

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 227**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2014 PCT/JP2014/006252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2014 E 14871598 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3085767**

54 Título: **Recipiente de cultivo y método para el cultivo de linfocitos**

30 Prioridad:

18.12.2013 JP 2013261181
25.12.2013 JP 2013267082

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2019

73 Titular/es:

TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD. (100.0%)
18-1 Higashi-Gotanda 2-chome
Shinagawa-kuTokyo 141-8627, JP

72 Inventor/es:

TOTANI, TAKAHIKO;
TANAKA, SATOSHI;
AIHARA, TAKESHI y
ISHIZAKI, YOICHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 703 227 T3

Aviso:En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Recipiente de cultivo y método para el cultivo de linfocitos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una tecnología de cultivo celular. En particular, la presente invención se refiere a un recipiente de cultivo, a un método para el cultivo de linfocitos, a un método de producción de un recipiente de cultivo en el que se inmovilizan proteínas y a un aparato de inmovilización.

10

Técnica antecedente

En los últimos años, en los campos de la producción de productos farmacéuticos, la terapia génica, la terapia regenerativa, la inmunoterapia o similar, ha habido una demanda para cultivar una gran cantidad de células, tejidos, microorganismos, en un ambiente artificial de forma eficaz.

15

En tales circunstancias, se realizó el cultivo de una gran cantidad de células en un sistema cerrado mediante el sellado de células y de un líquido de cultivo en una bolsa de cultivo formada por una película permeable a los gases.

20

Entretanto, para proliferar linfocitos, en primer lugar se precisa activar los linfocitos. Por lo tanto, los linfocitos se activaron sobre un elemento basal en el que se habían inmovilizado anticuerpos anti CD3 y, después, los linfocitos activados se sellaron en una bolsa de cultivo y se proliferaron.

25

En este momento, como se muestra en la Fig. 8, en general, para la activación de linfocitos se usó un matraz en el que los anticuerpos anti CD3 están inmovilizados en la superficie inferior del mismo y, después de la activación de los linfocitos, los linfocitos activados se transfirieron a una bolsa de cultivo para realizar el cultivo de los linfocitos. El motivo de esto es el siguiente: los linfocitos tienen la propiedad que, aunque para proliferar precisan ser irritados por anticuerpos anti CD3, apenas proliferan cuando se los irrita de forma continua mediante los anticuerpos anti CD3. Por lo tanto, después de la activación de linfocitos, es preciso cultivar los linfocitos activados en un recipiente en donde no haya anticuerpos anti CD3 inmovilizados.

30

Como recipiente de cultivo para activar linfocitos, se puede proporcionar un recipiente de cultivo celular cerrado (divulgado en el Documento de Patente 1) o similar. En este recipiente de cultivo celular cerrado, se inmovilizan anticuerpos anti CD3 en toda la superficie del recipiente (párrafos 0048 y 0057), por lo que los linfocitos se pueden activar de forma eficaz.

35

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de los linfocitos se realiza generalmente mediante anticuerpos anti CD3. Es decir, los linfocitos se activan en un recipiente en el que los anticuerpos anti CD3 están inmovilizados y, después de eso, los linfocitos activados se sellan en una bolsa de cultivo en la que no hay anticuerpos anti CD3 inmovilizados, por lo que los linfocitos proliferan.

40

Por lo tanto, antes de la activación de los linfocitos, se precisó inmovilizar (recubrir) anticuerpos anti CD3 en un recipiente utilizado para la activación de linfocitos.

45

Como método convencional de inmovilización, en general, después de sumergir la superficie inferior de un matraz en una solución que contiene anticuerpos anti CD3 y dejar reposar el matraz, la solución se retira, mediante lo cual se inmovilizan los anticuerpos anti CD3.

50

Específicamente, por ejemplo, el Documento de Patente 2 divulga la preparación de un matraz en el que se inmovilizan anticuerpos, en el que se sumergen anticuerpos anti CD3 de forma homogénea en la superficie inferior de un matraz, se almacena en un refrigerador durante una noche y, después, se retiran los anticuerpos anti CD3, para preparar de este modo un matraz en el que los anticuerpos están inmovilizados (párrafos 0035 a 0036, y Fig. 1).

55

Además, el Documento de Patente 1 establece que se sella una solución obtenida disolviendo anticuerpos anti CD3 en una parte de alojamiento de un recipiente, y el recipiente se deja reposar durante un período de tiempo prescrito, mediante lo cual se inmovilizan anticuerpos anti CD3 sobre la superficie de la película del recipiente (párrafo 0015 y Fig. 1).

60

El Documento de Patente 3 divulga un recipiente de cultivo que tiene las mismas, o más excelentes, propiedades de cultivo que una placa de Petri o un matraz hecho de una resina de estireno, que es altamente seguro y que es adecuado para su uso en el cultivo con fines médicos. Además se divulga un método de introducción de genes y un método de cultivo celular utilizando el recipiente. En la superficie del cuerpo del recipiente para alojar células en su interior, al menos una parte que hace contacto con las células está formada por una resina de cicloolefina.

65

JP-A-2007-175028
Documento de Patente 2
Patente de Japón N.º 4399710
Documento de Patente 3
5 WO 2008/023771 A1

Sumario de la invención

Cuestión a resolver mediante la invención

10 Sin embargo, si los linfocitos se cultivan utilizando solo el recipiente de cultivo celular cerrado divulgado en el Documento de Patente 1, dado que se sigue irritando a los linfocitos después de la activación de los mismos mediante los anticuerpos anti CD3, los linfocitos se irritan en exceso y, como resultado, se suprime su proliferación. Por consiguiente, para cultivar una gran cantidad de linfocitos de forma eficaz, es conveniente usar este recipiente
15 de cultivo celular cerrado como un recipiente destinado a la activación y realizar la proliferación de las células en un recipiente de cultivo distinto.

Por lo tanto, en esta tecnología convencional, si se cultiva de forma eficaz una gran cantidad de linfocitos, surge el problema que plantea la problemática de la transferencia de células activadas o el riesgo de contaminación.

20 Los inventores de la presente invención realizaron estudios intensivos y han desarrollado un recipiente de cultivo para el cultivo de linfocitos, donde el recipiente de cultivo está formado por una película permeable a los gases, se inmovilizan anticuerpos anti CD3 solo sobre una de las superficies internas del recipiente enfrentadas entre sí, proporcionando de este modo una superficie inmovilizadora y una superficie no inmovilizadora. El recipiente de cultivo se dispone de forma que la superficie de inmovilización se convierte en una superficie inferior, para activar de
25 este modo los linfocitos, y después de eso, el recipiente de cultivo se dispone de forma que la superficie de no inmovilización se convierte en una superficie inferior, de modo que proliferen los linfocitos, mediante lo cual los inventores permitieron satisfactoriamente la activación y la proliferación de linfocitos de forma eficaz y simultánea en un único recipiente.

30 Es decir, la presente invención está dirigida a proporcionar un recipiente de cultivo que tenga la capacidad de activar y proliferar linfocitos de forma eficaz en un único recipiente de cultivo, así como un método para el cultivo de linfocitos.

35 Además, los métodos de inmovilización convencionales descritos en los Documentos de Patente 1 y 2 tienen el problema de que se precisa un tiempo de reposo largo para permitir que los anticuerpos estén suficientemente inmovilizados.

40 Además, los métodos convencionales tienen el problema de que, dado que la mayoría de los anticuerpos permanecen en solución sin adsorberse al interior del recipiente, es preciso usar los anticuerpos en una cantidad mayor que la cantidad inmovilizada. Por ejemplo, como se ha menciona más adelante, cuando un recipiente en el que los anticuerpos se sellan mediante un método convencional se dejó reposar durante 1 hora, se presentó el problema de que solo el 10 % de los anticuerpos se adsorbieron al interior del recipiente y el 90 % restante de los anticuerpos se descartó sin haberse inmovilizado en el recipiente.

45 Al mismo tiempo, las proteínas tales como los anticuerpos se ven fácilmente afectadas por el calor, y las funciones de las mismas desaparecen cuando se adsorben a altas temperaturas. Por lo tanto, los anticuerpos son materiales que son difíciles de inmovilizar en un recipiente. Por otro lado, se desea realizar la inmovilización en una cantidad necesaria en un período corto de tiempo, utilizando una pequeña cantidad de proteínas. Además, dado que los anticuerpos generalmente son caros, se desea reducir la cantidad de anticuerpos a descartar de forma dispendiosa.
50

Los inventores de la presente invención realizaron estudios intensivos, y descubrieron que, sellando gotitas de líquido de una solución proteica en un recipiente junto con un gas y moviendo estas gotitas de líquido sobre la superficie interna del recipiente, las moléculas de proteína concentradas en la interfaz gas-líquido de las gotitas de líquido se adsorben de forma eficaz en el recipiente. La presente invención se ha completado basándose en este hallazgo.
55

Es decir, la presente invención está dirigida a proporcionar, al inmovilizar proteínas en la superficie interna de un recipiente, un método para inmovilizar proteínas de forma eficaz en un recipiente sellando gotitas de líquido de una solución proteica en un recipiente junto con un gas y moviendo las gotitas de líquido sobre la superficie interna del recipiente, permitiendo de este modo que las proteínas se inmovilicen en el recipiente de forma eficaz, así como un aparato de inmovilización para implementar este método.
60

Medios para solucionar la cuestión

65 Para conseguir el objetivo mencionado anteriormente, el recipiente de cultivo de la presente invención es un

recipiente de cultivo para cultivar linfocitos, donde el recipiente de cultivo está formado por una película permeable a los gases, se inmovilizan anticuerpos solo sobre una de las superficies internas del recipiente enfrentadas entre sí, proporcionando de este modo una superficie inmovilizadora y una superficie no inmovilizadora, y en la superficie de inmovilización, se inmovilizan anticuerpos anti CD3 en la superficie de inmovilización, donde la superficie de inmovilización y la superficie de no inmovilización se mantienen en un estado en que no están en contacto entre sí, donde los anticuerpos anti CD3 se inmovilizan en la superficie de inmovilización a una concentración de 10 a 300 ng/cm² y donde se sella un gas en una cantidad de 0,01 a 4 ml por cm² del área de la superficie inferior del recipiente.

El método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con la presente invención es un método para cultivar linfocitos que utiliza el recipiente de cultivo mencionado anteriormente, que comprende las etapas de: una etapa de activación en la que se sellan linfocitos y un líquido de cultivo en el recipiente de cultivo, y el recipiente de cultivo se dispone de forma que la superficie de inmovilización se convierta en una superficie inferior, activando de este modo los linfocitos, y una etapa de proliferación en la que el recipiente de cultivo se invierte y se dispone de forma que la superficie de no inmovilización se convierte en una superficie inferior, de modo que proliferen los linfocitos, y donde, en la etapa de activación, se divide el recipiente de cultivo mediante un elemento de división para formar una parte de cultivo en el recipiente de cultivo, y se sellan linfocitos y un líquido de cultivo en esta parte de cultivo y donde, la etapa de proliferación comprende: una primera etapa de proliferación en la que el recipiente de cultivo se invierte y se dispone de forma que la superficie de no inmovilización en el recipiente de cultivo se convierte en una superficie inferior, de modo que proliferen los linfocitos, una etapa de ampliación del volumen en la que el elemento de división se mueve o se retira, para ampliar de este modo el volumen de la parte de cultivo, y una segunda etapa de proliferación en la que los linfocitos se hacen proliferar después de que se amplía el volumen de la parte de cultivo.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, es posible realizar la activación y la proliferación de linfocitos de forma eficaz en un único recipiente de cultivo, sin utilizar un aparato de cultivo destinado a ello o similar. Por lo tanto, se hace posible eliminar la problemática de la transferencia realizada para prevenir la irritación excesiva ejercida por los anticuerpos sobre los linfocitos y el riesgo de contaminación.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una vista que muestra el recipiente de cultivo de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados del movimiento de anticuerpos cuando se almacena el recipiente de cultivo en un estado en que las superficies internas del recipiente están pegadas;

La Fig. 3A es una vista que muestra el estado de almacenamiento del recipiente de cultivo de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 3B es una vista que muestra el estado de almacenamiento del recipiente de cultivo de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 4 es una vista que muestra el método de cultivo de linfocitos de acuerdo con una primera realización de la presente invención;

La Fig. 5 es una vista que muestra el método de cultivo de linfocitos de acuerdo con una segunda realización de la presente invención;

La Fig. 6 es una vista esquemática que muestra los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del recipiente de cultivo y el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 7 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento realizado en los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del recipiente de cultivo y el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 8 es una vista que muestra un método convencional para el cultivo de linfocitos;

La Fig. 9 es una vista para explicar el principio de inmovilización en el método para producir un recipiente de cultivo;

La Fig. 10 es una vista que muestra una bolsa de cultivo en la que se inmovilizan anticuerpos, obtenida mediante el método de producción de un recipiente de cultivo;

La Fig. 11 es una vista (vista en planta) que muestra un aparato de inmovilización que se puede utilizar en un método de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 12 es una vista (vista frontal) que muestra un aparato de inmovilización que se puede utilizar en un método de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 13 es una vista que muestra la forma de inmovilización mediante el aparato de inmovilización;

La Fig. 14 son vistas (vista frontal y vista lateral) que muestran medios de retención en el aparato de inmovilización;

La Fig. 15 es una vista que muestra el estado de uso de medios de retención en el aparato de inmovilización;

La Fig. 16 es una vista esquemática que muestra los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del recipiente de cultivo (bolsa de cultivo en la que se inmovilizan los anticuerpos) de acuerdo con la realización de la presente invención;

La Fig. 17 es un gráfico que muestra los resultados de experimentos realizados en los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos en el método de producción de un recipiente de cultivo (bolsa de cultivo en la que se inmovilizan

anticuerpos);

La Fig. 18 es una vista esquemática que muestra los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos en el método de producción de un recipiente de cultivo (matraz de cultivo en el que se inmovilizan anticuerpos);

5 La Fig. 19 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento realizados en los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del método de producción de un recipiente de cultivo (matraz de cultivo en la que se inmovilizan anticuerpos);

La Fig. 20 es una vista esquemática que muestra los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del método de producción de un recipiente de cultivo (bolsa de cultivo en la que se inmoviliza fibronectina); y

10 la Fig. 21 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento en los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del método de producción de un recipiente de cultivo (bolsa de cultivo en la que se inmoviliza fibronectina).

Modo para realizar la invención

15 A continuación en el presente documento, se hará una explicación detallada sobre la realización del recipiente de cultivo y el método de cultivo de linfocitos de acuerdo con la presente invención. En primer lugar, una realización del recipiente de cultivo de acuerdo con la presente invención se explicará con referencia a la Fig. 1. La Fig. 1 muestra una vista esquemática vista desde arriba y una vista esquemática vista desde el lateral del recipiente de cultivo montado en una mesa de montaje (no se muestra).

20 [Recipiente de cultivo]

Como se muestra en la Fig. 1, el recipiente de cultivo 10 de acuerdo con la realización de la presente invención tiene paredes de recipiente enfrentadas entre sí en una dirección vertical. Una de las superficies internas del recipiente es una superficie inmovilizada 11 (superficie inferior del recipiente, mostrada en la Fig. 1) en la que los anticuerpos 20 están inmovilizados. La otra superficie interna del recipiente es una superficie de no inmovilización 12 (superficie superior del recipiente, mostrada en la Fig. 1) en la que no hay inmovilizados anticuerpos 20. El recipiente de cultivo 10 está provisto de un tubo 13. Mediante este tubo 13, se realiza el sellado de los linfocitos y de un líquido de cultivo en el recipiente de cultivo 10, y la recuperación de los linfocitos cultivados y del líquido de cultivo. En el ejemplo 30 mostrado en la figura, solo está anexado al recipiente de cultivo 10 un tubo 13, pero se pueden anexar dos o más tubos 13.

El recipiente de cultivo 10 se forma en forma de una bolsa usando una película que tiene la permeabilidad a gases necesaria para el cultivo celular. Como material para el recipiente de cultivo 10, se puede usar, preferentemente, una 35 resina de poliolefina tal como polietileno y polipropileno.

Como los anticuerpos 20 a inmovilizar en la superficie de inmovilización 11 se usan anticuerpos anti CD3. Los linfocitos pueden activarse mediante anticuerpos anti CD3 y hacerse proliferar.

40 La concentración de los anticuerpos 20 inmovilizados sobre la superficie de inmovilización 11 es de 10 a 300 ng/cm², más preferentemente de 10 a 40 ng/cm².

Al permitir que la concentración de los anticuerpos 20 inmovilizados sea de 10 ng/cm² o más, los linfocitos pueden activarse de manera efectiva y, después de eso, los linfocitos activados pueden proliferar de forma eficaz. Si se 45 permite que la concentración de anticuerpos 20 inmovilizados sea mayor que 40 ng/cm², no surgen diferencias en la eficacia de proliferación de los linfocitos y, por el contrario, el costo del recipiente aumenta debido al uso excesivo de anticuerpos.

La concentración de empaquetamiento estrecho de anticuerpos anti CD3 en la superficie de inmovilización 11 es de 50 300 ng/cm². Dentro de este intervalo, es posible activar suficientemente los linfocitos y, después, hacer proliferar los linfocitos de forma eficaz. Por otro lado, la concentración de anticuerpos anti CD3 que exceda los 300 ng/cm² no es preferible, dado que los anticuerpos anti CD3 pueden flotar en el líquido de cultivo en el recipiente de cultivo 10, provocando una irritación excesiva en los linfocitos.

55 El recipiente de cultivo 10 de acuerdo con esta realización se puede producir, por ejemplo, como sigue.

En primer lugar, se extruye polietileno de baja densidad mediante un aparato de moldeo por extrusión de plástico para formar una película. Después, utilizando una selladora de impulso, se produce un recipiente de cultivo 10 en 60 forma de bolsa a partir de esta película. Como se muestra en la Fig. 1, el recipiente de cultivo 10 se produce de forma que esté provisto del tubo 13.

Posteriormente, el recipiente de cultivo 10 se monta sobre una mesa de montaje, y se sella una cantidad prescrita de gas. En ese momento, se sella de forma continua una solución tamponadora en la que están disueltos los anticuerpos 20. Balanceando, o similar, el recipiente de cultivo 10, las gotitas de líquido de la solución tamponadora se mueven sobre la superficie inferior del recipiente de cultivo 10, mediante lo cual los anticuerpos 20 contenidos en 65 la solución tamponadora se adhieren a la superficie inferior del recipiente de cultivo 10. Como resultado, los

anticuerpos 20 se adhieren solo a la superficie inferior en el recipiente de cultivo 10, mediante lo cual se forma la superficie de inmovilización 11. En este momento, la superficie superior del recipiente de cultivo 10 se forma como una superficie de no inmovilización 12 sobre la que no se adhieren anticuerpos 20.

5 Posteriormente, se explicará el estado de almacenamiento del recipiente de cultivo 10 de acuerdo con esta realización.

Es preferente que el recipiente de cultivo 10 se almacene en un estado en el que la superficie de inmovilización 11 y la superficie de no inmovilización 12 no estén en contacto entre sí.

10 Es decir, cuando el recipiente de cultivo 10 se almacena a 37 °C durante 2 horas bajo una carga de 1,6 kg en un estado en que la superficie de inmovilización 11 y la superficie de no inmovilización 12 están en contacto entre sí, como se muestra en la Fig. 2, aproximadamente el 20 % de los anticuerpos 20 se mueven de la superficie de inmovilización 11 a la superficie de no inmovilización 12. Los anticuerpos 20 que se han movido de esta manera a la superficie de no inmovilización 12, pueden irritar los linfocitos en exceso, reduciendo la tasa de proliferación de los mismos cuando se realiza la proliferación después de la activación de los linfocitos. Por lo tanto, es preferible suprimir el movimiento de los anticuerpos 20 de la superficie de inmovilización 11 a la superficie de no inmovilización 12 tanto como sea posible.

20 Cuando se almacena el recipiente de cultivo 10 de acuerdo con esta realización, se sella una cantidad prescrita de un gas en el recipiente de cultivo 10 y se mantiene un estado en el que la superficie de inmovilización 11 y la superficie de no inmovilización 12 no están en contacto entre sí.

25 Específicamente, la cantidad de un gas a sellar es de 0,01 a 4 ml por cm² de la superficie inferior del recipiente de cultivo 10. Permitiendo que la cantidad de un gas a sellar esté en este intervalo, es posible impedir el contacto de la superficie de inmovilización 11 y la superficie de no inmovilización 12.

30 Aunque no se imponen restricciones específicas al gas a sellar, es preferible un gas inerte, y se puede utilizar aire, gas nitrógeno o similares. Dicho gas se puede inyectar en el recipiente de cultivo 10 a través del tubo 13 mediante un aparato de suministro de gas.

35 Como forma específica de almacenamiento del recipiente de cultivo 10 de acuerdo con esta realización, como se muestra en la Fig. 3A, es preferente que la forma del recipiente de cultivo 10 sea retenida por un recipiente de recubrimiento externo 60 que tenga rigidez. Cuando el recipiente de cultivo 10 se almacena utilizando tal recipiente de recubrimiento externo 60, sellando en el recipiente de cultivo 10 solo una pequeña cantidad de un gas, el recipiente de cultivo 10 se puede almacenar sin provocar el movimiento de los anticuerpos 20.

40 Además, como se muestra en la Fig. 3B, es preferente que el recipiente de cultivo 10 se almacene en un estado hinchado con un gas y envuelto con un recipiente de embalaje 70. Debido a tal configuración, es posible empaquetar una pluralidad de recipientes de cultivo 10 de forma simple y almacenarlos sin provocar el movimiento de los anticuerpos 20.

45 Como se ha explicado anteriormente en el presente documento, el recipiente de cultivo 10 de acuerdo con esta realización está fabricado de una película permeable a los gases, y los anticuerpos 20 están inmovilizados solo sobre una superficie de las paredes internas del recipiente enfrentadas entre sí, mediante lo cual está provisto de la superficie de inmovilización 11 y la superficie de no inmovilización 12. Los linfocitos sellados dentro del recipiente de cultivo 10 se acumulan en la parte inferior del recipiente.

50 Por lo tanto, utilizando el recipiente de cultivo 10 de forma que la superficie de inmovilización 11 se convierta en una superficie inferior cuando se activen los linfocitos y de forma que la superficie de no inmovilización 12 se convierta en una superficie inferior cuando proliferen los linfocitos, se puede impedir la irritación excesiva de los linfocitos ejercida por los anticuerpos 20, mediante lo cual la activación y la proliferación de linfocitos se puede realizar de forma eficaz en un único recipiente. Como resultado, se hace posible eliminar la problemática en la transferencia o el riesgo de contaminación. Además, dado que pasar de la activación a la proliferación es una operación simple (es decir, solo invertir el recipiente), se puede realizar de forma simple sin usar un aparato destinado a ellos o similar.

60 Además, sellando una cantidad prescrita de un gas en el recipiente de cultivo 10 de acuerdo con esta realización y conservando un estado en donde la superficie de inmovilización 11 y la superficie de no inmovilización 12 no están en contacto entre sí, es posible almacenar el recipiente de cultivo 10 sin reducir el efecto de impedimento de la irritación excesiva sobre los linfocitos.

65 Entretanto, en un matraz que se utiliza para activar los linfocitos convencional, los anticuerpos anti CD3 se inmovilizan solo en la superficie inferior, y los linfocitos pueden activarse con esta configuración. Sin embargo, la proliferación de linfocitos después de la activación no puede realizarse utilizando un único matraz. La motivo es que, en un matraz, el número de células por área no puede mantenerse a una densidad apropiada. Concretamente, los linfocitos proliferan después de la activación, por lo que se precisa ampliar el área de cultivo. En esta realización, es

posible ampliar el área de cultivo dividiendo parte del recipiente de cultivo mediante una pinza o un rodillo, y moviendo, retirando o similar, la pinza o el rodillo de acuerdo con la proliferación de las células. Sin embargo, tal ampliación del área de cultivo no puede realizarse en un matraz. Se puede usar un matraz para activar los linfocitos, pero no es adecuado para la proliferación.

5 [Método para el cultivo de linfocitos (Primera realización)]

Posteriormente, una primera realización del método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con la presente invención se explicará con referencia a la Fig. 4. Como se muestra en la Fig. 4, el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con esta realización comprende la etapa de una etapa de activación (1) y una etapa de proliferación (2).

No se muestran en la Fig. 4 detalles adicionales de la etapa de proliferación de acuerdo con la presente invención, que comprende una primera etapa de proliferación, una etapa de ampliación del volumen y una segunda etapa de proliferación, pero se describen en la segunda realización a continuación con referencia a la Fig. 5.

15 (1) Etapa de activación

La etapa de activación en el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con esta realización es una etapa en la que los linfocitos 30 y un líquido de cultivo 40 se sellan en el recipiente de cultivo 10, y el recipiente de cultivo 10 se dispone de forma que la superficie de inmovilización 11 se convierte en una superficie inferior, de modo que se activen los linfocitos 30.

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos 20 se inmovilizan sobre la superficie de inmovilización 11. Como tales anticuerpos 20 se usan anticuerpos anti CD3.

25 El tipo de linfocitos 30 no está particularmente restringido, y pueden ser objeto de cultivo los linfocitos NK, los linfocitos B, los linfocitos T y las células mononucleares o similares.

Como el líquido de cultivo 40, se puede usar uno usado comúnmente para cultivar los linfocitos 30. Por ejemplo, se puede usar preferentemente un líquido de cultivo al que se le ha añadido interleucina 2.

En esta etapa de activación, los linfocitos 30 en el recipiente de cultivo 10 se activan, dado que el CD3, como molécula receptora, está irritado por los anticuerpos anti CD3 que se han inmovilizado en la superficie de inmovilización 11.

35 (2) Etapa de proliferación

La etapa de proliferación en el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con esta realización es una etapa en la que el recipiente de cultivo 10 se invierte para disponer el recipiente de cultivo 10 de forma que la superficie de no inmovilización 12 se convierta en una superficie inferior, de modo que proliferen los linfocitos 30.

Disponiendo el recipiente de cultivo 10 de forma que la superficie de no inmovilización 12 se convierta en una superficie inferior, se hace posible cultivar los linfocitos 30 en el lado de la superficie de no inmovilización 12 en el recipiente de cultivo 10.

45 Como resultado, los linfocitos 30 pueden proliferar sin ser irritados por anticuerpos anti CD3 que se han inmovilizado en la superficie de inmovilización 11. Por lo tanto, la disminución de la eficacia de proliferación que se produce cuando los linfocitos 30 están irritados en exceso por los anticuerpos anti CD3 puede prevenirse.

50 [Método para el cultivo de linfocitos (segunda realización)]

Posteriormente, una segunda realización del método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con la presente invención se explicará con referencia a la Fig. 5. El método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con esta realización tiene, como se muestra en la Fig. 5, las etapas de etapa de activación (1), la primera etapa de proliferación (2), la etapa de ampliación del volumen (3) y la segunda etapa de proliferación (4).

Es decir, el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con esta realización tiene una etapa de ampliación del volumen en medio de la etapa de proliferación. Como resultado, la eficacia de la proliferación de linfocitos puede mejorarse aún más en comparación con la de la primera realización. En esta realización, la etapa de proliferación se explicará subdividiéndola en las tres etapas de (2) a (4) mencionadas anteriormente. Otros puntos son los mismos que los de la primera realización.

60 (1) Etapa de activación

65 En la etapa de activación en el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con esta realización, al dividir el recipiente de cultivo 10 mediante un elemento de división 50, el recipiente de cultivo 10 se divide en una parte de

cultivo 10-1 y una parte ampliable 10-2.

La parte de cultivo 10-1 es una cámara en donde los linfocitos 30 y el líquido de cultivo 40 se sellan para activar los linfocitos 30.

5 La parte ampliable 10-2 es una cámara en donde no se sellan linfocitos 30 y el líquido de cultivo 40, y se utiliza como un espacio que amplía la parte de cultivo 10-1 de acuerdo con la proliferación de los linfocitos 30.

Los linfocitos 30 y el líquido de cultivo 40 no pueden pasar entre la parte de cultivo 10-1 y la parte ampliable 10-2.

10 En este caso, en general, las células tienen la propiedad de que apenas proliferan a menos que tengan un nivel prescrito o más de densidad celular en la etapa inicial del cultivo. Por lo tanto, es preferente que el volumen de la parte de cultivo 10-1 se ajuste de forma que sea pequeño en la etapa inicial del cultivo y que se aumente de tamaño más tarde.

15 Además, la Fig. 5 muestra una etapa en la que el recipiente de cultivo 10 se divide utilizando una pinza como elemento de división 50 y la pinza se retira más tarde para permitir que la totalidad del recipiente de cultivo 10 sea la parte de cultivo 10-1. La manera de dividir el recipiente de cultivo 10 no se limita a ello. Por ejemplo, la parte de cultivo 10-1 se puede cambiar de forma continua utilizando un rodillo como elemento de división 50. También es posible cambiar la parte de cultivo 10-1 múltiples veces a un tamaño arbitrario.

Posteriormente, los linfocitos 30 y el líquido de cultivo 40 se sellan en la parte de cultivo 10-1 en el recipiente de cultivo 10 y, después, el recipiente de cultivo 10 se dispone de forma que la superficie de inmovilización 11 en la parte de cultivo 10-1 se convierta en una superficie inferior, mediante lo cual se activan los linfocitos 30.

25 Durante esta etapa de activación, los linfocitos 30 en la parte de cultivo 10-1 se activan mediante los anticuerpos anti CD3 que se han inmovilizado en la superficie de inmovilización 11.

(2) Primera etapa de proliferación

30 Posteriormente, el recipiente de cultivo 10 se invierte y el recipiente de cultivo 10 se dispone de forma que la superficie de no inmovilización 12 se convierta en una superficie inferior, mediante lo cual se proliferan los linfocitos 30.

35 Es decir, disponiendo el recipiente de cultivo 10 de forma que la superficie de no inmovilización 12 se convierta en una superficie inferior, se hace posible cultivar los linfocitos 30 en el lado de la superficie de no inmovilización 12 en la parte de cultivo 10-1. Como resultado, los linfocitos 30 pueden proliferar sin ser irritados por los anticuerpos anti CD3 que se han inmovilizado en la superficie de inmovilización 11. Por lo tanto, se hace posible proliferar los linfocitos de forma eficaz en un único recipiente.

40 (3) Etapa de ampliación del volumen

Una etapa de ampliación del volumen es una etapa de ampliación del volumen de la parte de cultivo 10-1 moviendo o retirando el elemento de división 50.

45 Mediante esta etapa, se hace posible ajustar el volumen de la parte de cultivo 10-1 de acuerdo con el número de linfocitos 30 que han proliferado. Como resultado, la eficacia de proliferación de los linfocitos 30 puede mejorarse adicionalmente.

50 (4) Segunda etapa de proliferación

Una segunda etapa de proliferación es una etapa de realización del cultivo de los linfocitos 30 de forma continua en un estado en donde la parte de cultivo 10-1 en el recipiente de cultivo 10 se amplía. En este momento, el recipiente de cultivo 10 está en el estado en donde la superficie de no inmovilización 12 se dispone de forma que la superficie de no inmovilización 12 se convierte en una superficie inferior.

55 Como resultado, los linfocitos 30 pueden proliferar sin ser irritados por los anticuerpos anti CD3 que se han inmovilizado en la superficie de inmovilización 11, y se hace posible evitar la reducción de la tasa de proliferación de los linfocitos 30 debido a una densidad excesiva de los linfocitos 30 en la parte de cultivo 10-1.

60 Entretanto, utilizando varias pinzas o rodillos como el elemento de división 50, las etapas (3) y (4) se repiten varias veces, mediante lo cual la ampliación del volumen de la parte de cultivo 10-1 se realiza de manera gradual.

65 Como se ha explicado anteriormente en el presente documento, de acuerdo con el método para el cultivo de linfocitos de acuerdo con la realización de la presente invención, se utiliza el recipiente de cultivo 10 de acuerdo con la realización de la presente invención, disponiendo el recipiente de cultivo 10 de forma que la superficie de

inmovilización 11 del mismo se convierta en una superficie inferior para activar los linfocitos 30 y, después de eso, disponiendo el recipiente de cultivo 10 de forma que la superficie de no inmovilización 12 del mismo se convierta en una superficie inferior para proliferar los linfocitos 30.

- 5 Por lo tanto, es posible evitar que los linfocitos 30 se irriten en exceso por los anticuerpos 20, mediante lo cual la activación y la proliferación de los linfocitos 30 se puede realizar de forma eficaz en un único recipiente.

Además, también es posible ajustar el volumen de la parte de cultivo 10-1 en el recipiente de cultivo 10 de acuerdo con el número de células de linfocitos proliferados 30, mediante lo cual la eficacia de proliferación de los linfocitos 30 puede mejorarse adicionalmente.

Posteriormente, se proporcionará una explicación detallada sobre un método de producción de un recipiente de cultivo y de un aparato de inmovilización.

- 15 [Método de producción de un recipiente de cultivo]

El método de producción de un recipiente de cultivo es un método de producción de un recipiente de cultivo en el que las proteínas se inmovilizan, caracterizado por que se inyectan gotitas de líquido que contienen proteínas disueltas en ellas y las gotitas de líquido se mueven a una parte o la totalidad de una superficie interna del recipiente de cultivo.

En primer lugar, se explicará con referencia a la Fig. 9 un principio para permitir que las proteínas se inmovilicen de forma eficaz sobre la superficie interna del recipiente de cultivo en el método de producción de un recipiente de cultivo.

25 Cuando una solución que contiene proteínas disueltas en ella se deja reposar, las proteínas presentan la propiedad de que se adsorben a la interfaz gas-líquido de esta solución (BUNSEKI KAGAKU Vol. 59, N.º 6. pág. 437-445 (2010)). Por lo tanto, en el método de producción de un recipiente de cultivo, las gotitas de líquido que contienen proteínas disueltas en ellas se mueven sobre el elemento basal, mediante lo cual se permite que las moléculas de proteína concentradas en la interfaz gas-líquido estén en contacto de forma activa con el elemento basal.

30 Como se ha mencionado anteriormente, permitiendo que las gotitas de líquido rueden en el recipiente para permitir que la interfaz gas-líquido se mueva en el recipiente, las proteínas se adsorben al elemento basal en el límite del gas, el líquido y el elemento basal. Cuando las proteínas se adsorben en el elemento basal, las proteínas en las gotitas de líquido se adsorben a una interfaz gas-líquido recién generada. Después, si las gotitas de líquido se mueven en la superficie interna del recipiente, las proteínas se adsorben a la superficie interna del recipiente con una alta probabilidad debido al contacto de la interfaz gas-líquido que tiene una alta concentración de proteína y la superficie interna del recipiente.

40 Como resultado, de acuerdo con el método de producción de un recipiente de cultivo de esta realización, es posible permitir que las proteínas se inmovilicen de forma eficaz en la superficie interna del recipiente.

Por ejemplo, cuando las proteínas se inmovilizan solo en la superficie inferior del recipiente, se hace posible evitar la pérdida de proteínas provocada por la adsorción de proteínas a la superficie superior del recipiente.

45 Un recipiente de cultivo significa todos los recipientes utilizados en el cultivo de células, e incluye recipientes utilizados para la activación y/o la proliferación de células.

50 En esta realización no se imponen restricciones específicas sobre la forma del recipiente de cultivo y se puede usar, preferentemente, una bolsa de cultivo en forma de bolsa fabricada de un material de empaquetamiento blando o un matraz de vidrio o poliestireno.

Por ejemplo, se puede usar preferentemente una bolsa de cultivo que tenga paredes opuestas en la superficie interna del recipiente, y las proteínas se inmovilizan en parte o la totalidad de una o ambas de las superficies internas de la bolsa de cultivo, mediante lo cual se puede producir la bolsa de cultivo de acuerdo con esta realización.

60 Específicamente, como se muestra en la Fig. 10, una de las superficies internas opuestas de una bolsa de cultivo 100 puede ser una superficie inmovilizada 110 en la que las proteínas 200 se inmovilizan (superficie inferior del recipiente en la Fig. 10), y la otra de las superficies internas de la bolsa de cultivo puede ser una superficie de no inmovilización 120 en la que no se inmovilizan proteínas 200 (superficie superior del recipiente en la Fig. 10).

65 La bolsa de cultivo 100 está provista del tubo 130, y a través de este tubo 130, pueden introducirse o retirarse de la bolsa de cultivo 100 las gotitas de líquido que contienen proteínas disueltas en ellas y un gas. En el ejemplo mostrado en esta figura, la bolsa de cultivo 100 está provista de dos tubos 130. Sin embargo, pueden proporcionarse dos o tres, o más tubos 130.

El preferente que la bolsa de cultivo 100 se forme usando una película que tenga permeabilidad para un gas necesario para cultivar células. Como material para tal recipiente de cultivo 100, se puede usar, preferentemente, una resina basada en poliolefina tal como polietileno y polipropileno.

5 Las proteínas 200 a inmovilizar en la bolsa de cultivo 100 no están particularmente restringidas. Pueden utilizarse anticuerpos tales como los anticuerpos anti CD3 y proteínas de adhesión celular tales como la fibronectina, el colágeno y la laminina. Los anticuerpos anti CD3 se usan preferentemente para activar linfocitos. Las proteínas de adhesión celular se usan preferentemente para permitir que las células se adhieran de forma eficaz sobre el elemento basal del cultivo.

10 Cuando se inmovilizan como proteínas 200 anticuerpos anti CD3, es preferente que los anticuerpos anti CD3 se inmovilicen a una concentración de 10 a 300 ng/cm². Si los anticuerpos anti CD3 se inmovilizan a una concentración de 10 ng/cm² o más, es posible activar de forma eficaz los linfocitos y, después de eso, proliferar los linfocitos de forma eficaz. Por otro lado, la inmovilización a una concentración de 300 ng/cm² o mayor no es preferible, dado que los anticuerpos anti CD3 flotan en el líquido de cultivo en la bolsa de cultivo 100 e irritan en exceso a los linfocitos.

Las gotitas de líquido para disolver proteínas en esta realización no están particularmente restringidas. Sin embargo, se puede usar preferentemente una solución tamponadora de fosfato.

20 Además, es preferente que el tamaño de las gotitas de líquido (cantidad de gotitas de líquido) que contienen proteínas disueltas en ellas sea de 1 cc a 20 cc. Dado que una fuerza de fricción actúa entre las gotitas de líquido y la superficie interna cuando las gotitas de líquido se mueven en la superficie interna de la bolsa de cultivo 100, si las gotas son demasiado pequeñas, no pueden moverse de forma adecuada. Además, si el tamaño de las gotitas de líquido es demasiado grande, la concentración de proteínas en las gotitas de líquido se reduce, y el área de la interfaz gas-líquido por volumen de la microgota líquida se reduce, mediante lo cual se reduce la eficacia de adhesión. En este sentido, el tamaño de la microgota líquida es preferentemente de 1 cc a 10 cc, más preferentemente de 1 cc a 5 cc, y aún más preferentemente de aproximadamente 2

30 Aunque el gas a sellar en la bolsa de cultivo 100 no está particularmente restringido, es preferible un gas inerte. Puede utilizarse aire, gas nitrógeno o similares. Dicho gas se puede inyectar en la bolsa de cultivo 100 a través del tubo 130 mediante, por ejemplo, un aparato de suministro de gas.

35 La cantidad de un gas a sellar en la bolsa de cultivo 100 es preferentemente de 0,1 a 4 ml, más preferentemente de 1 a 3 ml por cm² de la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100. Si se permite que la cantidad del gas a sellar esté en este intervalo, es posible evitar que las paredes opuestas en la superficie interior de la bolsa de cultivo 100 se pongan en contacto entre sí, mediante lo cual las gotitas de líquido que contienen las proteínas 200 disueltas en ellas pueden moverse de manera eficaz en la bolsa de cultivo 100.

La bolsa de cultivo 100 puede producirse, por ejemplo, como sigue.

40 En primer lugar, se extruye polietileno de baja densidad utilizando un aparato de moldeo por extrusión de plástico para formar una película. Utilizando una selladora de impulso, se produce la bolsa de cultivo 100 a partir de esta película. Como se muestra en la Fig. 10, la bolsa de cultivo 100 se produce con el tubo 130 que está anexado a la misma.

45 Posteriormente, la bolsa de cultivo 100 se monta sobre una mesa de montaje, y se sella una cantidad prescrita de un gas. En ese momento, se sella de forma continua una solución tamponadora en la que están disueltas las proteínas 200. Después, balanceando, o similar, la bolsa de cultivo 100, las gotitas de líquido de la solución tamponadora se mueven sobre la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100. Como resultado, las proteínas 200 contenidas en la solución tamponadora se adhieren a la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100, mediante lo cual puede obtenerse la bolsa de cultivo 100 en la que están inmovilizadas las proteínas 200.

[Aparato de inmovilización]

55 Posteriormente, se explicarán con referencia a las Fig. 11 a 15 un aparato de inmovilización que se puede usar preferentemente en el método de producción de un recipiente de cultivo y unos medios de retención usados en este aparato de inmovilización. La Fig. 11 muestra una vista en planta del aparato de inmovilización y la Fig. 12 es una vista frontal del aparato de inmovilización. La Fig. 13 muestra una forma de inmovilización mediante el aparato de inmovilización. La Fig. 14 muestra una vista frontal y una vista lateral de los medios de retención. La Fig. 15 muestra cómo se utilizan los medios de retención.

65 En la Fig. 11, el lado inferior muestra el lado frontal del aparato de inmovilización 300, la parte superior muestra el lado trasero del aparato de inmovilización 300, el lado izquierdo muestra el lado izquierdo del aparato de inmovilización 300 y el lado derecho muestra el lado derecho del aparato de inmovilización 300, respectivamente. En esta figura, la dirección lateral (la dirección longitudinal de la mesa de montaje mencionada más adelante) se toma como la dirección del eje X y la dirección vertical (la dirección lateral de la mesa de montaje) se toma como la

dirección del eje Y.

El aparato de inmovilización 300 está provisto de una mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X y una mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y. La bolsa de cultivo 100 sella gotitas de líquido que contienen proteínas disueltas en ellas y una cantidad prescrita de gas, y después se monta en la mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y. La mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X y la mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y se mueven integralmente. En lo sucesivo en el presente documento, la mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X y la mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y pueden denominarse ampliamente como la "mesa de montaje".

La mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X se apoya en ambos lados (lados frontal y trasero) en el medio de la dirección longitudinal mediante dos columnas de soporte 320 proporcionadas de forma vertical, que están fijadas a una base de apoyo 400.

La mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X está conectada a un servomotor 330 para moverse en la dirección del eje X (medios de accionamiento para moverse en la dirección longitudinal) a través de una caja de engranajes 340 para moverse en la dirección del eje X.

Accionando este servomotor 330 para moverse en la dirección del eje X, la mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X puede moverse alternativamente en dirección hacia la izquierda y en dirección hacia la derecha alrededor de la dirección del eje Y. Como resultado, la mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X puede realizar un movimiento de balanceo de forma lateral.

Por consiguiente, las gotitas de líquido en la bolsa de cultivo 100 montada sobre la mesa de soporte que contienen proteínas disueltas en ellas pueden moverse de forma lateral y recíproca desde el extremo izquierdo al extremo derecho en la bolsa de cultivo 100.

En este momento, el ángulo del movimiento rotativo de la mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X puede estar, por ejemplo, en un intervalo de -10° a $+10^\circ$. En las Fig. 11 y 12, el caso en donde el lado izquierdo queda en alto es menos (-) y el caso en donde el lado derecho queda en alto es más (+).

La velocidad del movimiento rotativo de la mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X puede ser una velocidad a la que las gotitas que contienen proteínas disueltas en ella se mueven en la bolsa de cultivo 100 a una velocidad de, por ejemplo, 5 m/min a 15 m/min.

Se utiliza un sensor de detección de límite en origen para el eje Y 350 para detectar el origen y el límite del eje Y.

La mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y está apoyada por ambos lados (los lados izquierdo y derecho) en el medio de la dirección lateral, por dos partes de soporte que están proporcionadas de forma vertical en las partes del extremo izquierdo y derecho de la mesa de soporte 310 para moverse en la dirección del eje X.

Además, la mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y está conectada a un servomotor 370 (medios de accionamiento para moverse en la dirección lateral) a través de una caja de engranajes 380 para moverse en la dirección del eje Y.

Accionando este servomotor 370 para moverse en la dirección del eje Y, la mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y puede realizar un movimiento rotativo junto con la mesa de soporte 310 para moverse en la dirección X, siendo la dirección del eje X como un eje central, alternativamente en la dirección hacia la izquierda y la dirección derecha. Como resultado, la mesa de montaje puede moverse de forma lateral; es decir, realizar un movimiento de balanceo (movimiento hacia arriba y hacia abajo en la Fig. 11).

Por lo tanto, las gotitas de líquido que contienen proteínas disueltas en ellas en la bolsa de cultivo 100 montada en la mesa de montaje, pueden moverse en la bolsa de cultivo 100 desde el extremo inferior hasta el extremo superior.

En este momento, el ángulo del movimiento rotativo de la mesa de soporte 360 para moverse en la dirección del eje Y puede estar, por ejemplo, en un intervalo de -50° a $+50^\circ$. En las Fig. 11 y 12, el caso en donde el lado frontal queda en alto es menos (-) y el caso en donde el lado trasero queda en alto es más (+).

Es preferente que el movimiento de las gotitas de líquido en la dirección del eje Y se realice en una distancia que sea igual o menor que el tamaño de las gotitas de líquido. Permitiendo que las gotitas de líquido se muevan en la dirección del eje Y y permitiendo que las gotitas de líquido se muevan en la dirección del eje X desde el extremo izquierdo al extremo derecho en la bolsa de cultivo 100, es posible permitir que las gotitas de líquido se muevan sobre toda la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100, así como que se adsorban de forma eficaz las proteínas contenidas en las gotitas de líquido en la bolsa de cultivo 100.

Se utiliza un sensor de detección de límite en origen del eje X 390 para detectar el origen y el límite del eje X.

Posteriormente, se hará una explicación sobre método de producción de la bolsa de cultivo 100 utilizando el aparato de inmovilización 300.

5 En primer lugar, la bolsa de cultivo 100 se monta sobre la mesa de montaje, y se sella una cantidad prescrita de gas. Después, se inyectan las gotitas de líquido que contienen proteínas disueltas en ellas. Posteriormente, accionando un servomotor 370 para moverse en la dirección del eje Y, como se muestra en la Fig. 13, la mesa de montaje se mueve de forma rotativa hacia el lado frontal, con la dirección del eje X como el eje central. Como resultado, se permite que las gotitas de líquido se muevan hacia la parte del extremo en el lado frontal de la bolsa de cultivo 100.

10 Posteriormente, accionando el servomotor 330 para moverse en la dirección del eje X, se permite que la mesa de montaje se mueva de forma rotativa en la dirección lateral, con la dirección del eje Y como el eje central. Como resultado, se permite que las gotitas de líquido se muevan de forma lateral en la bolsa de cultivo 100 desde el extremo izquierdo y el extremo derecho.

15 Posteriormente, accionando el servomotor 370 para moverse en la dirección del eje Y, la mesa de montaje se mueve ligeramente de forma rotativa hacia el lado posterior, mediante lo cual las gotitas de líquido se mueven ligeramente hacia el lado posterior. Después, accionando otra vez el servomotor 330 para moverse en la dirección del eje X para permitir que la mesa de montaje se mueva de forma rotativa en una dirección lateral, se permite que las gotitas de líquido en la bolsa de cultivo 100 se muevan de forma lateral del extremo izquierdo hacia al extremo derecho. La operación mencionada anteriormente se repite hasta que las gotitas de líquido se muevan a la parte del extremo en el lado posterior de la bolsa de cultivo 100 y se muevan de forma lateral del extremo izquierdo al extremo derecho.

20 Como se ha mencionado anteriormente, permitiendo que las proteínas se adsorban a la bolsa de cultivo 100 utilizando el aparato de inmovilización 300, la eficacia de inmovilización de las proteínas puede mejorarse adicionalmente.

25 El aparato de inmovilización 300 de esta realización se puede usar preferentemente cuando las proteínas se inmovilizan no solo en la bolsa de cultivo 100 sino también en un matraz u otros recipientes.

A continuación, se hará una explicación sobre un elemento de retención usado en el aparato de inmovilización.

30 El elemento de retención es un elemento para soportar el recipiente de cultivo de forma que la superficie inferior del mismo forme una forma semicilíndrica, y se fija en la mesa de montaje o se forma integralmente con la mesa de montaje.

35 Como se muestra en la Fig. 14, el elemento de retención 500 está provisto de un cuerpo principal 510, una parte de tapa superior 520 y una parte de presión 530.

40 La parte de cuerpo principal 510 está provista de una parte de rebaje semicilíndrico 510-1 para retener la bolsa de cultivo 100 en un estado curvo. La parte de tapa superior 520 está unida a la parte de cuerpo principal 510 cubriendo esta parte de rebaje 510-1. El método para unir la parte de tapa superior 520 a la parte de cuerpo principal 510 no está particularmente restringido. Por ejemplo, se puede proporcionar una unión por atornillado.

45 La parte de tapa superior 520 está provista de una parte de presión 530 para presionar la bolsa de cultivo 100 desde el exterior. Permitiendo que la parte de presión 530 se mueva hacia abajo, se presiona la bolsa de cultivo 100 dispuesta en la parte de rebaje 510-1 de la parte de cuerpo principal 510, mediante lo cual la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100 se puede estabilizar en una forma semicilíndrica.

50 El método para unir la parte de presión 530 a la parte de tapa superior 520 no está particularmente restringido, siempre que la parte de presión 530 pueda moverse hacia abajo y la bolsa de cultivo 100 pueda presionarse. Por ejemplo, la parte de tapa superior 520 y la parte de presión 530 se acoplan mediante un tornillo.

55 La forma de la parte de presión 530 no se limita a una varilla como se muestra en la Fig. 14. La parte de presión 530 puede tener otras formas. Por ejemplo, es preferible mantener la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100 en una forma semicilíndrica permitiendo que el extremo inferior de la parte de presión 530 sea ramificado o permitiendo que la parte de presión 530 sea una semiesfera más estable con la parte inferior de la misma siendo curva.

60 La Fig. 14 muestra un estado en el que están unidas a la parte de tapa superior 520 tres partes de presión 530. El número de las partes de presión 530 a unir no está particularmente limitado. Pueden ser una, dos o cuatro, o más.

La Fig. 15 muestra un estado en donde se usa el elemento de retención 500 y muestra cómo el elemento de retención 500 retiene la bolsa de cultivo 100.

65 Primero, en la parte de rebaje 510-1 de la parte de cuerpo principal 510 del elemento de retención 500, está

dispuesta la bolsa de cultivo 100. En este momento, la bolsa de cultivo está dispuesta de forma que la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100 se curva a lo largo de la parte de rebaje 510-1.

5 Posteriormente, la parte de tapa superior 520 se une a la parte de cuerpo principal 510, y la parte de presión 530 se mueve hacia abajo. Como resultado, la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100 se puede mantener en una forma semicilíndrica.

10 El elemento de retención 500 se fija a la mesa de montaje del aparato de inmovilización 300 de forma que la dirección del eje central de la forma semicilíndrica de la parte de rebaje 510-1 se hace idéntica a la dirección longitudinal de la mesa de montaje. Además, el elemento de retención 500 puede formarse integralmente con la mesa de montaje con esta relación de posición.

15 Si tal elemento de retención 500 retiene la bolsa de cultivo 100 de forma que la superficie inferior de la bolsa de cultivo 100 se mantenga en forma semicilíndrica, y las gotitas de líquido en la bolsa de cultivo 100 se muevan en la dirección del eje Y, dado que las gotitas de líquido siempre se posicionan en la parte más baja de la parte de rebaje 510-1 del elemento de retención 500, el movimiento de las gotitas de líquido en la dirección del eje Y se puede controlar de forma precisa.

20 Como se ha explicado anteriormente en el presente documento, de acuerdo con el método de producción de un recipiente de cultivo, es posible permitir que las proteínas se inmovilicen de forma eficaz en la superficie interna del recipiente de cultivo. Como resultado, el tiempo necesario para la inmovilización se puede acortar y, al mismo tiempo, se puede mejorar la eficacia de adsorción al recipiente de cultivo, mediante lo cual se puede realizar una cantidad necesaria de inmovilización con una cantidad pequeña de proteínas. Por consiguiente, puede reducirse la cantidad de proteínas desechadas sin inmovilizar. Además, utilizando el aparato de inmovilización de esta
25 realización, es posible mejorar adicionalmente la eficacia de inmovilización de las proteínas. Además, utilizando el elemento de retención, el movimiento de las gotitas de líquido se puede controlar de forma más precisa, mediante lo cual la eficacia de inmovilización de las proteínas puede mejorarse adicionalmente.

30 Ejemplos

A continuación en el presente documento, los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del recipiente de cultivo y el método para el cultivo de linfocitos se explicarán con referencia a las Fig. 6 y 7. La Fig. 6 es una vista esquemática que muestra los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos, y la Fig. 7 es un gráfico que muestra los resultados de los experimentos realizados en los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos. La Fig. 6 muestra una diferencia entre los
35 Ejemplos y los Ejemplos Comparativos, y se omite la ampliación del volumen de la parte de cultivo.

[Experimento 1: Producción de un recipiente de cultivo]

(Ejemplo 1)

40 Utilizando Labo Plastmill (fabricado por Toyoseiki Seisakusho, Co., Ltd.) como aparato de moldeo por extrusión de plástico, se extruyó polietileno de baja densidad para formar una película de 100 μm de grosor. Posteriormente, utilizando una selladora de impulso, se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm^2) a partir de esta película. Esta bolsa se esterilizó con rayos y para su uso en un experimento.

45 Posteriormente, se sellaron en esta bolsa aproximadamente 600 ml de aire, seguido del sellado de 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 μg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella. En este momento, el sellado se realizó de forma que las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato se pusieran en contacto solo con una superficie (superficie inmovilizadora) de las superficies internas de la bolsa.
50

Después, la bolsa se hizo oscilar con las manos durante 1 minuto a 26 °C, para mover de este modo las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato sobre la superficie inferior de la bolsa a una velocidad de 10 m/min, se formó de este modo una superficie de inmovilización en la bolsa para producir un recipiente de cultivo.
55

Entretanto, se produjeron dos recipientes de cultivo. Uno de los recipientes de cultivo se usó para medir la concentración de anticuerpos que se habían inmovilizaron y el otro se usó para una prueba de cultivo de linfocitos. Lo mismo se aplica a otros Ejemplos y Ejemplos Comparativos.

60 La medición de la concentración de anticuerpos que estaban inmovilizados se realizó de la siguiente manera.

En primer lugar, se retiró el líquido del recipiente de cultivo y se pusieron en contacto 500 μl de una solución tamponadora de fosfato (igual que la anterior) que comprendía dodecilsulfato de sodio al 1 % (fabricado por Sigma-Aldrich Japón) con la superficie de inmovilización, y se dejó reposar el recipiente durante 30 minutos. Después, se aplicó una fuerte vibración mediante un PresentMixer (fabricado por TAITEC Co., Ltd.), mediante los cual se desprendieron los anticuerpos adsorbidos. La cantidad de anticuerpos en el líquido de desprendimiento se midió
65

ES 2 703 227 T3

mediante el kit Micro BCATM Protein Assay (fabricado por ThermoFisher Scientific K.K.), y la concentración de adsorción se calculó dividiendo por un área inmovilizadora.

5 Como para el recipiente de cultivo del Ejemplo 1, se inmovilizaron anticuerpos anti CD3 solo sobre una de las superficies internas del mismo.

Como resultado de la medición de la concentración de anticuerpos que estaban inmovilizados en el recipiente de cultivo en el Ejemplo 1, la concentración de los anticuerpos anti CD3 en la superficie de inmovilización era de 40 ng/cm².

10 (Ejemplo 2)

Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 1.

15 Posteriormente, se sellaron en esta bolsa aproximadamente 600 ml de aire, seguido del sellado de 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 5 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella. En cuanto a otros puntos, para producir el recipiente de cultivo del Ejemplo 2 se realizaron los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1.

20 En el recipiente de cultivo del Ejemplo 2, se inmovilizaron anticuerpos anti CD3 solo sobre una de las superficies internas del mismo.

Como resultado de la medición de la concentración de los anticuerpos inmovilizados en el recipiente de cultivo en el Ejemplo 2, la concentración de los anticuerpos anti CD3 en la superficie de inmovilización era de 11 ng/cm².

25 (Ejemplo comparativo 1)

Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 1.

30 Posteriormente, en esta bolsa, se sellaron 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella. Las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato se pusieron en contacto con las superficies superior e inferior de la bolsa, y la bolsa se dejó reposar a 26 °C durante 60 minutos. Después, se lavó tres veces el interior de la bolsa con 40 ml de la solución tamponadora de fosfato, mediante lo cual se produjo el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 1.

35 En el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 1, se inmovilizaron anticuerpos anti CD3 sobre ambas superficies internas del mismo.

40 Como resultado de la medición de la concentración de los anticuerpos inmovilizados en el recipiente de cultivo en el Ejemplo Comparativo 1, la concentración de los anticuerpos anti CD3 en la superficie de inmovilización era de 25 ng/cm².

45 (Ejemplo comparativo 2)

Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 1.

50 Posteriormente, se sellaron en esta bolsa aproximadamente 600 ml de aire, seguido del sellado de 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 5 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella. En este momento, el sellado se realizó de forma que las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato se pusieran en contacto solo con una superficie (superficie de inmovilización) de la superficie interna de la bolsa.

55 Después, la bolsa se hizo oscilar con las manos durante 1 minuto a 26 °C para mover las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato sobre la superficie inferior de la bolsa a una velocidad de 10 m/min, se formó de este modo una superficie de inmovilización en la bolsa. Además, se lavó el interior de la bolsa tres veces con 10 ml de la solución tamponadora de fosfato, para producir de este modo el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 2.

60 En el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 2, se inmovilizaron anticuerpos anti CD3 solo sobre una superficie interna del mismo.

65 Como resultado de la medición de la concentración de los anticuerpos inmovilizados en el recipiente de cultivo en el Ejemplo Comparativo 2, la concentración de los anticuerpos anti CD3 en la superficie de inmovilización era de 8 ng/cm².

[Experimento 2: Cultivo de linfocitos]

(Etapa de activación)

5 Cada uno de los recipientes de cultivo obtenidos en los Ejemplos 1 y 2, y los Ejemplos Comparativos 1 y 2 del Experimento 1 se dividieron mediante una pinza de forma que la parte de cultivo convirtiera en de 5 cm x 11 cm.

10 Posteriormente, se suspendieron $5,8 \times 10^4$ células mononucleares humanas (fabricadas por Cell Applications, Inc.) en medio de cultivo ALyS505N-7 que contenía suero bovino fetal al 10 % (fabricado por Cell Science & Technology, Inc.) y se sellaron 4 ml de la suspensión en el recipiente de cultivo. El recipiente de cultivo se dejó reposar a 37 °C durante 75 horas, para activar de este modo los linfocitos.

15 En los Ejemplos 1 y 2, y en el Ejemplo Comparativo 2, la activación se realizó con la superficie de inmovilización del recipiente de cultivo mirando hacia abajo. Como para el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 1, como se ha mencionado anteriormente, se inmovilizó la misma cantidad de anticuerpos anti CD3 en las superficies superior e inferior de su interior. Por lo tanto, no hay distinción entre la superficie superior y la superficie inferior; es decir, no hay distinción entre la superficie de inmovilización y la superficie de no inmovilización.

(Etapa de proliferación)

20 Al recipiente de cultivo que había completado la etapa de activación, se añadieron 4 ml del medio de cultivo mencionado anteriormente. El recipiente de cultivo se invirtió y, en ese estado, el recipiente de cultivo se dejó reposar a 37 °C durante 26 horas, de modo que proliferen los linfocitos (primera etapa de proliferación en la segunda realización).

25 Posteriormente, se retiró la pinza para ampliar el volumen de la parte de cultivo del recipiente de cultivo (etapa de ampliación del volumen en la segunda realización). Después, se añadieron 20 ml del medio de cultivo mencionado anteriormente, y se dejó reposar el recipiente a 37 °C durante 62 horas para continuar la proliferación de los linfocitos (segunda etapa de proliferación en la segunda realización).

30 En el momento de cada operación después del inicio del cultivo (después de 75 horas, $75 + 26 (= 101)$ horas, $75 + 26 + 62 (= 163)$ horas, y 18 horas después de retirar la pinza ($75 + 26 + 18 (= 119)$), se contó el número de linfocitos. Los resultados se muestran en la Fig. 7.

35 Como se muestra en la Fig. 7, en los Ejemplos 1 y 2, en donde se inmovilizaron anticuerpos anti CD3 40 ng/cm^2 y 11 ng/cm^2 solo sobre una superficie del recipiente de cultivo, se hizo posible proliferar linfocitos durante la etapa de proliferación de forma significativa. En este momento, no se observó una diferencia significativa en la eficacia de proliferación entre la concentración inmovilizadora de 40 ng/cm^2 (Ejemplo 1) y la de 11 ng/cm^2 (Ejemplo 2).

40 En el Ejemplo Comparativo 1, en el que se inmovilizaron anticuerpos anti CD3 en ambas superficies del recipiente de cultivo, podría entenderse que la eficacia de proliferación de linfocitos en la etapa de proliferación se redujo significativamente en comparación con los Ejemplos 1 y 2.

45 Además, en el Ejemplo Comparativo 2, en el que la concentración de los anticuerpos anti CD3 a inmovilizar era ligeramente más reducida que la del Ejemplo 2, la mayoría de los linfocitos no pudieron hacerse proliferar durante la etapa de proliferación. A partir de este resultado, se puede entender que es preferible permitir que la concentración de los anticuerpos anti CD3 a inmovilizar sobre la superficie inmovilizadora sea de aproximadamente 10 ng/cm^2 o más.

50 Posteriormente, los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos del método de producción de un recipiente de cultivo de acuerdo con esta realización se explicarán con referencia a las Fig. 16 a 21. Las Fig. 16, 18 y 20 son vistas esquemáticas que muestra los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos, y las Fig. 17, 19 y 21 son gráficos que muestran los resultados de los experimentos de los Ejemplos y los Ejemplos Comparativos.

55 [Experimento 3: Producción de una bolsa de cultivo en la que se inmovilizan anticuerpos]

(Ejemplo 3)

60 Utilizando un Labo Plastmill (fabricado por Toyo Seiki Kogyo Co., Ltd.) como aparato de moldeo por extrusión de plástico, se extruyó polietileno de baja densidad para formar una película de $100 \mu\text{m}$ de grosor. Posteriormente, utilizando una selladora de impulso, se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm^2) a partir de esta película. Esta bolsa se esterilizó con rayos y para su uso en un experimento.

65 Posteriormente, esta bolsa se montó sobre la mesa de soporte y se sellaron en esta bolsa aproximadamente 600 ml de aire, seguido del sellado de 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía $50 \mu\text{g}$ de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella. En este momento,

el sellado se realizó de forma que las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato se pusieran en contacto solo con la superficie inferior de la superficie interna de la bolsa.

5 Después, la bolsa se hizo oscilar con las manos durante 1 minuto a 26 °C, para mover de este modo las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato sobre la superficie inferior de la bolsa a una velocidad de 10 m/min. Como resultado, los anticuerpos se adsorbieron a la superficie inferior de la bolsa, mediante lo cual se produjo una bolsa de cultivo en la que estaban inmovilizados los anticuerpos.

La medición de los anticuerpos que estaban inmovilizados se realizó de la siguiente manera:

10 En primer lugar, se retiró el líquido del recipiente de cultivo y se pusieron en contacto 500 µl de un tampón de fosfato (igual que el anterior) que comprendía dodecilsulfato de sodio al 1 % (fabricado por Sigma-Aldrich Japón) con la superficie de inmovilización, y se dejó reposar el recipiente durante 30 minutos. Después, se aplicó una fuerte vibración mediante un PresentMixer (fabricado por TAITEC Co., Ltd.), mediante lo cual se desprendieron los anticuerpos adsorbidos. La cantidad de anticuerpos en el líquido de desprendimiento se midió mediante el kit Micro BCATM Protein Assay (fabricado por ThermoFisher Scientific K.K.). La cantidad de proteínas adsorbidas por unidad de área (en lo sucesivo en el presente documento denominado concentración de adsorción) se calculó dividiendo la cantidad de anticuerpos por el área en donde se inmovilizaron los anticuerpos.

20 En el recipiente de cultivo del Ejemplo 3, se inmovilizaron anticuerpos anti CD3 solo sobre una superficie (superficie interior) del interior del mismo. Como resultado de medir la concentración de anticuerpos que se habían inmovilizado en el recipiente de cultivo en el Ejemplo 3, se encontró que la concentración de los anticuerpos anti CD3 adsorbidos era de 41,5 ng/cm².

(Ejemplo 4)

25 Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 3.

30 Posteriormente, se sellaron en esta bolsa aproximadamente 600 ml de aire, seguido del sellado de 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella.

35 Después, la bolsa se hizo oscilar con las manos durante 2,5 minutos a 26 °C, para mover de este modo las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato sobre la superficie inferior de la bolsa a una velocidad de 10 m/min, para permitir de este modo que los anticuerpos se adsorbieran a la superficie inferior de la bolsa. Posteriormente, la bolsa se dio la vuelta y después se hizo oscilar otra vez con las manos durante 2,5 minutos, para permitir de este modo que las gotitas de líquido se movieran sobre la superficie inferior de la bolsa (superficie superior antes de darle la vuelta) a una velocidad de 10 m/min. Como resultado, los anticuerpos se adsorbieron sobre ambas superficies de la pared interna de la bolsa, mediante lo cual se produjo una bolsa de cultivo en la que estaban inmovilizados los anticuerpos.

40 En el recipiente de cultivo del Ejemplo 4, los anticuerpos anti CD3 se inmovilizaron sobre ambas superficies del interior del mismo. Como resultado de medir la concentración de los anticuerpos que estaban inmovilizados en el recipiente de cultivo del Ejemplo 4, la concentración de los anticuerpos anti CD3 que estaban adsorbidos era de 31,2 ng/cm².

45 (Ejemplo comparativo 3)

Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 3.

50 Posteriormente, sin sellar aire en esta bolsa, se sellaron 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella, y esta solución tamponadora de fosfato se dejó estar en contacto con las superficies superior e inferior de la bolsa, y la bolsa se dejó reposar a 26 °C durante 60 minutos. Se lavó el interior de la bolsa tres veces con 40 ml de la solución tamponadora de fosfato, mediante lo cual se produjo una bolsa de cultivo en la que estaban inmovilizados los anticuerpos.

60 En el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 3, los anticuerpos anti CD3 se inmovilizaron sobre ambas superficies del interior del mismo. Como resultado de medir la concentración de los anticuerpos que estaban inmovilizados en el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 3, se encontró que la concentración de los anticuerpos anti CD3 que estaban adsorbidos era de 26,1 ng/cm².

(Ejemplo comparativo 4)

65 Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 3.

Posteriormente, sin sellar aire en esta bolsa, se sellaron 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada

por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella. Después, la bolsa se hizo oscilar con las manos a 26 °C durante 5 minutos, mediante lo cual se permitió que las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato se movieran en la bolsa a una velocidad de 10 m/min. Como resultado, los anticuerpos se adsorbieron a la superficie interna de la bolsa. Además, se lavó el interior de la bolsa tres veces con 10 ml de la solución tamponadora de fosfato, mediante lo cual se produjo una bolsa en la que estaban inmovilizados los anticuerpos.

En el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 4, los anticuerpos anti CD3 se inmovilizaron sobre ambas superficies del interior del mismo. Como resultado de medir la concentración de los anticuerpos que estaban inmovilizados en el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 4, se encontró que la concentración de los anticuerpos anti CD3 que estaban adsorbidos era de 23,8 ng/cm².

Como se muestra en la Fig. 17, las eficacias de adsorción (concentración de adsorción x 225 cm²/50000 ng x 100) de los anticuerpos sobre la superficie inferior del recipiente de cultivo por área, de los anticuerpos del Ejemplo 3, Ejemplo 4, Ejemplo Comparativo 3 y Ejemplo Comparativo 4 fueron del 19 %, el 14 %, el 12 % y el 11 %, respectivamente.

Es decir, de acuerdo con el método del Ejemplo 3, aunque el tiempo de inmovilización fue de 1 minuto, la eficacia de adsorción se aumentó en aproximadamente el 60 % en comparación con los resultados del Ejemplo Comparativo 3, en el que la inmovilización se realizó durante 60 minutos.

Por otro lado, en el Ejemplo Comparativo 4, en el que los anticuerpos se inmovilizaron moviendo las gotitas de líquido sin sellar un gas en el recipiente de cultivo, la eficacia de adsorción fue pequeña en comparación con el Ejemplo Comparativo 3.

Se piensa que la razón del hecho de que la eficacia de adsorción en el Ejemplo 4 fuera menor que la del Ejemplo 3 es que el área de absorción era dos veces más grande en el Ejemplo 4 que el área de absorción del Ejemplo 3.

Además, cuando los resultados del Ejemplo 4 se comparan con los resultados del Ejemplo Comparativo 4, se puede entender que permitiendo que los anticuerpos se inmovilicen después de incorporar un gas en el recipiente de cultivo mientras se mueven las gotitas de líquido, la eficacia de adsorción podría mejorarse en aproximadamente el 30 %.

Como se ha mencionado anteriormente, de acuerdo con el método de producción de un recipiente de cultivo de esta realización, es posible permitir que una mayor cantidad de anticuerpos se inmovilice en el recipiente de cultivo durante un período de tiempo más corto. Además, es posible permitir que una mayor cantidad de anticuerpos se inmovilice en un recipiente de cultivo usando anticuerpos en una cantidad más pequeña que la usada en el método convencional.

[Experimento 4: Producción de un matraz en el que se inmovilizan anticuerpos]

(Ejemplo 5)

En un matraz de cultivo en suspensión 800 (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd., fabricado de poliestireno, que tenía una superficie inferior de 225 cm²), se sellaron 10 ml de una solución tamponadora de fosfato en el estado de gotitas de líquido (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella. El matraz se hizo oscilar con las manos a 26 °C durante 5 minutos, se permitió que las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato se movieran sobre la superficie inferior de la bolsa a una velocidad de 10 m/min y se adsorbieran sobre la superficie inferior del matraz, mediante lo cual se produjo un matraz en el que había anticuerpos inmovilizados. En el Ejemplo 5, la concentración de los anticuerpos anti CD3 en el matraz en el que se inmovilizaron los anticuerpos era de 27,9 ng/cm².

(Ejemplo comparativo 5)

En un matraz de cultivo en suspensión 800 (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd., fabricado de poliestireno, que tenía una superficie inferior de 225 cm²), se pusieron 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella, y la solución de los anticuerpos se extendió sobre toda la superficie. El matraz se dejó reposar a 26 °C durante 60 horas. Como resultado, los anticuerpos se adsorbieron sobre la superficie interna del matraz, mediante lo cual se produjo un matraz en el que estaban inmovilizados los anticuerpos. En el Ejemplo Comparativo 5, la concentración de los anticuerpos anti CD3 en el matraz en el que se inmovilizaron los anticuerpos era de 27,6 ng/cm².

(Ejemplo comparativo 6)

En un matraz de cultivo en suspensión 800 (fabricado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd., fabricado de poliestireno, que tenía una superficie inferior de 225 cm²), se pusieron 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por

Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella, y la solución de los anticuerpos se extendió sobre toda la superficie. El matraz se dejó reposar a 26 °C durante 5 minutos. Como resultado, los anticuerpos se adsorbieron sobre la superficie interna del matraz, mediante lo cual se produjo un matraz en el que estaban inmovilizados los anticuerpos. En el matraz del Ejemplo Comparativo 6 en el que se inmovilizaron los anticuerpos anti-CD3, la concentración de los anticuerpos era de 21,8 ng/cm².

Como se muestra en la Fig. 19, las eficacias de adsorción de los anticuerpos por área del matraz del Ejemplo 5, Ejemplo Comparativo 5 y Ejemplo Comparativo 6 fueron del 13 %, el 12 % y el 10 %, respectivamente.

Concretamente, como se muestra en el Ejemplo Comparativo 5, en el método convencional para inmovilizar anticuerpos, en el que los anticuerpos se dejan en reposo, la eficacia de absorción fue del 12 % después de transcurridos 60 minutos desde el inicio de la inmovilización. Por otro lado, como se muestra en el Ejemplo 5, en el método de producción de un recipiente de cultivo de acuerdo con esta realización, la eficacia de absorción podría ser del 13 % después de un período de 5 minutos desde el inicio de la inmovilización.

Por consiguiente, se ha revelado que, de acuerdo con el método de producción de un recipiente de cultivo de esta realización, incluso si las proteínas están inmovilizadas en un matraz, se puede inmovilizar una cantidad equivalente de proteínas durante un período de tiempo más corto en comparación con los métodos convencionales.

[Experimento 5: Producción de una bolsa de cultivo en la que se inmoviliza fibronectina]

(Ejemplo 6)

Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 3.

Posteriormente, en esta bolsa se sellaron aproximadamente 600 ml de aire y después se sellaron de forma continua 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies Japón), en el estado de gotitas de líquido, que contenía 50 µg de fibronectina plasmática humana (fabricada por Sigma-Aldrich Japón) disuelta en ella.

La bolsa se hizo oscilar con las manos durante 1 minuto a 26 °C, mediante lo cual se permitió que las gotitas de líquido de la solución tamponadora de fosfato se movieran sobre la superficie inferior de la bolsa a una velocidad de 10 m/min. Como resultado, la fibronectina se adsorbió a la superficie inferior de la bolsa, mediante lo cual se produjo una bolsa en la que la fibronectina estaba inmovilizada.

En el recipiente de cultivo del Ejemplo 6, se inmovilizó fibronectina solo sobre un lado (superficie inferior) en el interior del mismo. Como resultado de medir la concentración de la fibronectina inmovilizada en el recipiente de cultivo del Ejemplo 6, se encontró que la concentración de la fibronectina adsorbida era de 53,6 ng/cm².

(Ejemplo comparativo 7)

Se preparó una bolsa de 11 cm x 22,5 cm (aproximadamente 225 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 3.

Posteriormente, sin sellar aire en esta bolsa, se sellaron 10 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) que contenía 50 µg de fibronectina plasmática humana (fabricada por Sigma-Aldrich Japón) disuelta en ella. Las gotitas de la solución tamponadora de fosfato se pusieron en contacto con ambas de las superficies superior e inferior en la bolsa, y la bolsa se dejó reposar a 26 °C durante 60 minutos. Se lavó el interior de la bolsa tres veces con 40 ml de la solución tamponadora de fosfato, mediante lo cual se produjo una bolsa de cultivo en la que la fibronectina estaba inmovilizada.

En el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 7, se inmovilizó fibronectina en ambas superficies del interior del mismo. Como resultado de medir la concentración de la fibronectina inmovilizada en el recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 7, se encontró que la concentración de la fibronectina adsorbida era de 30,7 ng/cm².

Como se muestra en la Fig. 21, en el Ejemplo 6 y el Ejemplo comparativo 7 las eficacias de adsorción de la fibronectina por área del recipiente de cultivo fueron del 24 % y el 14 %, respectivamente.

Concretamente, cuando se usa fibronectina como proteína, de acuerdo con el método de producción de un recipiente de cultivo de esta realización, es posible permitir que la fibronectina se inmovilice con una eficacia de absorción que es un 70 % superior a la de los métodos convencionales.

Por lo tanto, de acuerdo con el método de producción de un recipiente de cultivo de esta realización, se ha revelado que las proteínas que no son anticuerpos pueden inmovilizarse de forma eficaz en un período de tiempo corto.

[Experimento 6: Producción de una bolsa de cultivo en la que se inmovilizan anticuerpos utilizando un aparato de inmovilización]

(Ejemplo 7)

Se preparó una bolsa de 8 cm x 20 cm (aproximadamente 160 cm²) de la misma manera que en el Ejemplo 3.

5 Posteriormente, esta bolsa se montó sobre el elemento de retención en el aparato de inmovilización. Utilizando la parte de presión, la bolsa se fijó de tal forma que la superficie inferior de la misma se volvió semicilíndrica. Posteriormente, se sellaron aproximadamente 280 ml de aire y se sellaron de forma continua 2 ml de una solución tamponadora de fosfato (fabricada por Lifetechnologies, Japón) en el estado de gotitas de líquido que contenía 10 µg de anticuerpos anti CD3 (fabricados por Miltenyi Biotec K.K.) disueltos en ella.

10 Como se muestra en la Fig. 13, la mesa de montaje en el aparato de inmovilización estaba inclinada aproximadamente -50° en la dirección del eje Y (movimiento rotativo con la dirección del eje X siendo el eje central) para permitir que las gotitas de líquido se muevan hacia la parte final de la bolsa de cultivo. Posteriormente, la mesa de montaje se giró en la dirección del eje X de -10° a 10° (movimiento rotativo con la dirección del eje Y siendo el eje central) para permitir que las gotitas de líquido se muevan hacia la dirección del eje X, mediante lo cual que las gotitas de líquido se movieron de forma lateral en la bolsa de cultivo, recíprocamente desde el extremo izquierdo al extremo derecho.

15 Posteriormente, la mesa de montaje se giró 10° en la dirección del eje Y para permitir que las gotitas de líquido se muevan ligeramente hacia el lado posterior. Posteriormente, la mesa de montaje se giró otra vez en la dirección del eje X de -10° a 10° para permitir que las gotitas de líquido se muevan en la dirección del eje X, mediante lo cual que las gotitas de líquido se movieron lateralmente en la bolsa de cultivo, recíprocamente desde el extremo izquierdo al extremo derecho.

20 Las operaciones mencionadas anteriormente se repitieron hasta que el ángulo de rotación en la dirección del eje Y (ángulo de rotación del eje X) fue de 50°, mediante lo cual las gotitas de líquido se movieron sobre toda la superficie inferior de la bolsa de cultivo. Tomando esta operación como un ciclo, se realizaron cuatro ciclos (tiempo de inmovilización: 3,5 minutos, temperatura: 26 °C) y se midió la cantidad de anticuerpos inmovilizados.

25 En el recipiente de cultivo del Ejemplo 7, los anticuerpos anti CD3 se inmovilizaron solo sobre una superficie del interior del mismo. Como resultado de medir la concentración de los anticuerpos inmovilizados para el recipiente de cultivo del Ejemplo 7, se encontró que la concentración de los anticuerpos anti CD3 adsorbidos era de 30,1 ng/cm².

30 Por consiguiente, la eficacia de adsorción de los anticuerpos por área del recipiente de cultivo en el Ejemplo 7 (concentración de adsorción x 160 cm²/10000 ng x 100) fue del 48 %. Esta eficacia de adsorción fue 4 veces mayor que la eficacia de adsorción del recipiente de cultivo del Ejemplo Comparativo 3 (12 %).

35 Como se ha mencionado anteriormente, al producir un recipiente de cultivo utilizando el aparato de inmovilización de esta realización, se puede obtener un recipiente de cultivo que presente una alta eficacia de adsorción que no se puede producir con recipientes de cultivo convencionales.

40 La presente invención no se limita a las realizaciones o ejemplos mencionados anteriormente, y es obvio que son posibles diversas modificaciones dentro del ámbito de la presente invención.

45 Por ejemplo, el tamaño de un recipiente de cultivo, el tipo de linfocitos, el tipo de medio de cultivo, el tipo de proteínas, o similares, pueden cambiarse apropiadamente de forma que sean distintos de los de los Ejemplos.

Aplicabilidad industrial

50 La presente invención se puede utilizar preferentemente para cultivar una gran cantidad de linfocitos usando un único recipiente de cultivo, mientras se elimina la problemática de la transferencia de las células activadas o del riesgo de contaminación. Además, la presente invención se puede utilizar preferentemente para producir un recipiente de cultivo en el que las proteínas se inmovilizan de forma eficaz en la superficie interna del mismo durante en un período de tiempo corto.

55 Explicación de los números de referencia

- 60 10. Recipiente de cultivo
11. Superficie de inmovilización
12. Superficie de no inmovilización
13. Tubo
20. Anticuerpos
30. Linfocitos
40. Líquido de cultivo
65 50. Elemento de división
60. Recipiente de recubrimiento externo

- 70. Recipiente de embalaje
- 100. Bolsa de cultivo
- 110. Superficie de inmovilización
- 120. Superficie de no inmovilización
- 5 130. Tubo
- 200. Proteínas
- 300. Aparato de inmovilización
- 310. Mesa de soporte para moverse en la dirección del eje X
- 320. Columna de soporte
- 10 330. Servomotor para moverse en la dirección del eje X
- 340. Caja de engranajes para moverse en la dirección del eje X
- 350. Sensor de detección de límite en origen para el eje Y
- 360. Mesa de soporte para moverse en la dirección del eje Y
- 370. Servomotor para moverse en la dirección del eje Y
- 15 380. Caja de engranajes para moverse en la dirección del eje Y
- 390. Sensor de detección de límite en origen para el eje X
- 400. Base de apoyo
- 500. Elemento de retención
- 510. Parte de cuerpo principal
- 20 510-1. Parte de rebaje
- 520. Parte de tapa superior
- 530. Parte de presión

REIVINDICACIONES

1. Un recipiente de cultivo para el cultivo de linfocitos, donde el recipiente de cultivo está formado de una película permeable a los gases, se inmovilizan anticuerpos solo sobre una de las superficies internas del recipiente enfrentadas entre sí, para proporcionar de este modo una superficie de inmovilización y una superficie de no inmovilización, y se inmovilizan anticuerpos anti CD3 en la superficie de inmovilización, donde la superficie de inmovilización y la superficie de no inmovilización se mantienen en un estado en que no están en contacto entre sí, **caracterizado por que** los anticuerpos anti CD3 se inmovilizan en la superficie de inmovilización a una concentración de 10 a 300 ng/cm² y **por que** se sella un gas en una cantidad de 0,01 a 4 ml por cm² del área de la superficie inferior del recipiente.
2. Un método para el cultivo de linfocitos utilizando el recipiente de cultivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- una etapa de activación en la que se sellan linfocitos y un líquido de cultivo en el recipiente de cultivo, y el recipiente de cultivo se dispone de forma que la superficie de inmovilización en el recipiente de cultivo se convierte en una superficie inferior, para activar de este modo los linfocitos; y
 - una etapa de proliferación en la que el recipiente de cultivo se invierte y se dispone de forma que la superficie de no inmovilización en el recipiente de cultivo se convierte en una superficie inferior, de modo que proliferen los linfocitos, donde, en la etapa de activación, se divide el recipiente de cultivo mediante un elemento de división para formar una parte de cultivo en el recipiente de cultivo, y se sellan linfocitos y un líquido de cultivo en esta parte de cultivo y donde, la etapa de proliferación comprende:
 - una primera etapa de proliferación en la que el recipiente de cultivo se invierte y se dispone de forma que la superficie de no inmovilización en el recipiente de cultivo se convierte en una superficie inferior, de modo que proliferen los linfocitos,
 - una etapa de ampliación del volumen en la que el elemento de división se mueve o se retira, para ampliar de este modo el volumen de la parte de cultivo, y
 - una segunda etapa de proliferación en la que los linfocitos se hacen proliferar después de que se amplía el volumen de la parte de cultivo.

Fig.1

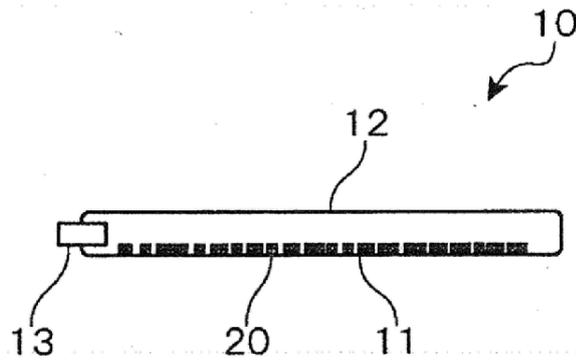
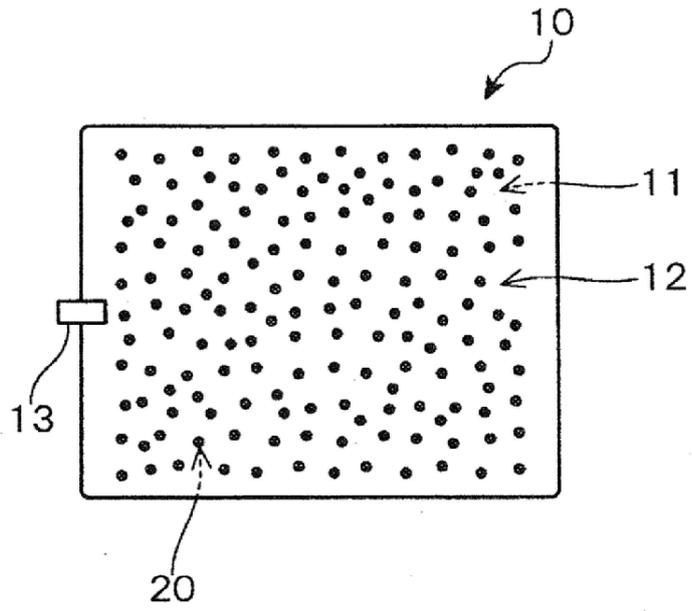


Fig.2

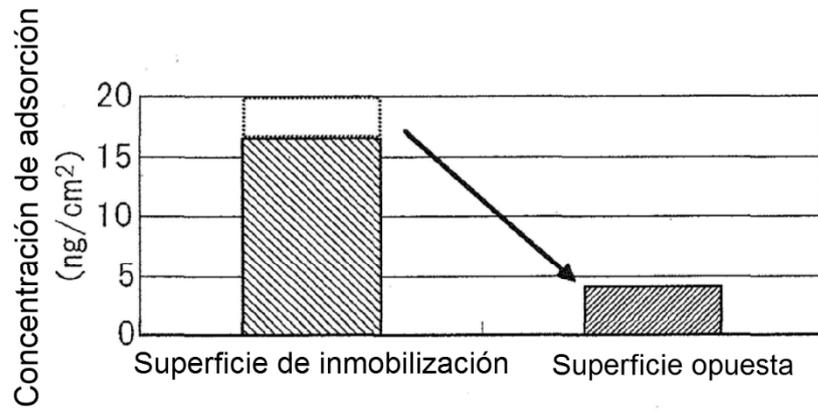


Fig. 3A

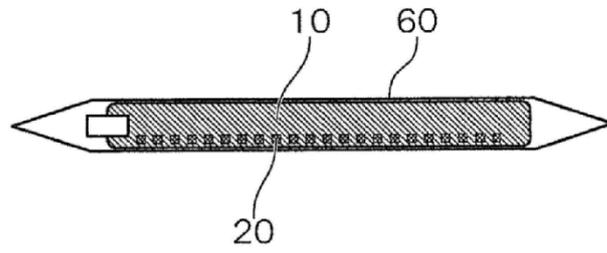


Fig. 3B

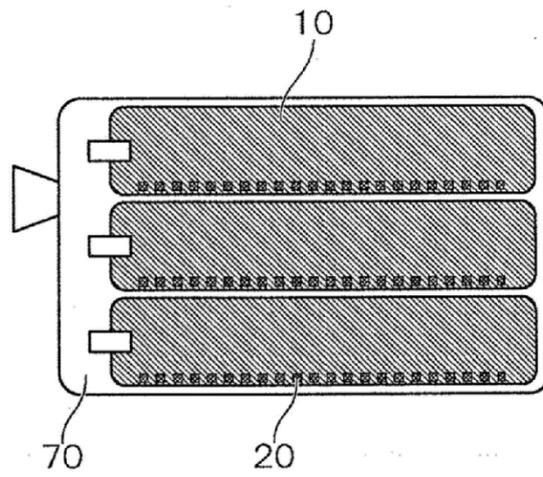


Fig. 4

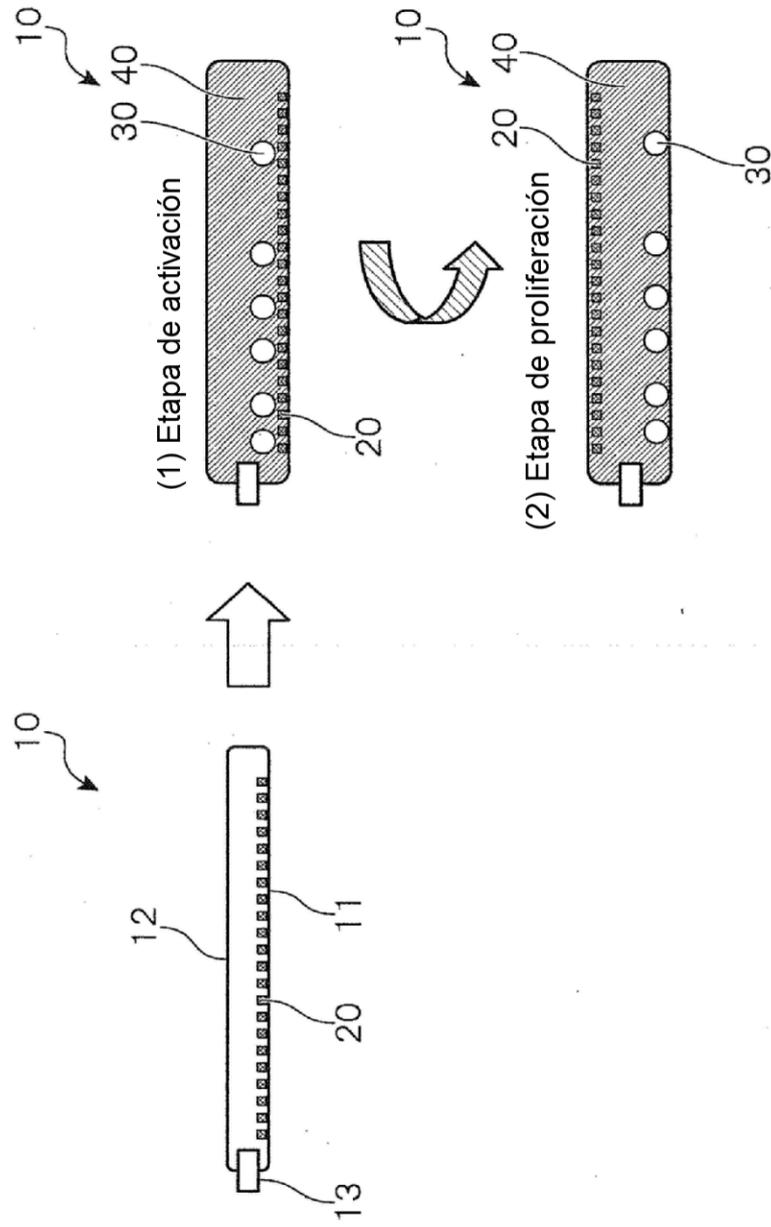


Fig. 5

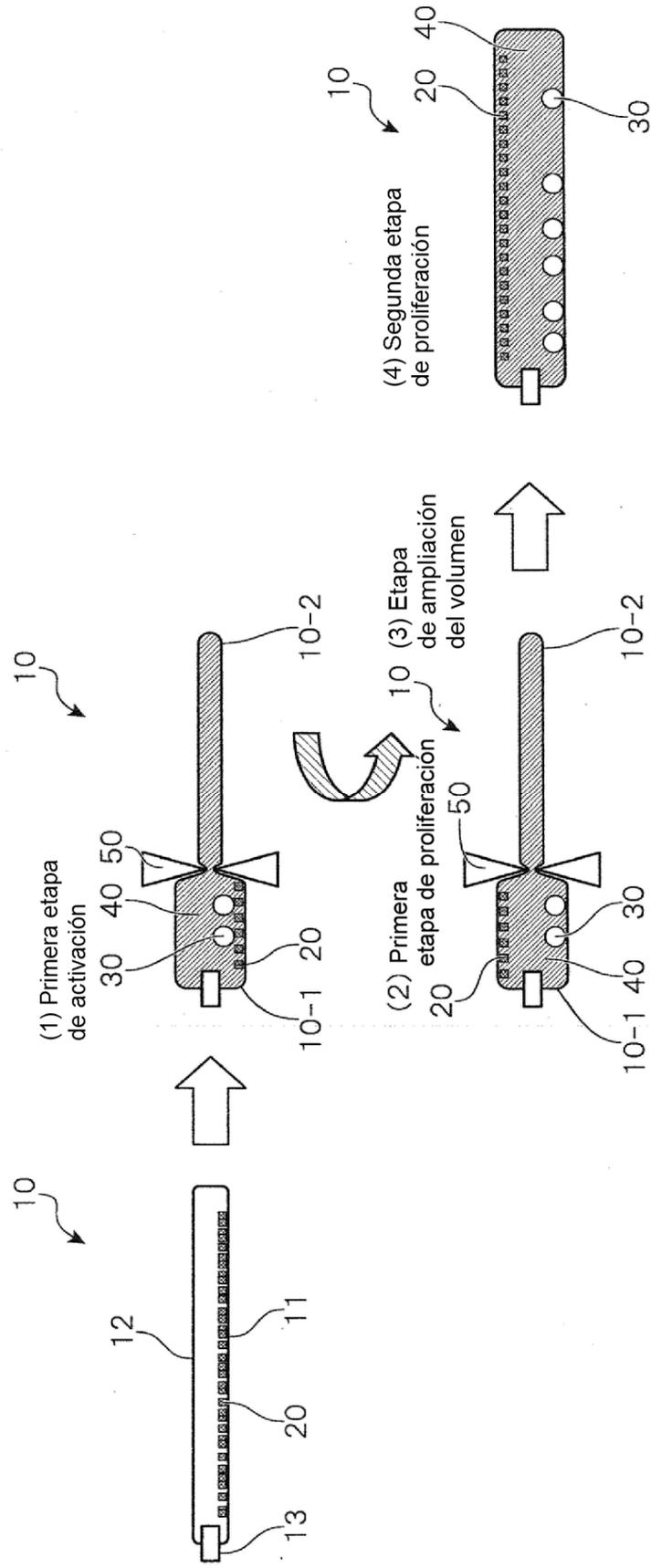


Fig. 6

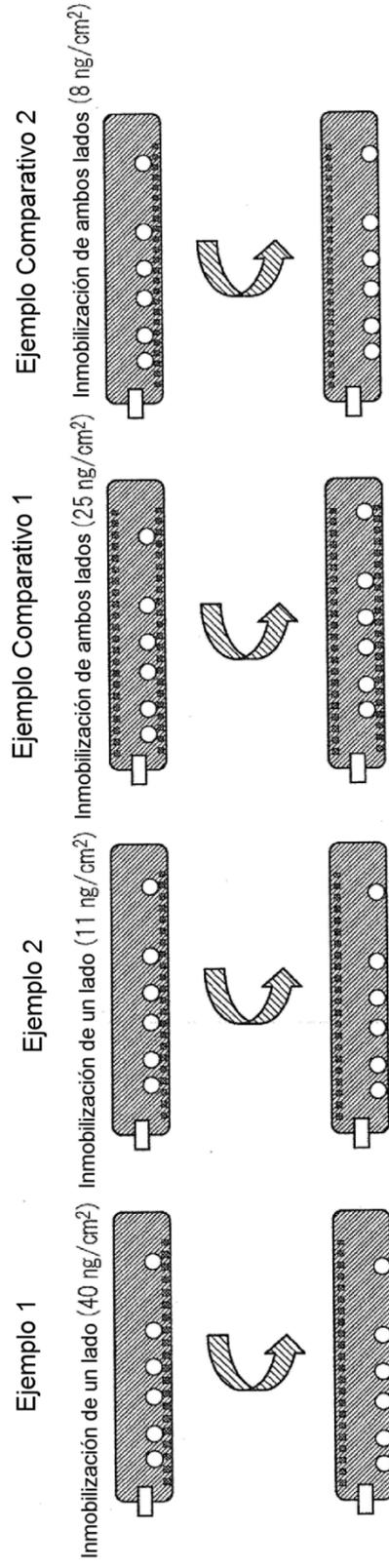


Fig. 7

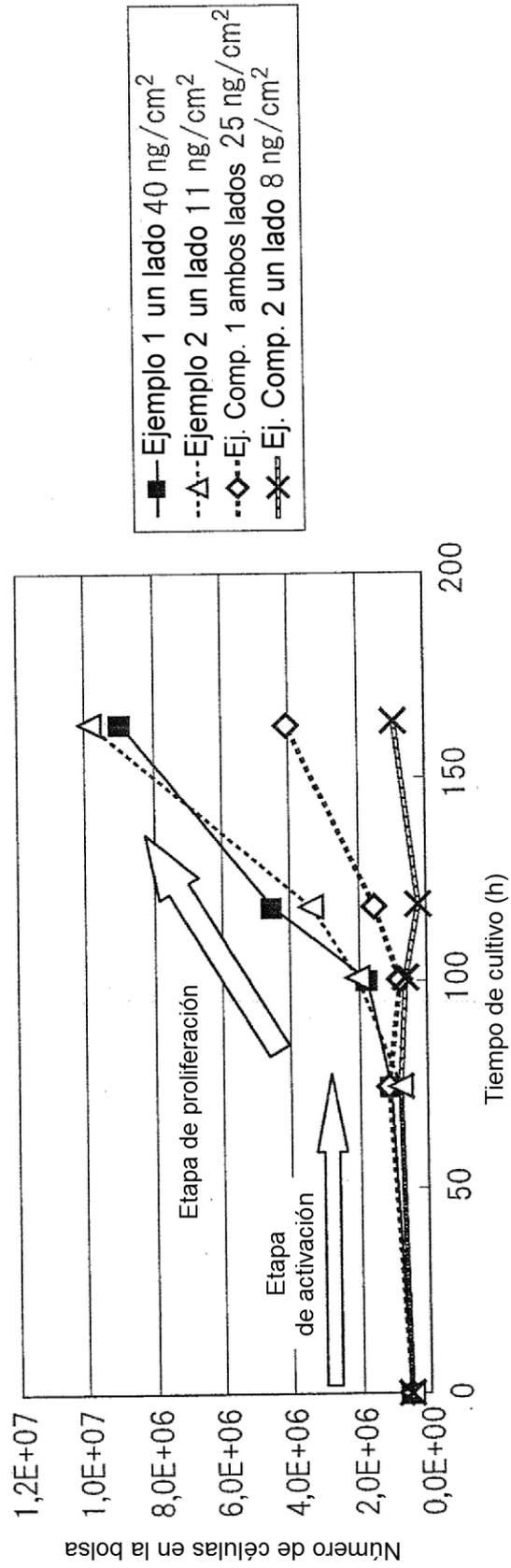


Fig. 8

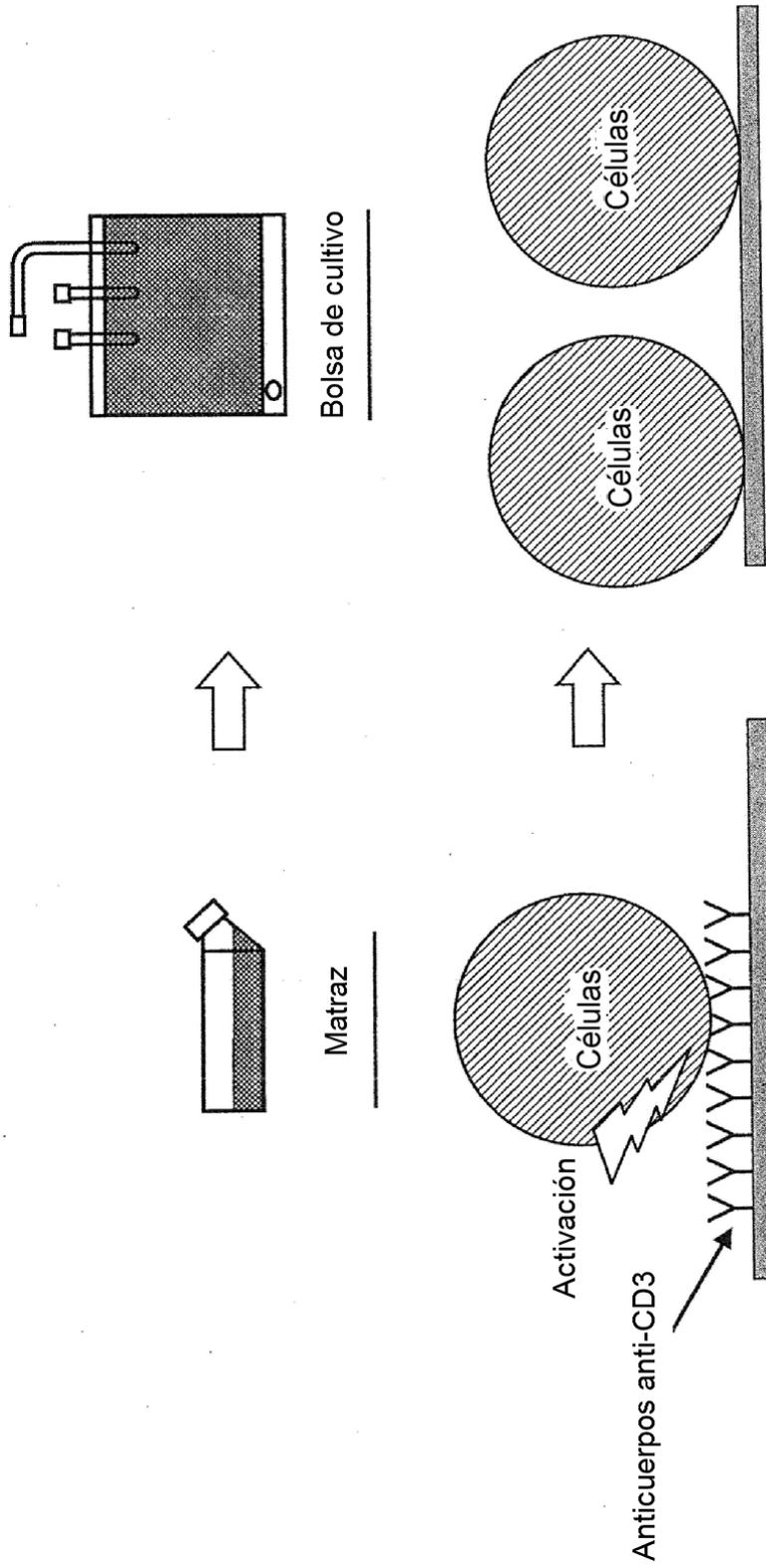


Fig. 9

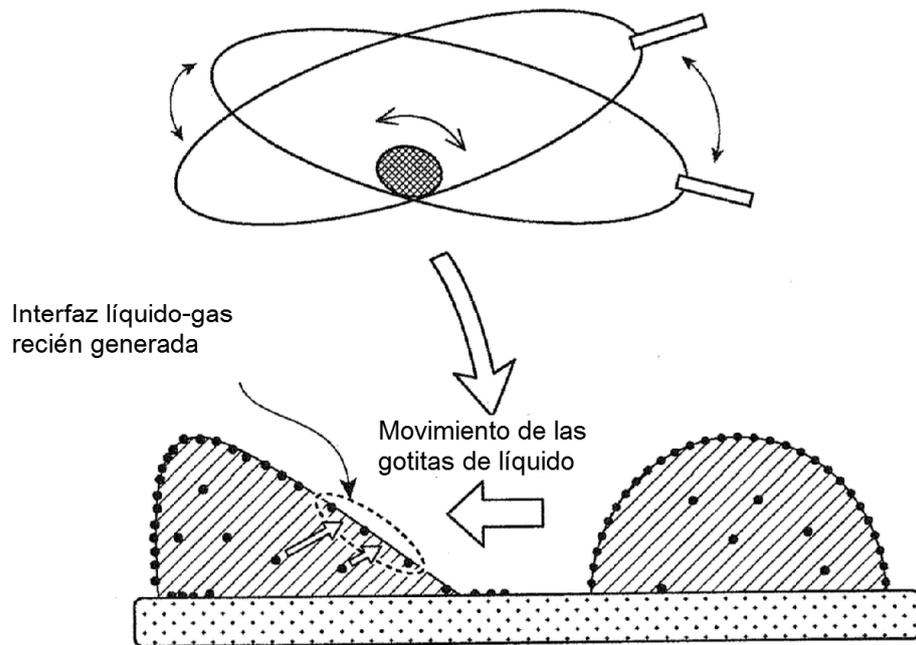


Fig.10

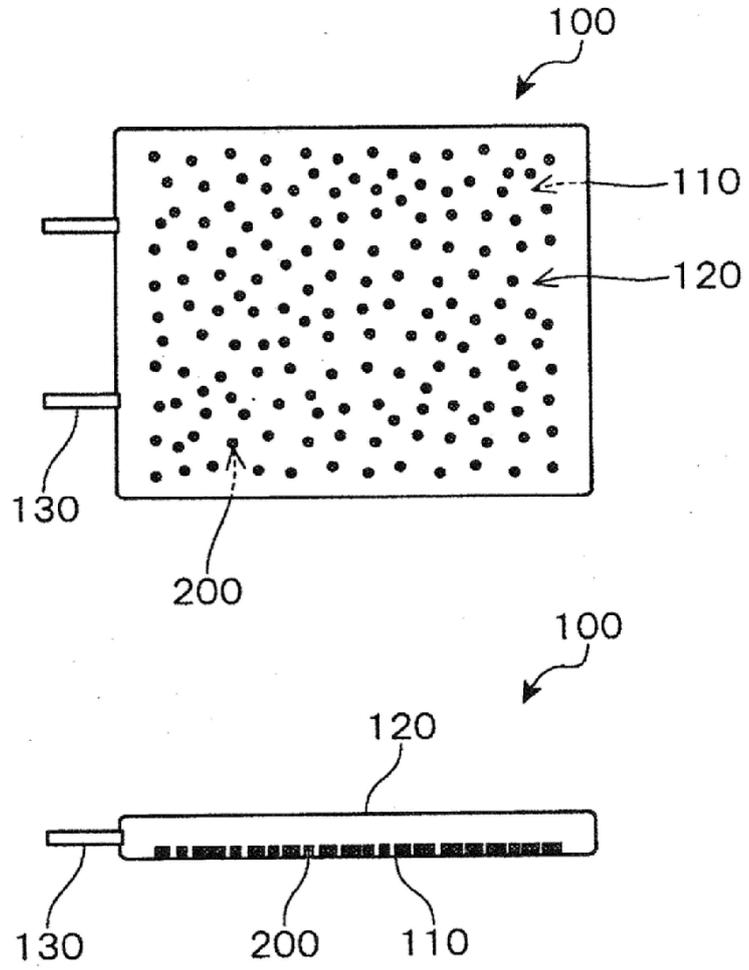


Fig.11

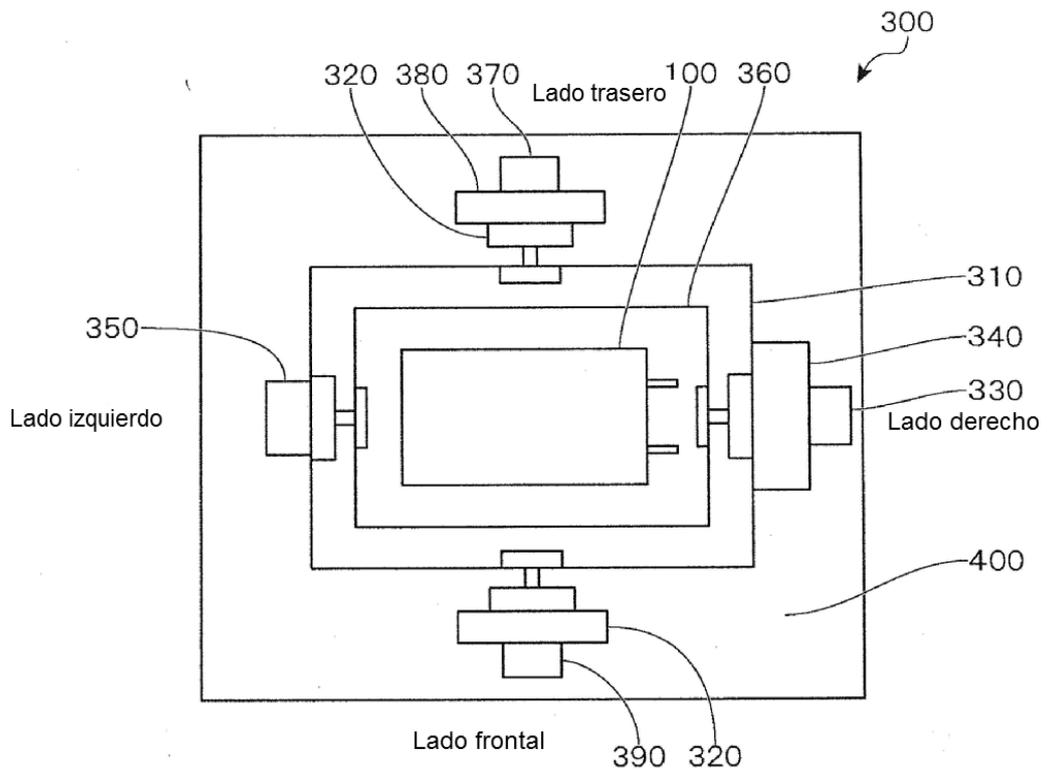
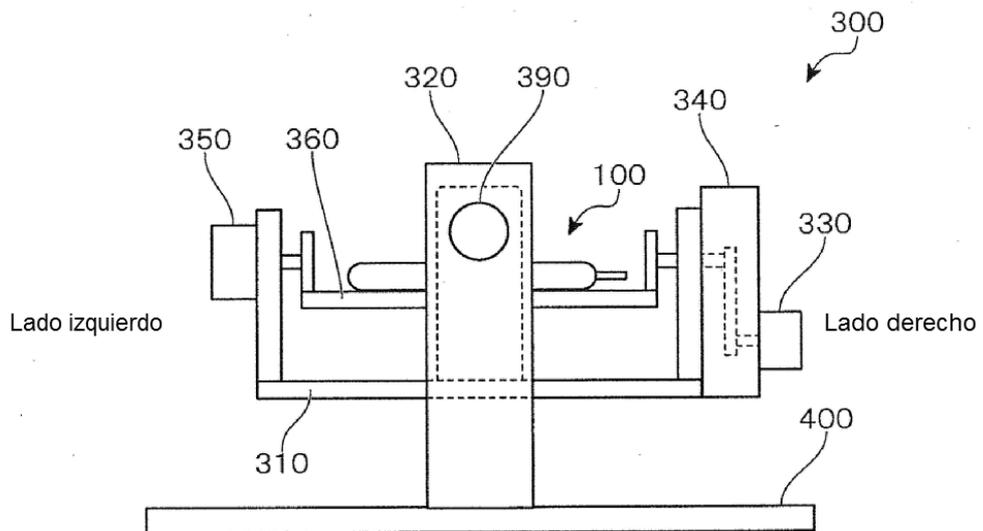


Fig.12



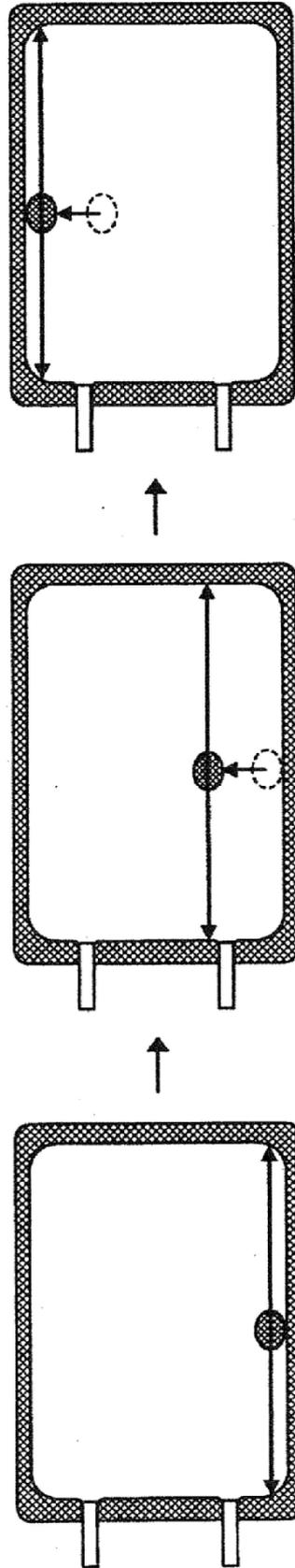


Fig. 13

Fig.14

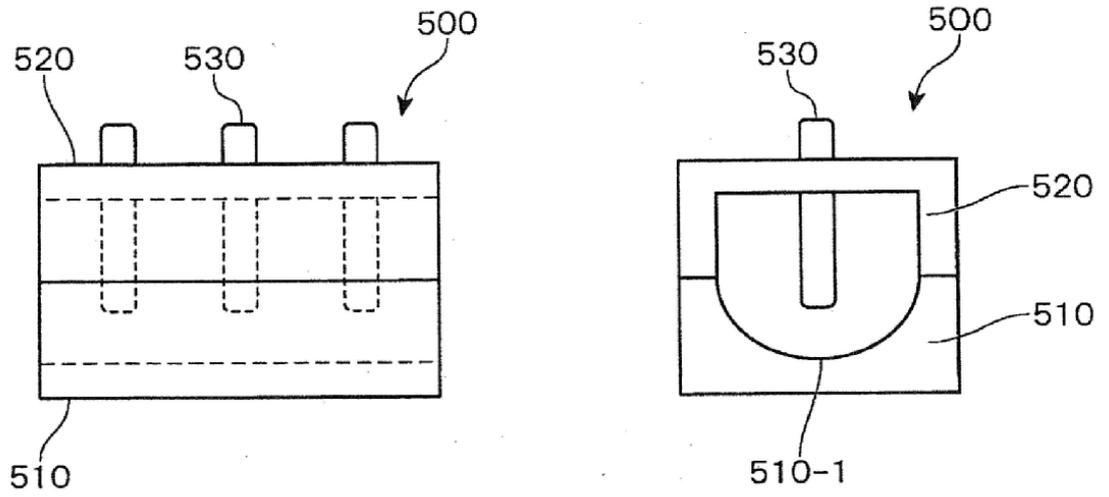


Fig.15

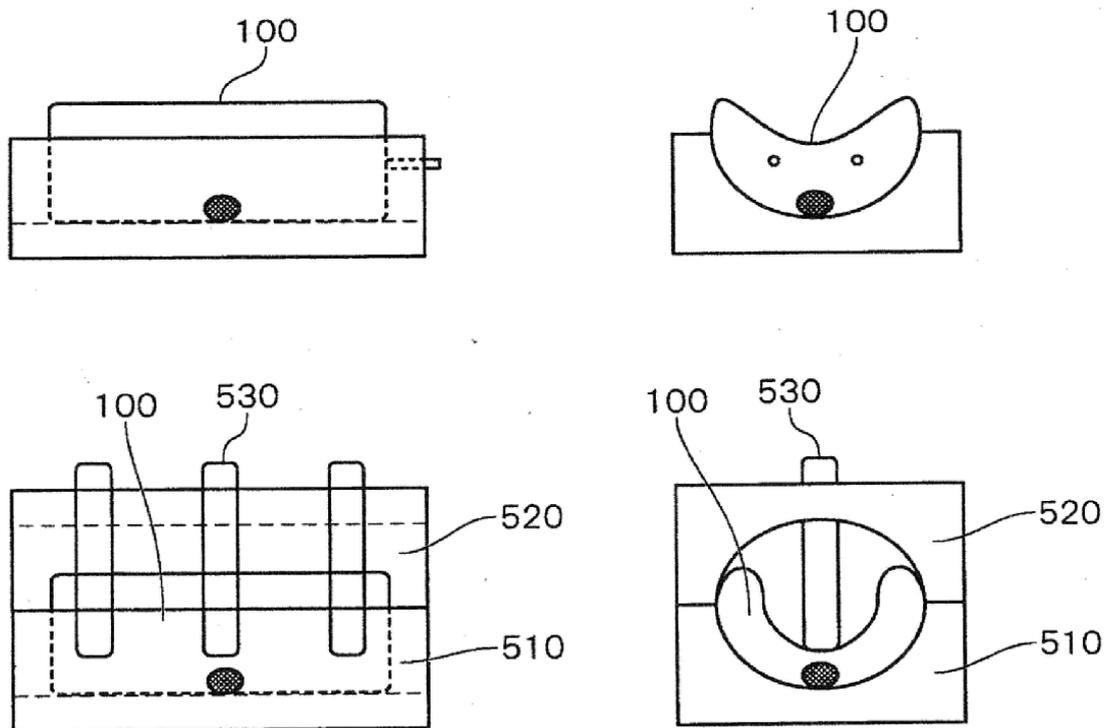


Fig. 16

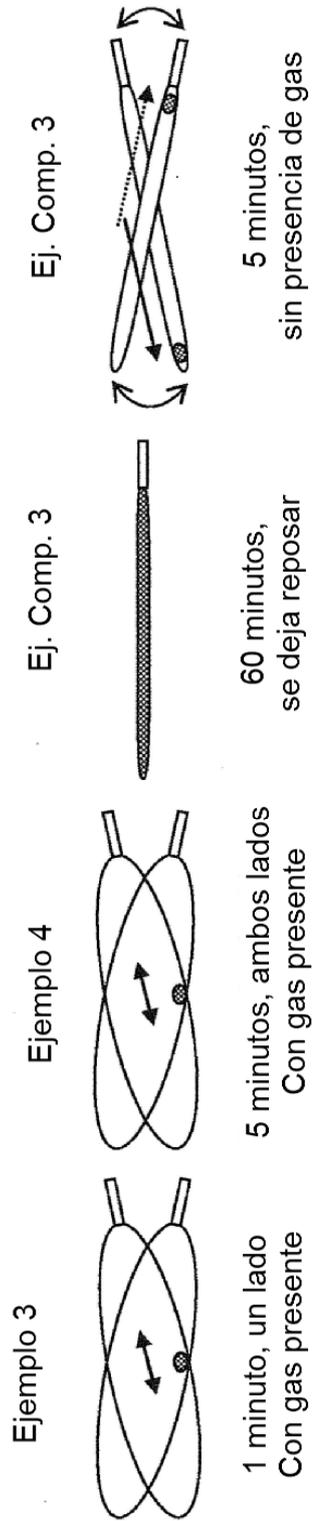


Fig. 17

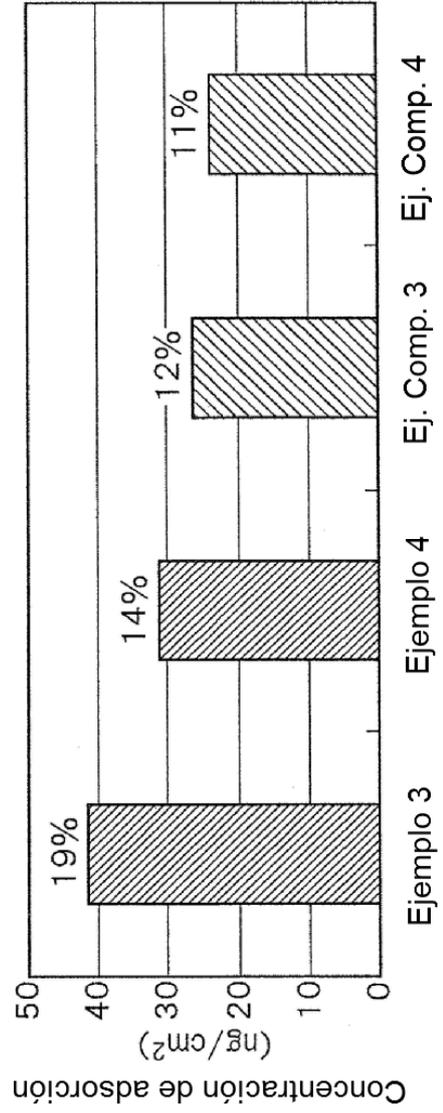


Fig.18

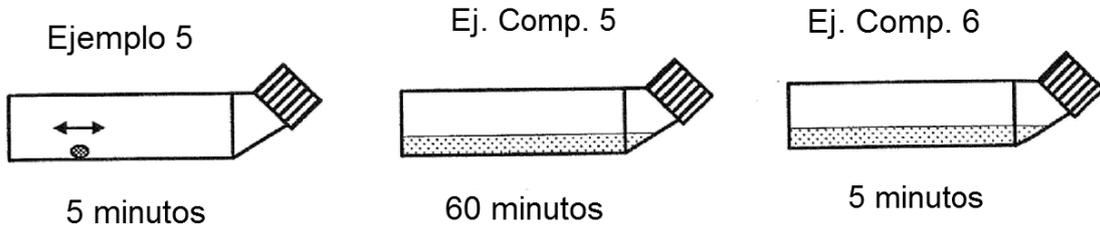


Fig.19

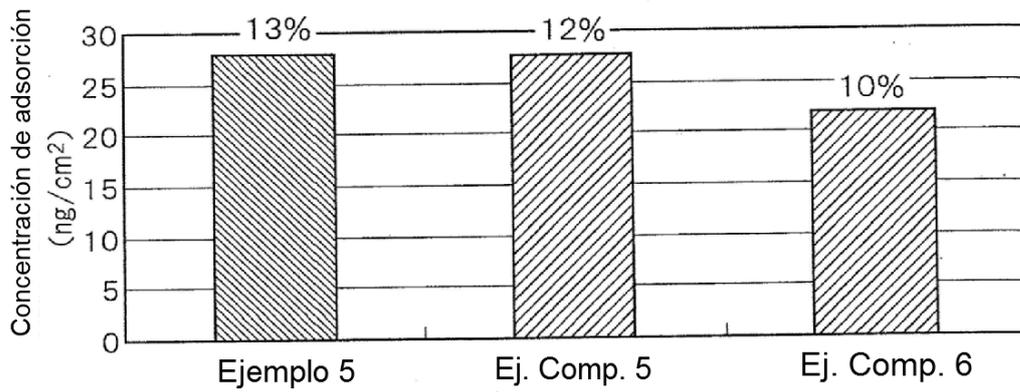


Fig.20

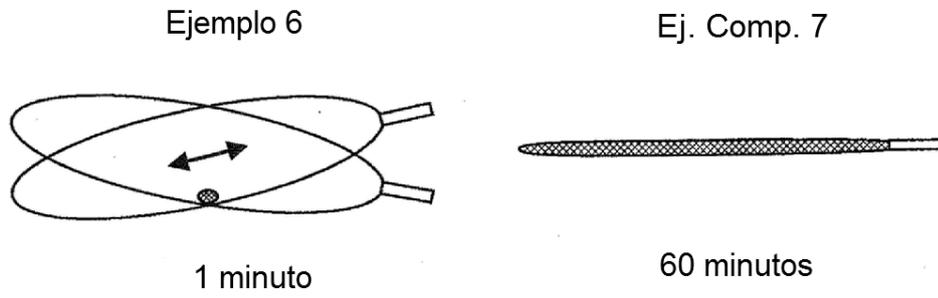


Fig.21

