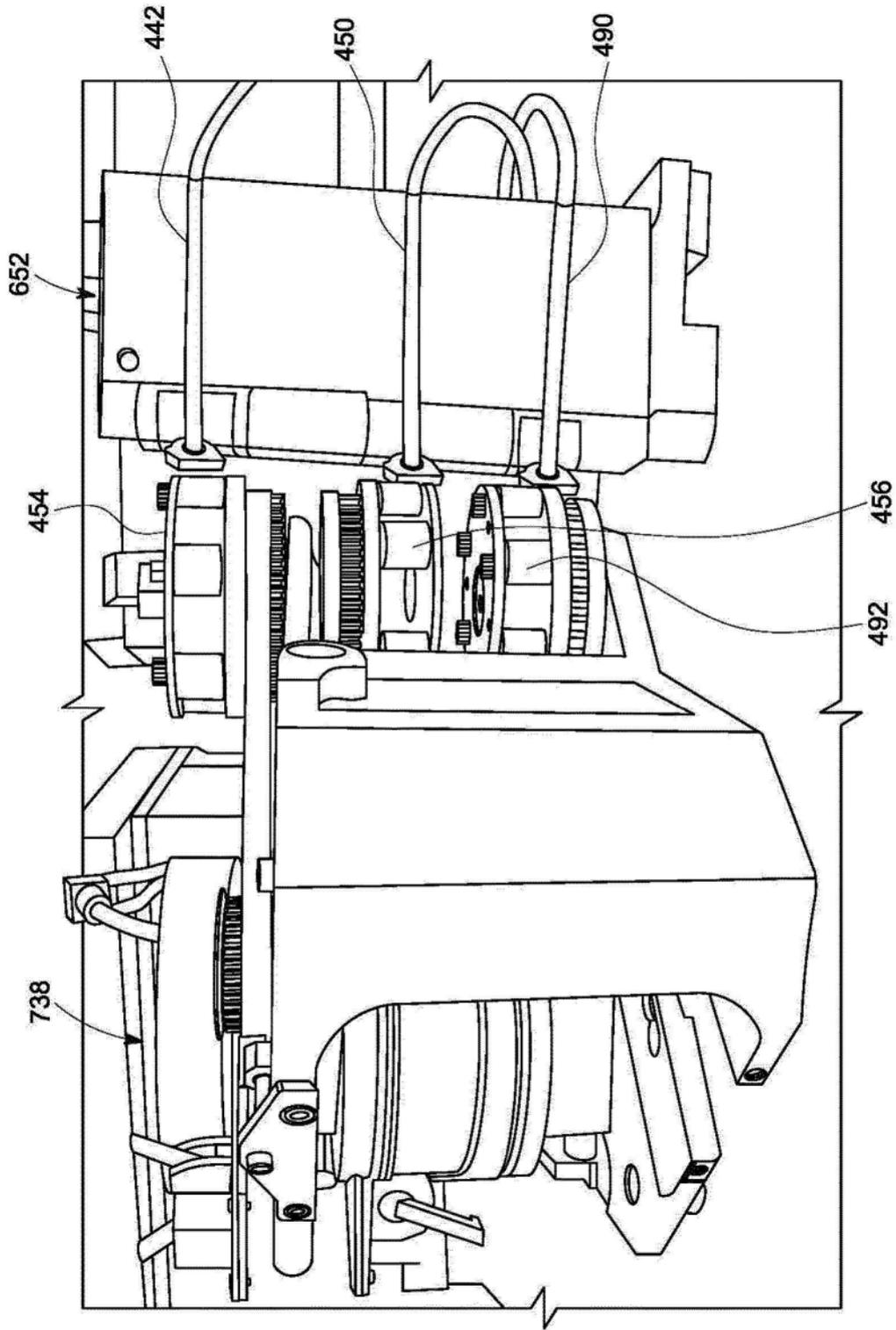


图36

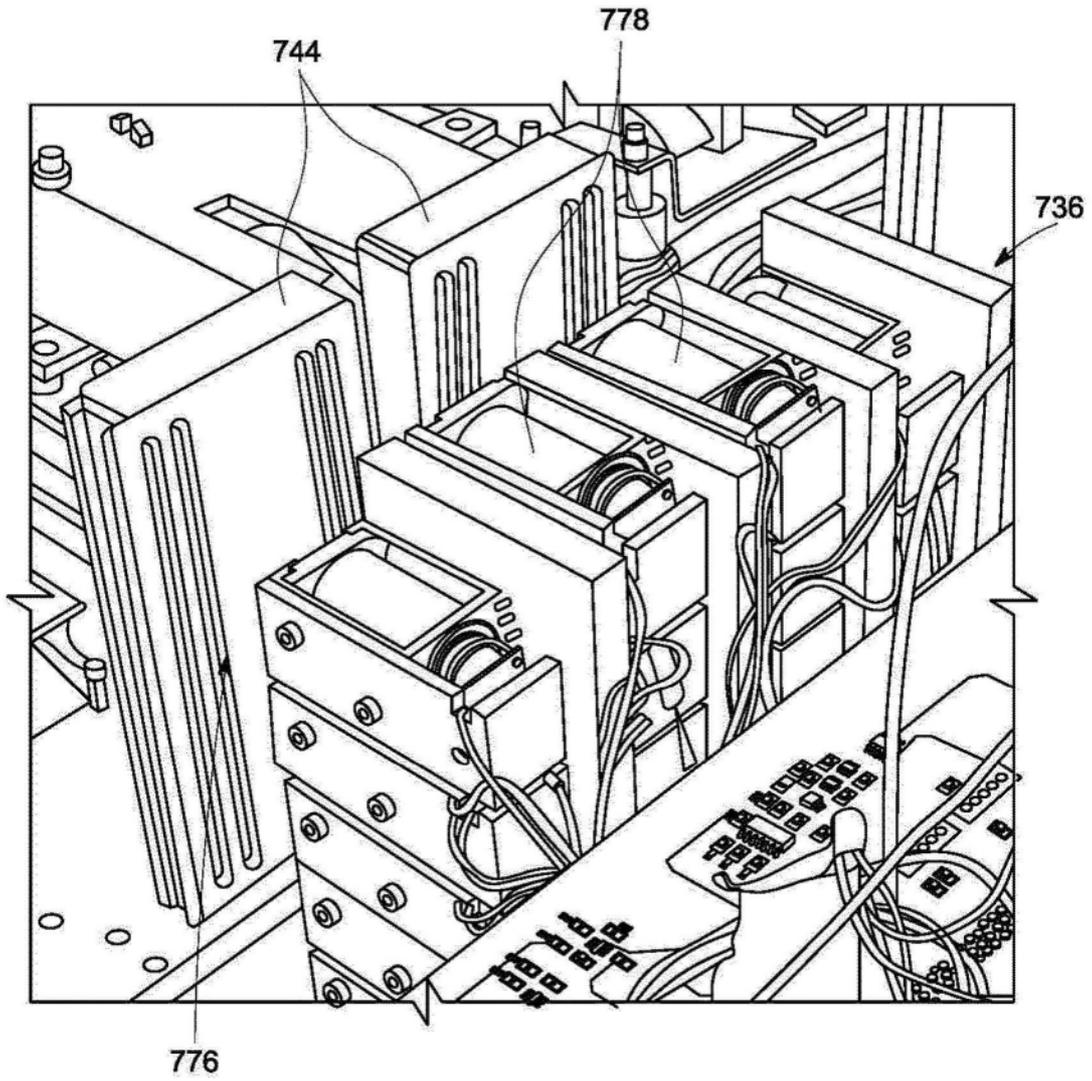


图37

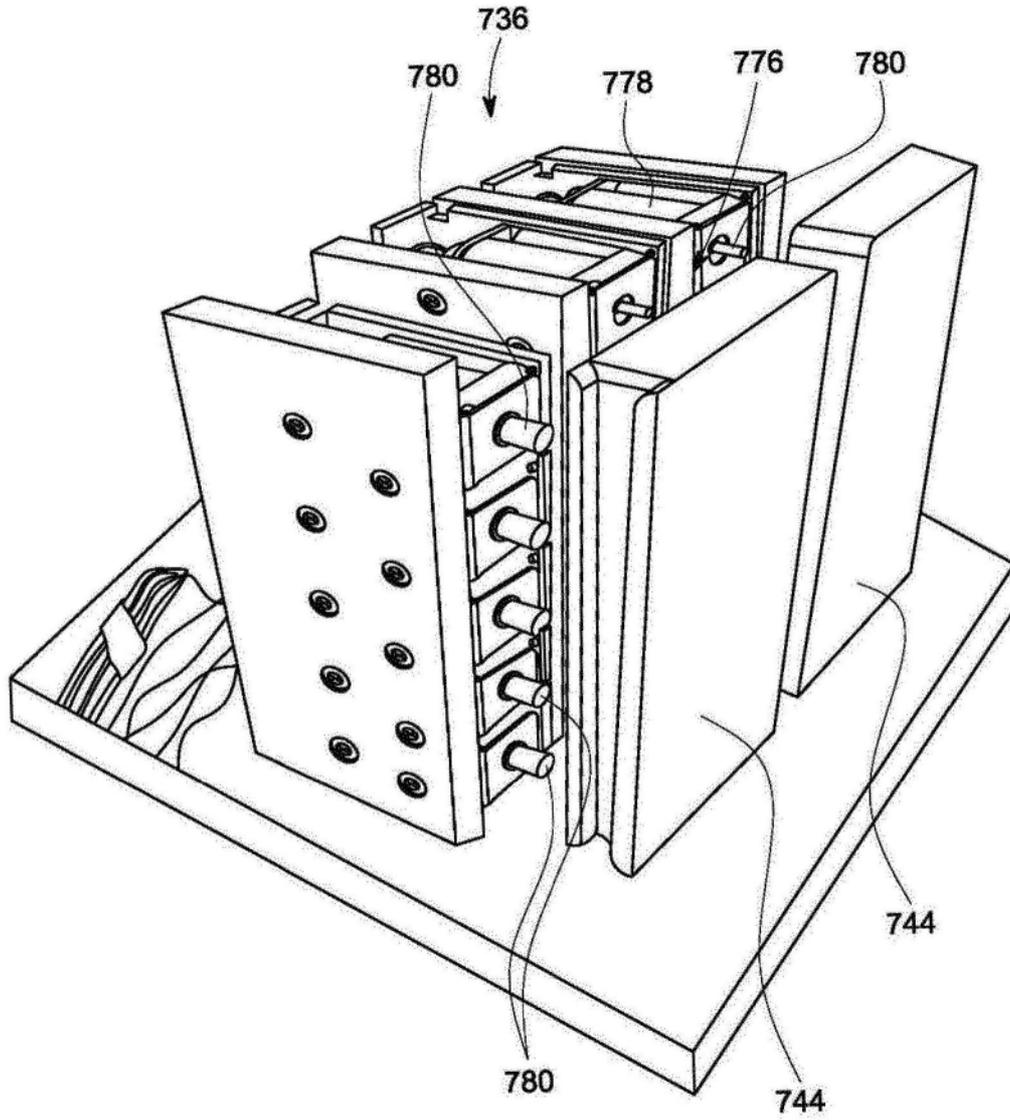


图38

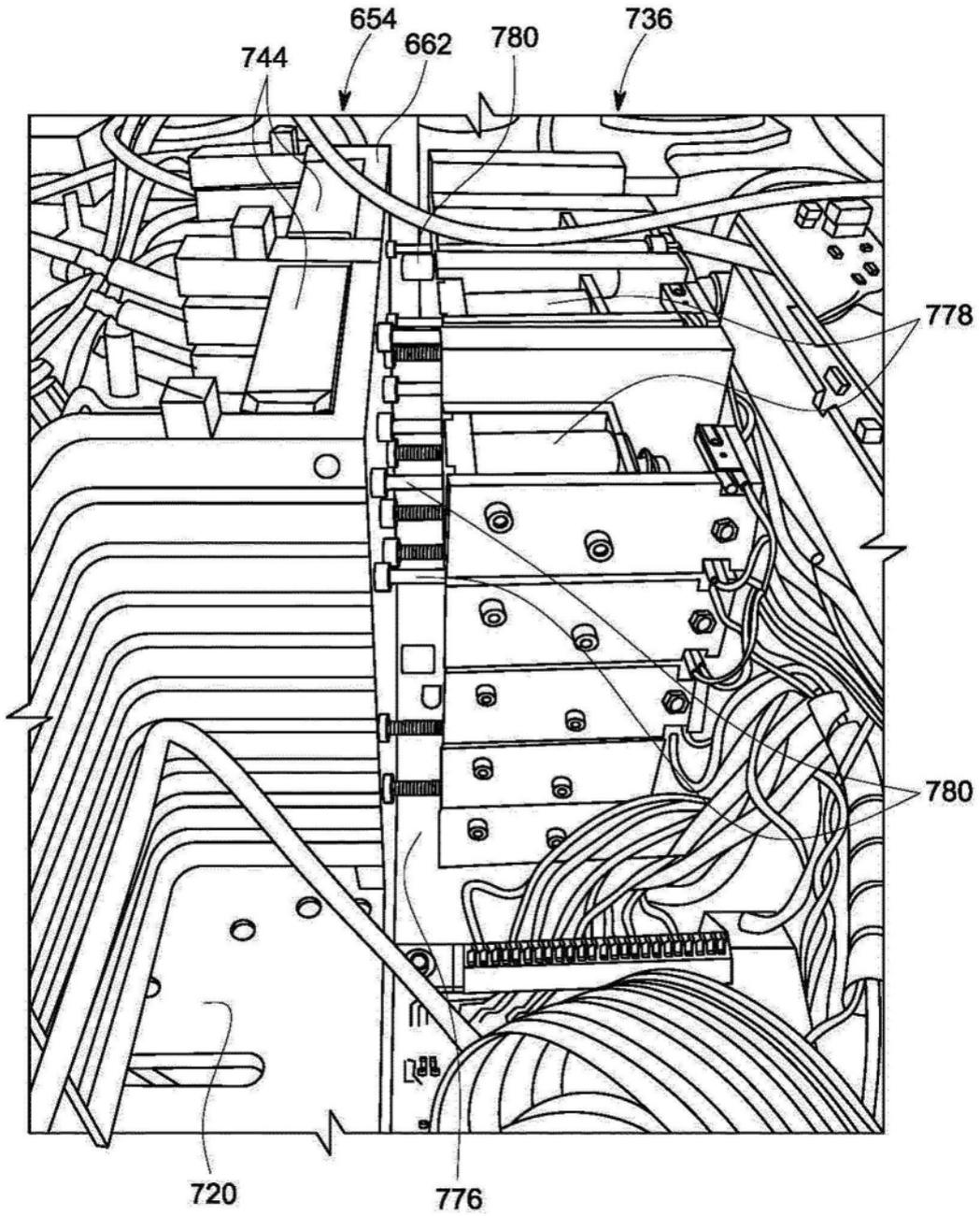


图39

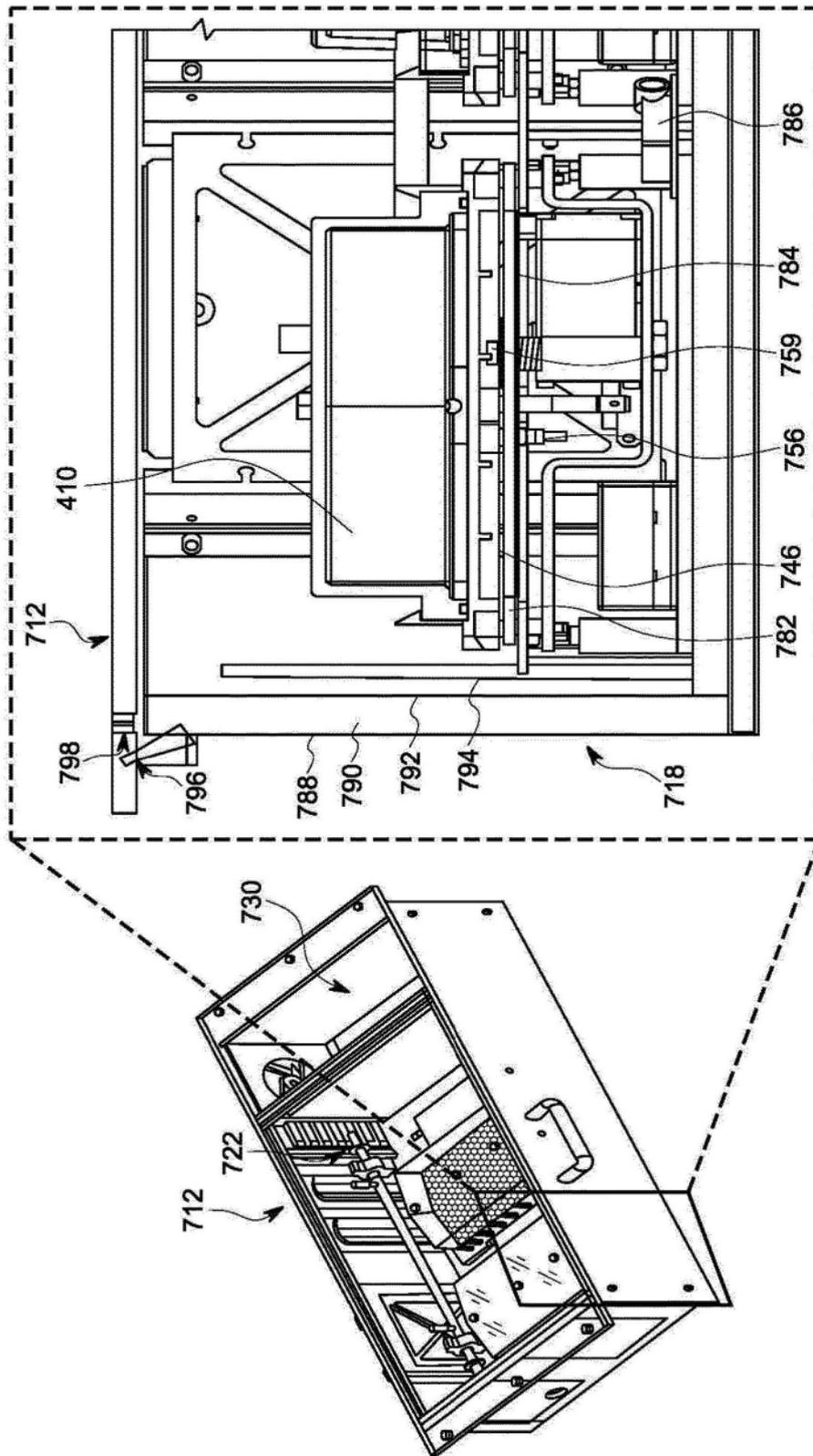


图40

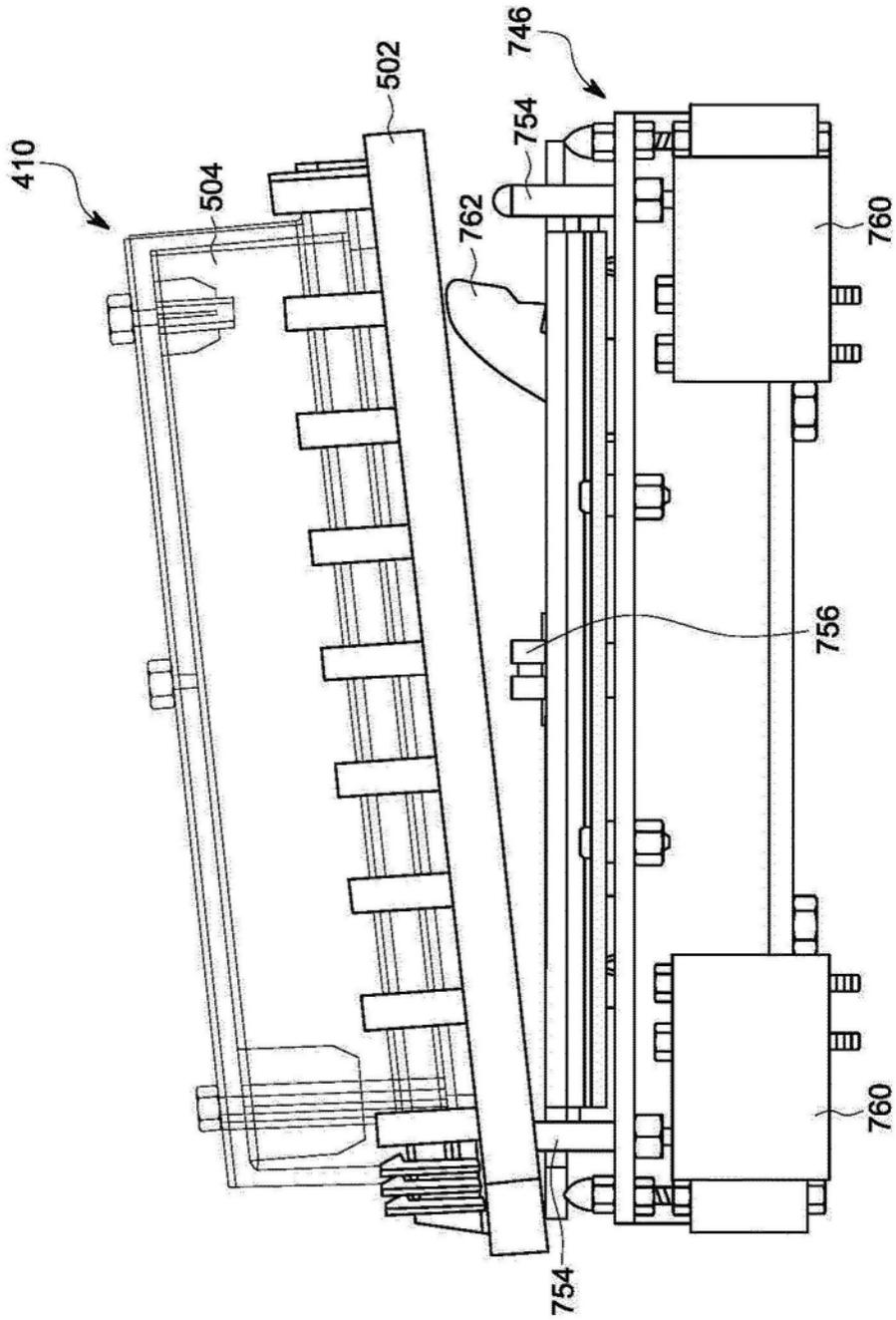


图41

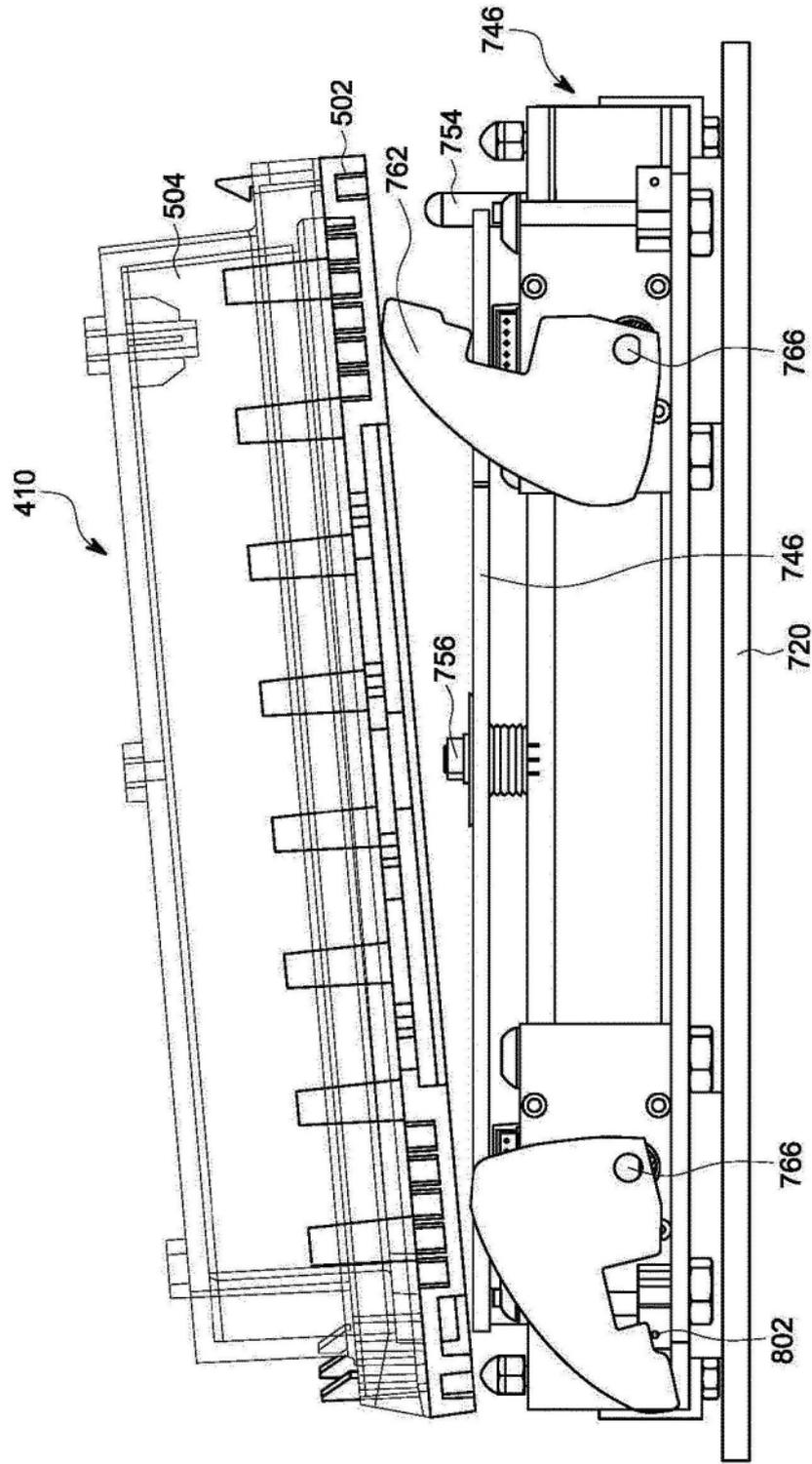


图42

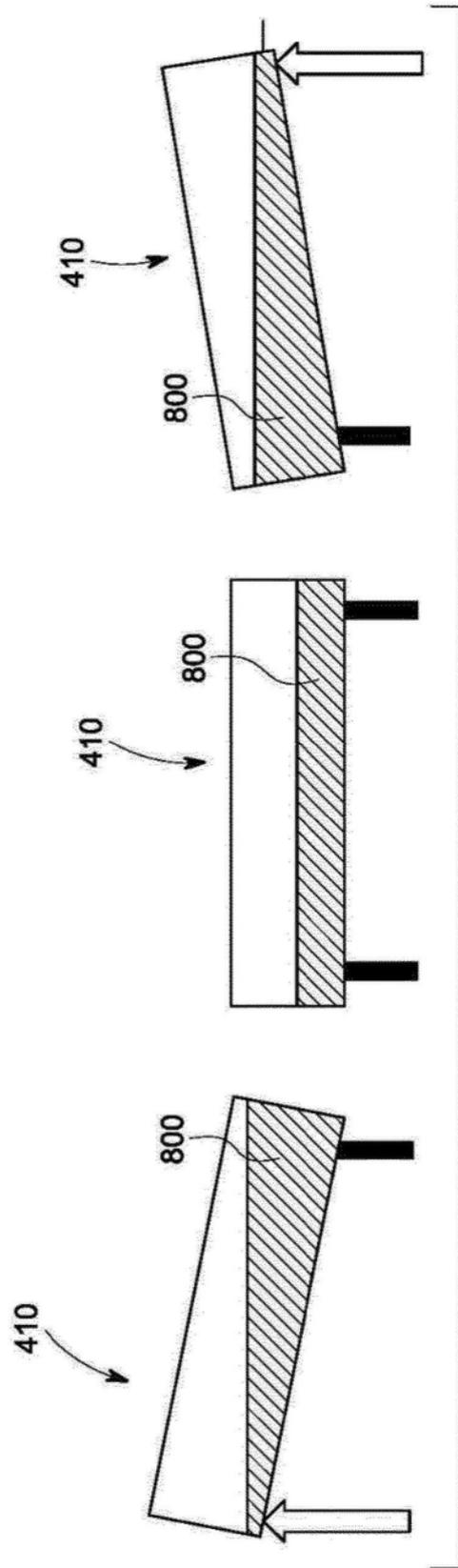


图43

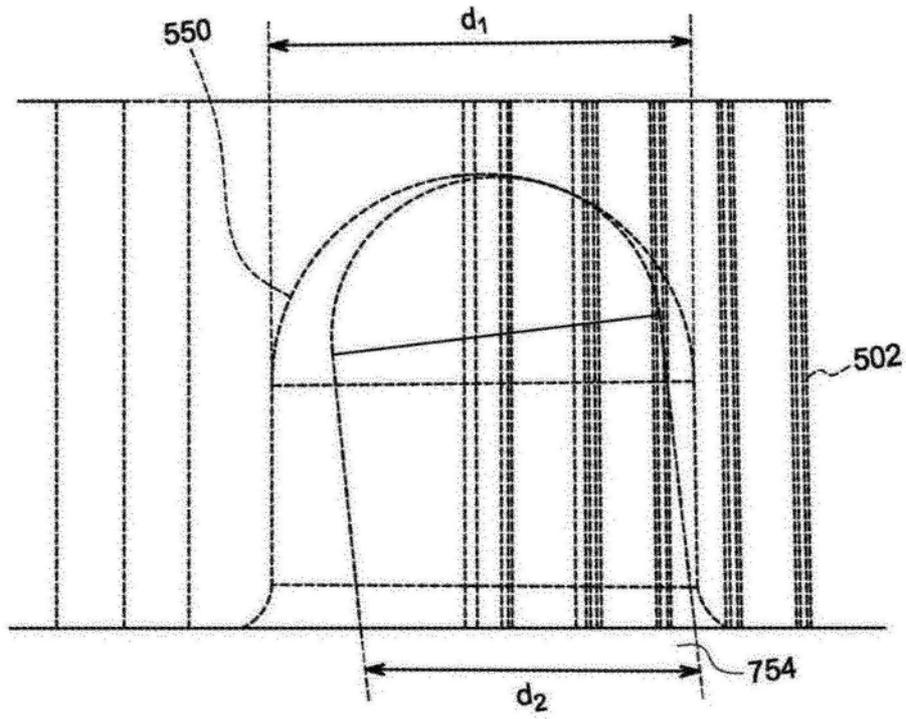


图44

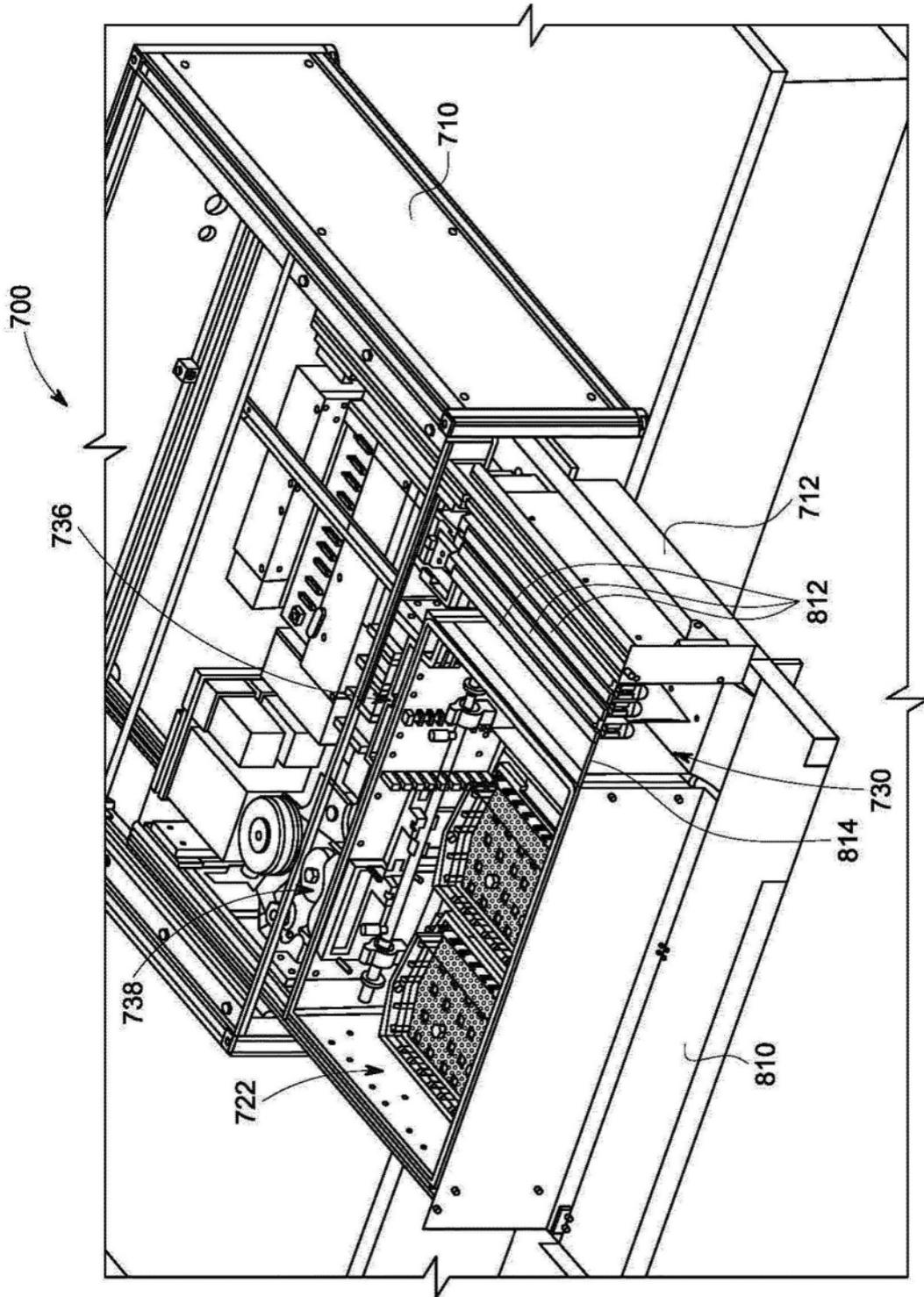


图45

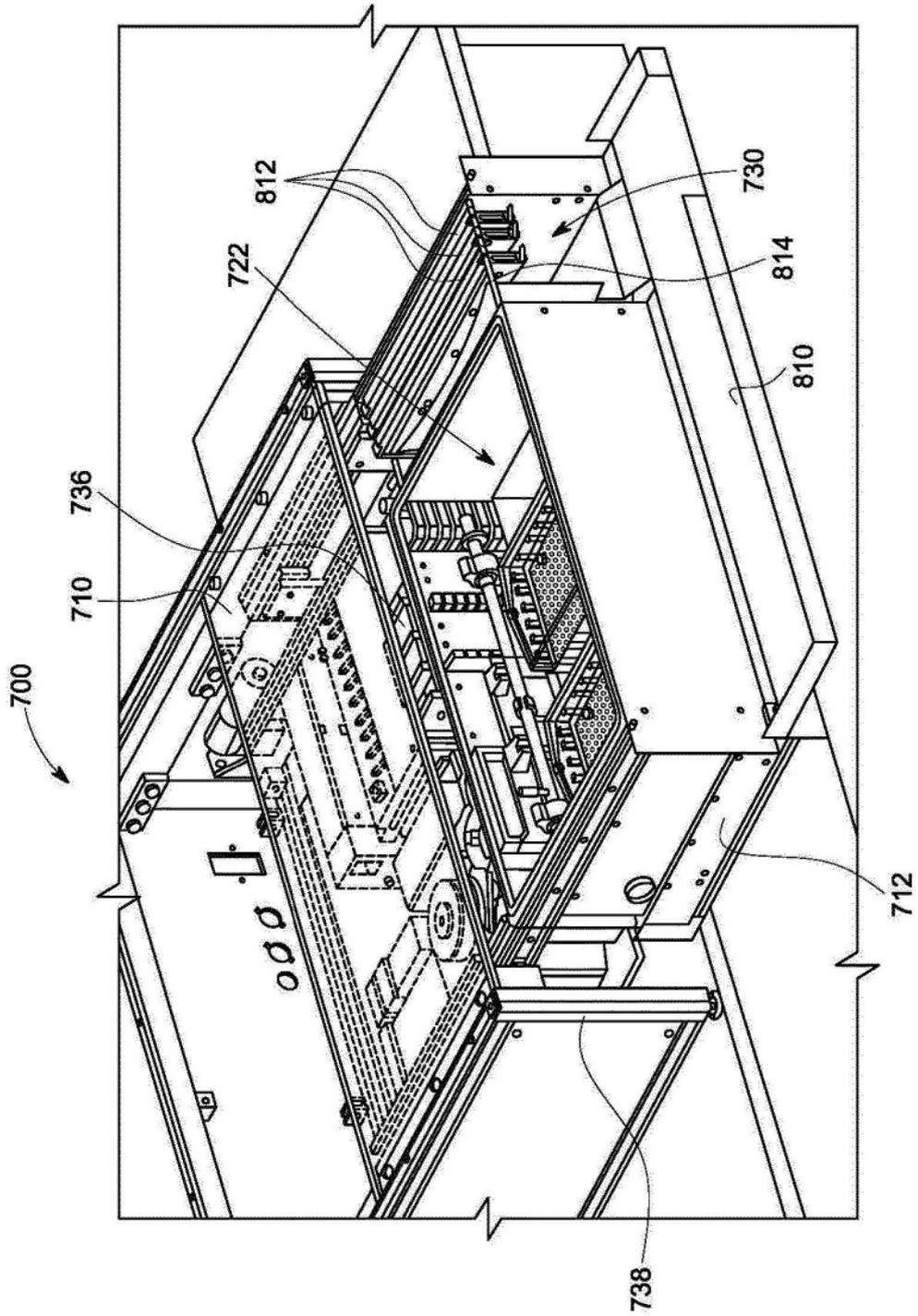


图46

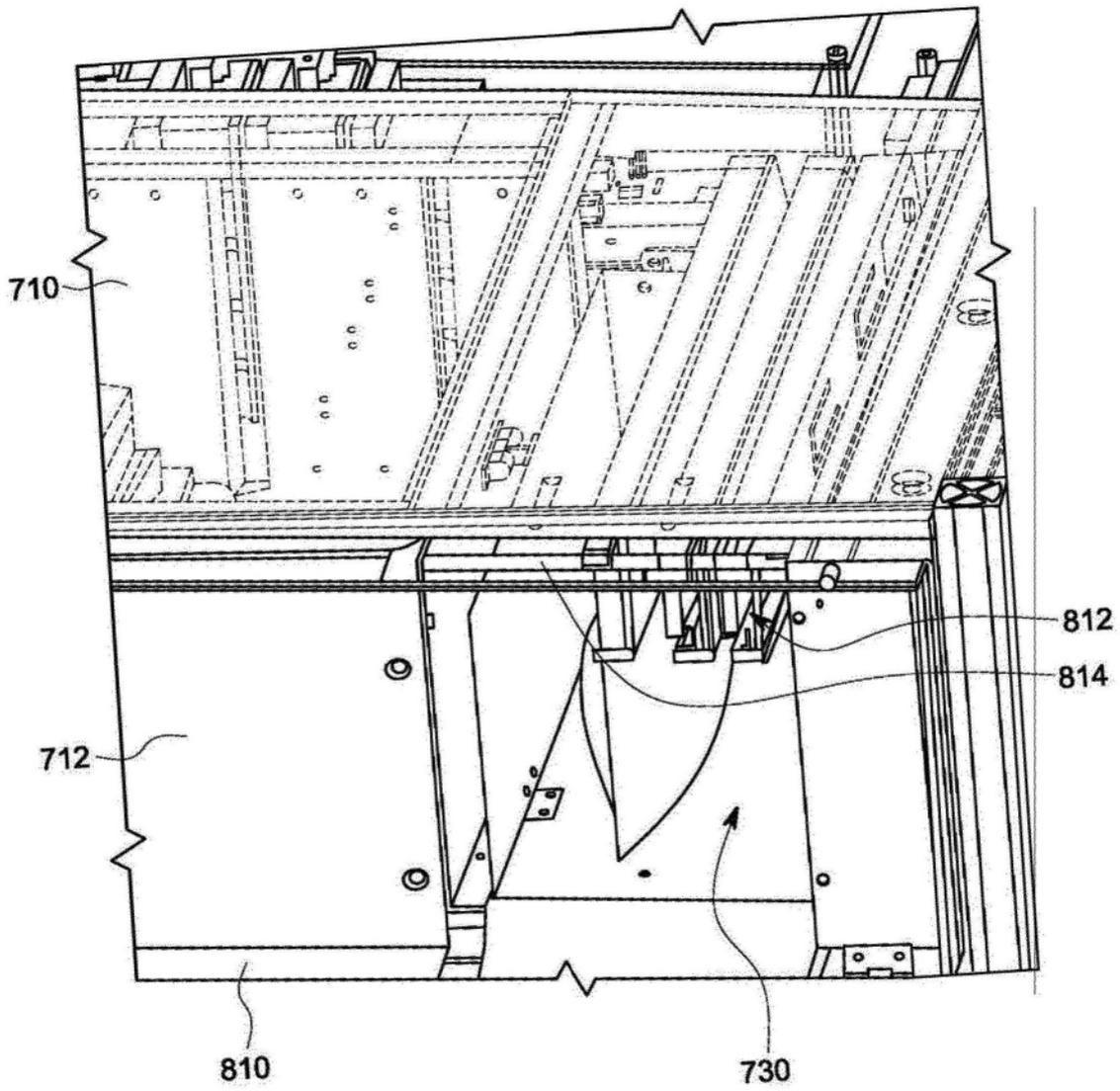


图47

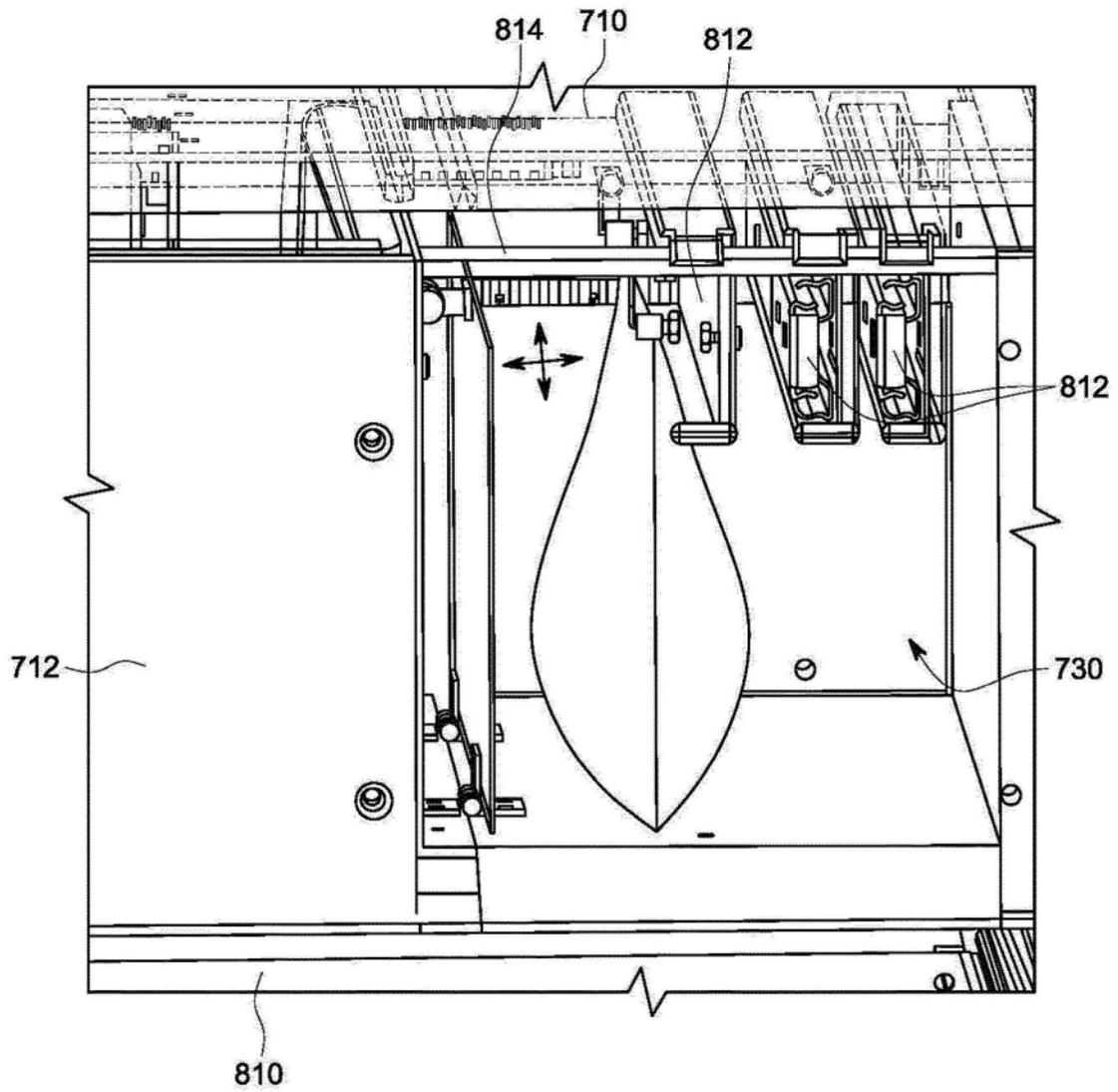


图48

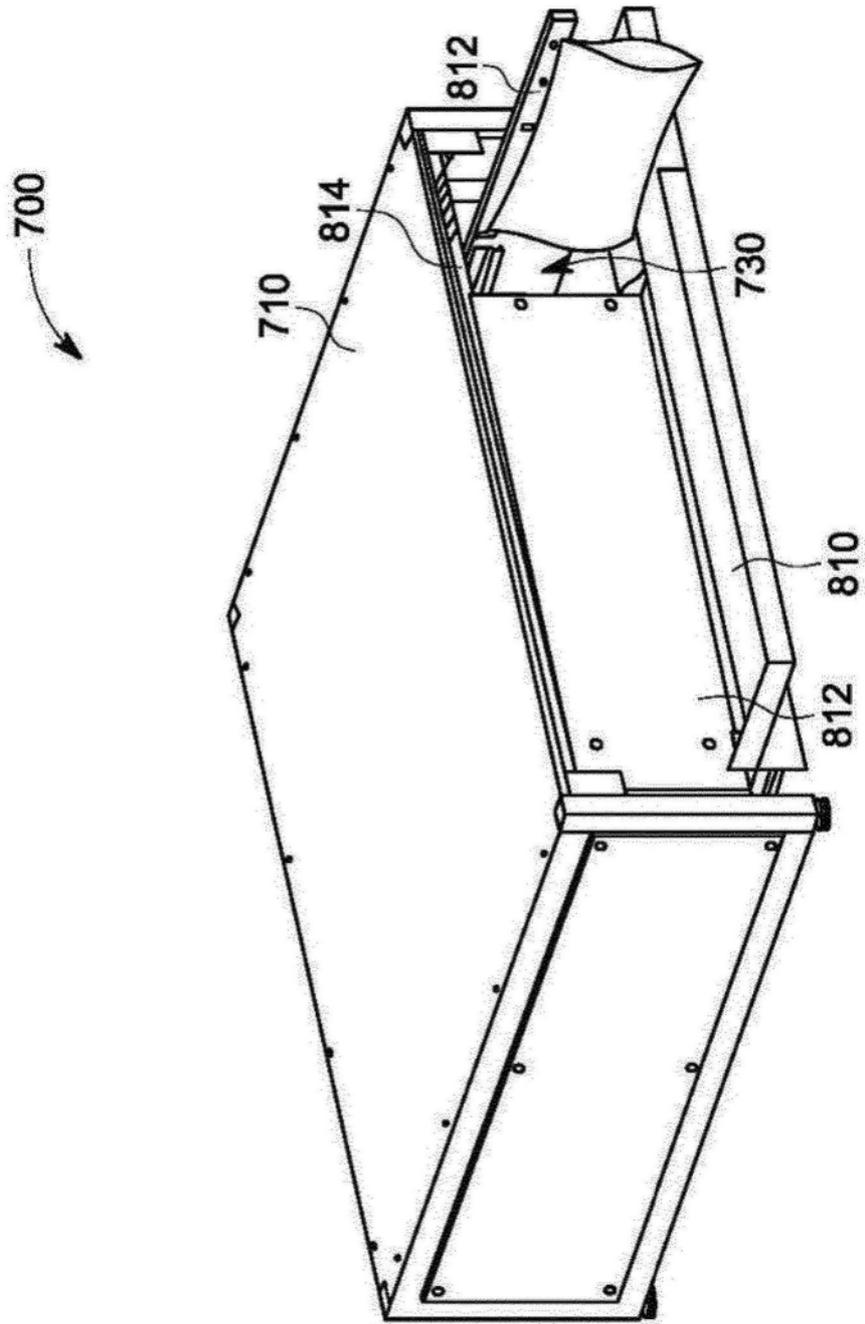


图49

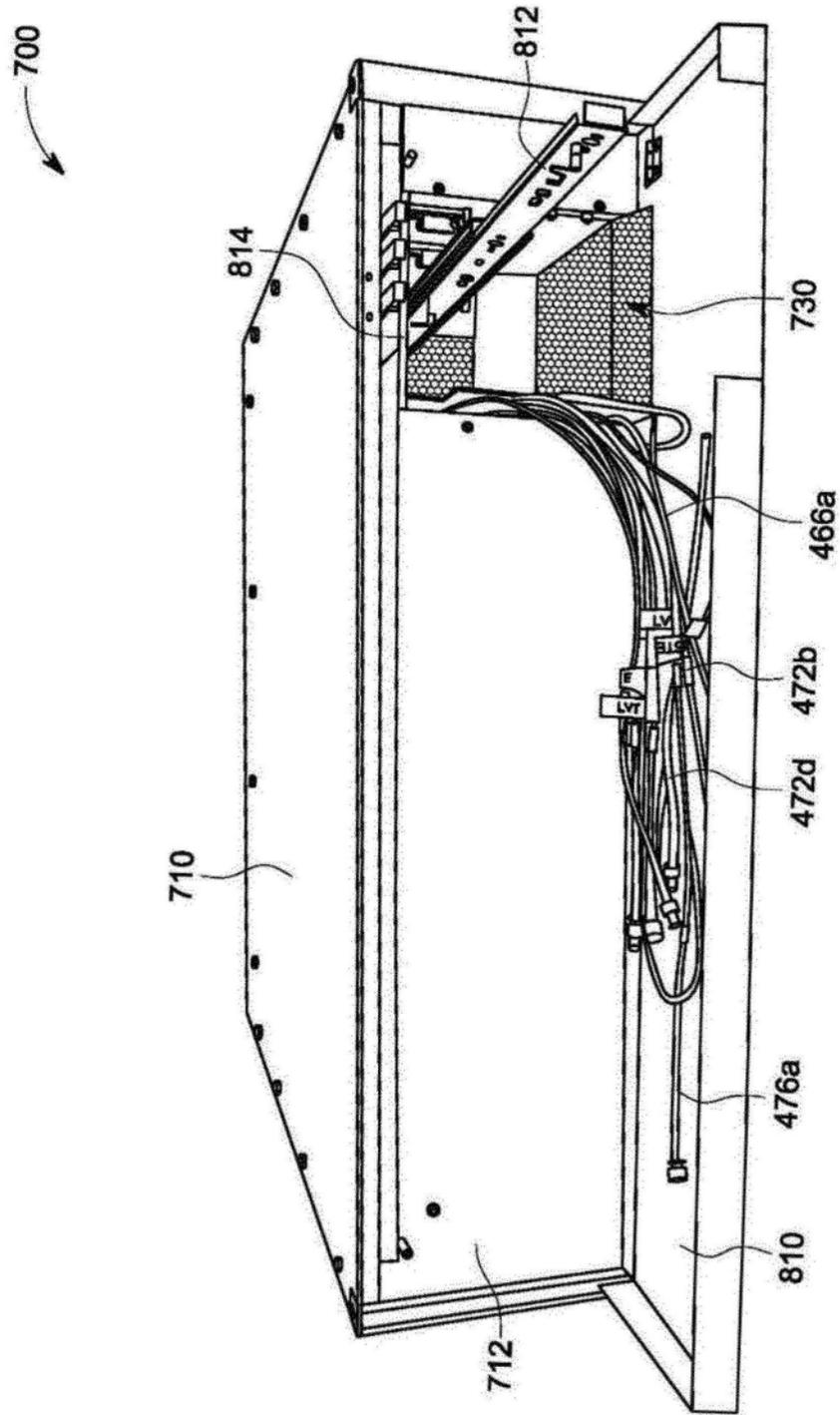


图50

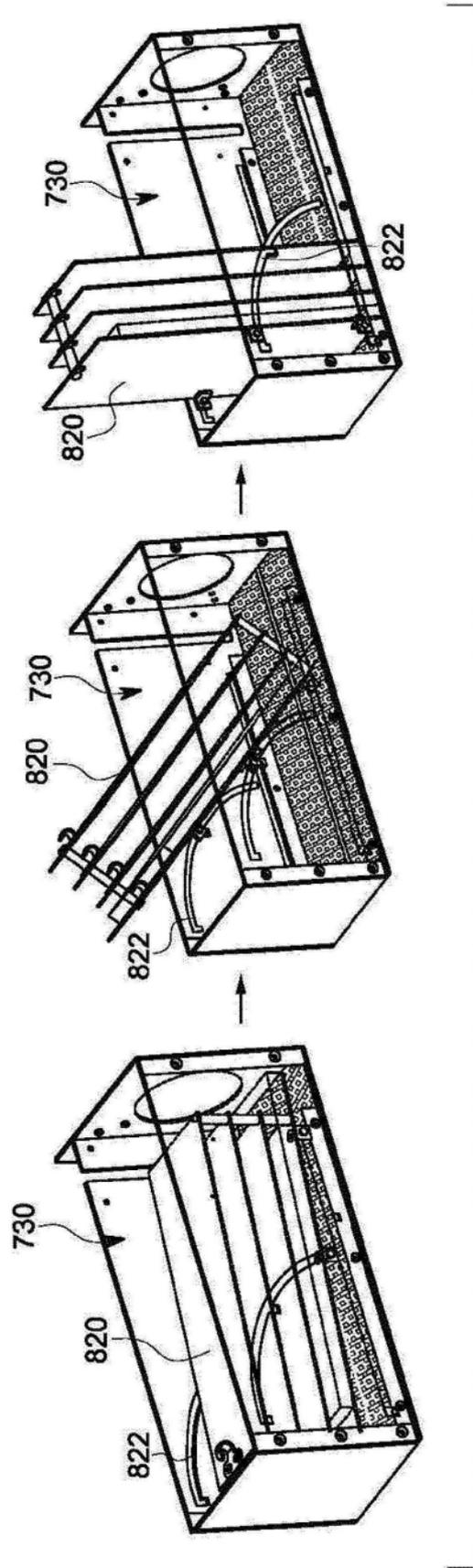


图51

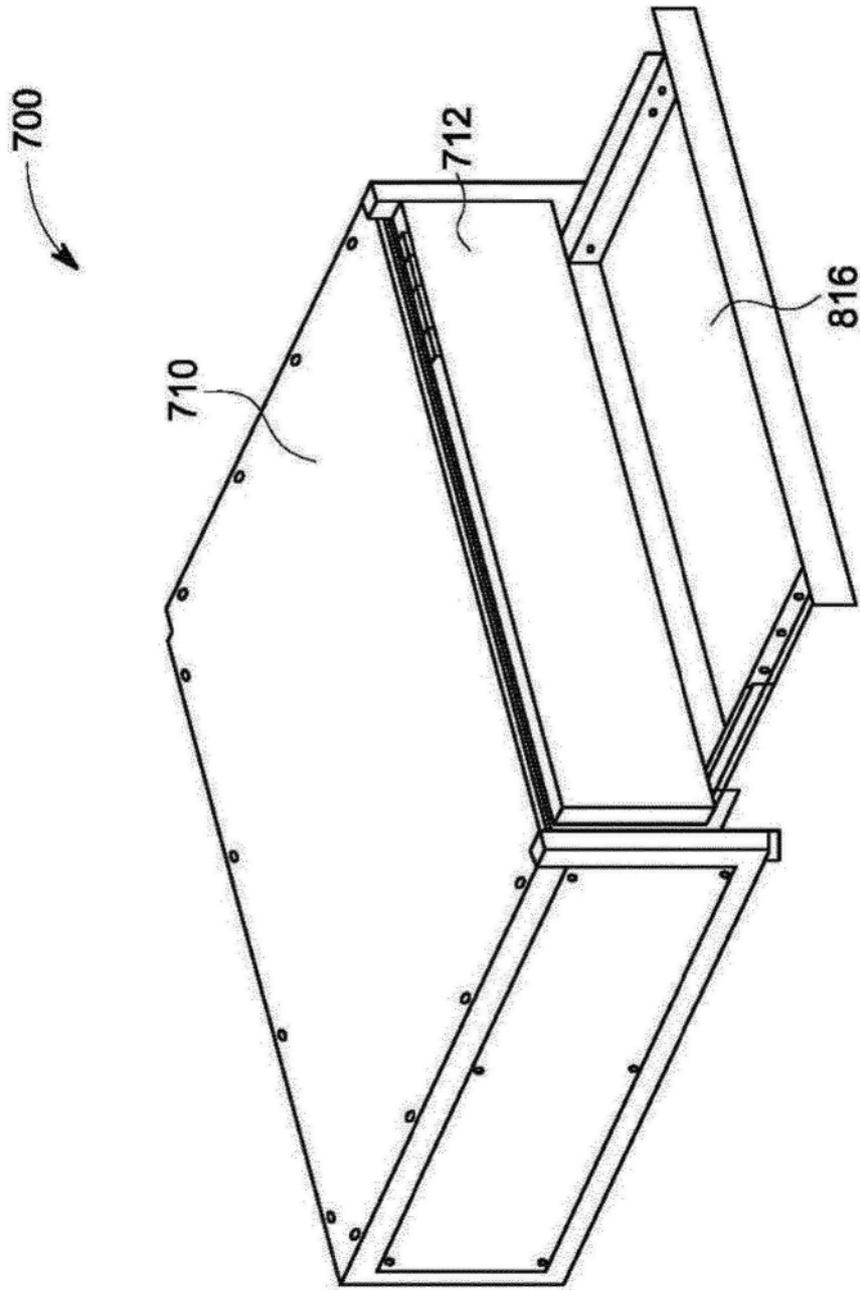


图52

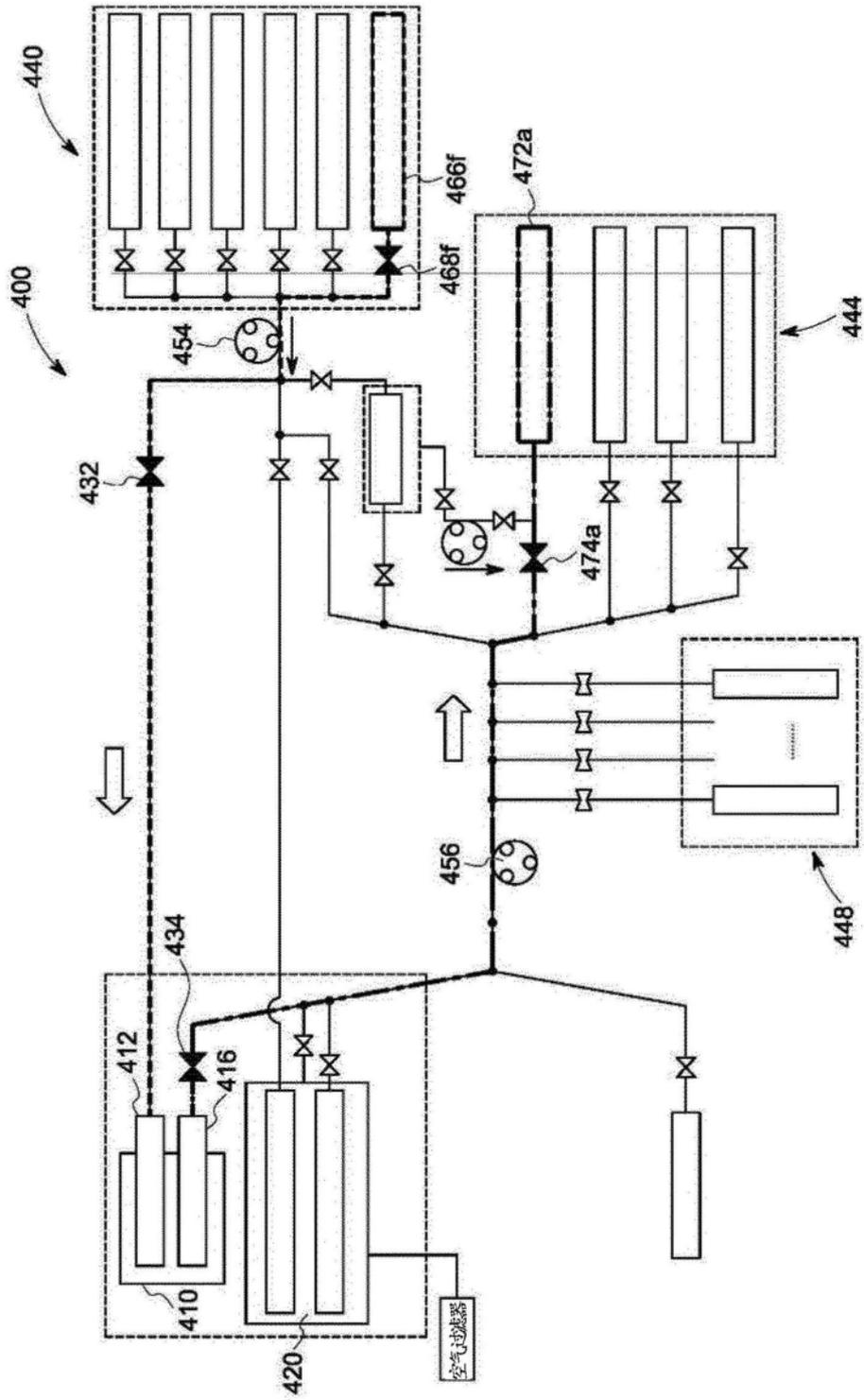


图53

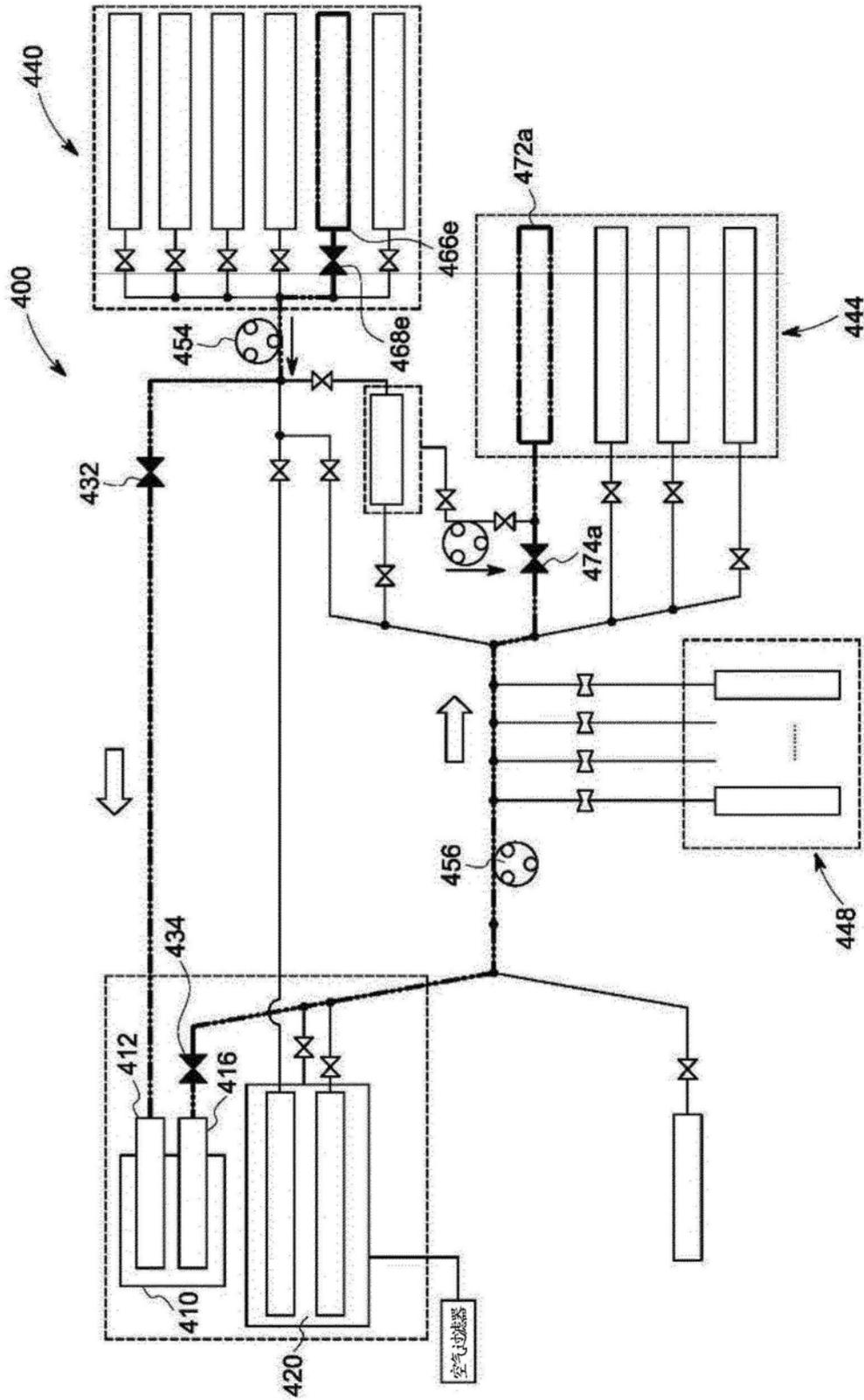


图54

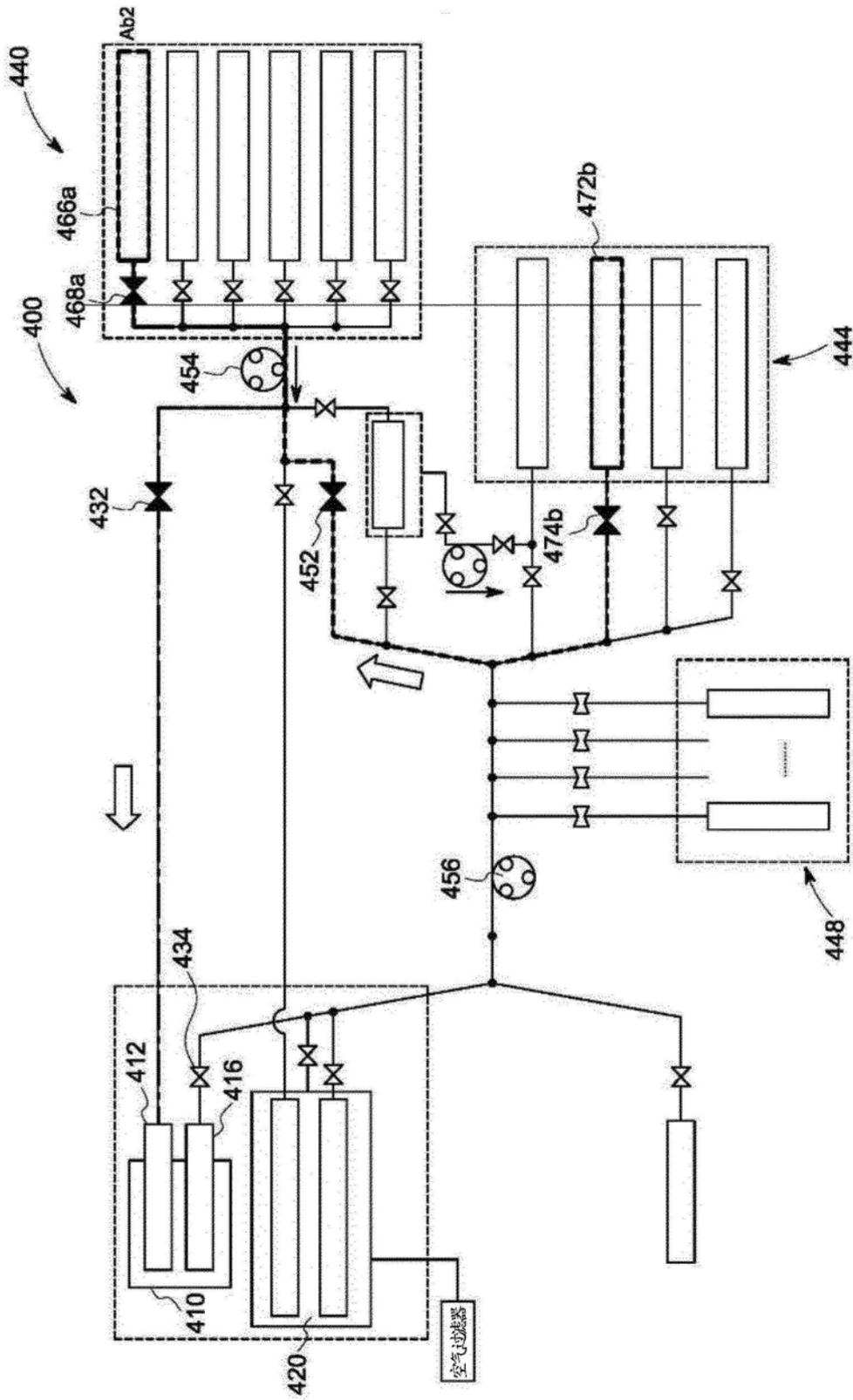


图57

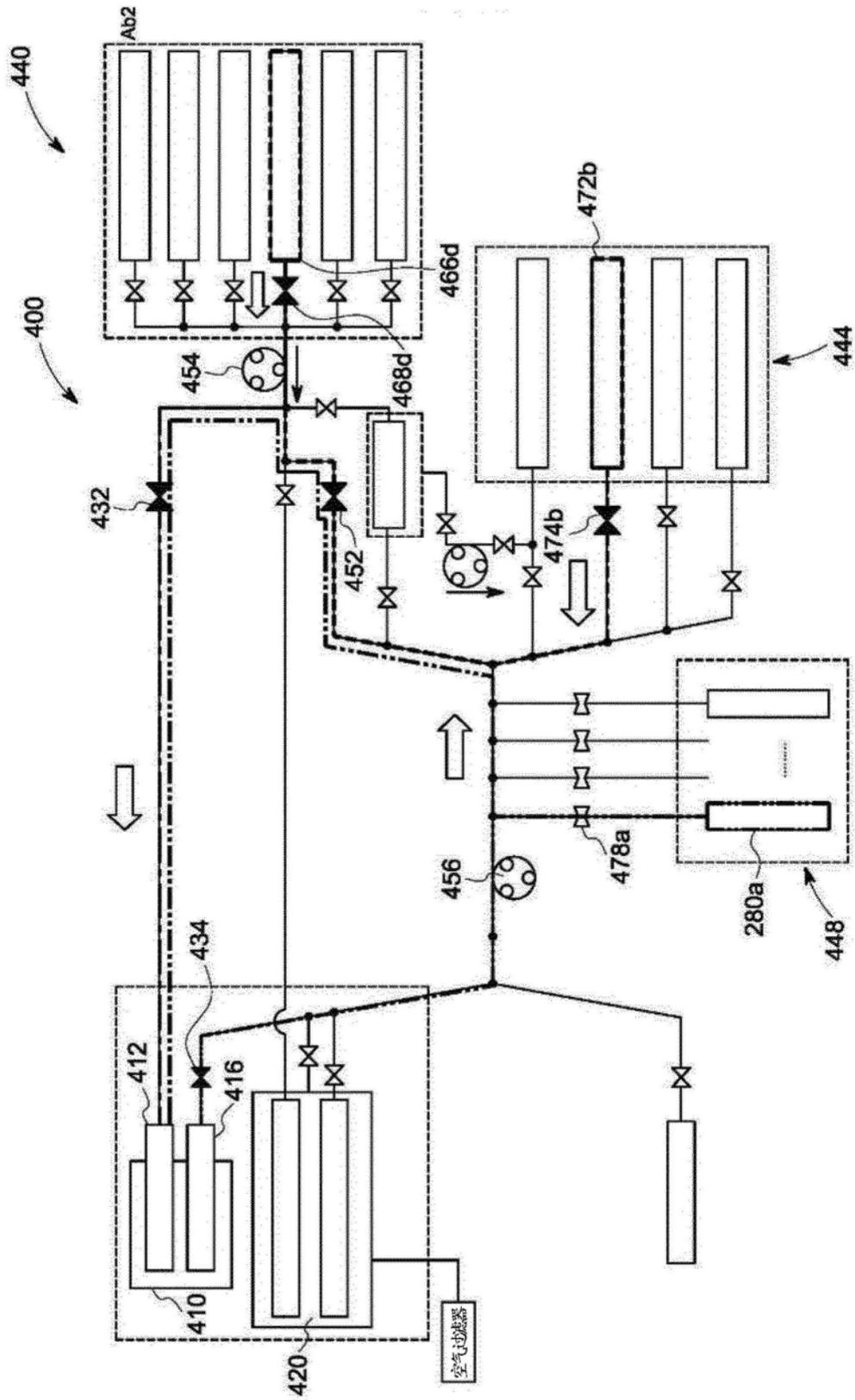


图58

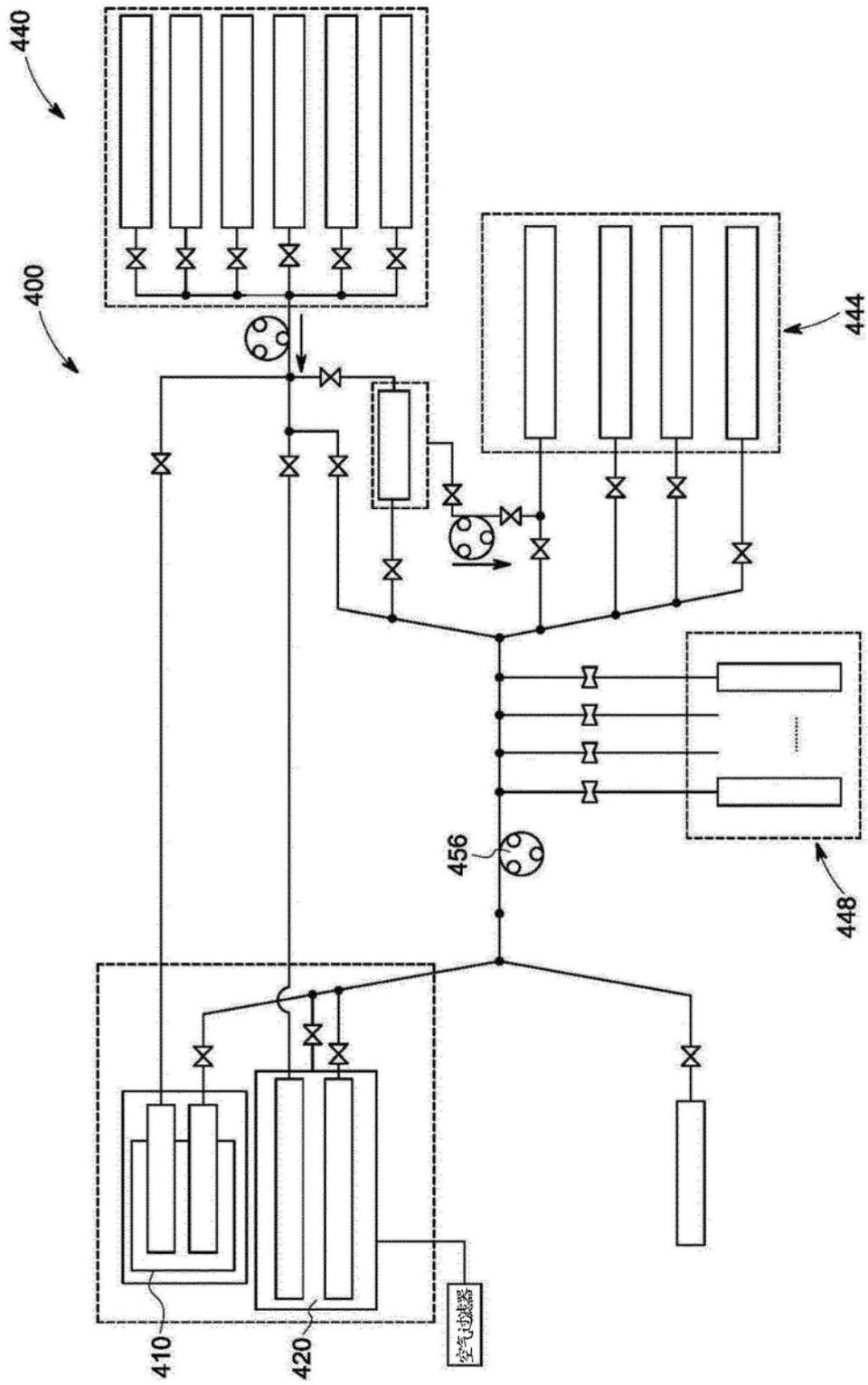


图59

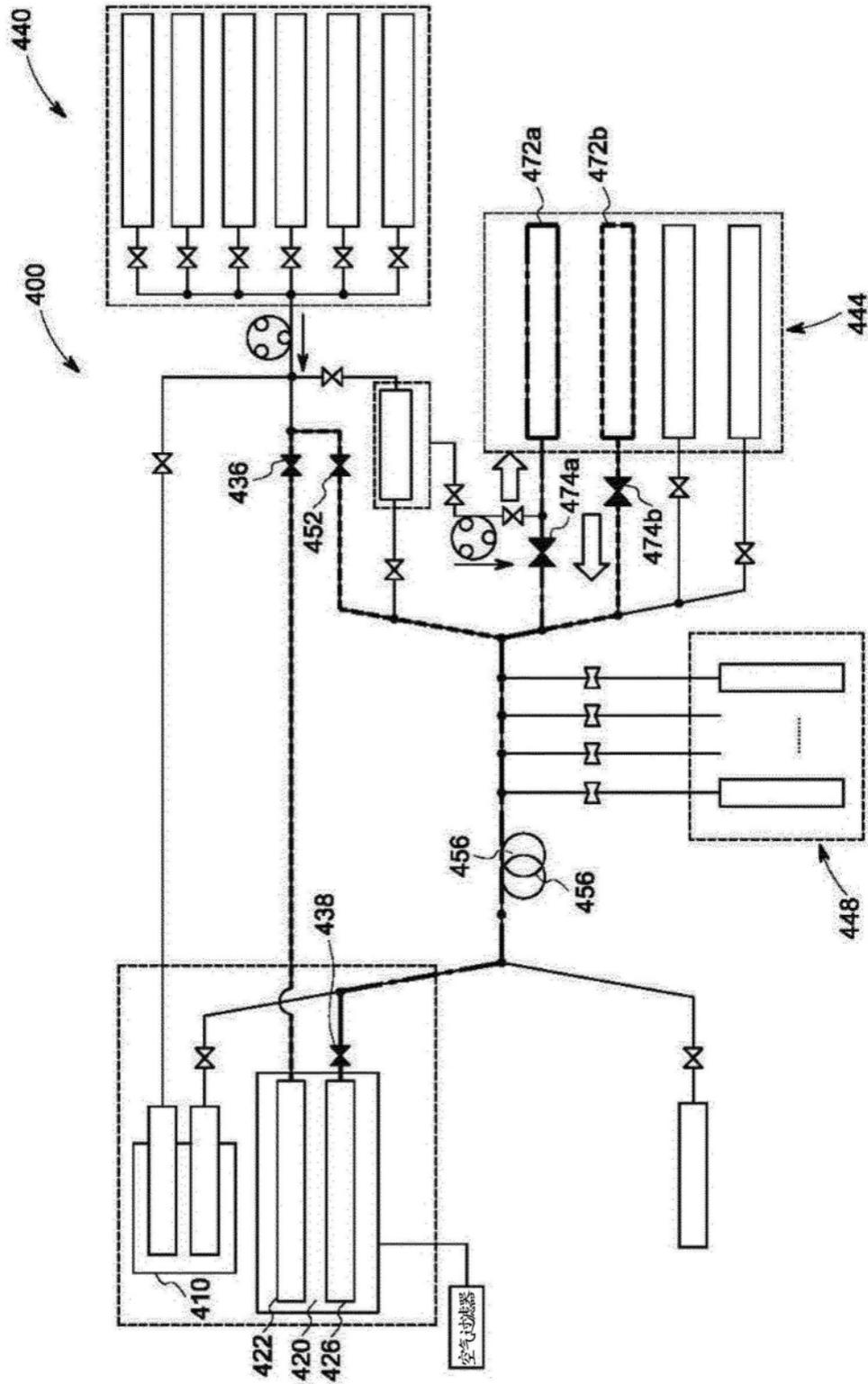


图60

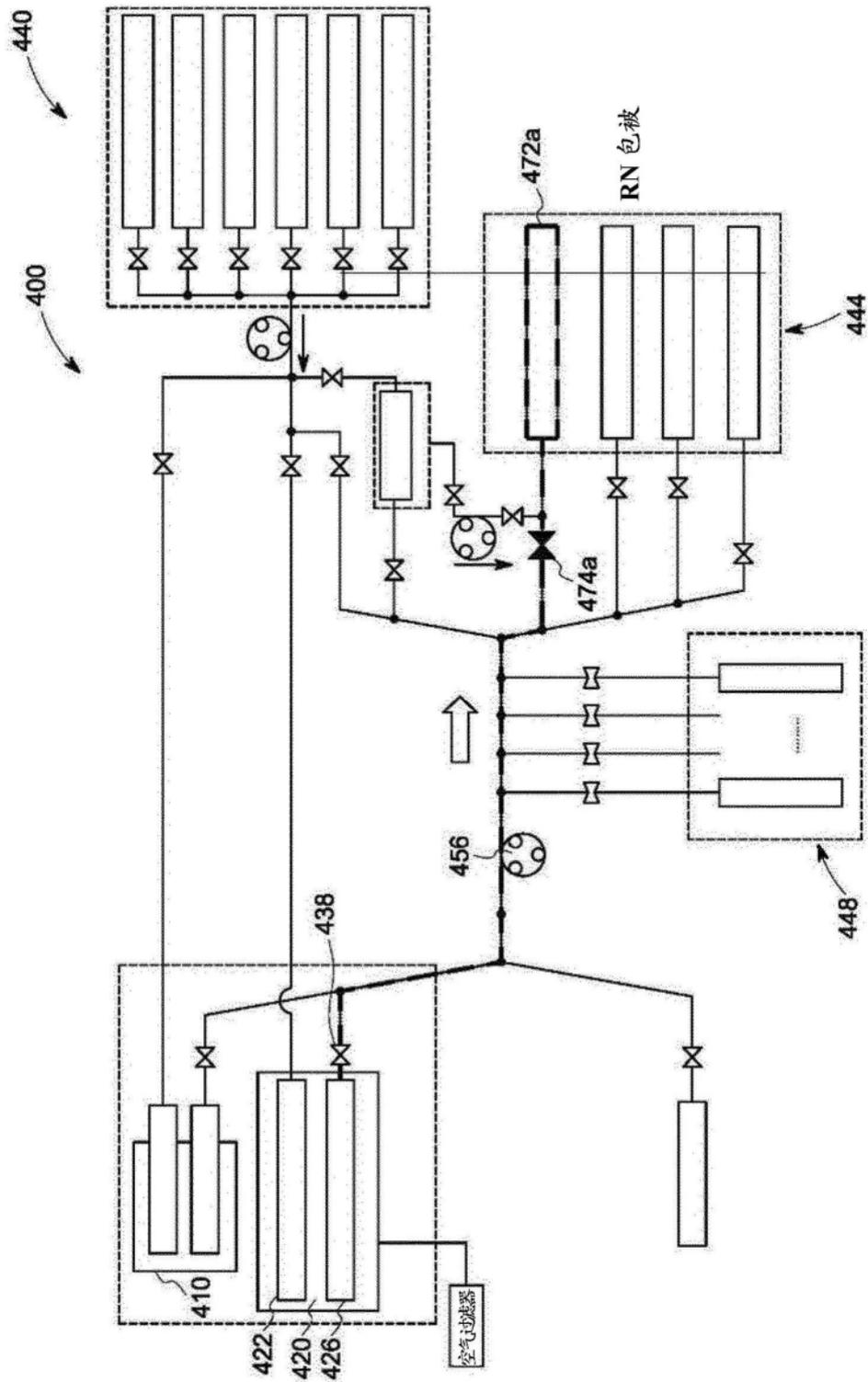


图62

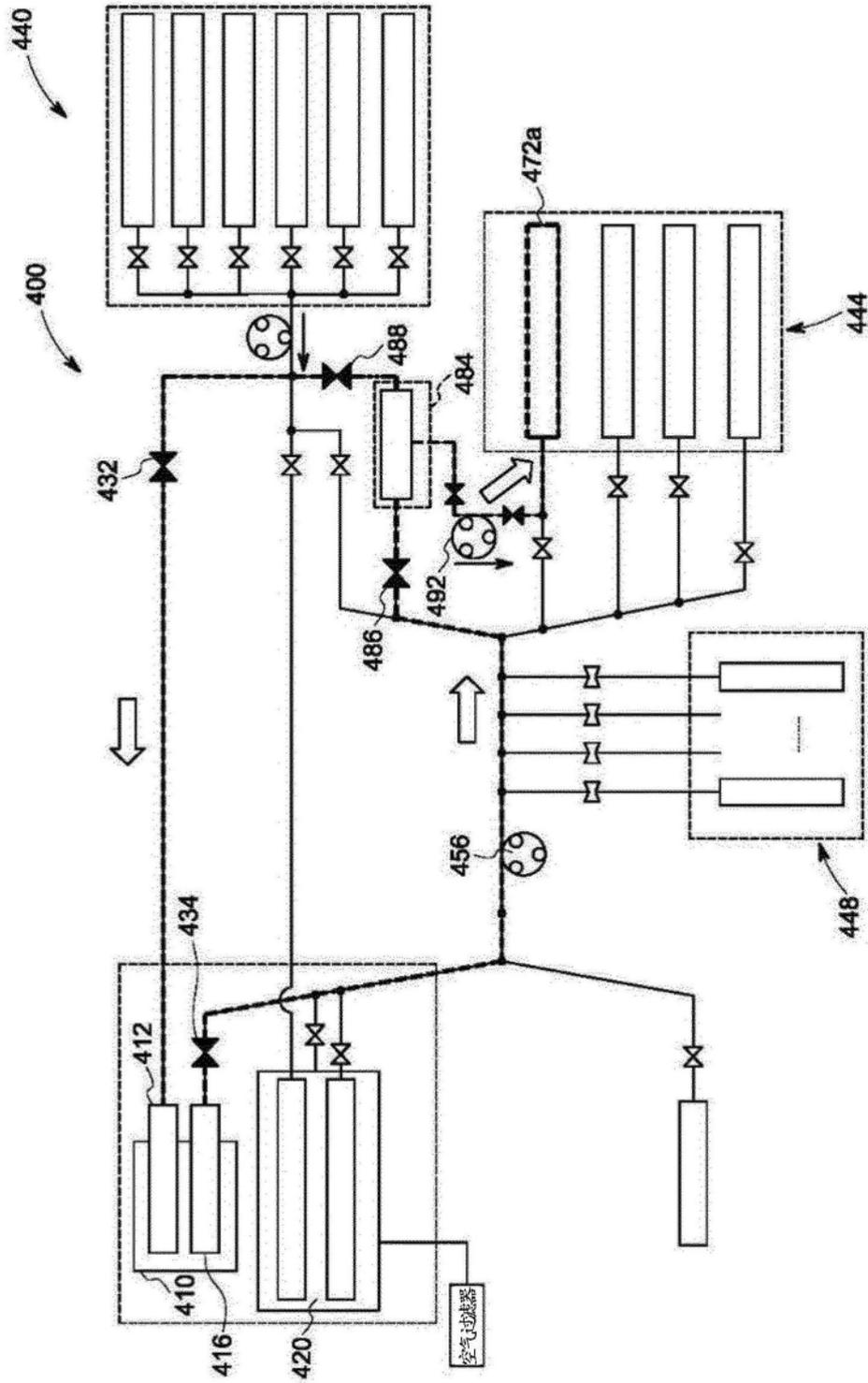


图64

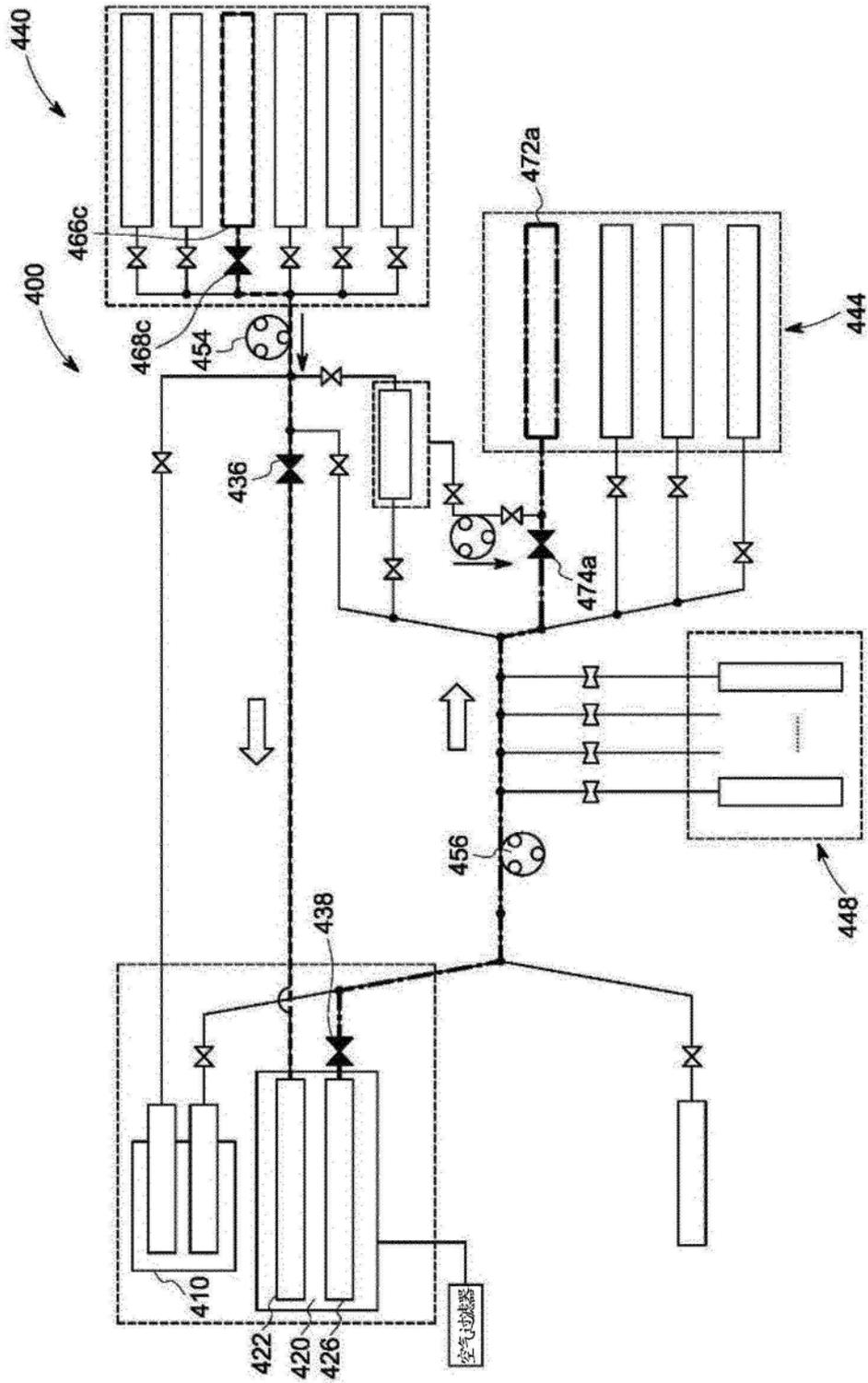


图67

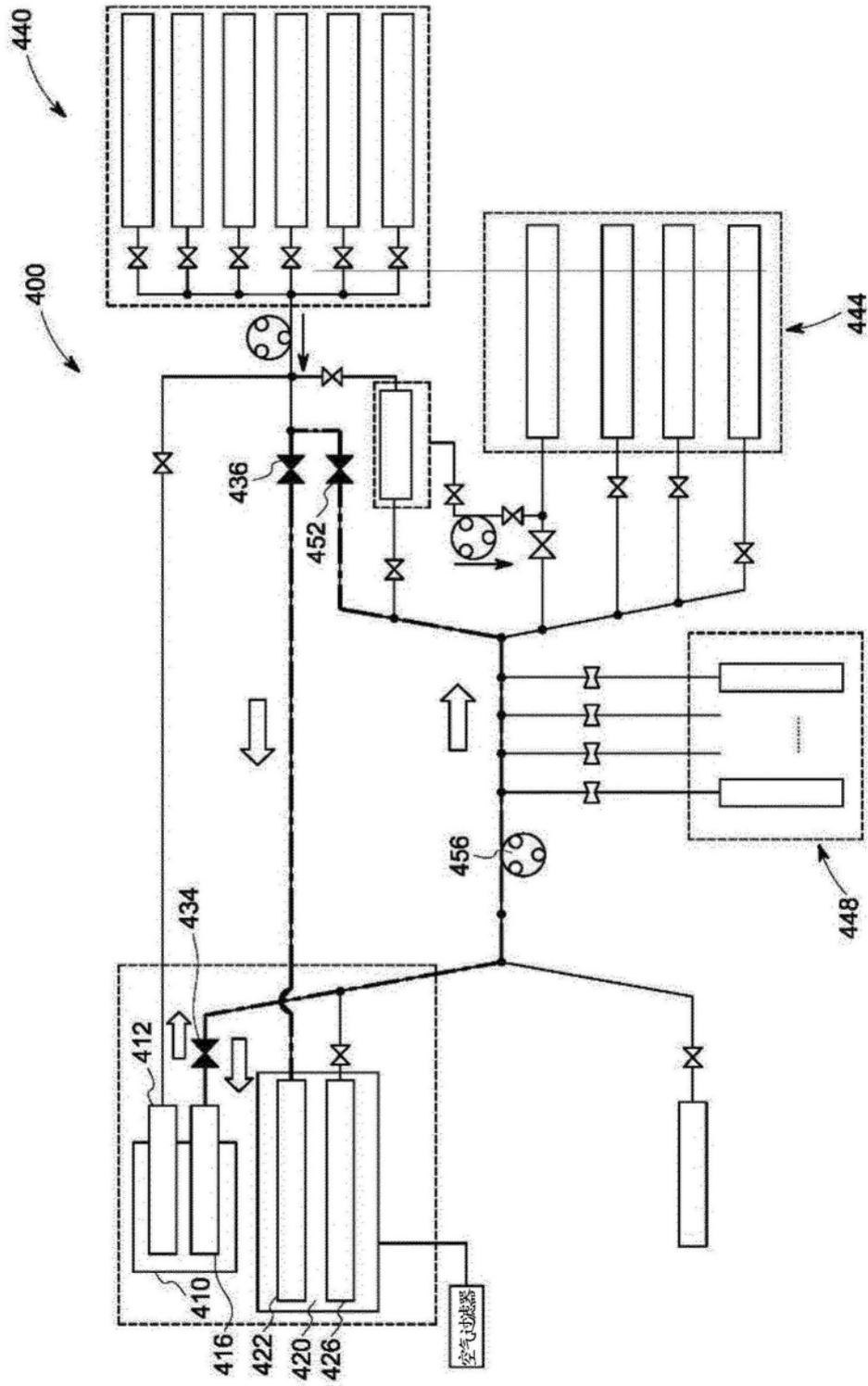


图68

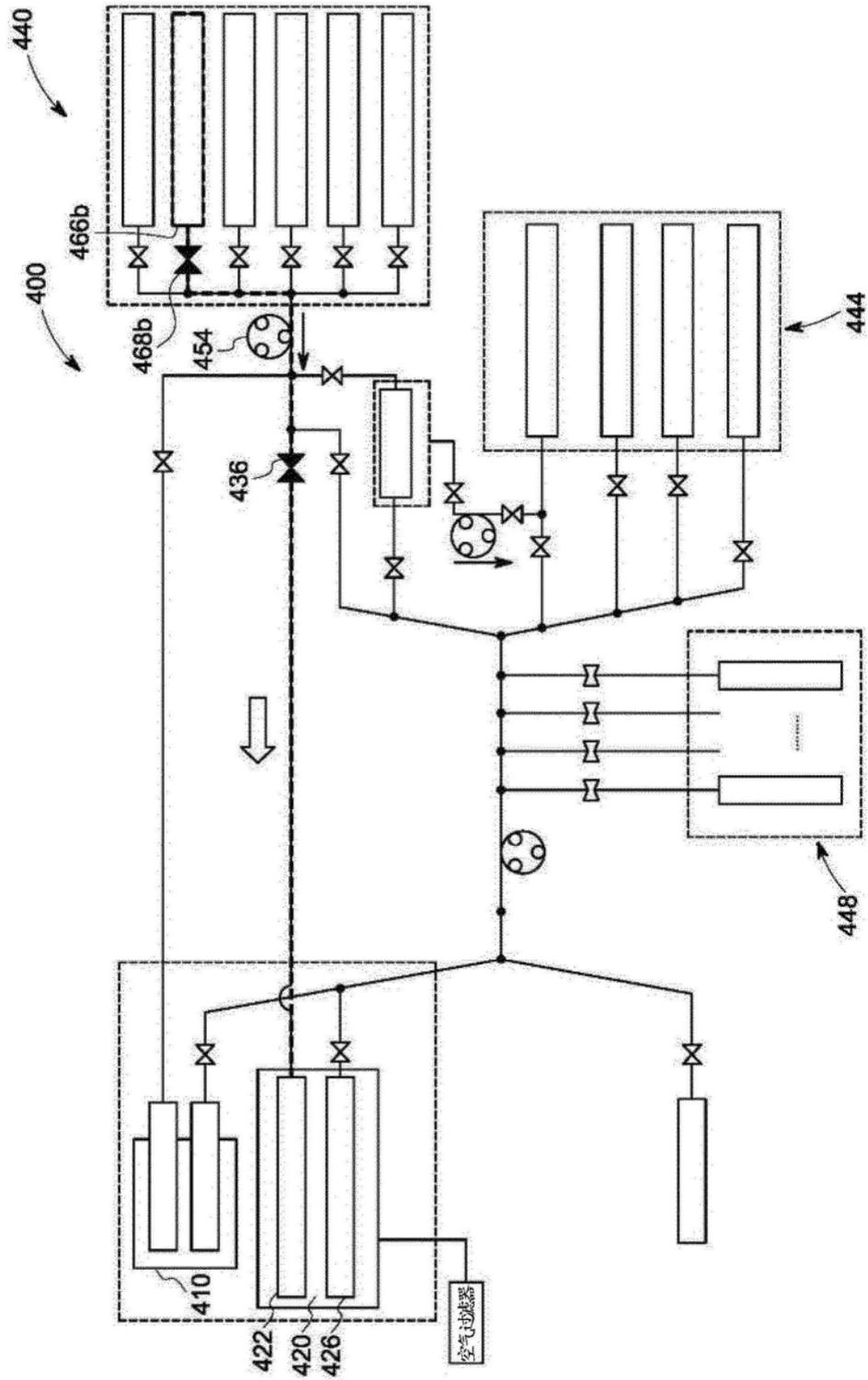


图69

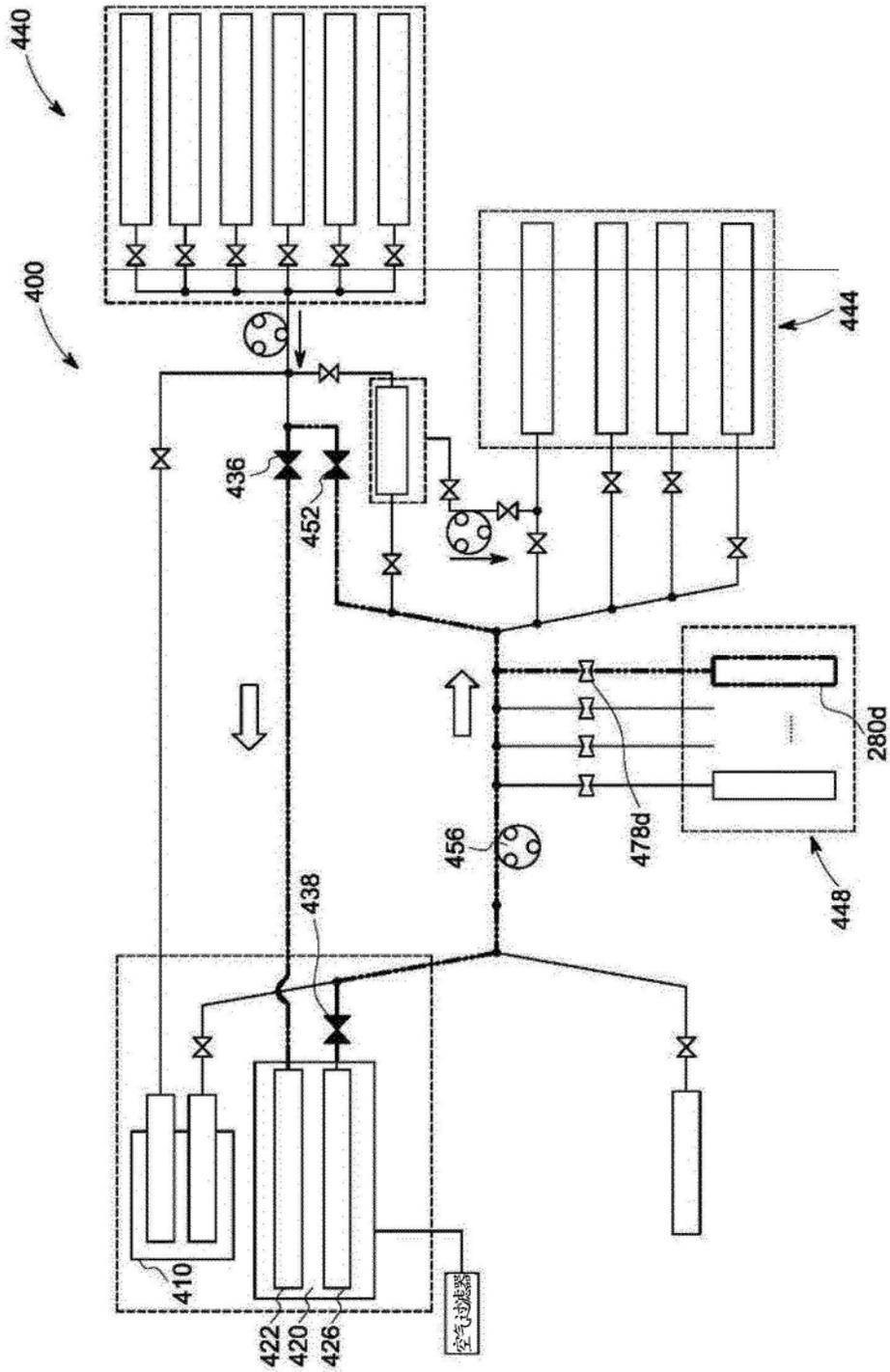


图70

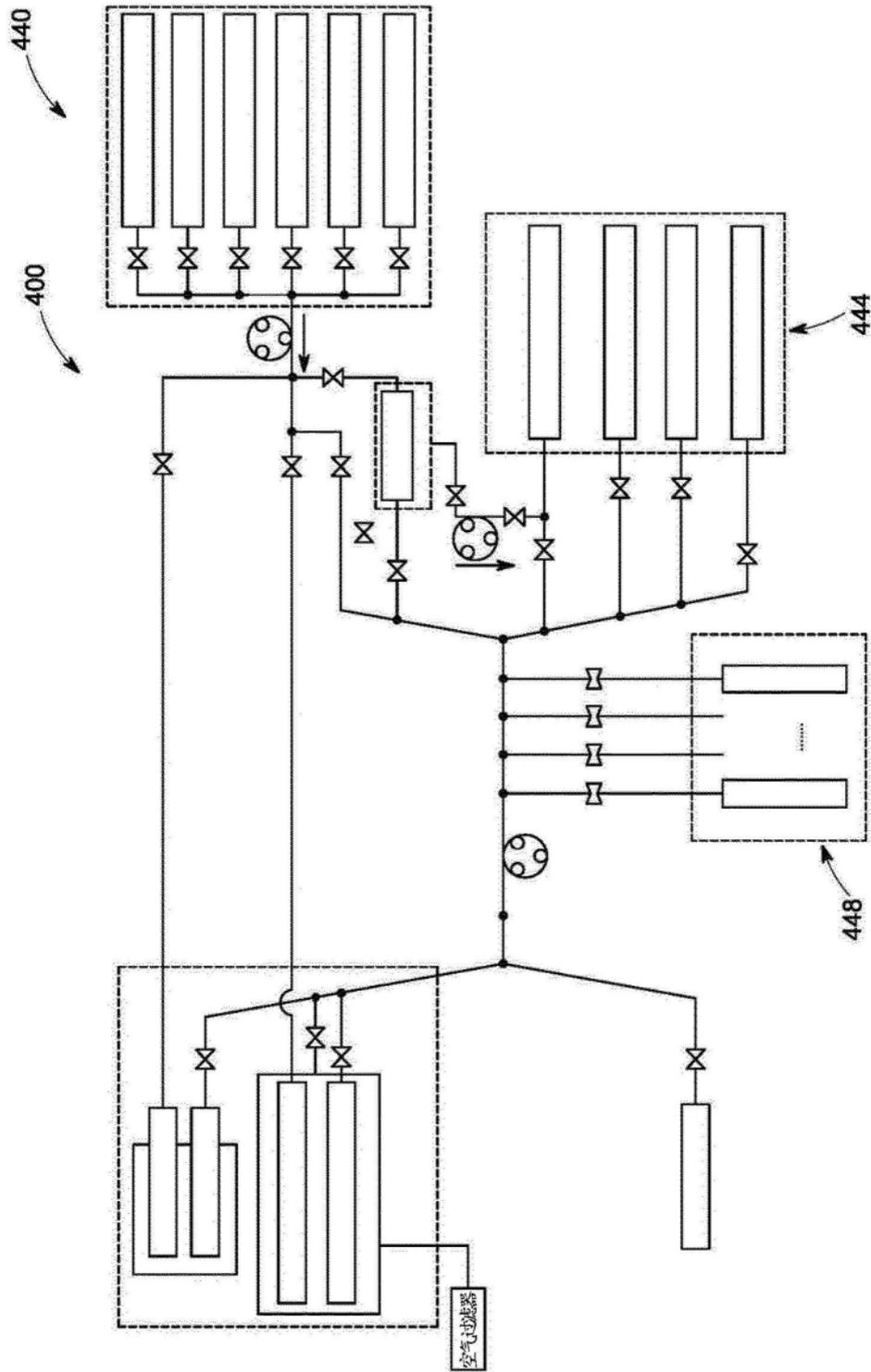


图71

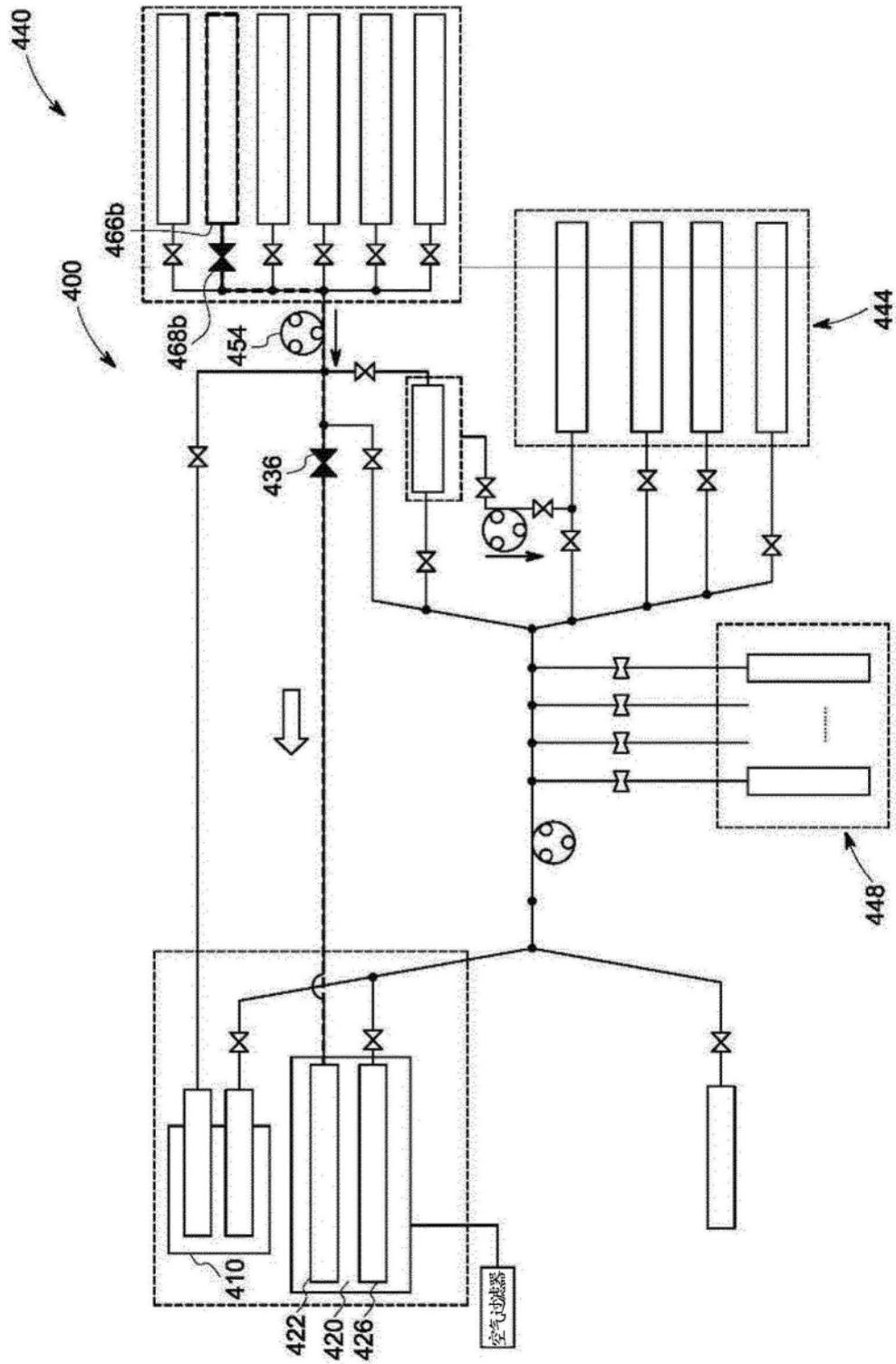


图72

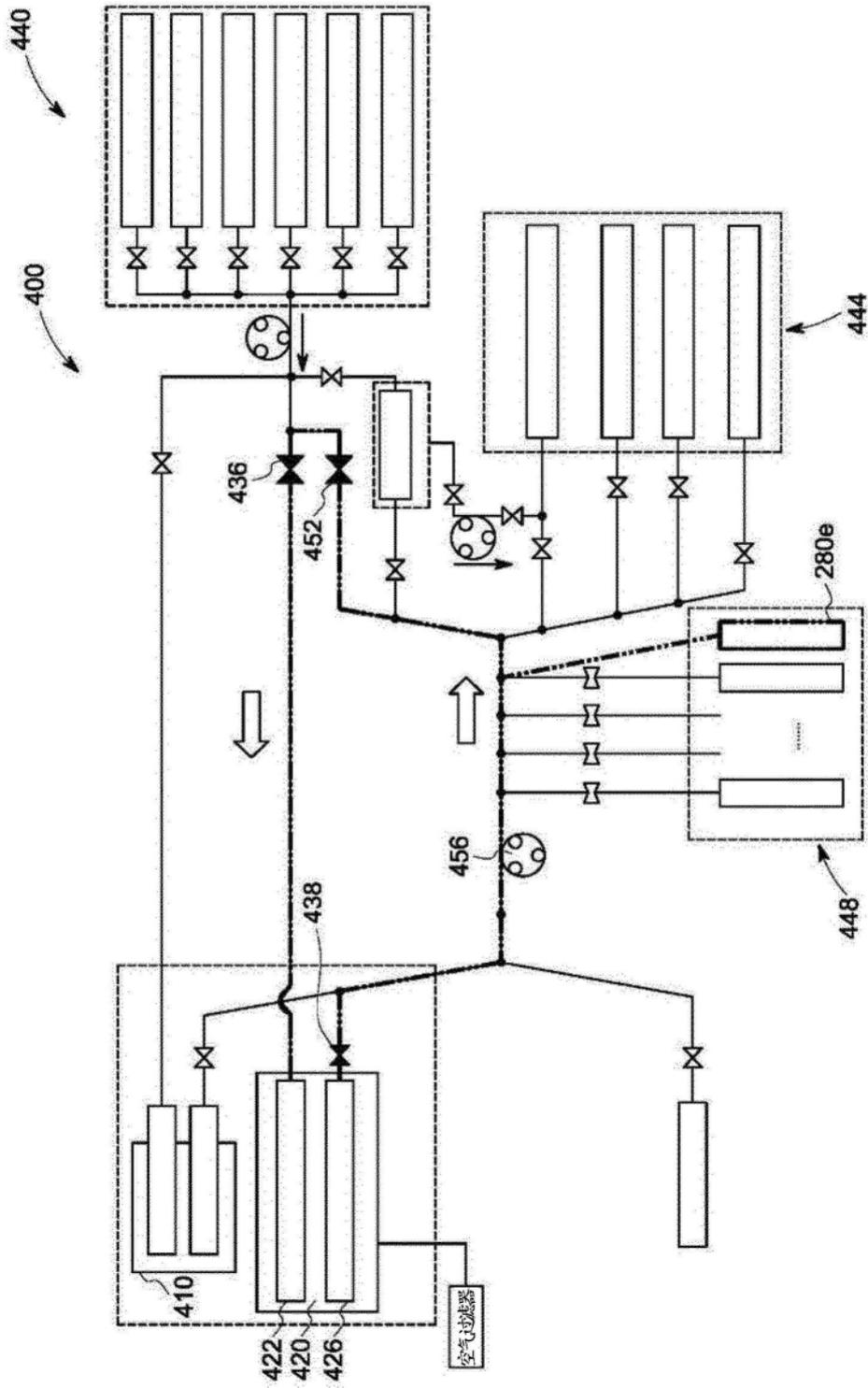


图73

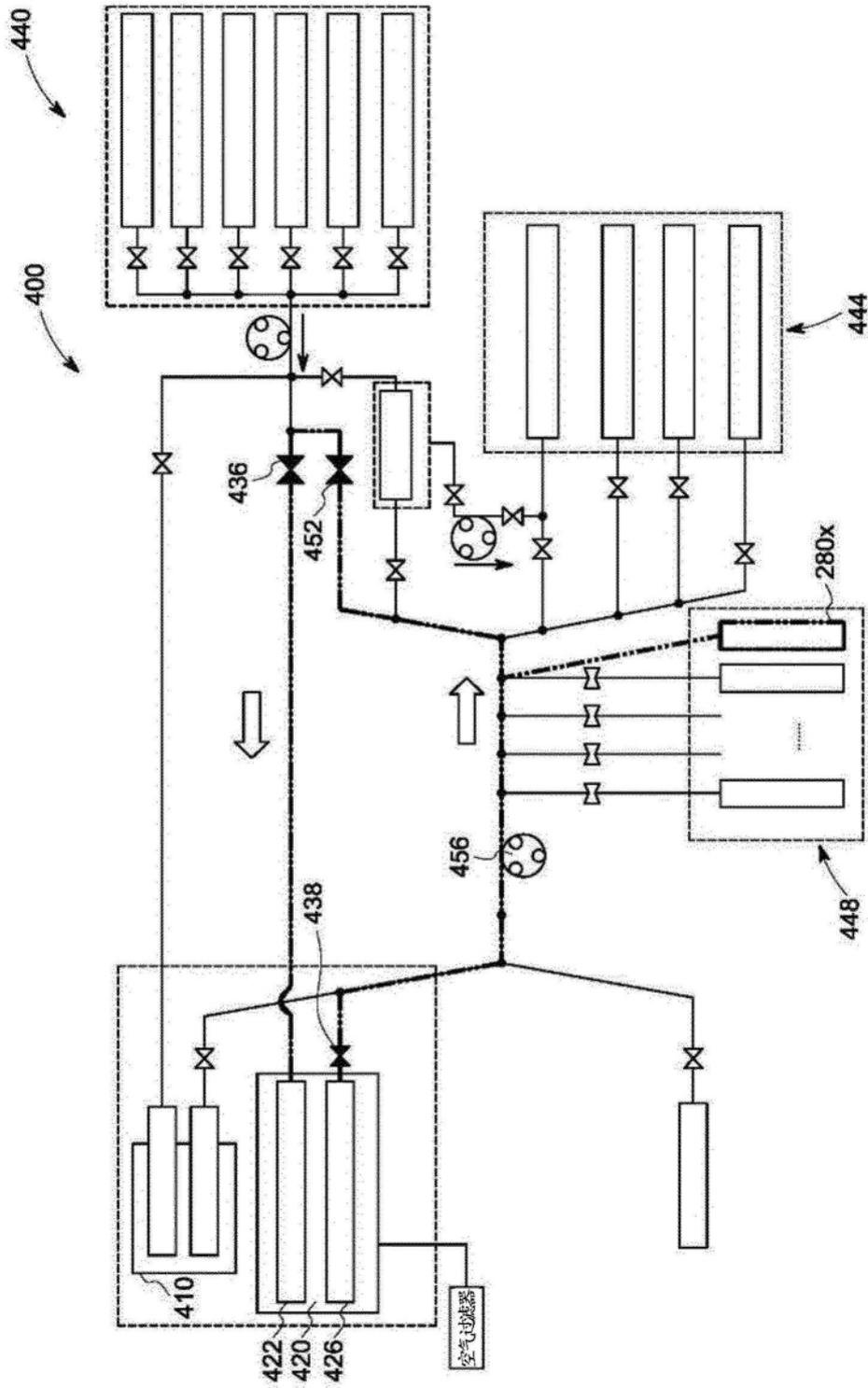


图75

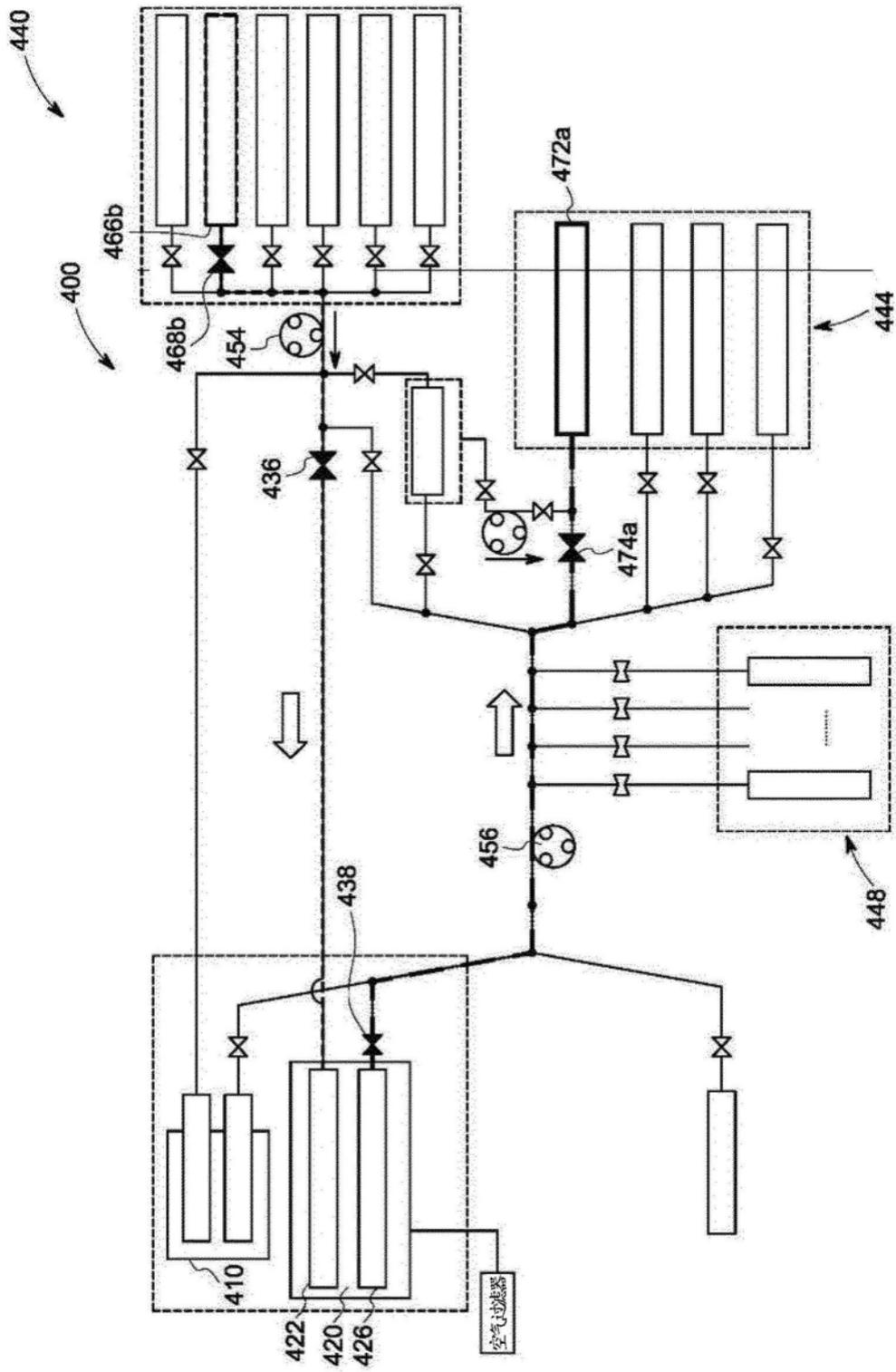


图76

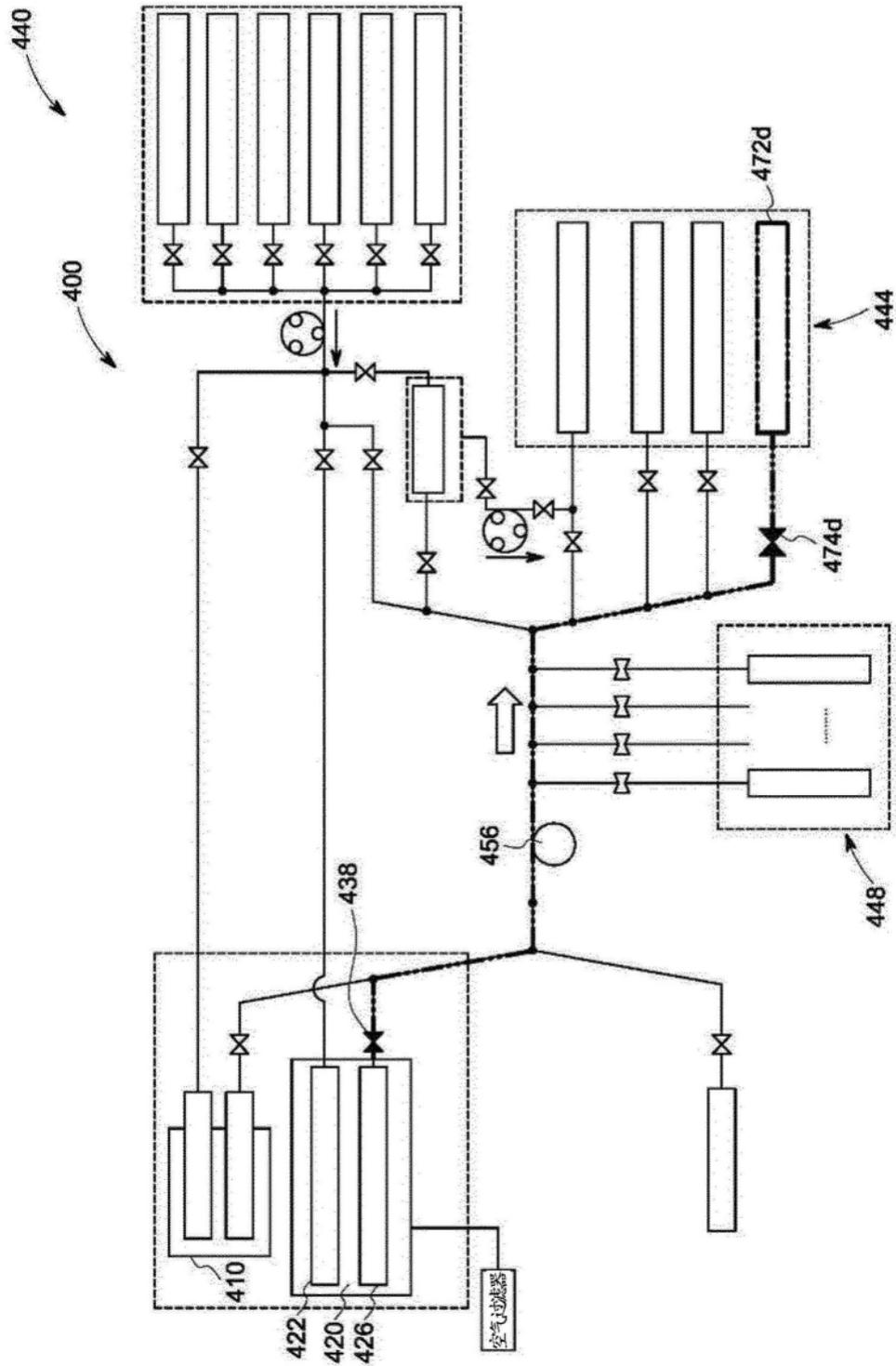


图77

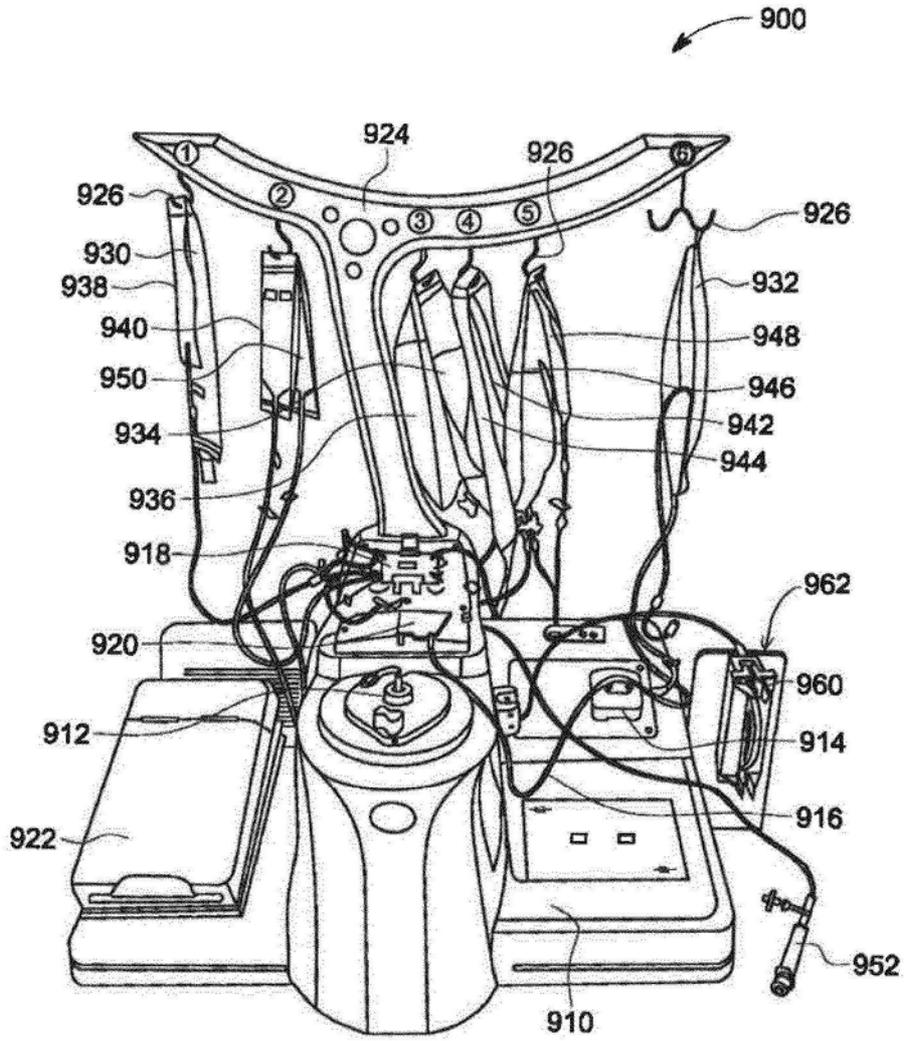


图78

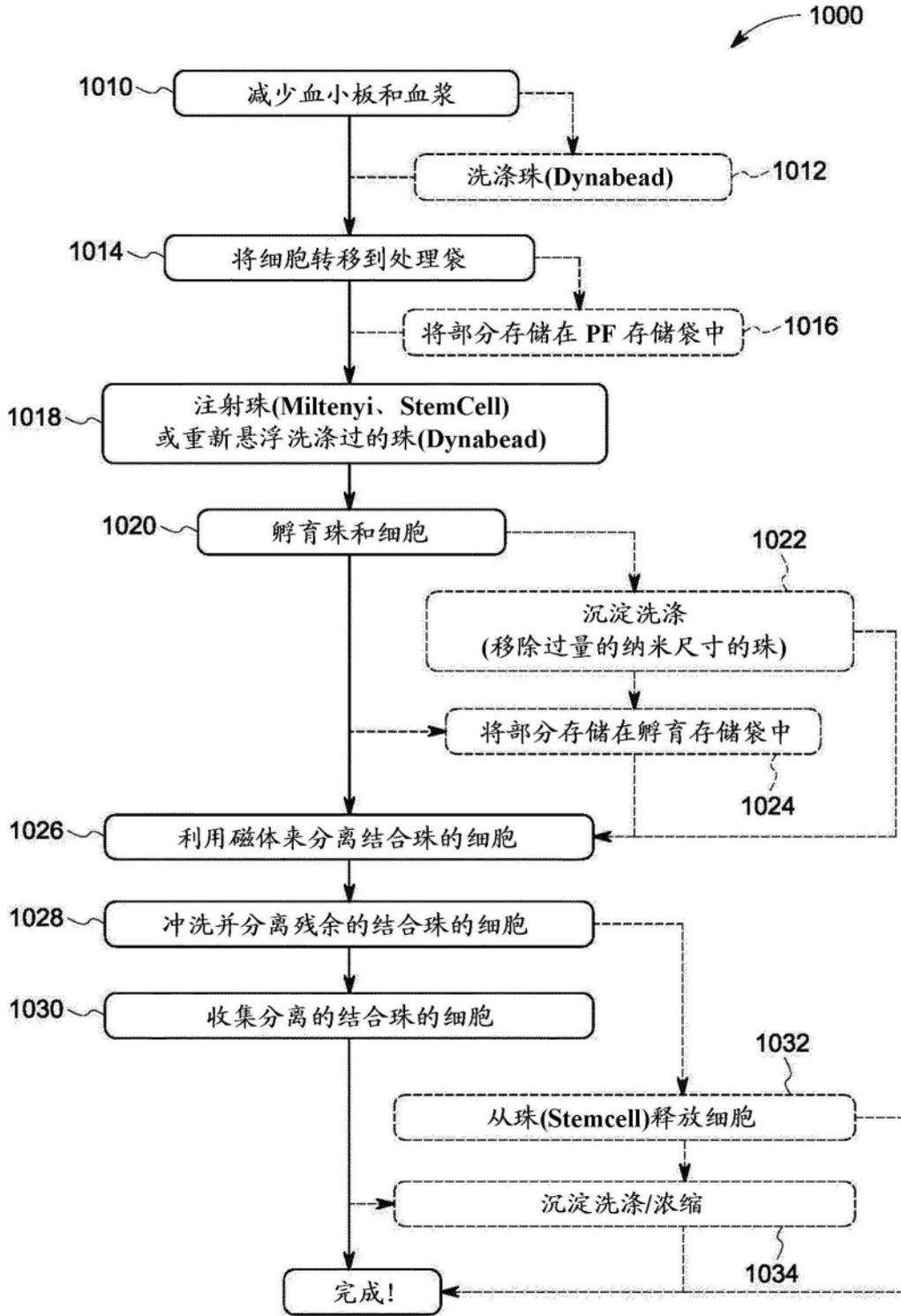


图79

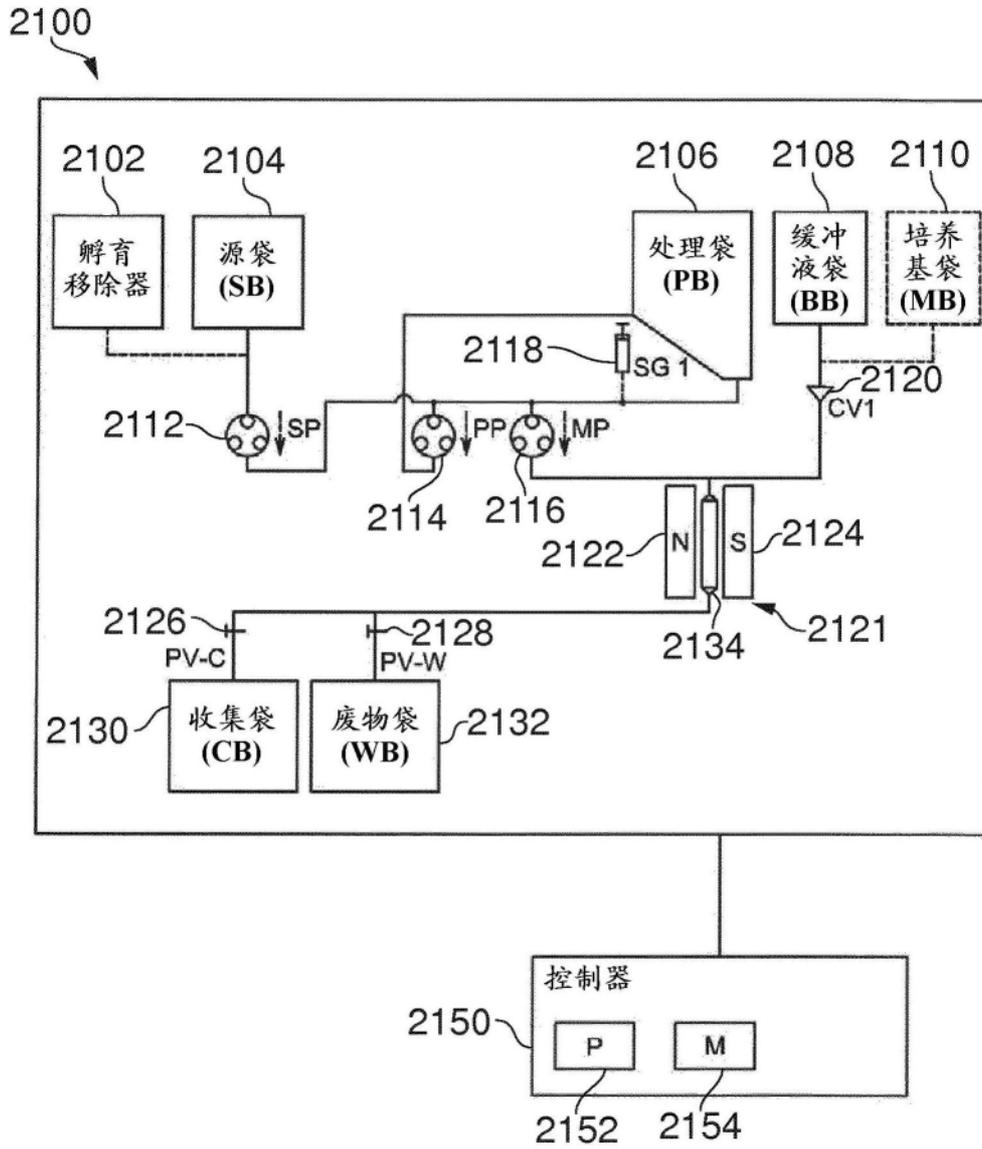


图81

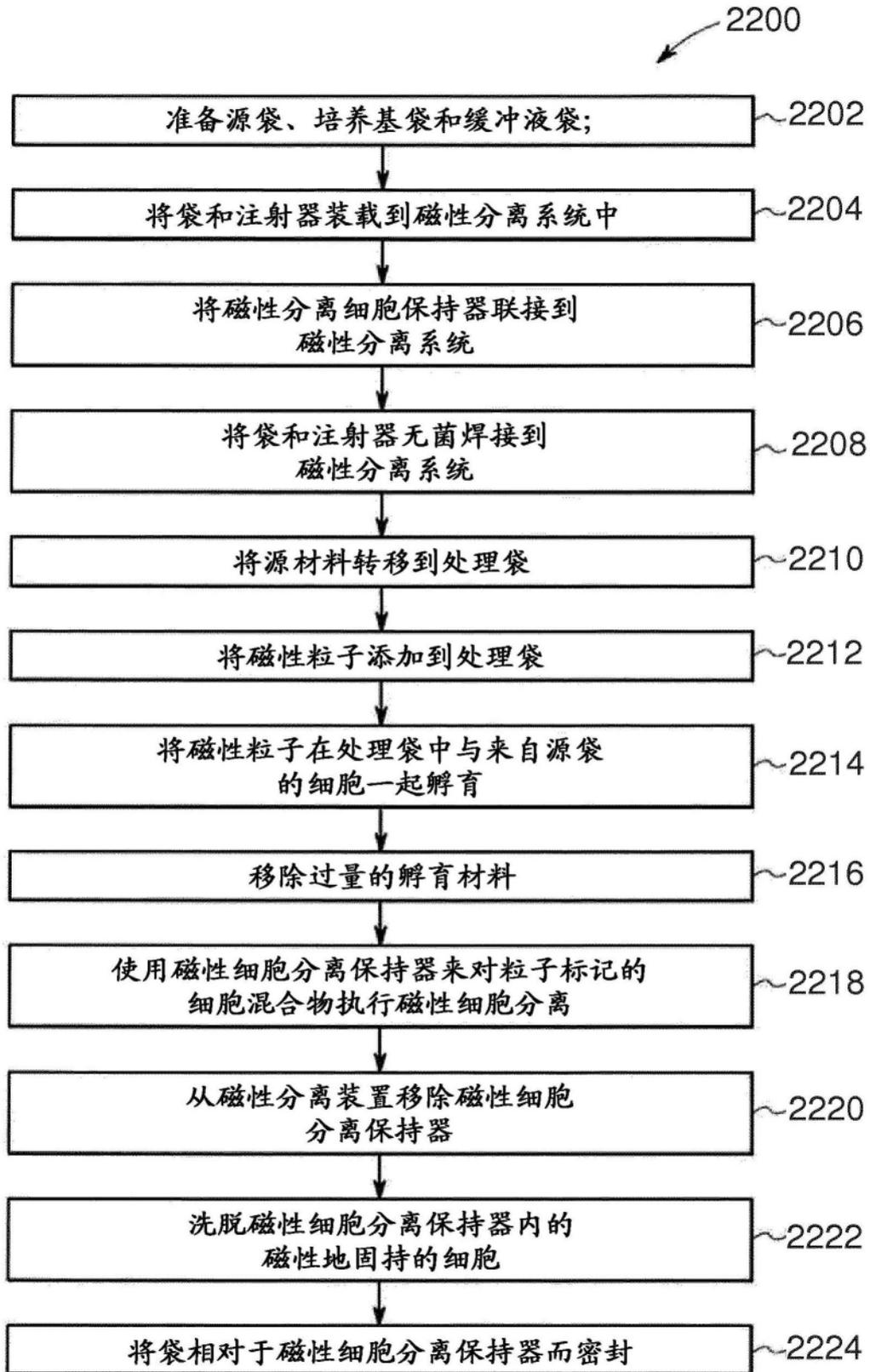


图82

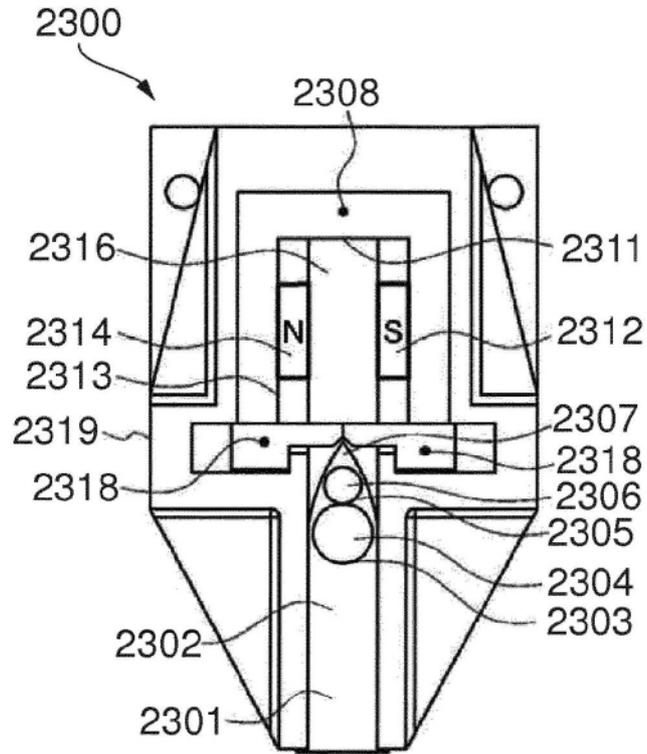


图83A

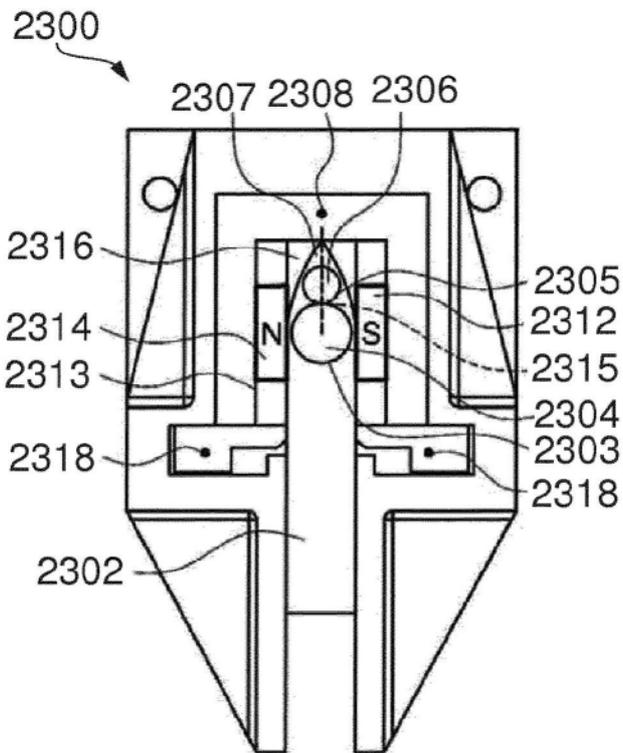


图83B

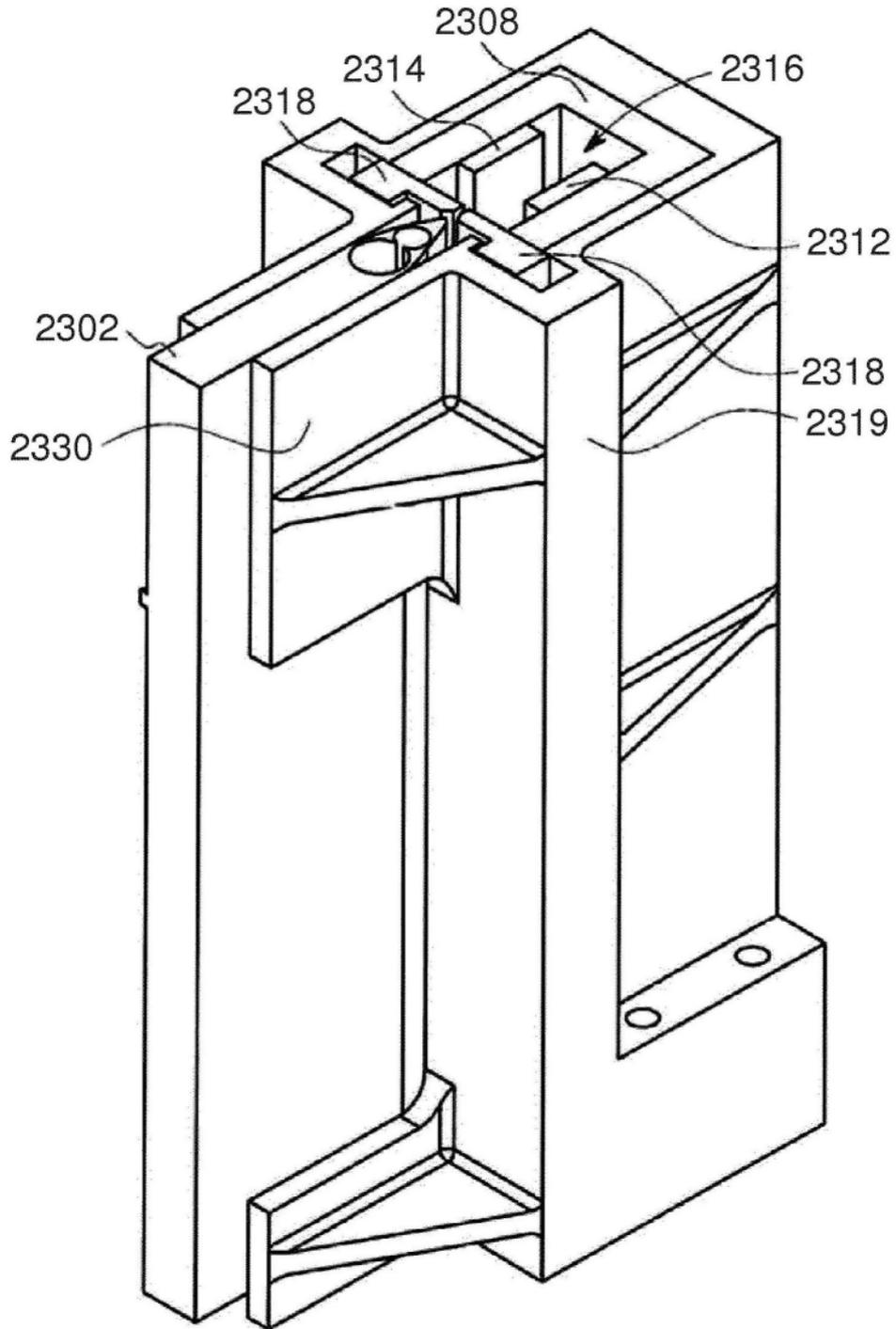


图84A

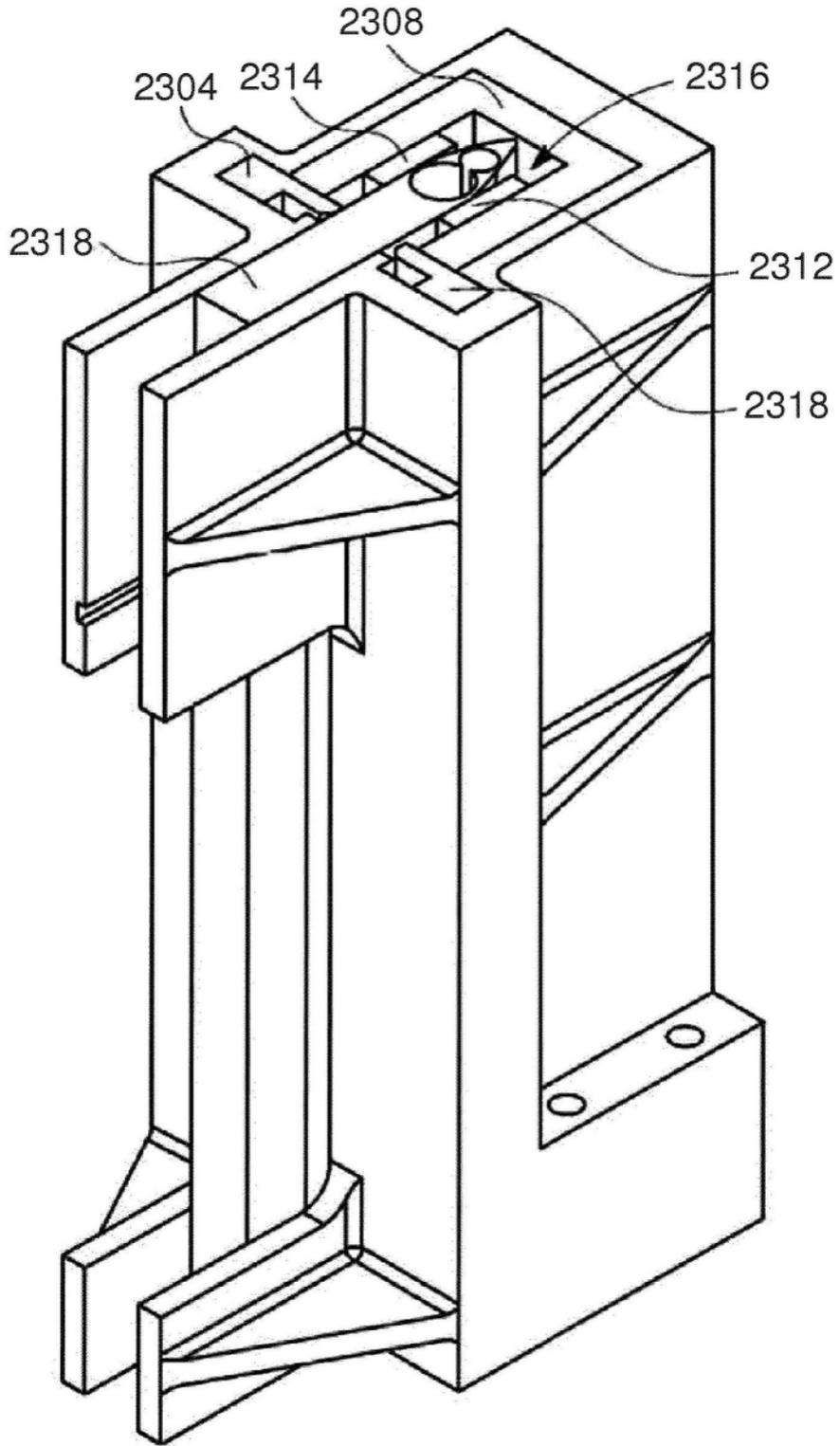


图84B

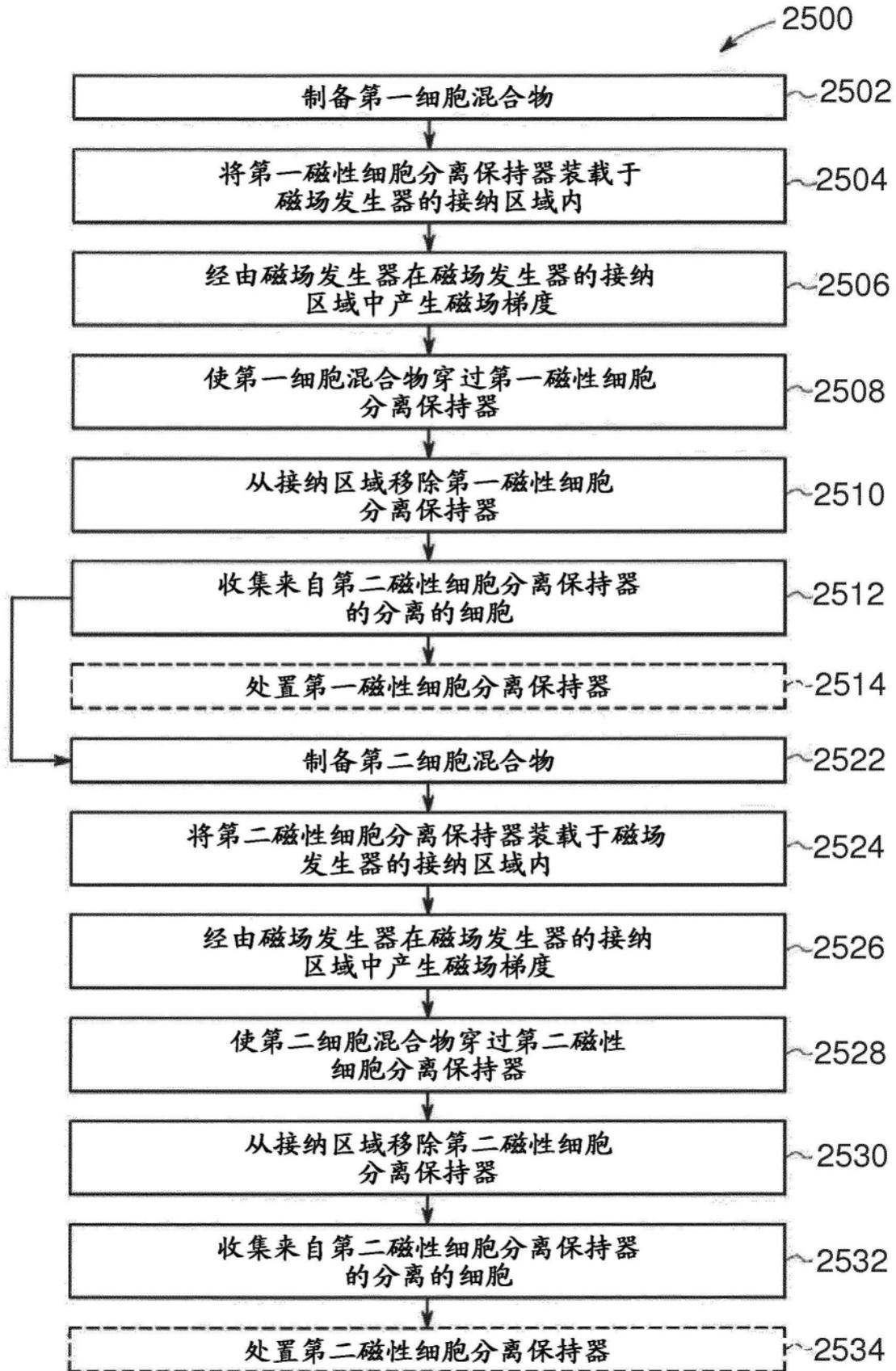


图85

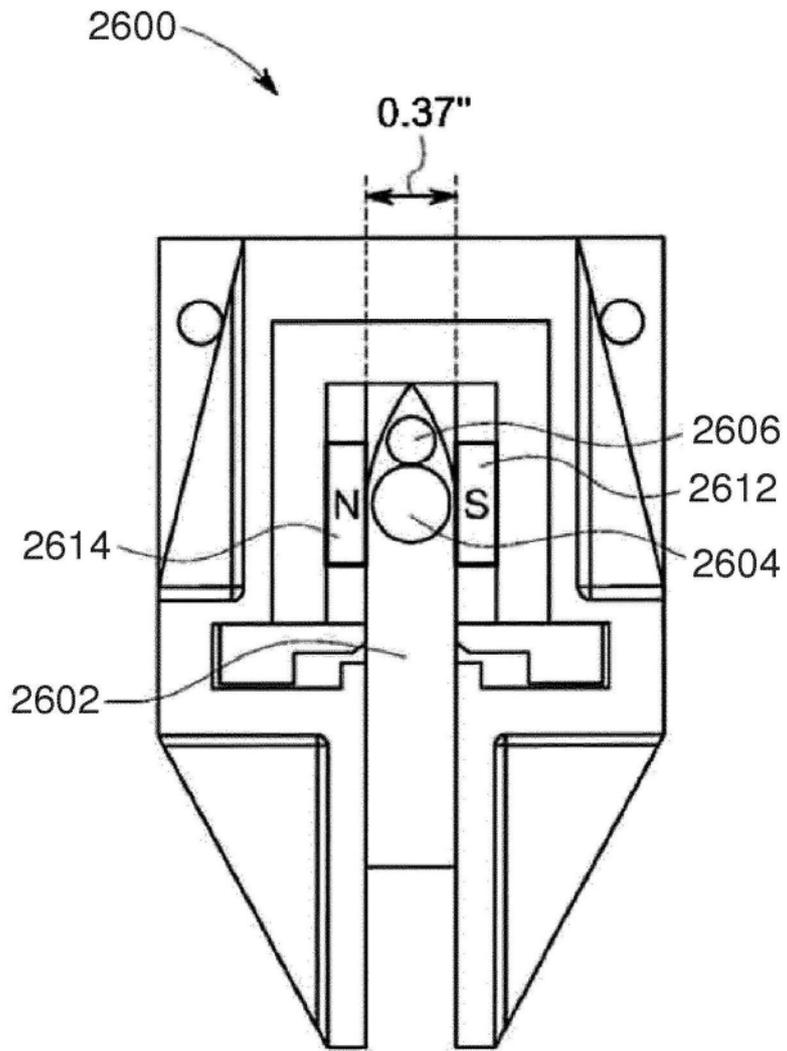


图86

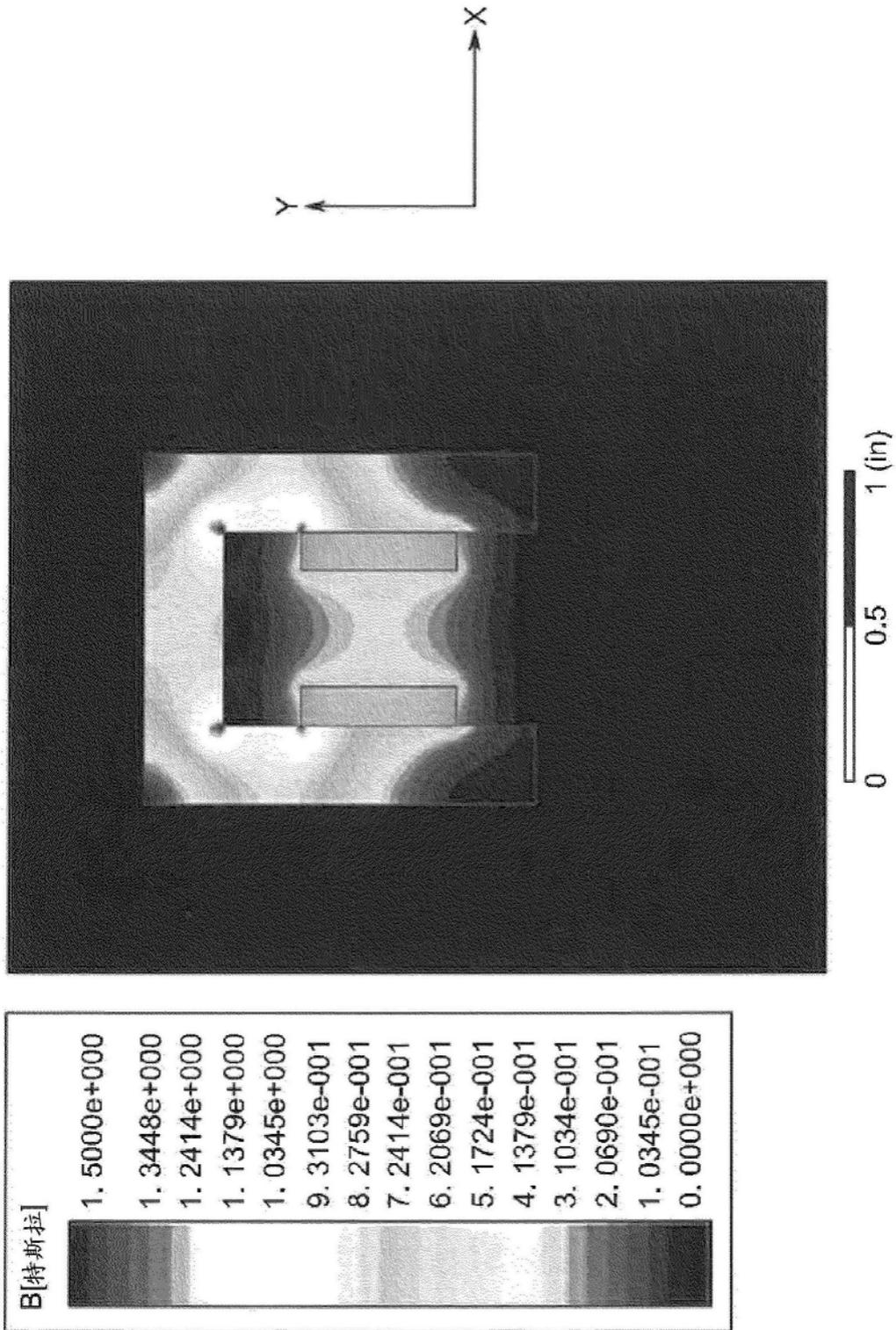


图87