



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120035656 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 23

(21) 申请号 202380070300.4

(22) 申请日 2023.09.13

(30) 优先权数据

10-2022-0127105 2022.10.05 KR

10-2023-0041264 2023.03.29 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.03.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2023/013756 2023.09.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/076030 KO 2024.04.11

(71) 申请人 杜塞尔股份有限公司

地址 韩国

(72) 发明人 金耻花 黄致渊

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51) Int.Cl.

C12N 5/078 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页 附图75页

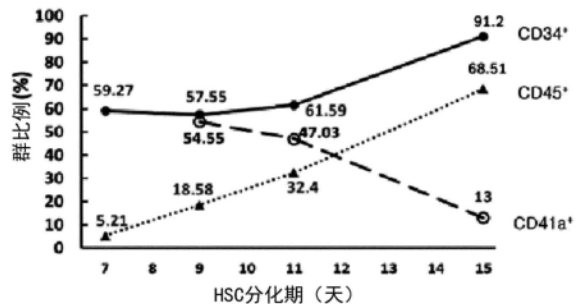
(54) 发明名称

用于生产血小板的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于生产血小板的方法。本发明的方法包括以下的步骤: (S1) 培养多能干细胞以获得含有造血干细胞的培养物; (S2) 当培养物中不表达CD41a的细胞构成总细胞的至少15%时, 从培养物中获得悬浮细胞群; 和 (S3) 使悬浮细胞群分化为巨核细胞, 由此该方法能够以高产量生产高质量血小板。

HSC分化期间的标记物表达的改变



1. 一种用于生产血小板的方法,其包括:
  - (S1) 培养多能干细胞以获得含有造血干细胞的培养物;
  - (S2) 当所述培养物中含有的细胞中CD41a<sup>-</sup>细胞的数量为细胞的总数的至少15%时,从所述培养物中获得悬浮细胞群;和
  - (S3) 在第一培养基中使所述悬浮细胞群分化为巨核细胞。
2. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其进一步包括(S4) 在含有血小板生成素的第二培养基中培养所述巨核细胞和使所述巨核细胞成熟。
3. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中(S1) 包括以下步骤:
  - (S1a) 在含有GSK3抑制剂的第三培养基中培养所述多能干细胞;
  - (S1b) 在含有血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的第四培养基中培养在所述第三培养基中培养的细胞;和
  - (S1c) 在含有血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、和转化生长因子 $\beta$ 信号传导抑制剂的第五培养基中培养在所述第四培养基中培养的细胞。
4. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中所述悬浮细胞群具有总细胞计数的50%以下的CD45<sup>+</sup>细胞计数。
5. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中所述悬浮细胞群具有总细胞计数的45%以上的CD34<sup>+</sup>细胞计数。
6. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中所述悬浮细胞群具有总细胞计数的85%以下的CD41a<sup>-</sup>细胞计数。
7. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其进一步包括(S0) 以2,000至20,000个细胞/cm<sup>2</sup>在培养容器的底部接种所述多能干细胞。
8. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中所述培养物进一步包括造血祖细胞和巨核细胞祖细胞。
9. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中所述第一培养基包含血小板生成素、干细胞因子、白介素-3、和白介素-6。
10. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中,在(S2) 中,当所述培养物中含有的细胞中CD41a<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的40至85%时,从所述培养物中获得悬浮细胞群。
11. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中,在(S2) 中,当所述培养物中含有的细胞中CD34<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的45至80%时,从所述培养物中获得悬浮细胞群。
12. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中,在(S2) 中,当所述培养物中含有的细胞中CD45<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的1至50%时,从所述培养物中获得悬浮细胞群。
13. 根据权利要求1所述的用于生产血小板的方法,其中所述多能干细胞为人诱导多能干细胞。
14. 根据权利要求4所述的用于生产血小板的方法,其中所述悬浮细胞群的CD45<sup>+</sup>细胞的比例低于CD41a<sup>+</sup>细胞的比例。
15. 一种用于生产血液制品的方法,其包括将通过权利要求1至14中任一项所述的方法

生产的血小板与其他血液组分混合的步骤。

## 用于生产血小板的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于生产血小板的方法。本说明书是在以下国家研究项目的支持下准备的。

[0002] [表1]

| 类别     | 国家研究项目1                      | 国家研究项目2                               |
|--------|------------------------------|---------------------------------------|
| 项目编号   | 1465040518                   | 1415187966                            |
| 部门     | 卫生福利部                        | 贸易、工业和能源部                             |
| 研究管理机构 | (基金会)韩国再生医学基金                | 韩国技术进步研究院                             |
| 研究计划名称 | 再生医学中的转化技术的发展                | 材料和组分技术发展项目                           |
| 研究项目名称 | 源自干细胞的i-aPLP™用于骨关节炎疗法的临床研究批准 | 用于代替胎牛血清(FBS)的人造人血小板裂解物(i-ahPLys™)的发展 |
| 赞助商    | DewCell, Inc.                | DewCell, Inc.                         |
| 研究周期   | 2023.04.01-2026.12.31        | 2023.04.01-2025.12.31                 |

### 背景技术

[0004] 将血小板制剂施用至患有手术或受伤期间的大出血、或与化疗之后的血小板减少症相关的出血的患者,用于治疗和预防这些症状的目的。

[0005] 目前,血小板制剂的生产依赖于来自健康志愿者的献血。最近,献血者的数量减少,并且预期未来会血液短缺。因此,血小板的稳定供应是该技术领域的重要问题。

[0006] 传统的血小板制剂具有高的细菌污染的风险,这可能会在血小板输注之后导致严重感染。因此,临床环境中对更安全血小板制剂存在持续需求。

[0007] 为了满足该需求,最近已开发用于从体外培养的巨核细胞生产血小板的方法。然而,还没有以高产量获得血小板,并且该过程不是经济可行的,需要技术改进。

### 发明内容

[0008] 发明要解决的问题

[0009] 本发明的目的是提供用于以高产量生产人造血小板的方法。

[0010] 本发明的另一个目的是提供用于以高工艺效率(process efficiency)生产血小

板的方法。

[0011] 用于解决问题的方案

[0012] 1.一种用于生产血小板的方法,其包括:(S1)培养多能干细胞以获得含有造血干细胞的培养物;(S2)当培养物中含有的细胞中CD41a<sup>-</sup>细胞的数量为细胞的总数的至少15%时,从培养物中获得悬浮细胞群;和(S3)在第一培养基中使悬浮细胞群分化为巨核细胞。

[0013] 2.根据上述1的用于生产血小板的方法,其进一步包括(S4)在含有血小板生成素的第二培养基中培养巨核细胞和使巨核细胞成熟。

[0014] 3.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中(S1)包括以下步骤:(S1a)在含有GSK3抑制剂的第三培养基中培养多能干细胞;(S1b)在含有血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的第四培养基中培养在第三培养基中培养的细胞;和(S1c)在含有血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、和转化生长因子 $\beta$ 信号传导抑制剂的第五培养基中培养在第四培养基中培养的细胞。

[0015] 4.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中悬浮细胞群具有总细胞计数的50%以下的CD45<sup>+</sup>细胞计数。

[0016] 5.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中悬浮细胞群具有总细胞计数的45%以上的CD34<sup>+</sup>细胞计数。

[0017] 6.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中悬浮细胞群具有总细胞计数的85%以下的CD41a<sup>-</sup>细胞计数。

[0018] 7.根据上述1的用于生产血小板的方法,其进一步包括(S0)以2,000至20,000个细胞/cm<sup>2</sup>在培养容器的底部接种多能干细胞。

[0019] 8.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中培养物进一步包含造血祖细胞和巨核细胞祖细胞。

[0020] 9.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中第一培养基包含血小板生成素、干细胞因子、白介素-3、和白介素-6。

[0021] 10.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中,在(S2)中,当培养物中含有的细胞中CD41a<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的40至85%时,从培养物中获得悬浮细胞群。

[0022] 11.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中,在(S2)中,当培养物中含有的细胞中CD34<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的45至80%时,从培养物中获得悬浮细胞群。

[0023] 12.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中,在(S2)中,当培养物中含有的细胞中CD45<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的1至50%时,从培养物中获得悬浮细胞群。

[0024] 13.根据上述1的用于生产血小板的方法,其中多能干细胞为人诱导多能干细胞。

[0025] 14.根据上述4的用于生产血小板的方法,其中悬浮细胞群的CD45<sup>+</sup>细胞的比例低于CD41a<sup>+</sup>细胞的比例。

[0026] 15.一种用于生产血液制品的方法,其包括将通过上述1至14中任一项的方法生产的血小板与其他血液组分混合的步骤。

[0027] 发明的效果

[0028] 本发明的用于生产血小板的方法不需要CD41a<sup>+</sup>细胞的分离和纯化,这是因为巨核细胞从含有至少15% CD41a<sup>-</sup>细胞的悬浮细胞群生产。

[0029] 本发明的用于生产血小板的方法能够实现快速且经济的血小板生产,这是因为当

悬浮细胞群满足某些要求时可以进行后续过程。

[0030] 本发明的用于生产血小板的方法具有优异的向巨核细胞的分化效率和血小板生产效率。

[0031] 本发明的用于生产血小板的方法简单,不需要复杂的设备,并且就时间和成本而言是有利的。

[0032] 根据本发明的方法生产的血小板可以由刺激剂(例如,ADP(二磷酸腺苷)、胶原蛋白、纤维蛋白原等)激活以增加PAC-1和CD62p表达。这确认了本发明的血小板是具有正常功能的血小板。

[0033] 根据本发明的方法生产的血小板可以表现出对与血小板减少或功能障碍有关的疾病的治疗或预防作用。

### 附图说明

[0034] 图1是人诱导多能干细胞的培养过程的实施方案。

[0035] 图2是确认制备例1-1至1-4和比较制备例1-1的悬浮细胞群的表面标记物(CD34、CD45、CD41a)的结果。

[0036] 图3是确认制备例1-1至1-3和比较制备例1-1的悬浮细胞群的表面标记物(CD34、CD45、CD41a)的结果。

[0037] 图4是用于获得实施例1和2的细胞培养物的过程。

[0038] 图5是实施例1的细胞培养物的照片。

[0039] 图6是用于获得比较例1的细胞培养物的过程。

[0040] 图7是比较例1的细胞培养物的照片。

[0041] 图8显示出实施例1的细胞表达巨核细胞特异性标记物。

[0042] 图9显示出实施例2的细胞表达巨核细胞特异性标记物。

[0043] 图10显示出比较例1的细胞不表达巨核细胞特异性标记物。

[0044] 图11显示出实施例1的细胞通过ADP处理而激活,并且PAC-1和CD62p表达增加。

[0045] 图12显示出实施例2的细胞通过ADP处理而激活,并且PAC-1和CD62p表达增加。

[0046] 图13是在制备例1-2的悬浮细胞群中选择CD41a<sup>+</sup>细胞的结果。

[0047] 图14显示实施例1(制备例1-2)和比较例2中CD41a<sup>+</sup>/CD42b<sup>+</sup>的比例。

[0048] 图15显示出实施例1表现出相比于比较例2高约40倍的细胞增殖能力。

[0049] 图16是确认制备例3-1至3-6和比较制备例3-1和3-2的悬浮细胞群的表面标记物(CD34、CD45、CD41a)的结果。

[0050] 图17至图22显示出实施例3至8表达巨核细胞和血小板特异性标记物。

[0051] 图23和图24显示出比较例3和4不表达巨核细胞和血小板特异性标记物。

### 具体实施方式

[0052] 本发明提供用于生产血小板的方法,其包括以下步骤:(S1)培养多能干细胞以获得含有造血干细胞的培养物;(S2)当培养物中含有的细胞中不表达CD41a的细胞的数量为细胞的总数的至少15%时,从培养物中获得悬浮细胞群;和(S3)在第一培养基中使悬浮细胞群分化为巨核细胞。

[0053] 本发明的生产方法可以进一步包括(S0)以2,000至20,000个细胞/cm<sup>2</sup>在培养容器的底部接种多能干细胞。

[0054] 本发明的生产方法可以进一步包括(S4)在含有血小板生成素的第二培养基中培养巨核细胞和使巨核细胞成熟。

[0055] 本发明的生产方法可以进一步包括(S5)从在(S4)中获得的培养物获得血小板。

[0056] 在下文中,将描述从(S0)至(S5)的血小板生产过程。

[0057] (S0) 步骤

[0058] (S0)是以2,000至20,000个细胞/cm<sup>2</sup>在培养容器的底部接种多能干细胞的步骤。

[0059] 多能干细胞包括诱导多能干细胞(iPSC)或胚胎干细胞(ESC)。

[0060] 诱导多能干细胞(iPSC)是指不具有多能性但是通过人工重编程过程(artificial reprogramming process)获得多能性的细胞。

[0061] 诱导多能干细胞(iPSC)可以源自选自由以下组成的组中的个体:人、非人灵长类动物、啮齿类动物(小鼠、大鼠)、有蹄类动物(牛、绵羊等)、犬科动物(家犬和野狗)、猫科动物(家猫和野猫诸如狮子、老虎、猎豹)、兔子、仓鼠、山羊、大象、熊猫(包括大熊猫)、猪、浣熊、马、斑马、和海洋哺乳动物(海豚、鲸等)。

[0062] 诱导多能干细胞可以是人诱导多能干细胞(hiPSC)。

[0063] 诱导多能干细胞可以使用小鼠和/或人细胞生成。例如,诱导多能干细胞可以使用胚胎组织、胎儿组织、新生儿组织、和成人组织生成。

[0064] 诱导多能干细胞实际上可以源自处于任何发育阶段的任何体细胞作为起点。体细胞可以但不限于源自胚胎供体、胎儿供体、新生儿供体、青少年供体、或成人供体。体细胞可以是但不限于成纤维细胞,诸如通过皮肤样本或活检获得的皮肤成纤维细胞、来自滑膜组织的滑膜细胞、口腔细胞(buccal cell)、或肺成纤维细胞。

[0065] 多能干细胞在接种在培养容器的底部之后进行贴壁和培养。

[0066] 培养容器可以是任何类型而没有限制,只要其用于本领域中的细胞培养即可。例如,其可以是中或小培养容器。其也可以是细胞培养瓶诸如T25、T75、T175、或T225。

[0067] 以2,000至20,000个细胞/cm<sup>2</sup>接种多能干细胞就细胞汇合度(cell confluency)而言是优选的。当以该量接种时,细胞汇合度可以为70%至95%、75%至95%、80%至95%、或85%至95%,并且多能干细胞得以适当地培养和分化,使得含有足够量的造血干细胞、造血祖细胞、和巨核细胞祖细胞等的培养物可以在随后描述的(S1)步骤中获得。

[0068] 如果将多能干细胞以小于2,000个细胞/cm<sup>2</sup>接种在培养容器的底部,则在获得(S2)的悬浮细胞群时细胞汇合度可以为70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下等。此外,如果将多能干细胞以超过20,000个细胞/cm<sup>2</sup>接种在培养容器的底部,则细胞汇合度在多能干细胞尚未得以充分培养和分化时可能会超过100%,并且未分化的细胞可能会从培养皿脱落并且变得漂浮和死亡,或者添加至培养物的因子的量可能不足,导致细胞之间的不良信号传导和不良分化。

[0069] (S1) 步骤

[0070] (S1)是培养多能干细胞以获得含有造血干细胞的培养物的步骤。该步骤是培养(S0)步骤中接种的多能干细胞以获得可以分化为巨核细胞的悬浮细胞群的步骤。

[0071] (S1)步骤可以配置为包括以下子步骤:

[0072] (S1a) 在含有GSK3(糖原合成酶激酶3)抑制剂的第三培养基中培养多能干细胞;

[0073] (S1b) 在含有血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的第四培养基中培养在第三培养基中培养的细胞;和

[0074] (S1c) 在含有血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、和转化生长因子 $\beta$ 信号传导抑制剂的第五培养基中培养在第四培养基中培养的细胞。

[0075] 在该步骤中使用的第三培养基、第四培养基、和第五培养基是具有不同组成和目的的培养基。

[0076] 第三培养基至少含有GSK3抑制剂。GSK3抑制剂可以是但不限于CHIR99021、BI0(6-溴靛玉红-30-脞)、SB216763、CHIR-98014、CT98014、CT98023、CT99021、TWS119、SB41528、AR-A014418、AZD-1080、阿特波龙(Alsterpaullone)、Cazpaullone、或肯帕罗酮(Kenpaullone)。CHIR99021是GSK3抑制剂(一种Wnt信号传导增强剂),并且可以表示为氨基嘧啶。

[0077] GSK3抑制剂(例如,CHIR99021)不限于特定浓度,只要其为能够培养多能干细胞的量即可。GSK3抑制剂可以以例如2至10 $\mu$ M、2.5至9.5 $\mu$ M、3至9 $\mu$ M、3.5至8.5 $\mu$ M、4至8 $\mu$ M、4.5至7.5 $\mu$ M、5至7 $\mu$ M、5.5至6.5 $\mu$ M、或6 $\mu$ M的浓度包含在第三培养基中。

[0078] 第三培养基是基础培养基。第三培养基可以包含RPMI1640培养基或另一种类型的基础培养基。除了基础培养基以外,第三培养基还可以进一步包含抗氧化剂和/或B-27。

[0079] 抗氧化剂可以选自由以下组成的组:6-羟基褪黑激素、乙酰左旋肉碱(ALCAR)、 $\alpha$ -硫辛酸(ALA)、抗坏血酸(例如,AA2P(L-抗坏血酸2-磷酸)、AA2G(L-抗坏血酸2-葡萄糖苷))、类胡萝卜素(维生素A)、姜黄素、依达拉奉(edaravone)、多酚类、谷胱甘肽、羟基酪醇、L-肉碱、拉多替吉(ladostigil)、褪黑激素、莫非吉兰、N-乙酰半胱氨酸(NAC)、N-乙酰血清素(NAS)、橄榄油刺激醛(oleocanthal)、橄榄苦苷(oleuropein)、雷沙吉兰、白藜芦醇、司来吉兰、硒、生育酚(维生素E)、生育三烯酚、酪醇、泛醌(辅酶Q)、和尿酸。

[0080] 第四培养基是生长培养基。第四培养基至少含有生长因子诸如血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。第四培养基可以进一步含有其他生长因子以培养多能干细胞。

[0081] 血管内皮生长因子(VEGF)是表皮生长因子受体(EGFR/ErbB)中的成员。血管内皮生长因子在调节细胞增殖和分化方面起到至关重要的作用,并且导致各种形式的信号传导通路的激活以诱导细胞凋亡、存活、或细胞增殖。血管内皮生长因子包括例如人和非人动物(例如,小鼠)血管内皮生长因子。

[0082] 以能够适当地培养多能干细胞的浓度包含血管内皮生长因子。血管内皮生长因子可以以例如5至95ng/ml、10至90ng/ml、15至85ng/ml、20至80ng/ml、25至75ng/ml、30至70ng/ml、35至65ng/ml、40至60ng/ml、45至55ng/ml、或50ng/ml的浓度包含在第四培养基中。

[0083] 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是属于FGF家族的蛋白质,其在细胞增殖和细胞分化等中用作促有丝分裂因子、血管生成因子、骨形成因子、和神经生长因子。碱性成纤维细胞生长因子(也称为FGF2)激活包括FGFR1b、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c、和FGFR4c等受体蛋白,并且特别是强烈激活FGFR1c和FGFR3c。

[0084] 以能够与其他组分一起适当地培养多能干细胞的浓度包含碱性成纤维细胞生长

因子。碱性成纤维细胞生长因子可以以例如1至40ng/ml、5至35ng/ml、10至30ng/ml、15至25ng/ml、或20ng/ml的浓度包含在第四培养基中。

[0085] 第四培养基可以不含有转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 信号传导抑制剂。如果第四培养基含有TGF $\beta$ 信号传导抑制剂,则分化可以在细胞增殖不充分的情况下发生。

[0086] 第五培养基是生长培养基。与第四培养基一样,其至少含有生长因子诸如血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)。第五培养基可以进一步含有其他生长因子以培养多能干细胞。

[0087] 与第五培养基中的血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 有关的事项与针对第四培养基中的血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的那些事项相同。

[0088] 第五培养基含有转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 信号传导抑制剂。

[0089] 转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 信号传导抑制剂是指抑制TGF $\beta$ 信号传导的物质。TGF $\beta$ 是在体内调节各种生理过程诸如细胞增殖、分化、细胞凋亡、迁移、细胞外基质 (ECM) 的产生、血管生成、和发育的物质。

[0090] TGF $\beta$ 信号传导抑制剂可以是任何类型而没有限制,只要其是能够抑制TGF $\beta$ 信号传导的物质即可,并且可以是例如激活素受体样激酶 (ALK) 受体抑制剂。

[0091] 激活素受体样激酶受体抑制剂可以是但不限于ALK5、ALK4、和ALK7受体抑制剂。例如,ALK受体抑制剂可以是SB431542。SB431542可以用以下化合物名称表示:4-[4-(2H-1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺。

[0092] 以能够与其他组分一起培养多能干细胞的浓度包含转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 信号传导抑制剂。可以以例如1至20 $\mu$ M、5至15 $\mu$ M、或10 $\mu$ M的浓度包含转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 信号传导抑制剂。

[0093] 通过(S1)步骤的培养获得的培养物含有造血干细胞(HSC)。培养物可以进一步含有造血祖细胞(HPC)和巨核细胞祖细胞(MK-P)。

[0094] (S2) 步骤

[0095] (S2)是当培养物中含有的细胞中不表达CD41a的细胞(CD41a<sup>-</sup>细胞)的数量为细胞的总数的至少15%时从(S1)的培养物中获得悬浮细胞群的步骤。

[0096] 悬浮细胞群是指在培养物中悬浮的细胞和/或细胞群。悬浮细胞群含有大量可以分化为巨核细胞的细胞,诸如造血干细胞、造血祖细胞、和巨核细胞祖细胞,并且可以含有不直接分化为巨核细胞但是帮助造血干细胞、造血祖细胞、和巨核细胞祖细胞比它们单独存在时更好地分化的细胞。

[0097] 该步骤确定从(S1)的培养物中获得悬浮细胞群的最佳时间。通过该步骤,通过获得用于分化为巨核细胞的最佳悬浮细胞群,可以提高向巨核细胞和/或成熟巨核细胞的分化效率以及血小板生产效率。

[0098] 当CD41a<sup>-</sup>细胞的数量为细胞的总数的至少15%时,获得悬浮细胞群。即,表达CD41a的细胞(CD41a<sup>+</sup>细胞)的数量小于85%。如果CD41a<sup>+</sup>细胞的数量小于85%,则向巨核细胞的分化效率和血小板生产效率优异,并且如果CD41a<sup>+</sup>细胞的数量为85%以上,则血小板生产效率反而降低。

[0099] CD41a<sup>-</sup>细胞的数量为例如细胞的总数的至少15%、至少16%、至少17%、至少

18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%。

[0100] CD41a<sup>-</sup>细胞的数量为例如细胞的总数的85%以下、84%以下、83%以下、82%以下、81%以下、80%以下、79%以下、78%以下、77%以下、76%以下、75%以下、74%以下、73%以下、72%以下、71%以下、70%以下、69%以下、68%以下、67%以下、66%以下、65%以下、64%以下、63%以下、62%以下、61%以下、60%以下、59%以下、58%以下、57%以下、56%以下、55%以下、54%以下、53%以下、52%以下、51%以下、50%以下、49%以下、48%以下、47%以下、46%以下、45%以下、44%以下、43%以下、42%以下、41%以下、40%以下、39%以下、38%以下、37%以下、36%以下、35%以下、34%以下、33%以下、32%以下、31%以下、30%以下、29%以下、28%以下、27%以下、26%以下、25%以下、24%以下、23%以下、22%以下、21%以下、20%以下、19%以下、18%以下、17%以下、16%以下、或15%以下。

[0101] CD41a<sup>+</sup>细胞的百分比可以通过从100%中减去CD41a<sup>-</sup>细胞的百分比获得。

[0102] 在(S2)中,优选培养物中含有的细胞中CD41a<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的15%以上且小于85%、20%以上且小于85%、30%以上且小于85%、40%以上且小于85%、45%以上且小于85%、或50%以上且小于85%。

[0103] 获得悬浮细胞群的时间可以考虑表达CD45的细胞的数量以及培养物中的细胞是否表达CD41a来确定。当CD45<sup>+</sup>细胞的数量为例如细胞的总数的50%以下、49%以下、48%以下、47%以下、46%以下、45%以下、44%以下、43%以下、42%以下、41%以下、40%以下、39%以下、38%以下、37%以下、36%以下、或35%以下时,可以从培养物中获得悬浮细胞群。

[0104] 此外,当CD45<sup>+</sup>细胞的数量为例如1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、或20%以上时,可以从培养物中获得悬浮细胞群。

[0105] 在一个实施方案中,CD45<sup>+</sup>细胞的数量为1至50%、5至50%、10至50%、或15至50%。

[0106] 获得悬浮细胞群的时间可以考虑表达CD34的细胞的数量以及培养物中的细胞是否表达CD41a来确定。当CD34<sup>+</sup>细胞的数量为例如25%以上、26%以上、27%以上、28%以上、29%以上、30%以上、31%以上、32%以上、33%以上、34%以上、35%以上、36%以上、37%以上、38%以上、39%以上、40%以上、41%以上、42%以上、43%以上、44%以上、45%以上、46%以上、47%以上、48%以上、49%以上、50%以上、51%以上、52%以上、53%以上、54%以上、55%以上、56%以上、57%以上、58%以上、59%以上、60%以上、61%以上、62%以上、63%以上、64%以上、65%以上、66%以上、67%以上、68%以上、69%以上、70%以上、71%

以上、72%以上、73%以上、74%以上、或75%以上时,可以从培养物中获得悬浮细胞群。

[0107] 此外,当CD34<sup>+</sup>细胞的数量为例如90%以下、89%以下、88%以下、87%以下、86%以下、85%以下、84%以下、83%以下、82%以下、81%以下、80%以下、79%以下、78%以下、77%以下、76%以下、75%以下、74%以下、73%以下、72%以下、71%以下、70%以下、69%以下、68%以下、67%以下、66%以下、65%以下、64%以下、63%以下、62%以下、61%以下、60%以下、59%以下、58%以下、57%以下、56%以下、55%以下、54%以下、53%以下、52%以下、51%以下、或50%以下时,可以从培养物中获得悬浮细胞群。

[0108] 当CD41a<sup>+</sup>细胞的百分比高于CD45<sup>+</sup>细胞的百分比时,可以获得悬浮细胞群。

[0109] 即使总细胞群中的CD41a<sup>+</sup>细胞的比例低至小于50%,但是如果CD45<sup>+</sup>细胞的比例低于所述CD41a<sup>+</sup>细胞的比例,则向巨核细胞和血小板的分化可以很好地发生。

[0110] 通过确定培养物中的细胞是否表达CD41a以及CD45和CD34,不需要从总细胞群中单独分离或仅纯化能够分化为巨核细胞的细胞。

[0111] 计数细胞的数量可以使用本领域的任何常规技术而没有限制。例如,可以使用基于抗体的选择方法或分选机。基于抗体的选择方法可以是例如使用微珠的方法。

[0112] (S3) 步骤

[0113] (S3)是在第一培养基中使(S2)步骤中获得的悬浮细胞群分化为巨核细胞的步骤。

[0114] 第一培养基用于使悬浮细胞群分化为巨核细胞。第一培养基可以包含细胞因子。第一培养基可以包含血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、白介素-3(IL-3)、和白介素-6(IL-6)中的至少一种。

[0115] 血小板生成素是调节巨核细胞和血小板造血作用的主要生长因子并且主要由肝细胞合成和分泌。

[0116] 血小板生成素可以以能够与其他组分一起培养悬浮细胞群的浓度包含在第一培养基中,并且不需要以特定浓度包含。可以以例如1至50ng/ml、5至45ng/ml、10至40ng/ml、15至35ng/ml、20至30ng/ml、或25ng/ml的浓度包含血小板生成素。

[0117] 干细胞因子是由成纤维细胞和其他细胞类型合成的源自基质细胞的细胞因子。干细胞因子可以以能够与其他组分一起培养悬浮细胞群的浓度包含在第一培养基中,并且不需要以特定浓度包含。可以以例如1至50ng/ml、5至45ng/ml、10至40ng/ml、15至35ng/ml、20至30ng/ml、或25ng/ml的浓度包含血小板生成素。

[0118] 白介素-3可以以能够与其他组分一起培养悬浮细胞群的浓度包含在第一培养基中,并且不需要以特定浓度包含。可以以例如1至20ng/ml、5至15ng/ml、或10ng/ml的浓度包含白介素-3。

[0119] 白介素-6可以以能够与其他组分一起培养悬浮细胞群的浓度包含在第一培养基中,并且不需要以特定浓度包含。可以以例如1至20ng/ml、5至15ng/ml、或10ng/ml的浓度包含白介素-6。

[0120] 第一培养基不限于特定培养基。第一培养基可以包含IMDM(Iscove改良的Dulbecco培养基)作为基础培养基。IMDM可以进一步包含抗氧化剂(例如,AA2P等)和/或B-27。

[0121] (S4) 步骤

[0122] (S4)是在含有血小板生成素的第二培养基中培养(S3)的巨核细胞和使(S3)的巨

核细胞成熟的步骤。

[0123] 血小板生成素可以以例如50至150ng/ml、60至140ng/ml、70至130ng/ml、80至120ng/ml、90至110ng/ml、或100ng/ml的浓度包含在第二培养基中,但不限于此。

[0124] 除了血小板生成素以外,第二培养基还可以进一步包含使巨核细胞成熟所需的因子。

[0125] 第二培养基不限于特定培养基。第二培养基可以包含IMDM (Iscove改良的Dulbecco培养基) 作为基础培养基。IMDM可以进一步包含抗氧化剂(例如,抗坏血酸2-磷酸AA2P等)和/或B-27。

[0126] 在该步骤中获得的可以是成熟的巨核细胞,或含有巨核细胞和/或成熟的巨核细胞的培养物。

[0127] (S5) 步骤

[0128] (S5) 是从在(S4)中获得的培养物中获得血小板的步骤。

[0129] 该步骤可以为在使(S4)的培养物进一步分化之后从培养物中分离和/或纯化血小板,或者在不使(S4)的培养物进一步分化的情况下从(S4)的培养物中分离和/或纯化血小板。

[0130] 血小板的分离和/或纯化可以通过本领域已知的分离和/或纯化方法进行。例如,可以通过使培养物离心或使培养物通过柱来进行。

[0131] 当使培养物离心时,巨核细胞可以作为沉淀物被分离并且血小板作为上清液。

[0132] 在下文中,将参考实施例更详细地描述本发明。

[0133] 实施例

[0134] 1. 实施例1、实施例2、和比较例1

[0135] 1-1. 人诱导多能干细胞(hiPSC)的生产

[0136] 为了获得能够分化为巨核细胞的细胞群,人诱导多能干细胞如下进行培养(图1)。

[0137] 首先,将人诱导多能干细胞在具有10 $\mu$ g/ml ROCK抑制剂(Y-27632)的mTeSR plus培养基中以4000个细胞/cm<sup>2</sup>的密度置于T75烧瓶中,并且在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下培养。在培养之后24小时,将细胞用PBS清洗一次以去除Y-27632,并且将mTeSR plus培养基用新鲜培养基替换。在培养基每天替换一次的同时,将细胞培养3天以获得人诱导多能干细胞。

[0138] 1-2. 含有人造血干细胞(hHSC)的培养基的生产

[0139] 将获得的人诱导多能干细胞在具有6 $\mu$ M CHIR99021 (GSK3抑制剂)的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的RPMI1640基础培养基中在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下培养2天(培养基每天替换一次)。

[0140] 然后,将培养基组成更改为具有50ng/ml VEGF和20ng/ml bFGF的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的RPMI1640基础培养基,并且将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养3天(培养基每天更换一次)。继续培养直到细胞汇合度为约70%以上。然后,将10 $\mu$ M SB431542进一步添加至具有VEGF和bFGF的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的RPMI1640基础培养基,并且将细胞进一步培养4天。

[0141] (1) 制备例1-1

[0142] 在额外培养的第2天,表达特异性表面标记物(CD34、CD41a、CD45)的细胞的数量相对于悬浮细胞的总数的比例通过流式细胞术(FACS)确定。将来自BD的Lyric设备用于流式

细胞术,并且使用来自BD的抗CD34-FITC、抗CD45-FITC、和抗CD41a-APC抗体。通过该方式,分别分析CD34和CD41a以及CD45和CD41a的单阳性细胞或双阳性细胞的比例。

[0143] 结果,鉴定出CD34<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为59.27%,并且CD45<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为5.21%,此时,从培养物中获得悬浮细胞群(图2和图3中的第7天)。

[0144] (2) 制备例1-2

[0145] 在额外培养的第4天,表达特异性表面标记物(CD34、CD41a、CD45)的细胞的数量相对于悬浮细胞的总数的比例以与制备例1-1中相同的方式确定。结果,鉴定出CD34<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为57.55%,CD41a<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为54.55%,并且CD45<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为18.58%,此时,从培养物中获得悬浮细胞群(图2和图3中的第9天)。

[0146] (3) 制备例1-3

[0147] 在额外培养的第6天,表达特异性表面标记物(CD34、CD41a、CD45)的细胞的数量相对于悬浮细胞的总数的比例以与制备例1-1中相同的方式确定。结果,鉴定出CD34<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为61.59%,CD41a<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为47.03%,并且CD45<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为32.4%,此时,从培养物中获得悬浮细胞群(图2和图3中的第11天)。

[0148] (4) 制备例1-4

[0149] 在额外培养的第8天,表达特异性表面标记物(CD34、CD41a、CD45)的细胞的数量相对于悬浮细胞的总数的比例以与制备例1-1中相同的方式确定。结果,鉴定出CD34<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为52.05%,CD41a<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为18.88%,并且CD45<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为45.56%,此时,从培养物中获得悬浮细胞群(图2的第13天)。

[0150] (5) 比较制备例1-1

[0151] 在额外培养的第10天,表达特异性表面标记物(CD34、CD41a、CD45)的细胞的数量相对于悬浮细胞的总数的比例通过流式细胞术确定。结果,鉴定出CD34<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为91.2%,CD41a<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为13%,并且CD45<sup>+</sup>细胞相对于总细胞的比例为68.51%,此时,从培养物中获得悬浮细胞群(图2和图3的第15天)。

[0152] 1-3. 通过培养悬浮细胞群而诱导向巨核细胞的分化

[0153] 将来自制备例1-2和1-4的悬浮细胞群进行培养并且以 $1 \times 10^5$ 个细胞/ml的密度引入含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的IMDM基础培养基中。然后,将25ng/ml TPO、25ng/ml SCF、10ng/ml IL-3和10ng/ml IL-6添加至培养基,并且将培养物在37°C和5%CO<sub>2</sub>下孵育3天。然后将培养基组成更改为具有100ng/ml TPO的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的IMDM基础培养基,并且将培养物进一步孵育5天以使巨核细胞成熟并且获得实施例1和2的细胞培养物(图4)。实施例1的细胞培养物的照片在图5中示出。

[0154] 将来自比较制备例1-1的悬浮细胞群进行培养并且以 $1 \times 10^5$ 个细胞/ml的密度引入含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的IMDM基础培养基中。然后,将25ng/ml TPO、25ng/ml SCF、10ng/ml IL-3和10ng/ml IL-6添加至培养基,并且将培养物在37°C和5%CO<sub>2</sub>下孵育3天。然后将培养基组成更改为具有100ng/ml TPO的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的IMDM基础培养基,并且将培养物进一步孵育5天以使巨核细胞成熟并且获得细胞培养物(比较例1)(图6和图7)。

[0155] 1-4. 巨核细胞的血小板生产能力的确认

[0156] 收集来自实施例1、实施例2、和比较例1的细胞培养物并且在300 $\times$ g下离心3分钟。

将沉淀物和上清液分别分离为巨核细胞和血小板。然后对血小板进行分析并且通过以下实验进行表征。

[0157] (1-4-1) 使用FACS分析鉴定巨核细胞特异性标记物

[0158] 将来自实施例1、实施例2、和比较例1的细胞培养物离心以获得沉淀细胞(推定为巨核细胞的细胞)。

[0159] 为了确认沉淀细胞是否为巨核细胞,进行FACS分析以确定沉淀细胞的表面标记物表达。FACS分析使用来自BD的Lyric设备进行,并且使用来自BD的抗CD41a-FITC、抗CD61-PE和抗CD42b-APC抗体。将抗体在含有1% BSA的PBS (FACS缓冲液) 中以1:20稀释,并且用于30分钟反应以确认表面标记物表达。

[0160] 结果,来自实施例1的沉淀细胞对于巨核细胞特异性标记物(CD41a、CD42b、和CD61)的表达呈阳性(图8)。进一步,来自实施例2的沉淀细胞也对于巨核细胞特异性标记物(CD41a、CD42b、和CD61)的表达呈阳性(图9)。因此,确认了来自实施例1和2的悬浮细胞群分化为巨核细胞,并且因此也产生了血小板。

[0161] 相反,来自比较例1的沉淀细胞显示非常低的CD41a和CD61的表达,并且,特别地,CD42b的表达接近阴性(图10)。这表明来自比较例1的悬浮细胞群几乎不分化为巨核细胞,并且几乎未产生血小板。

[0162] (1-4-2) 通过ADP处理确认血小板功能

[0163] 将实施例1、实施例2、和比较例1离心以去除沉淀细胞(巨核细胞),并且将悬浮细胞在 $2000 \times g$ 下再次离心10分钟。然后,将沉淀细胞(推定为血小板的细胞)通过去除所有上清液来收集,并且用少量的PBS重悬。进行以下实验以确认以这种方式获得的细胞是否具有正常活性的血小板。

[0164] 对于PAC-1分析,用 $100 \mu\text{M}$  ADP处理细胞并且在室温下反应15分钟,然后使来自BD的抗PAC-1-FITC和抗CD62p-PE抗体反应30分钟。然后,对经反应的细胞进行FACS分析。

[0165] 来自实施例1和2的细胞通过ADP处理而激活,并且PAC-1和CD62p表达增加(图11和图12),确认了来自实施例1和2的细胞为具有正常活性的血小板。PAC-1是当血小板被激活时由CD41a和CD61形成的复合物。CD62p(p-选择素)是当血小板被激活时其表达增加的表面分子,并且用作白细胞可以结合至血小板的位点。

[0166] 通过上述实验结果,确认了当培养hiPSC并且细胞群满足一定条件(表达特异性表面标记物(例如CD41a、CD34、CD45)的细胞的数量相对于细胞的总数的比例高于或低于一定值)时,当进行后续培养步骤时,向巨核细胞的分化效率和血小板生产效率可以提高。

[0167] 2. 比较例2: 当从悬浮细胞群中选择仅CD41a<sup>+</sup>细胞并且进行后续培养时的血小板生产效率的比较

[0168] 从制备例1-2(比较例2)中获得的悬浮细胞群中选择仅CD41a<sup>+</sup>细胞并且进行后续培养,并且将血小板生产效率与实施例1的血小板生产效率进行比较(图13)。

[0169] 使用与上述FACS分析相同的方法,确认了两种情况下的血小板特异性标记物的表达,结果,CD41a<sup>+</sup>/CD42b<sup>+</sup>的比例是类似的,为57.58和56.20,确认了在血小板分化率方面没有显著性差异(图14)。

[0170] 然而,当测试细胞增殖能力时,发现与包含仅CD41a<sup>+</sup>细胞的细胞群向血小板的分化相比,如实施例1中的、包含是CD41a<sup>+</sup>的细胞以及不是CD41a<sup>+</sup>的细胞(例如,CD41a<sup>-</sup>)的细胞

群向血小板的分化显示出高约40倍的细胞增殖能力(图15)。

[0171] 作为上述的结果,确认了当将如制备例1-2中的包含CD41a<sup>-</sup>细胞的细胞群用于血小板生产而不是选择仅CD41a<sup>+</sup>细胞用于血小板生产时,可以高效地定量和定性地生产血小板。

[0172] 3. 实施例3至8以及比较例3和4

[0173] 3-1. 人诱导多能干细胞(hiPSC)的生产

[0174] 为了获得能够分化为巨核细胞的细胞群,人诱导多能干细胞如下进行培养。

[0175] 首先,将人诱导多能干细胞在具有10 $\mu$ g/ml ROCK抑制剂(Y-27632)的mTeSR plus培养基中以4500个细胞/cm<sup>2</sup>的密度置于T75烧瓶中,并且在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下培养。在培养之后24小时,将细胞用PBS清洗一次以去除Y-27632,并且将mTeSR plus培养基用新鲜培养基替换。在培养基每天替换一次的同时,将细胞培养3天以获得人诱导多能干细胞。

[0176] 3-2. 含有人造血干细胞(hHSC)的培养物的生产

[0177] 将获得的人诱导多能干细胞在具有6 $\mu$ M CHIR99021(GSK3抑制剂)的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的RPMI1640基础培养基中在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下培养2天。

[0178] 然后,将培养基组成更改为具有50ng/ml VEGF和20ng/ml bFGF的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的RPMI1640基础培养基,并且将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养3天。继续培养直到细胞汇合度为约90%以上。然后,将10 $\mu$ M SB431542进一步添加至具有VEGF和bFGF的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的RPMI1640基础培养基,并且将细胞进一步培养4天。

[0179] 在培养的第7、9、11、13、15、17、19、和21天获得培养物,并且相对于悬浮细胞的总数的表达特异性表面标记物(CD34、CD41a、和CD45)的细胞的数量通过流式细胞术(FACS)确定。将来自BD的Lyric设备以及来自BD的抗CD34-FITC、抗CD45-FITC和抗CD41a-APC抗体用于流式细胞术(图16)。

[0180] 3-3. 培养物中的CD41a<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>、和CD34<sup>+</sup>细胞的百分比

[0181] 在培养的第7、9、11、13、15、17、19、和21天的培养物中的CD41a<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>、和CD34<sup>+</sup>细胞的百分比在下表2中示出。

[0182] [表2]

[0183]

| 类别(%)    | 培养天数 | CD41a <sup>+</sup> 细胞百分比(%) | CD45 <sup>+</sup> 细胞百分比(%) | CD34 <sup>+</sup> 细胞百分比(%) |
|----------|------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 制备例3-1   | 7    | 61.13                       | 1.22                       | 56.32                      |
| 制备例3-2   | 9    | 82.74                       | 8.57                       | 77.01                      |
| 制备例3-3   | 11   | 84.44                       | 19.13                      | 78.83                      |
| 制备例3-4   | 13   | 51.68                       | 34.72                      | 50.56                      |
| 制备例3-5   | 15   | 29.86                       | 49.26                      | 47.14                      |
| 制备例3-6   | 17   | 20.00                       | 46.20                      | 46.38                      |
| 比较制备例3-1 | 19   | 14.63                       | 37.72                      | 29.07                      |
| 比较制备例3-2 | 21   | 9.68                        | 47.09                      | 18.16                      |

[0184] 3-4. 制备例3-1至3-6以及比较制备例3-1和3-2的悬浮细胞群向巨核细胞的分化

[0185] 将制备例3-1至3-6以及比较制备例3-1和3-2的悬浮细胞群分别以0.5 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞/ml的密度引入含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的IMDM基础培养基中,并且在将25ng/ml SCF、10ng/ml IL-3、和10ng/ml IL-6添加至培养基之后在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下培养3天。

[0186] 然后,将培养基组成更改为具有100ng/ml TPO的、含有300 $\mu$ M AA2P和2%B-27的

IMDM基础培养基,并且将细胞进一步培养5天以使巨核细胞成熟并且获得细胞培养物。

[0187] 3-5. 实施例3至8以及比较例3和4的血小板生产能力的确认

[0188] 收集经过巨核细胞成熟步骤的制备例3-1至3-6以及比较制备例3-1和3-2的细胞培养物并且在 $300 \times g$ 下离心3分钟。将被认为是巨核细胞的沉淀物去除,并且对含有血小板的上清液进行以下实验以确认最终产物是否是具有正常活性的血小板。将从制备例3-1至3-6以及比较制备例3-1和3-2的细胞培养物中获得的物质按描述的顺序分别命名为实施例3至8以及比较例3和4。

[0189] (1) FACS分析以鉴定血小板特异性标记物

[0190] 将经过巨核细胞成熟步骤的来自制备例3-1至3-6以及比较制备例3-1和3-2的细胞培养物离心。去除沉淀巨核细胞。将悬浮血小板在 $2000 \times g$ 下再次离心15分钟。

[0191] 对推定为巨核细胞和血小板的细胞进行FACS分析以确认表面标记物的表达。使用来自BD的Lyric设备,并且使用来自BD的抗CD41a-FITC、抗CD61-PE和抗CD42b-APC抗体。将抗体在含有1% BSA的PBS (FACS缓冲液)中以1:20稀释,并且用于30分钟反应以确认表面标记物表达。

[0192] 结果,实施例3至8显示对于巨核细胞和血小板特异性标记物的表达呈阳性(图17至图22)。这确认了制备例3-1至3-6的悬浮细胞群能够高效地生产巨核细胞和血小板。

[0193] 相反,比较例3和4几乎不显示巨核细胞和血小板的表面标记物的表达。结果,确认了比较制备例3-1和3-2的悬浮细胞群几乎不显示向巨核细胞的分化,并且实质上无法生产血小板(图23和图24)。

[0194] (2) 通过ADP处理确认血小板功能

[0195] 进行以下实验以确认经过巨核细胞成熟步骤的实施例3至8以及比较例3和4是否为具有正常功能的血小板。

[0196] 将经过巨核细胞成熟步骤的来自制备例3-1至3-6以及比较制备例3-1和3-2的细胞培养物离心。去除沉淀巨核细胞。将悬浮血小板在 $2000 \times g$ 下再次离心15分钟。为了收集通过离心而沉淀的血小板,去除上清液并且将少量的PBS用于重悬细胞。

[0197] 对于PAC-1分析,将 $500 \mu M$  ADP添加至血小板以在室温下反应15分钟,然后与来自BD的抗PAC-1-FITC和抗CD62p-PE抗体反应30分钟。立即对经反应的血小板进行FACS分析。

[0198] PAC-1是当CD41a和CD61在血小板被激活时形成复合物时出现的。CD62p (p-选择素)是在血小板被激活时表达增加的表面分子,并且用作白细胞可以结合至血小板的位点。

[0199] 实施例3至8通过用ADP处理而激活,并且PAC-1和CD62p的表达增加。这确认了实施例3至8是具有正常功能的血小板(图17至图22)。相反,比较例3和4几乎不表现出血小板激活(图23和图24)。

[0200] 如上所述,确认了当用在CD41a<sup>+</sup>细胞的数量为细胞的总数的至少15%时从培养物中获得的悬浮细胞群进行后续步骤时,向巨核细胞分化的效率和血小板生产的效率提高。

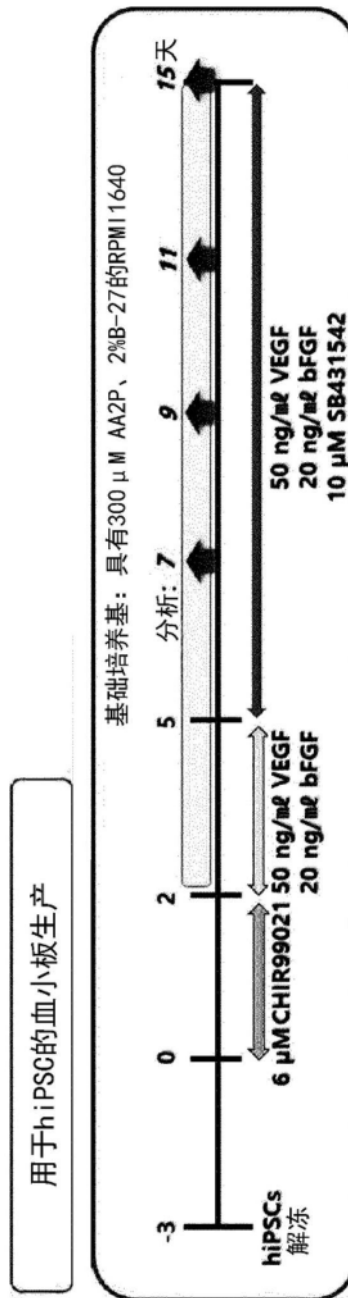


图1

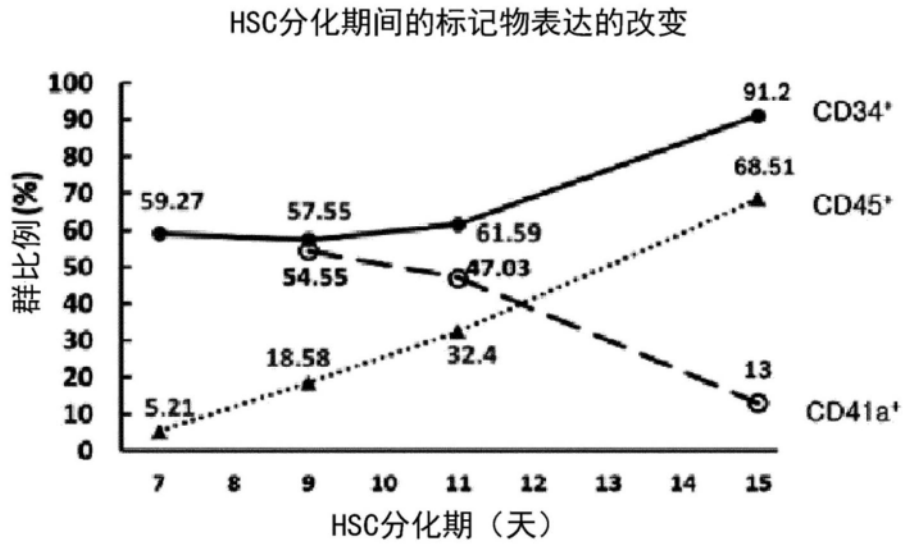


图2

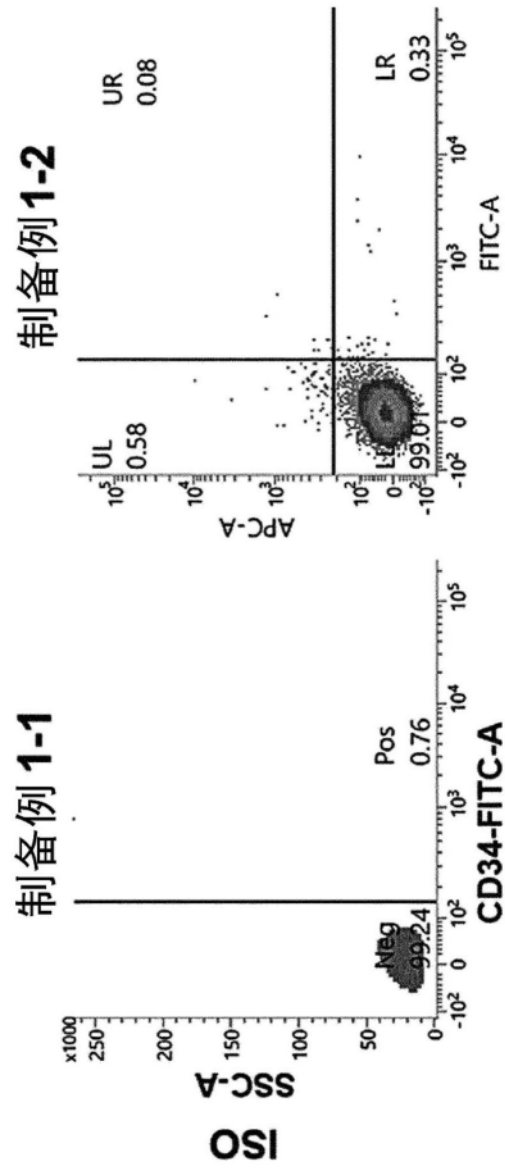


图3a

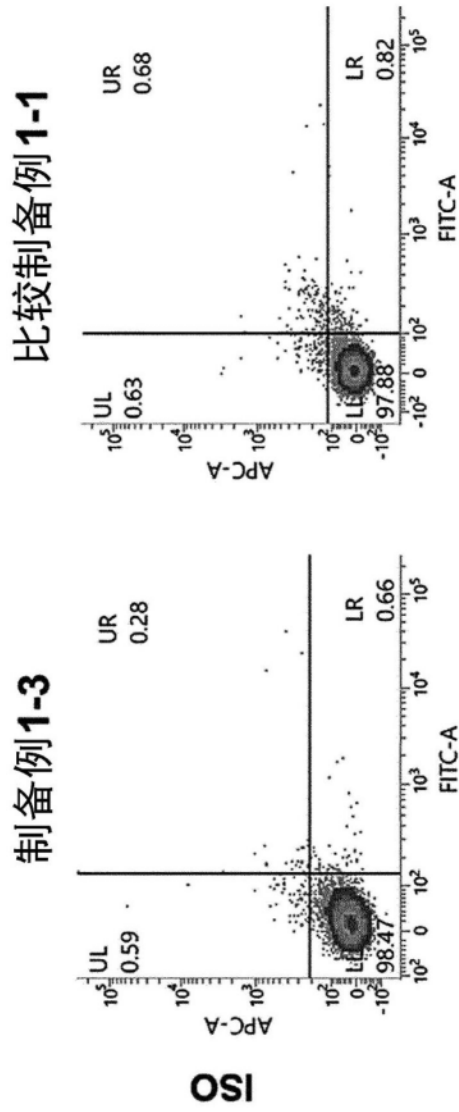


图3b

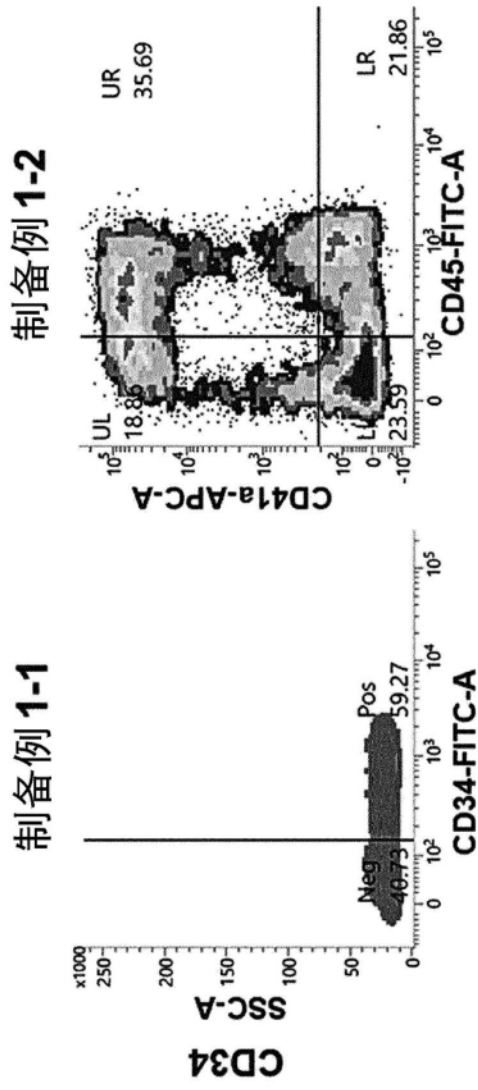


图3c

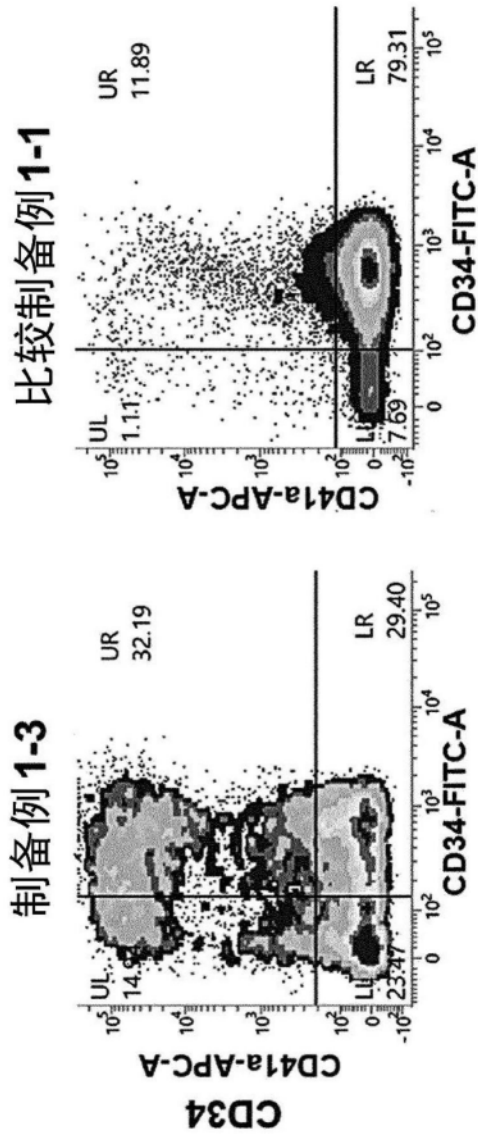


图3p

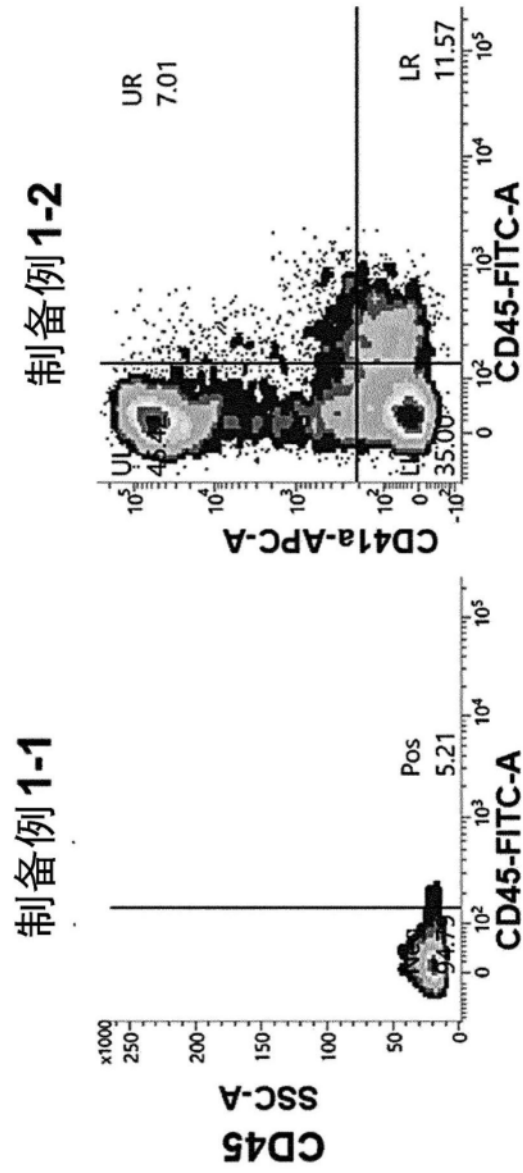


图3e

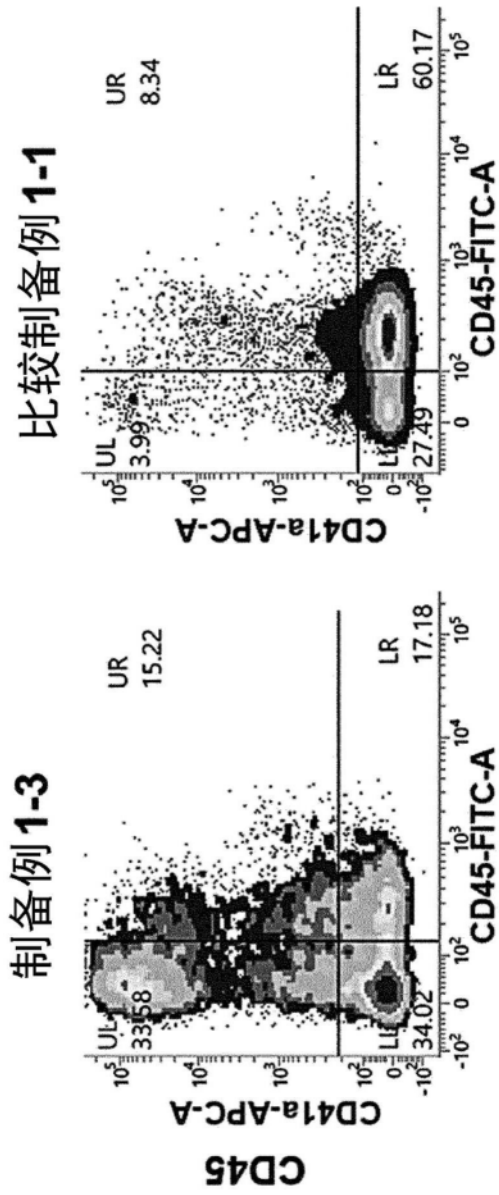


图3f

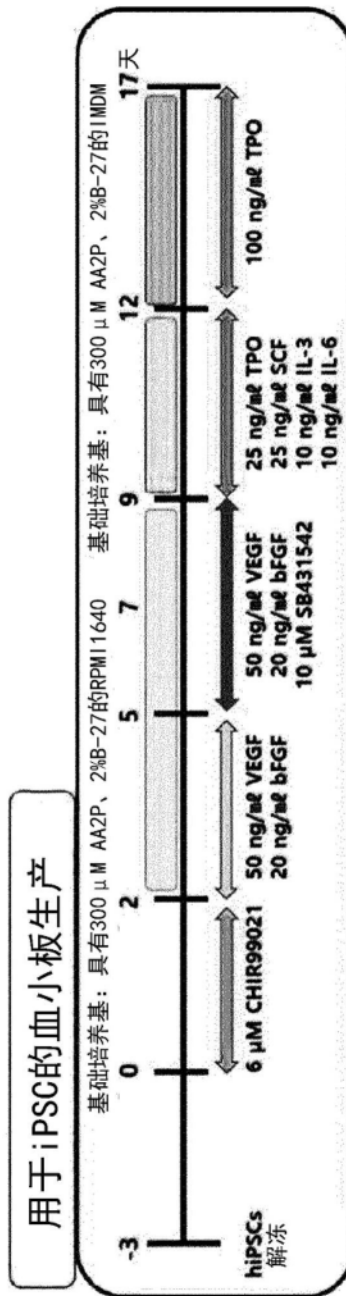


图4

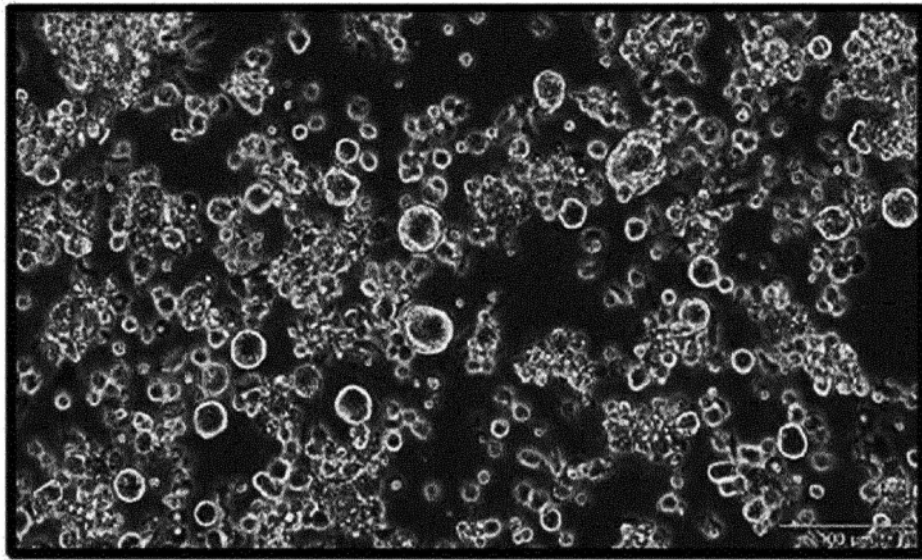


图5

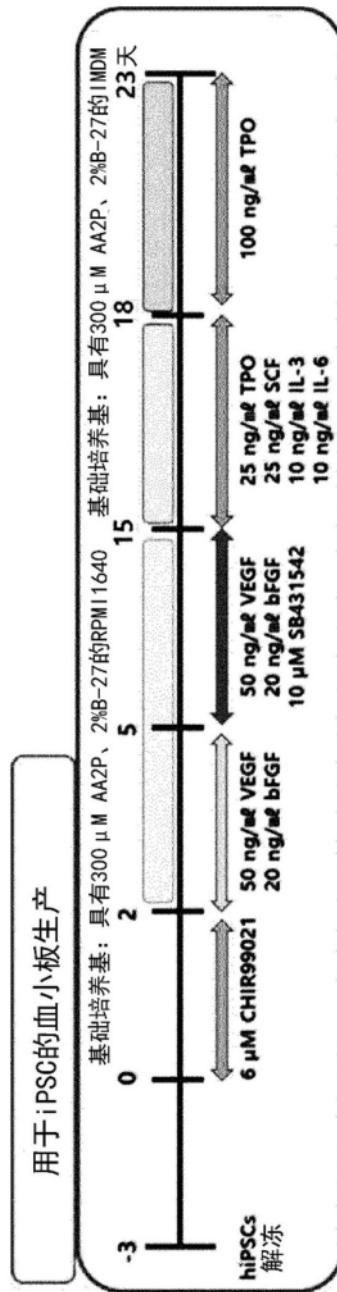


图6

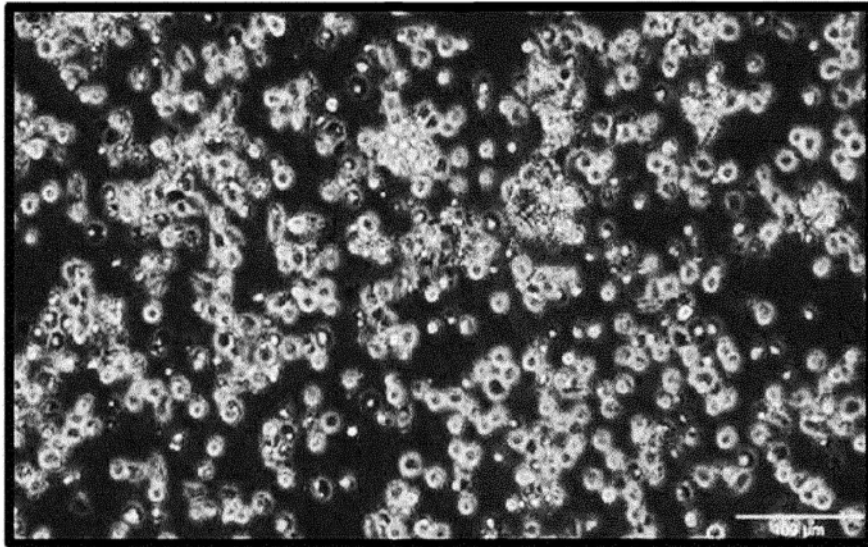


图7

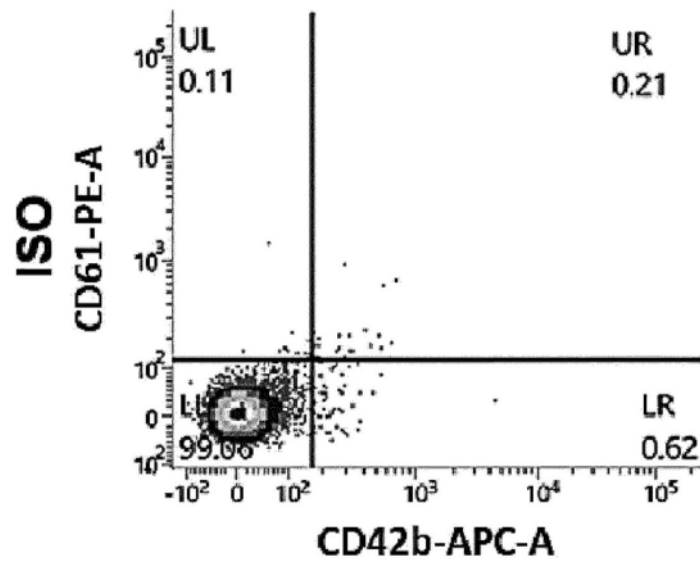


图8a

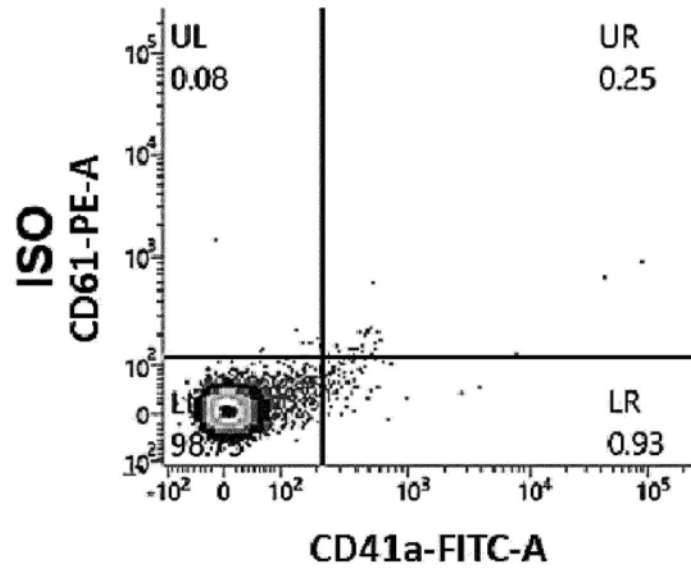


图8b

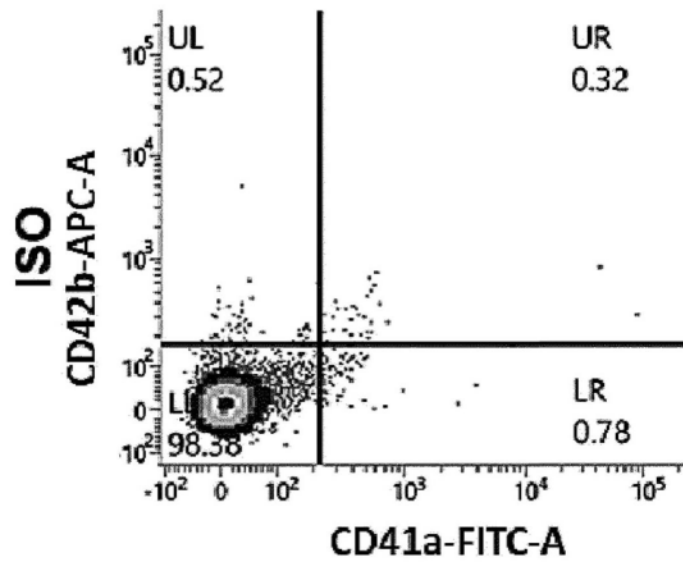


图8c

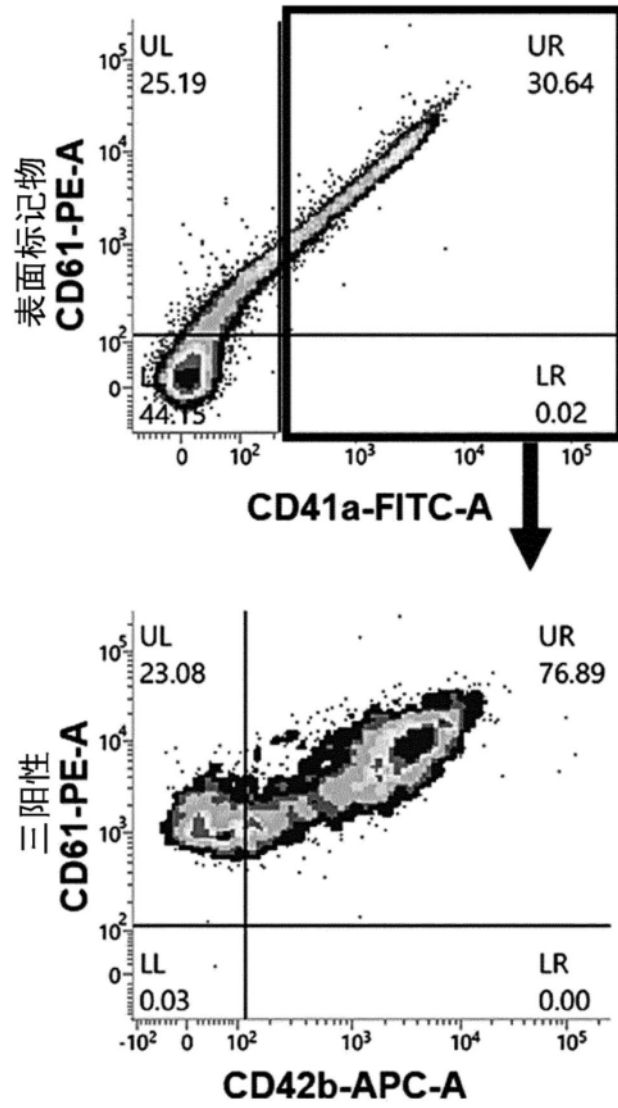


图8d

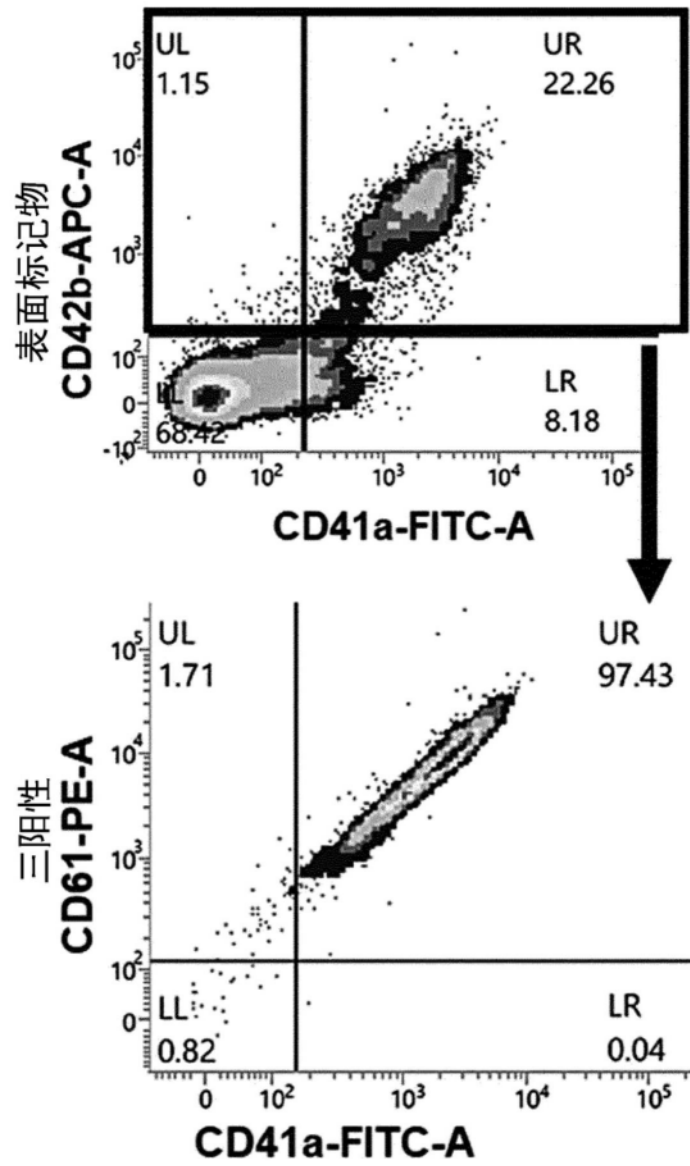


图8e

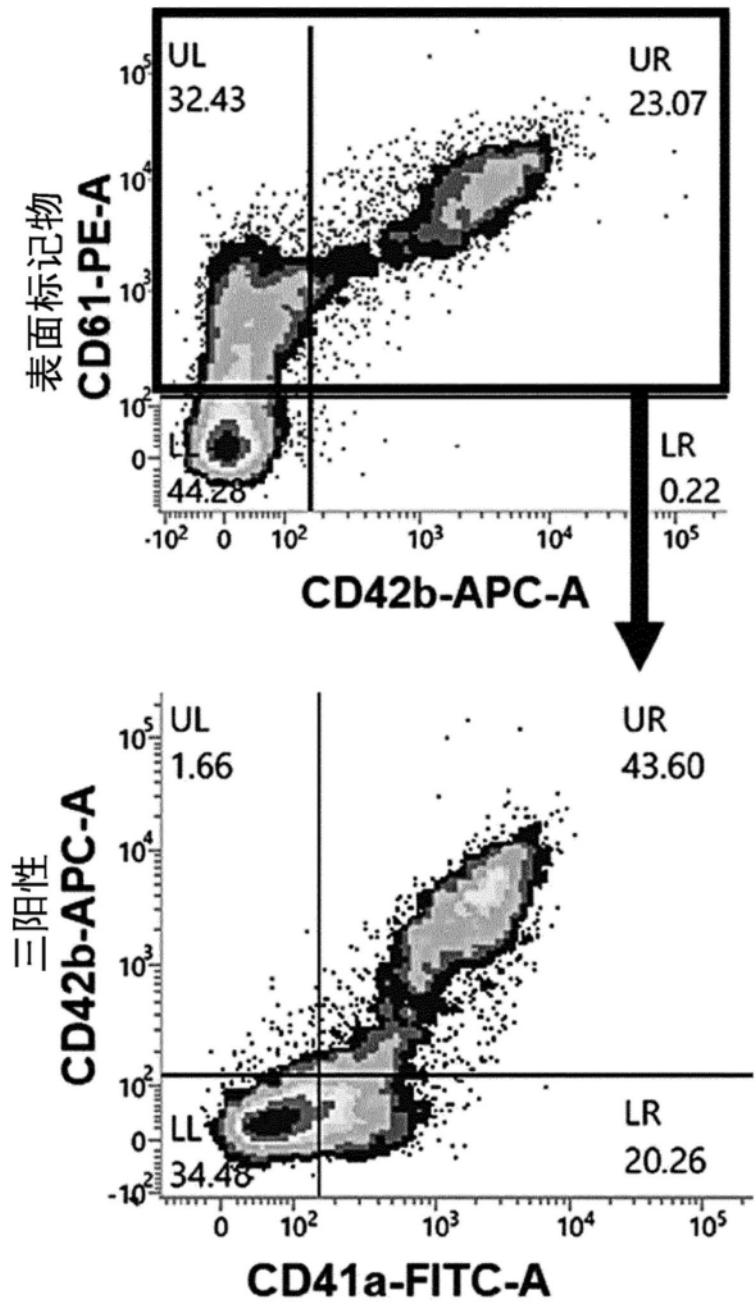


图8f

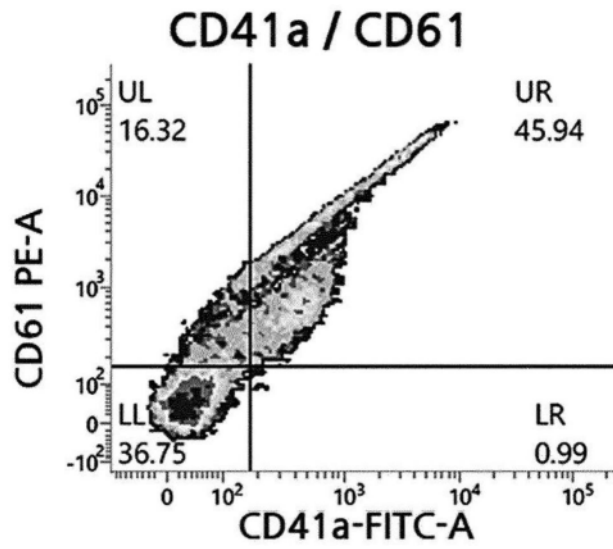


图9a

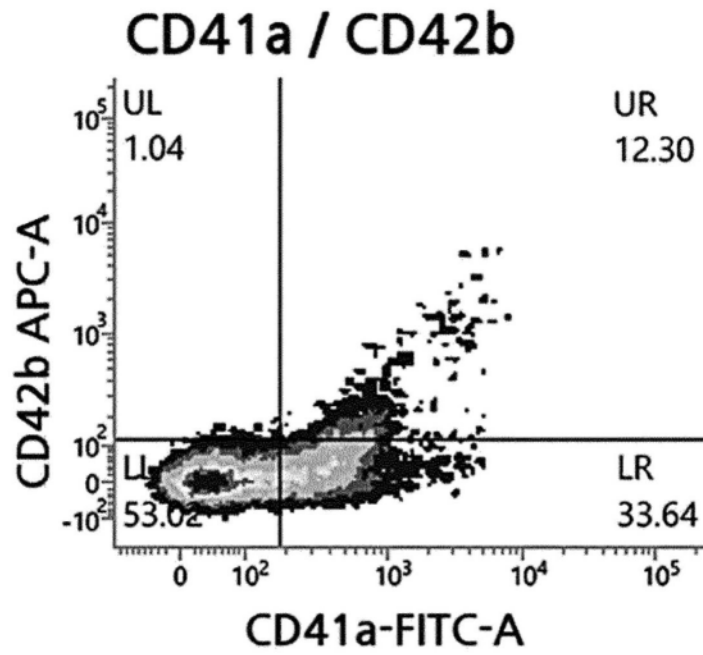


图9b

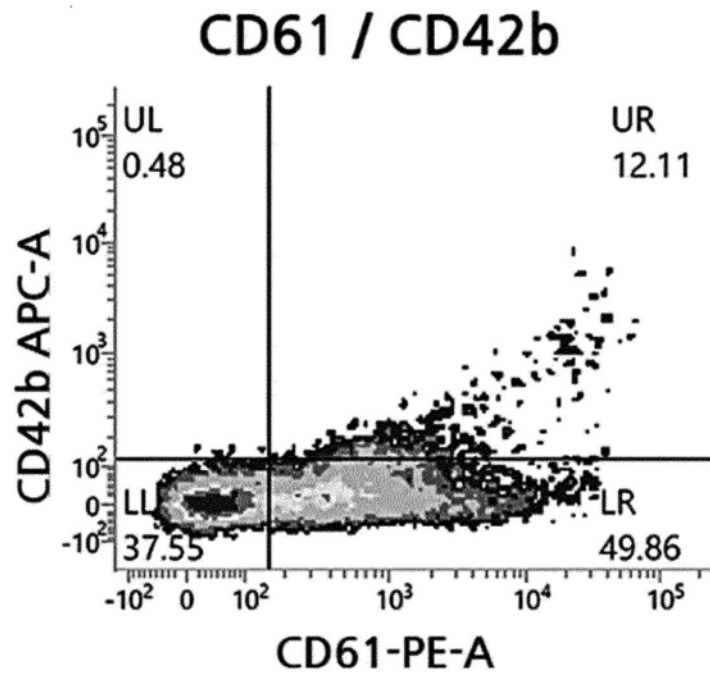


图9c

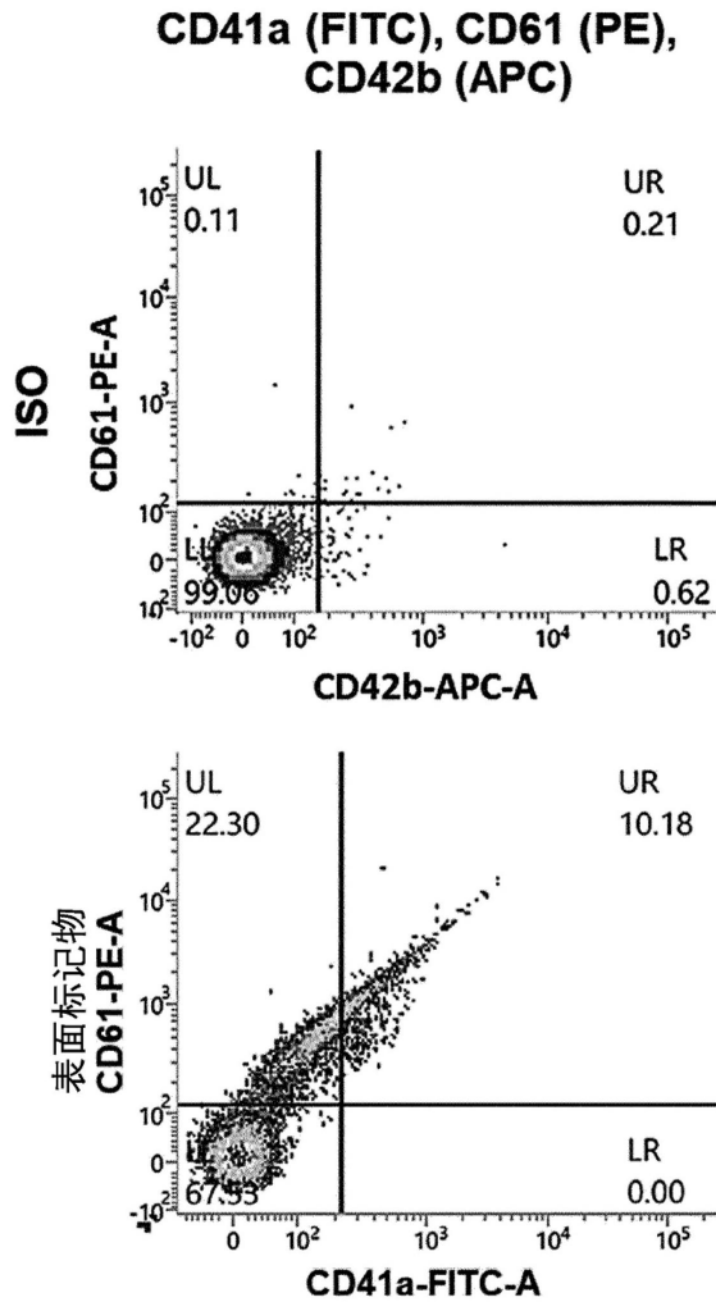


图10a

### CD41a (FITC), CD61 (PE), CD42b (APC)

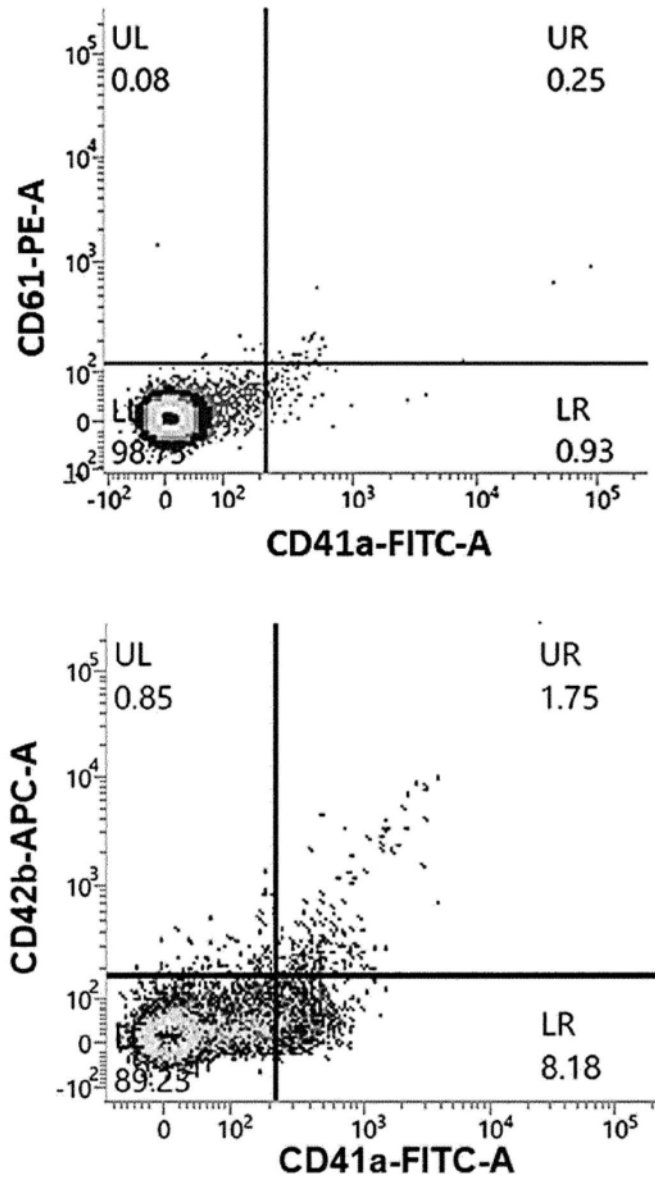


图10b

**CD41a (FITC), CD61 (PE),  
CD42b (APC)**

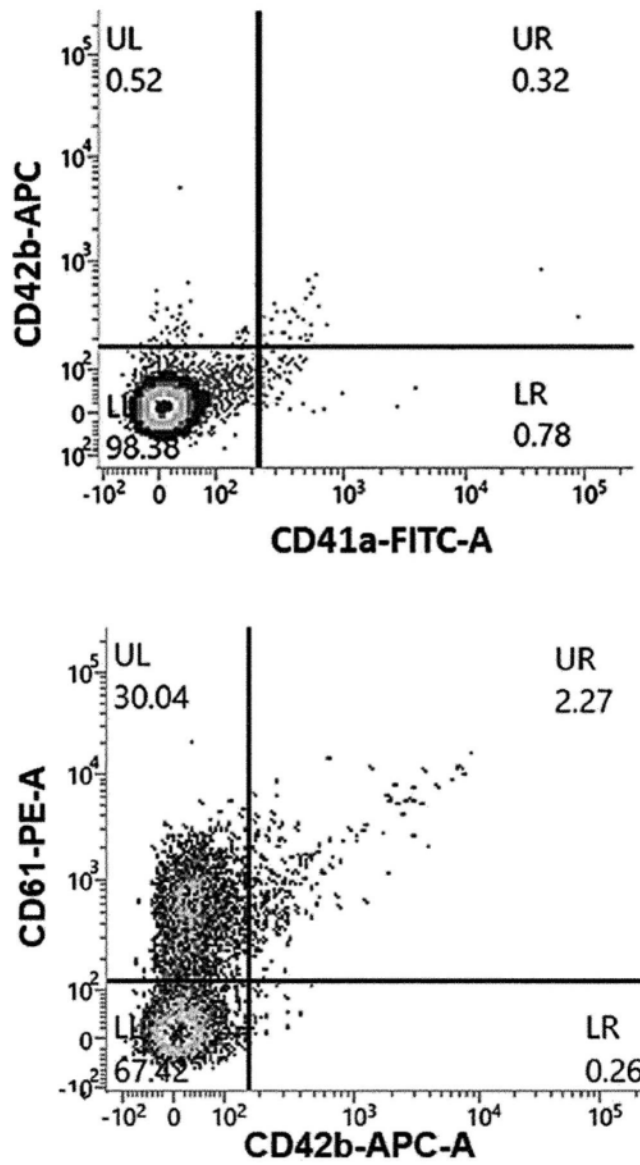


图10c

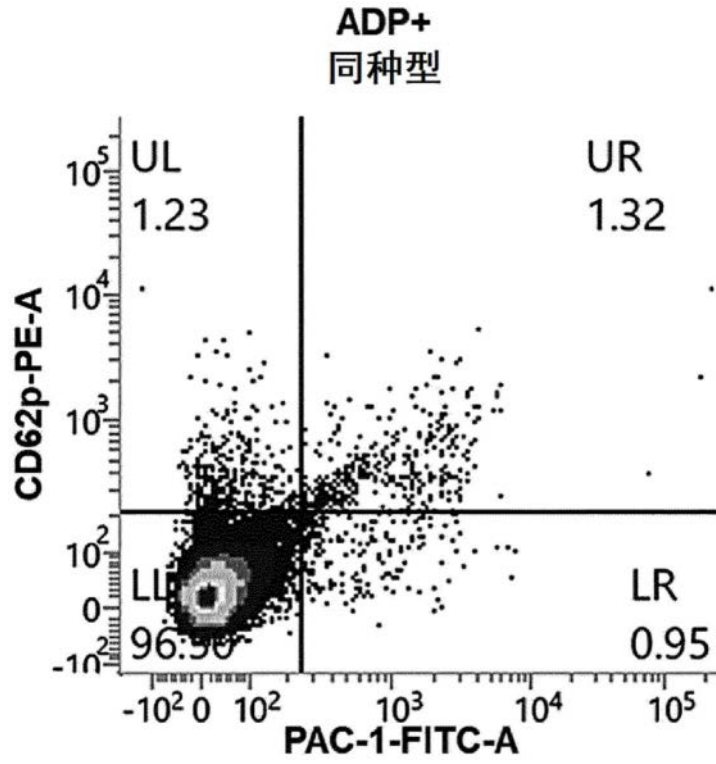


图11a

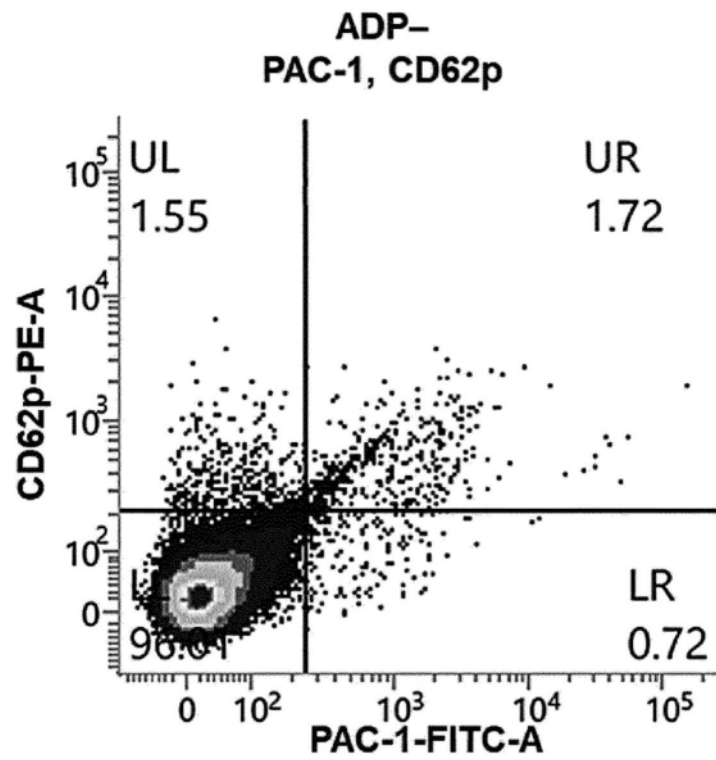


图11b

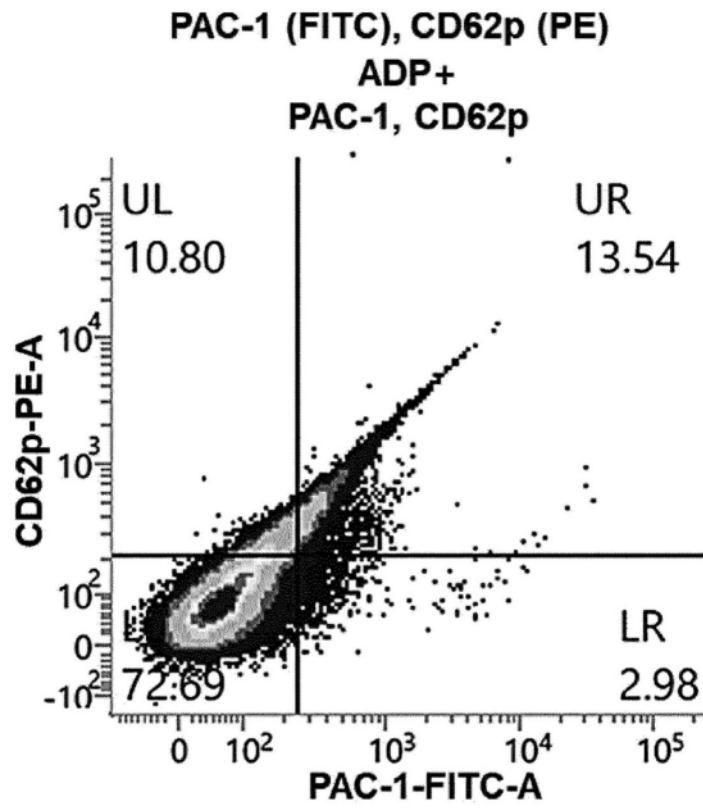


图11c

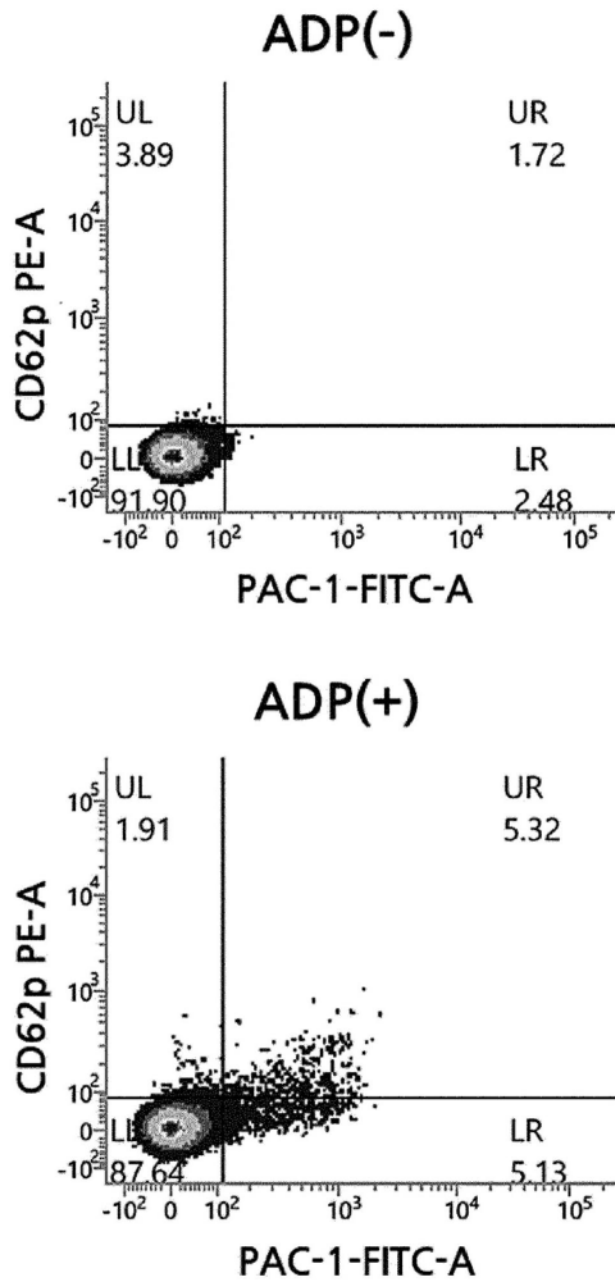


图12

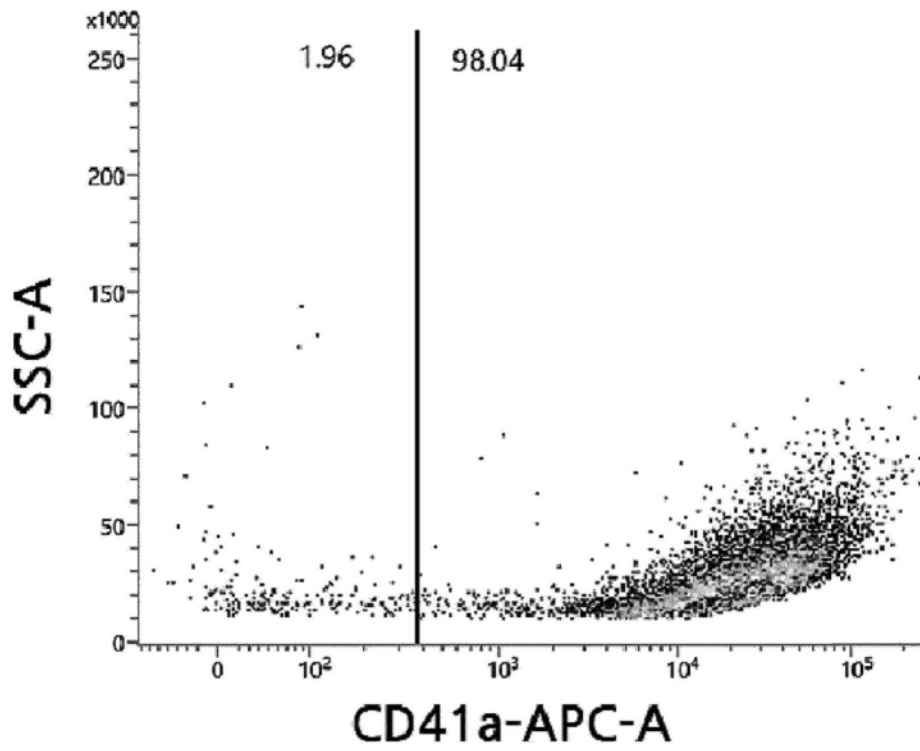
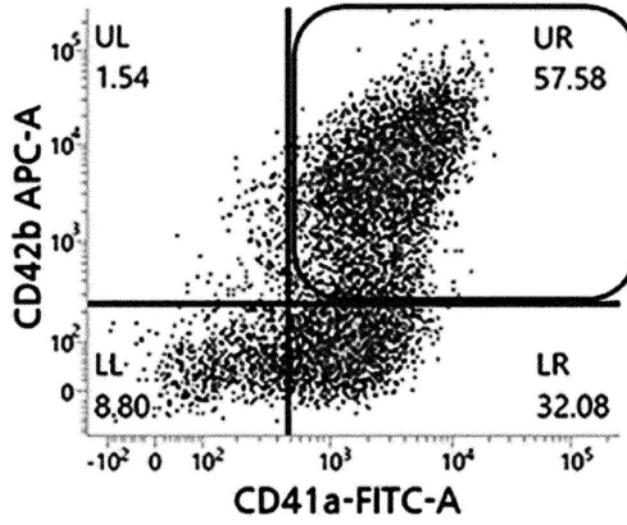


图13

**CD41a<sup>+</sup> 细胞 (比较例2)**



**实施例1**

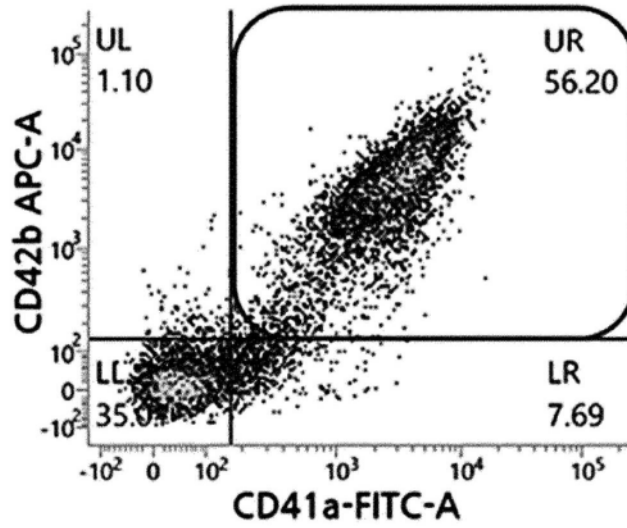


图14

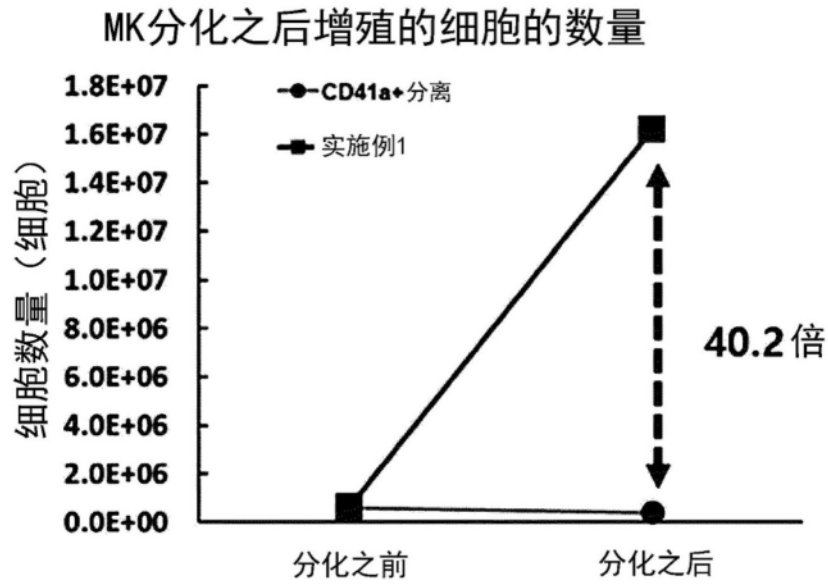


图15

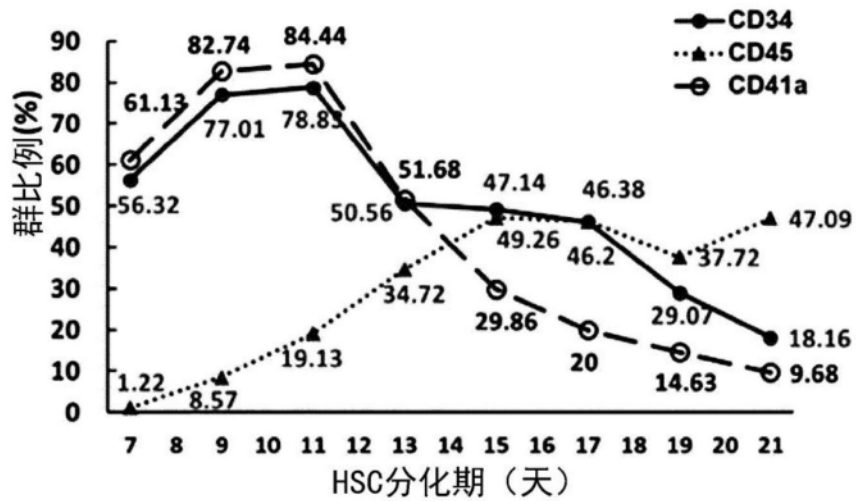


图16

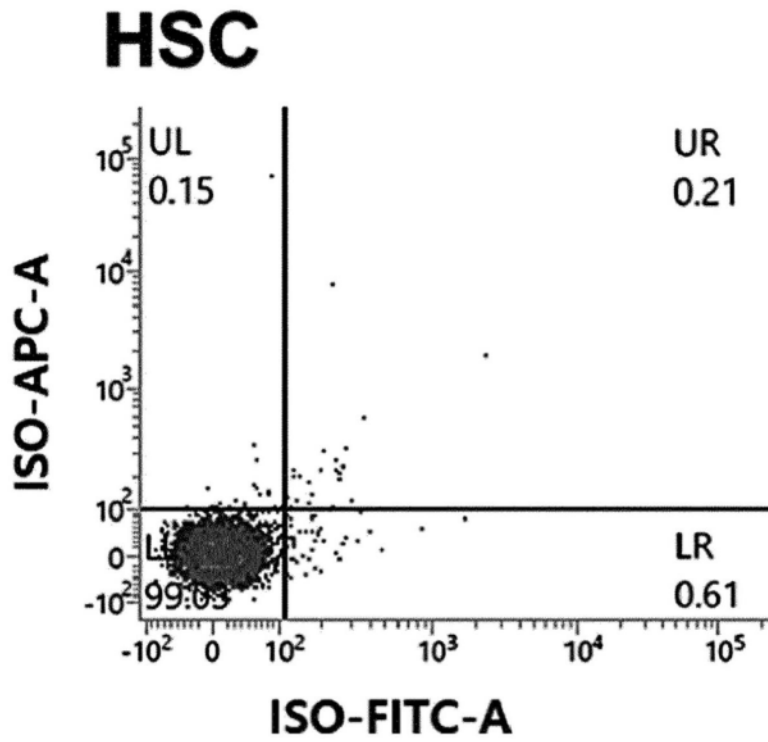


图17a

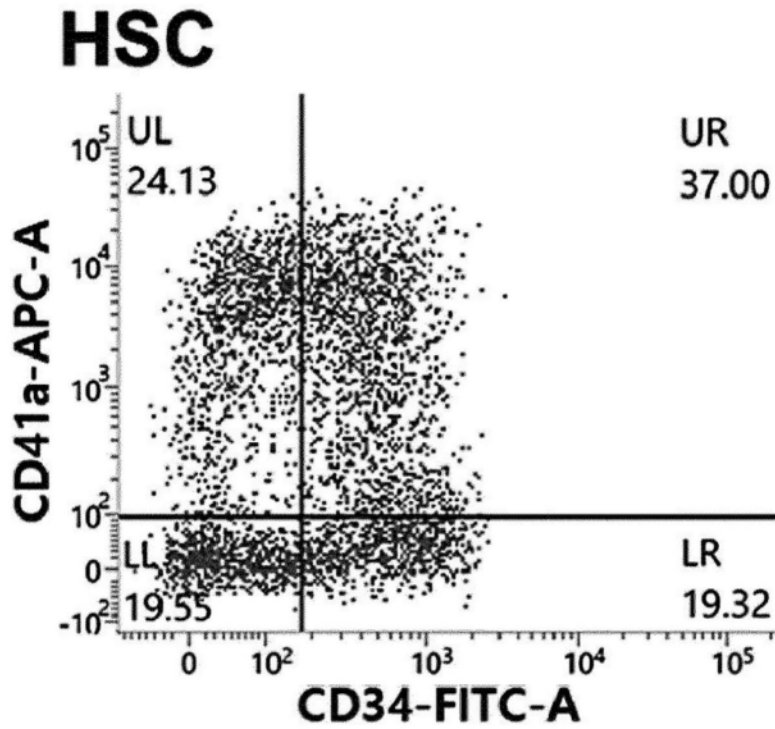


图17b

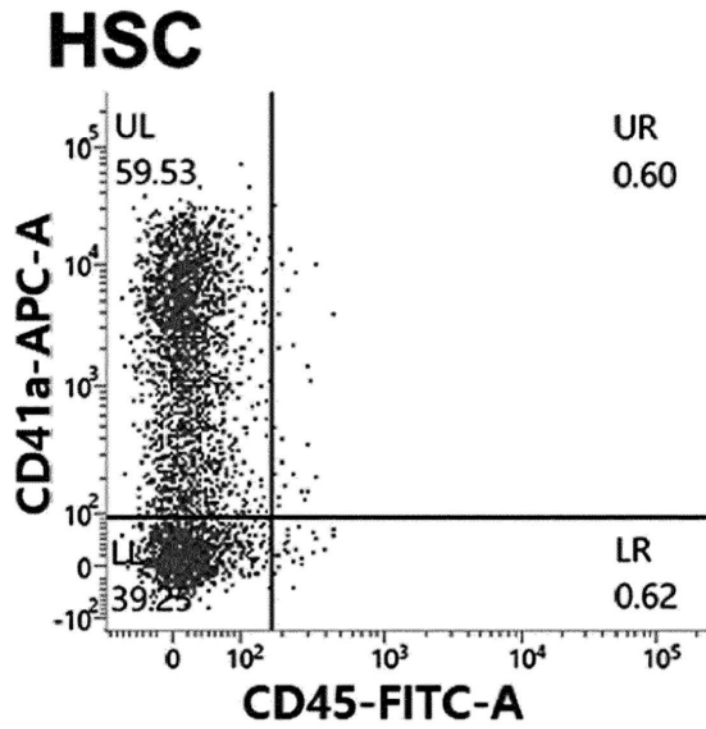


图17c

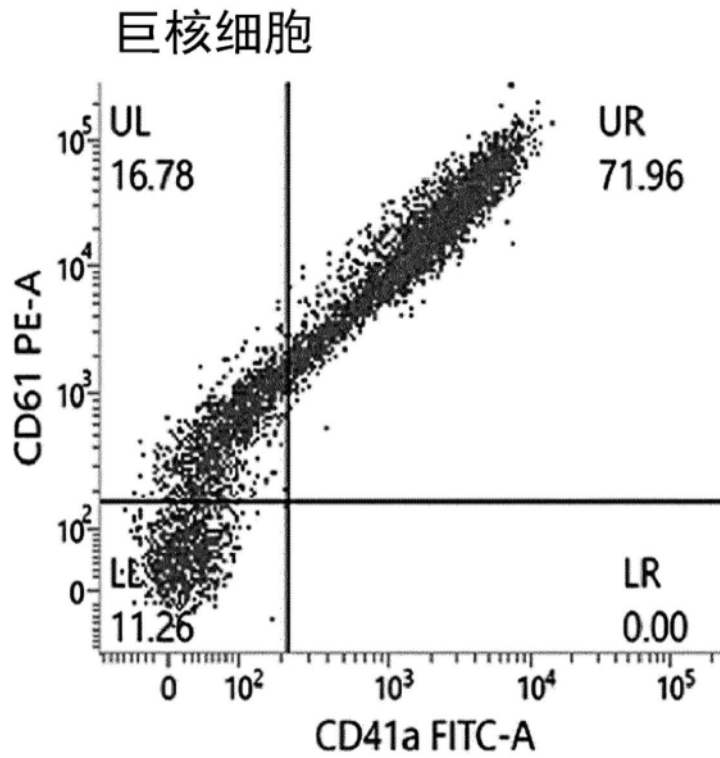


图17d

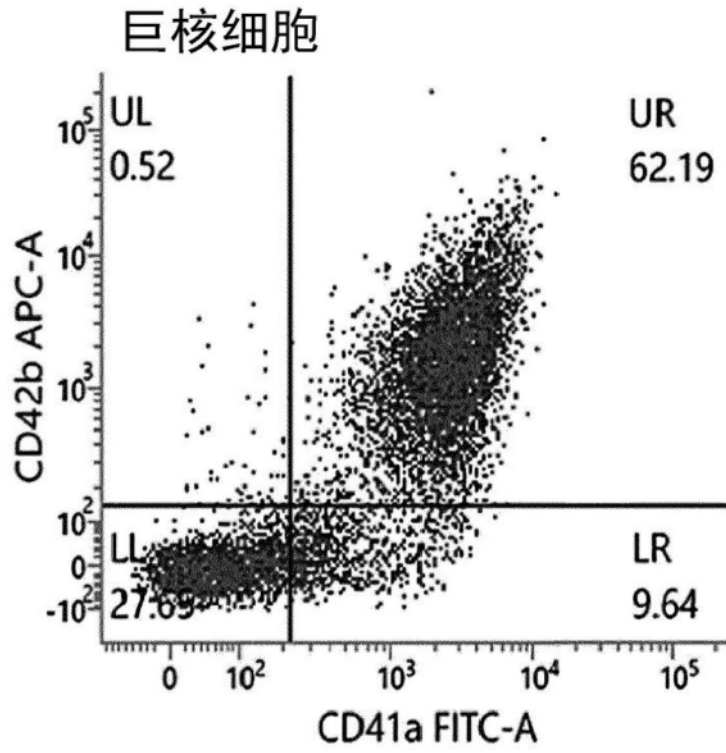


图17e

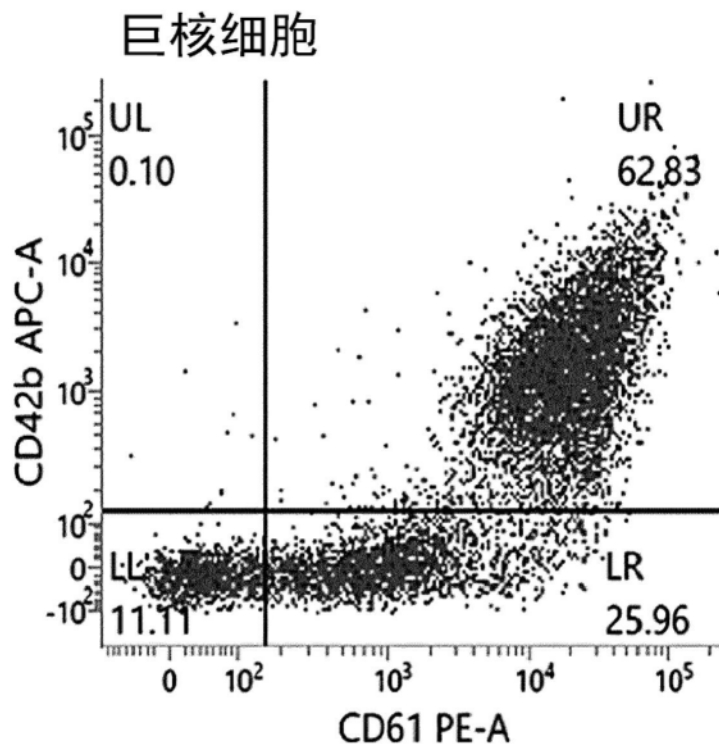


图17f

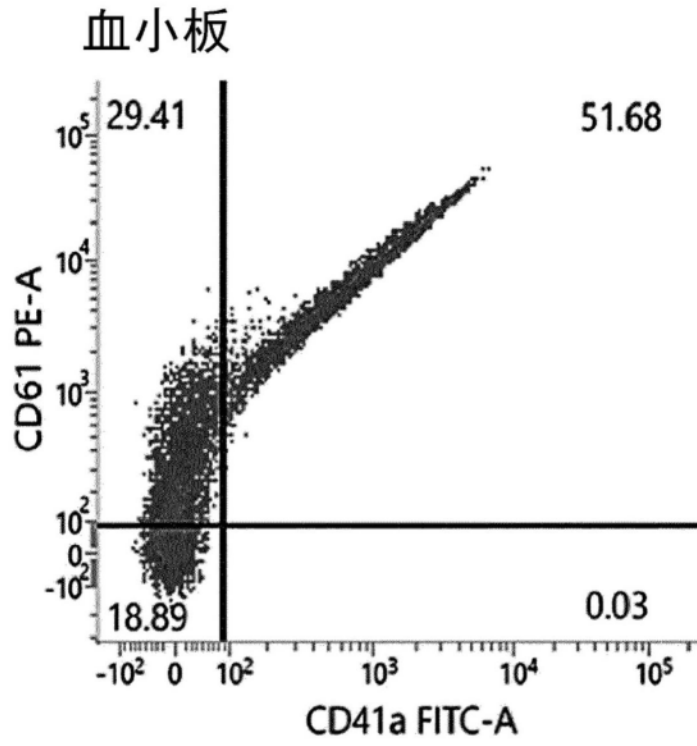


图17g

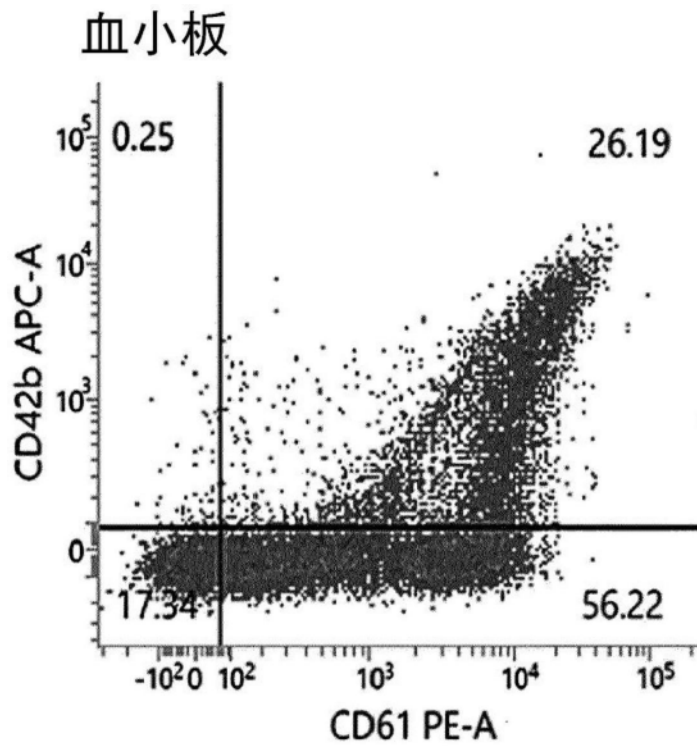


图17h

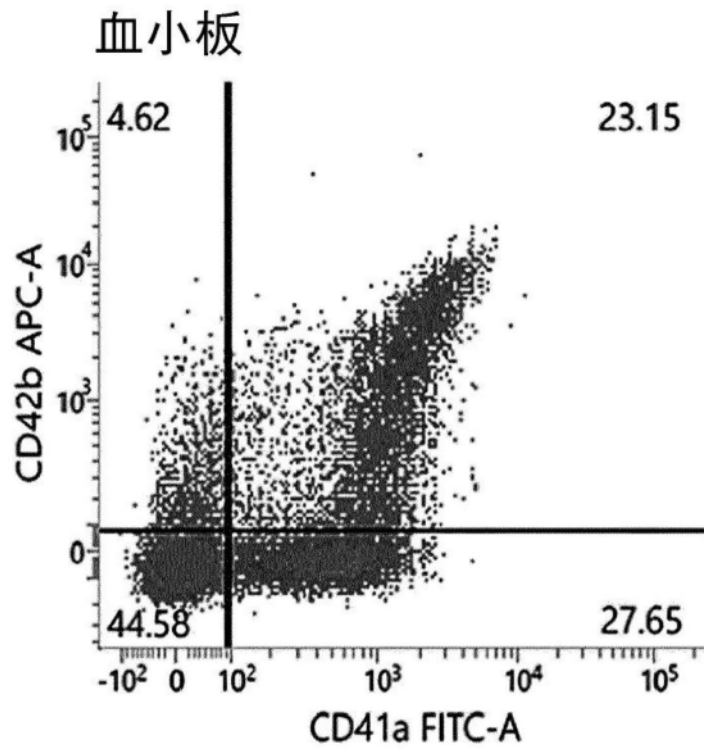
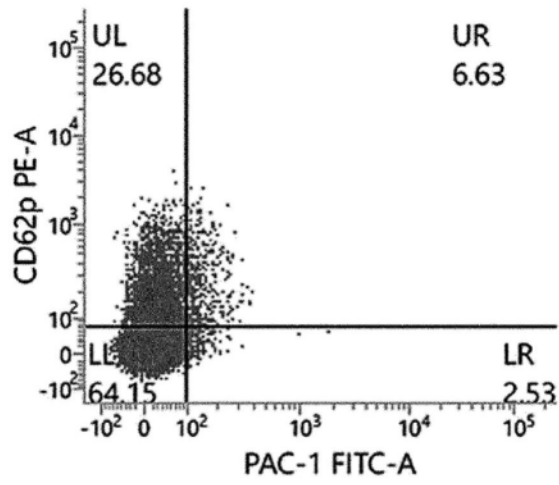


图17i

### 血小板PAC-1活性 ADP (-)



### ADP (+)

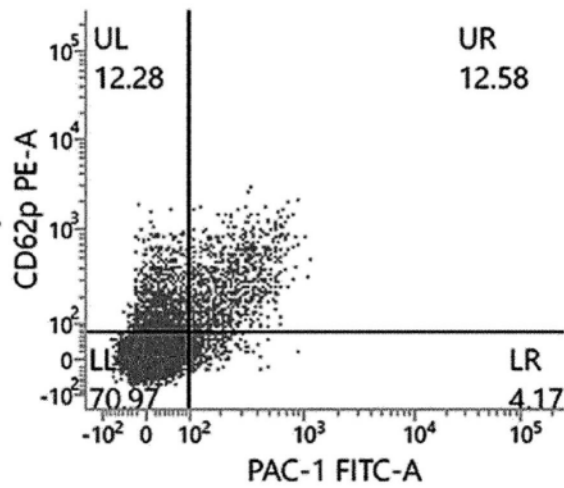


图17j

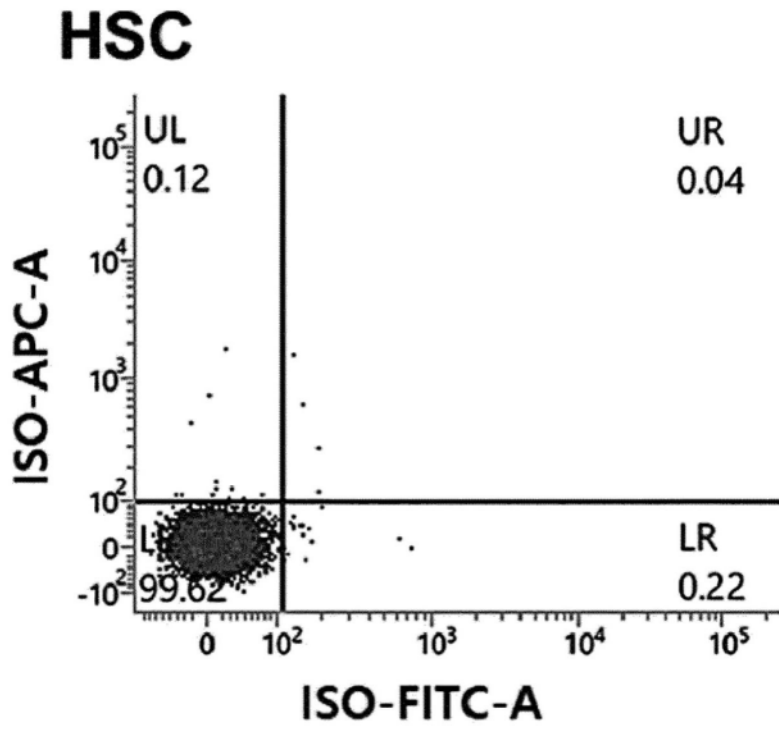


图18a

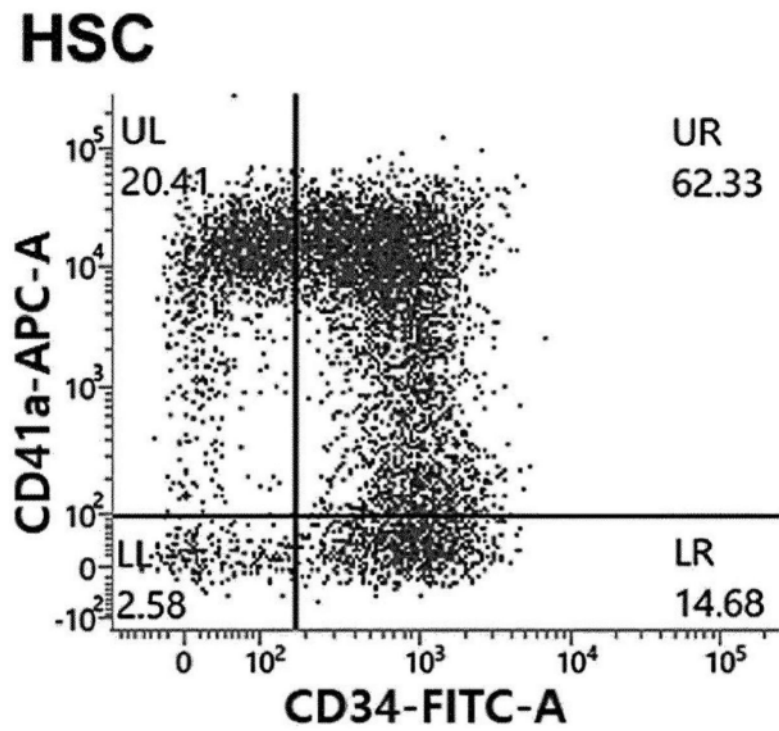


图18b

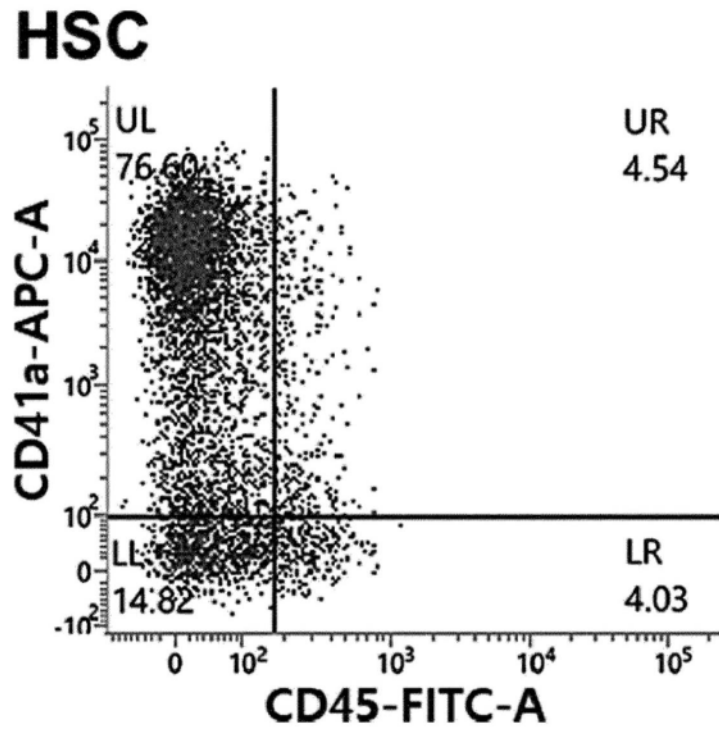


图18c

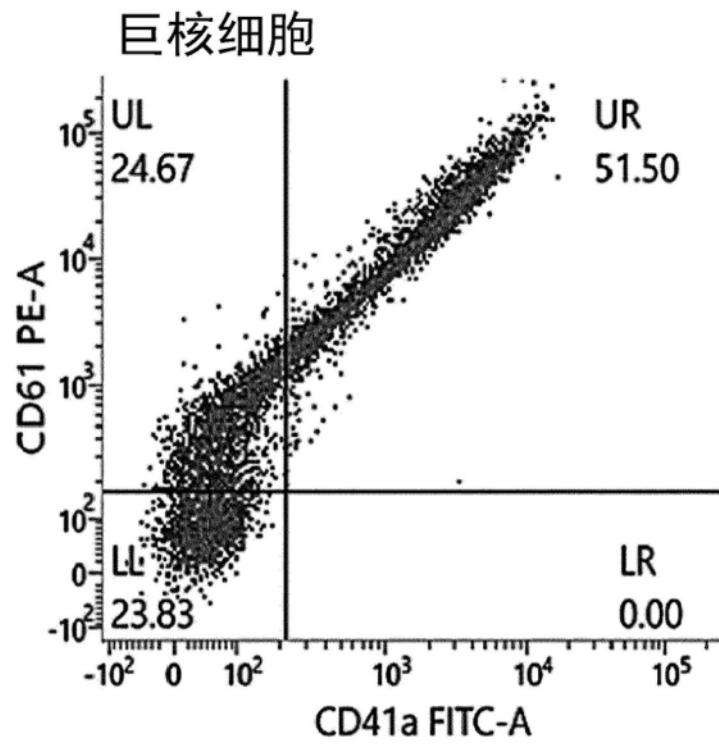


图18d

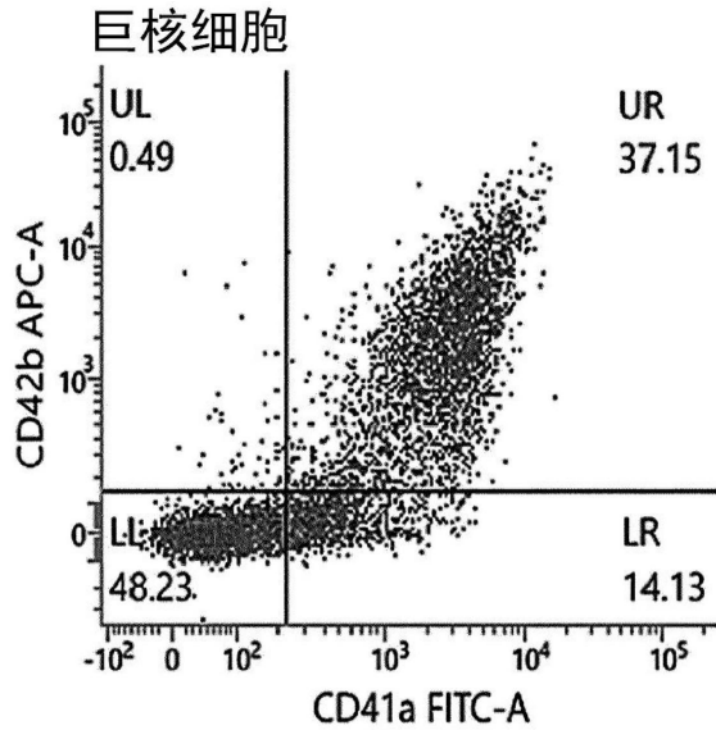


图18e

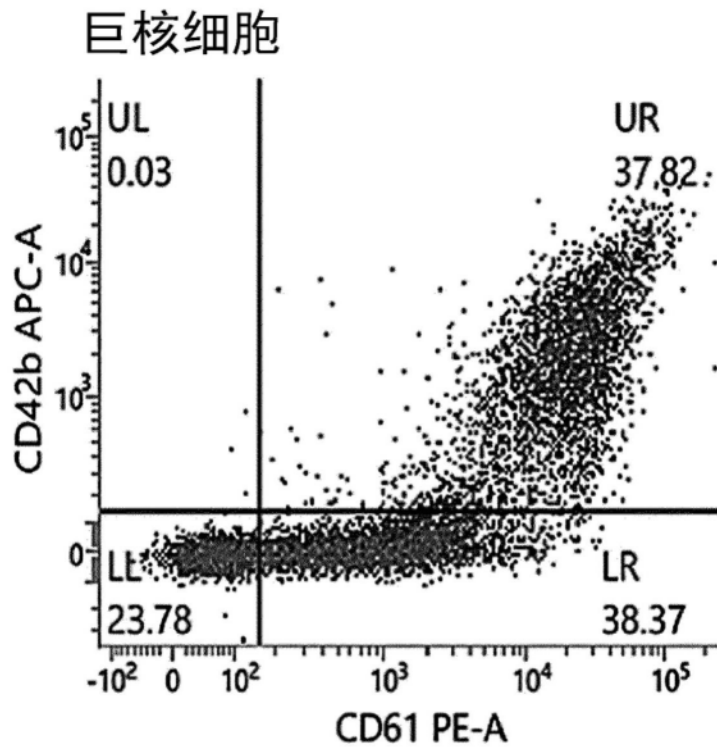


图18f

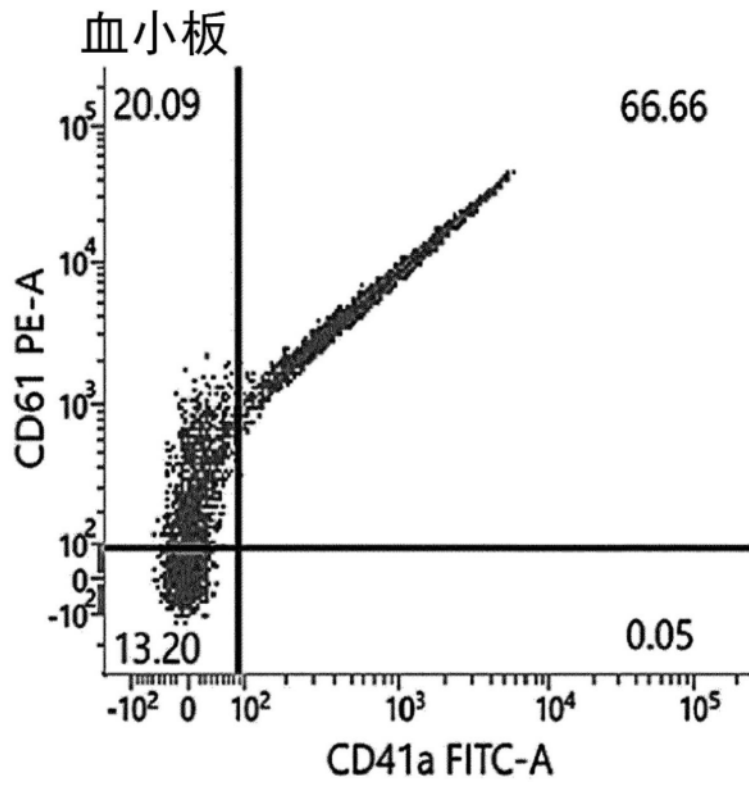


图18g

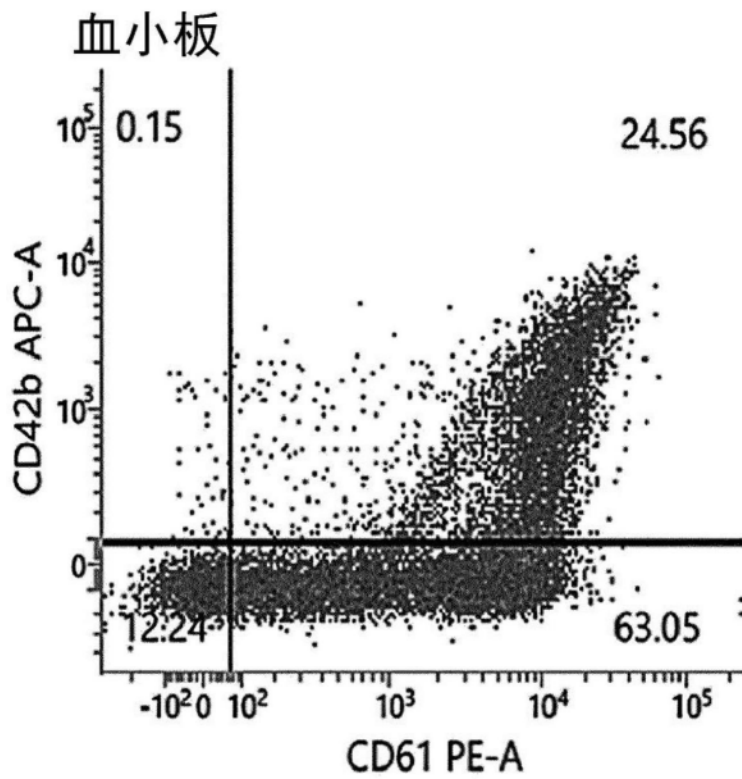


图18h

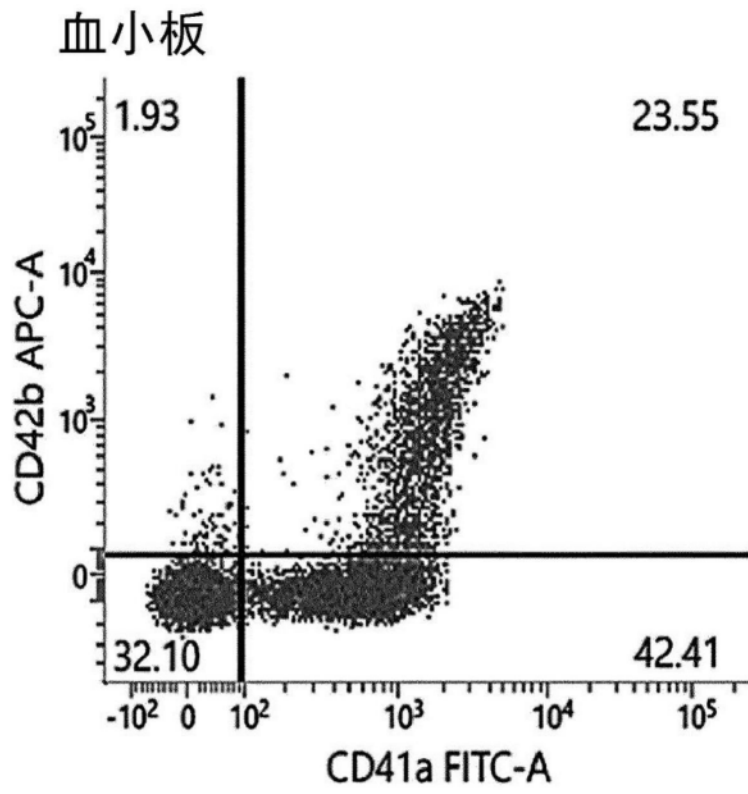
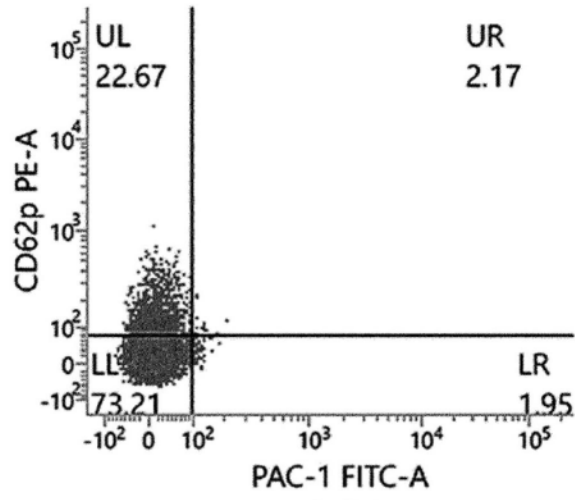


图18i

### 血小板PAC-1活性 ADP (-)



### ADP (+)

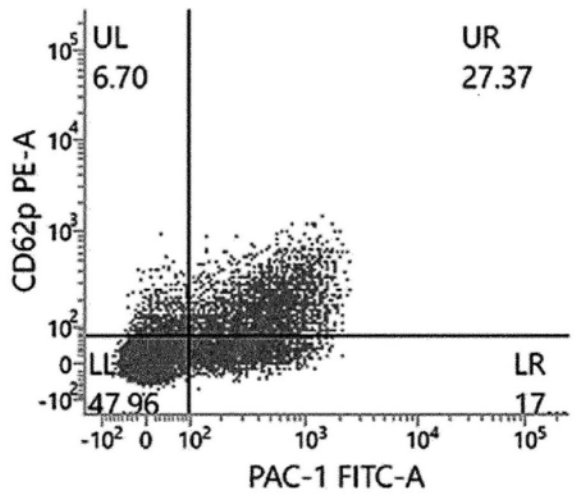


图18j

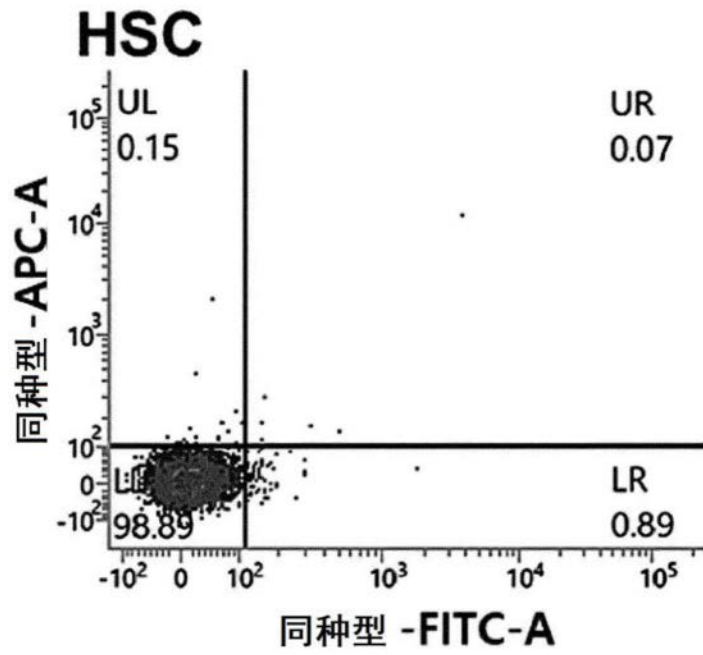


图19a

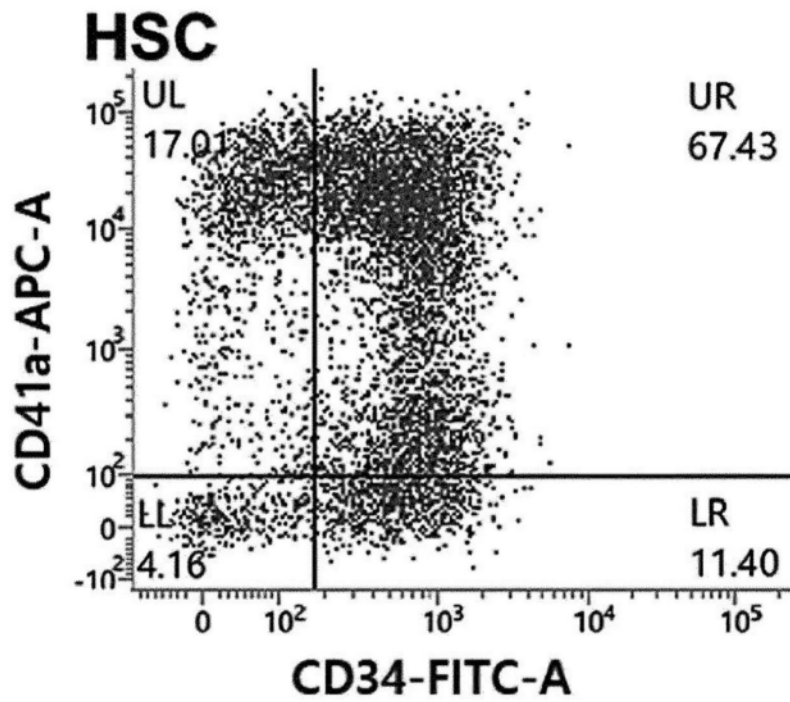


图19b

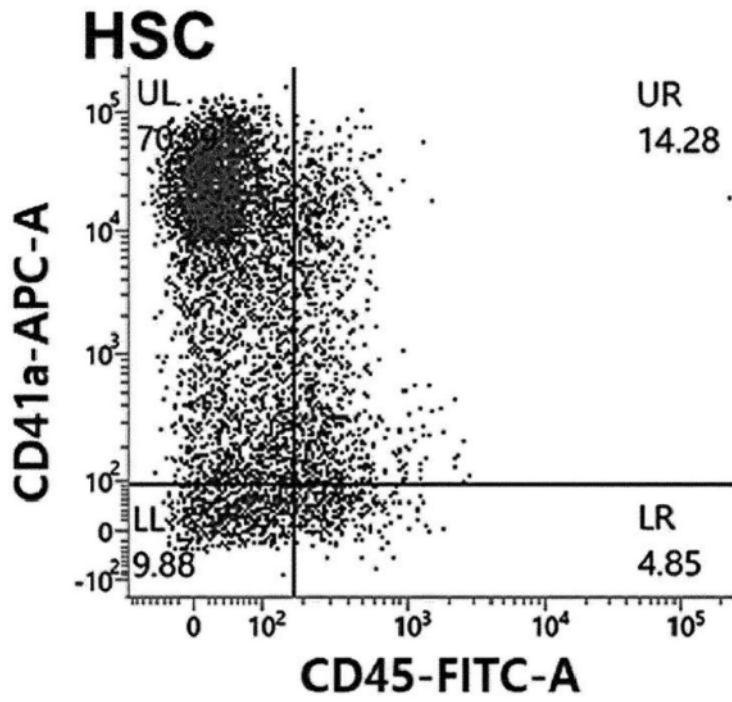


图19c

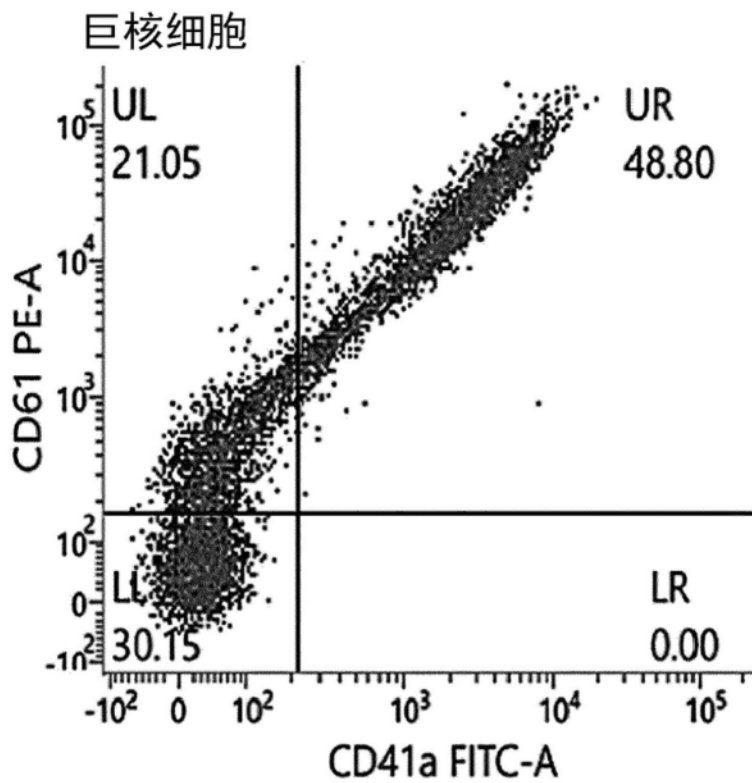


图19d

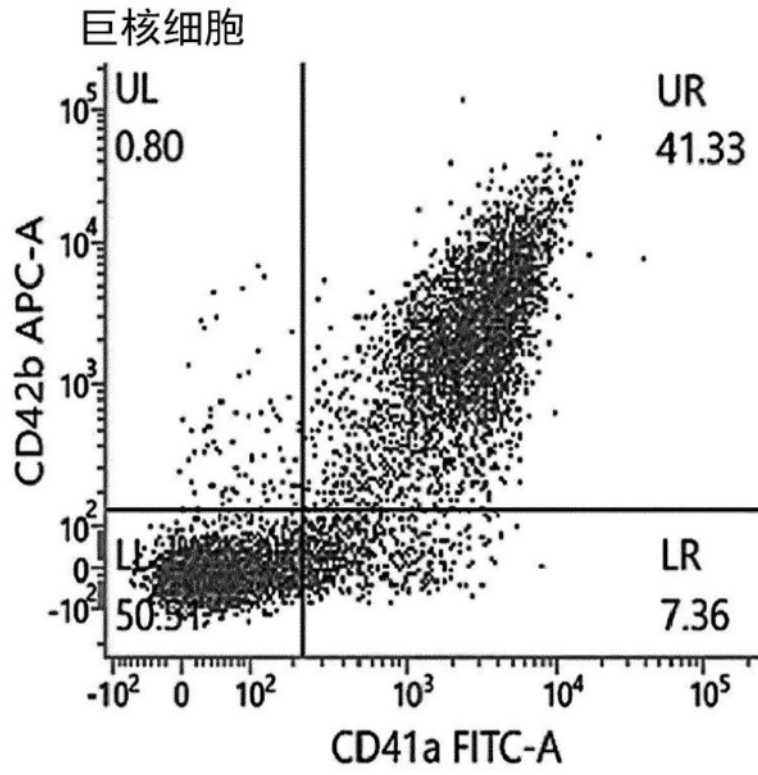


图19e

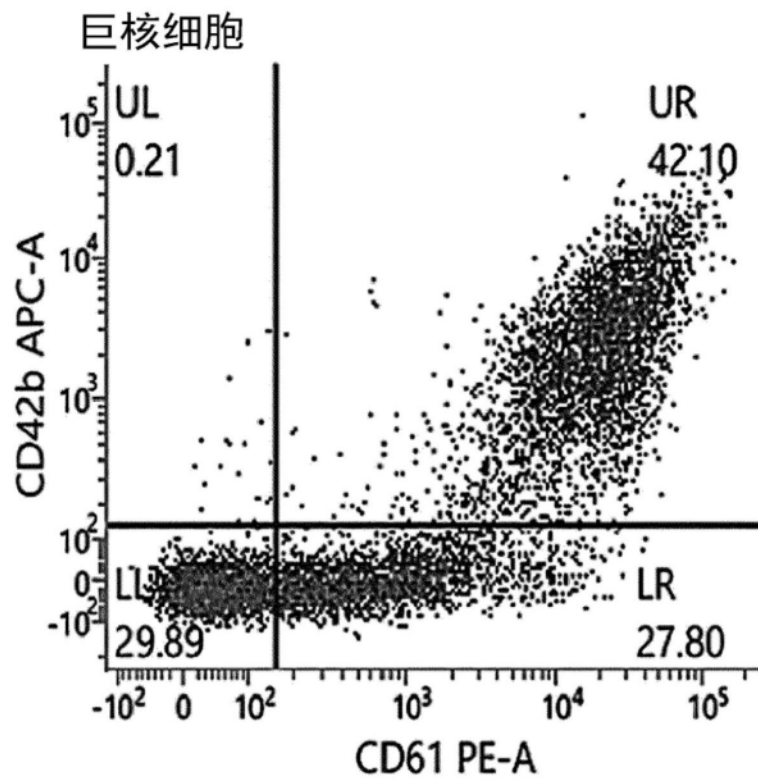


图19f

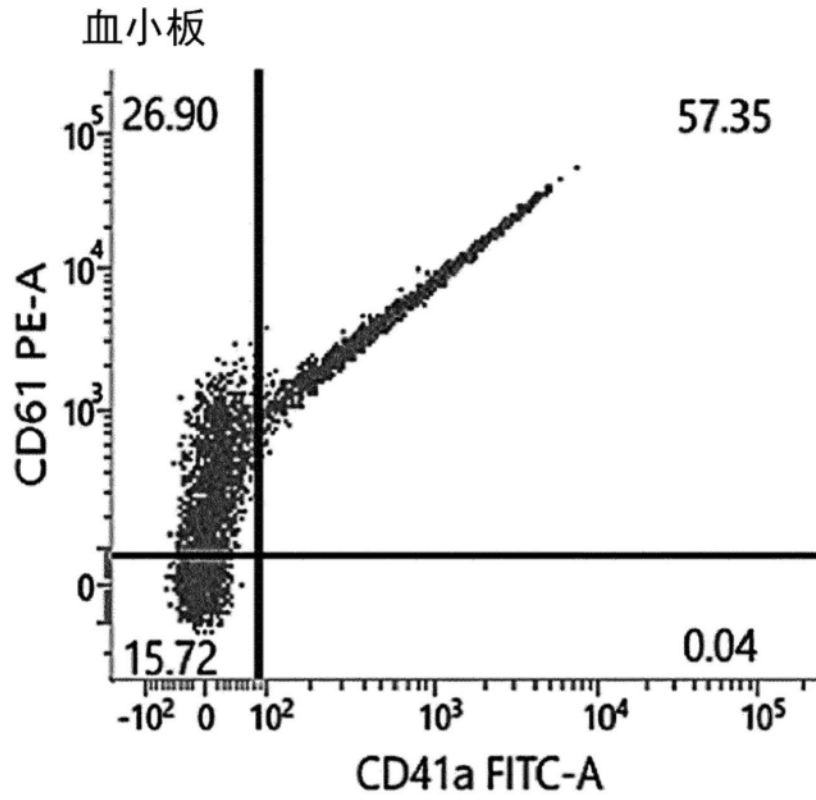


图19g

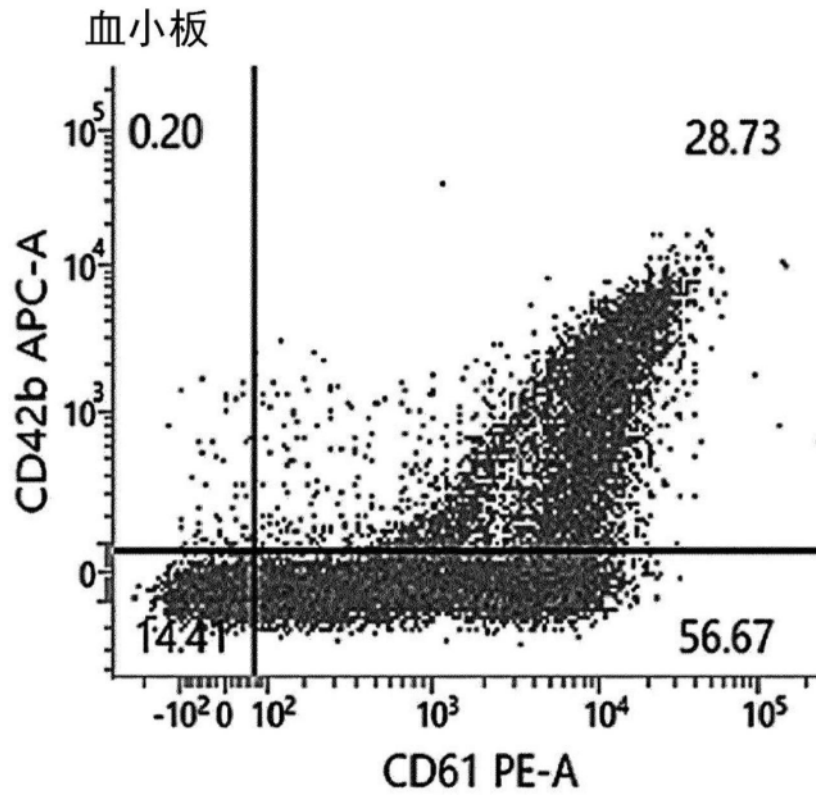


图19h

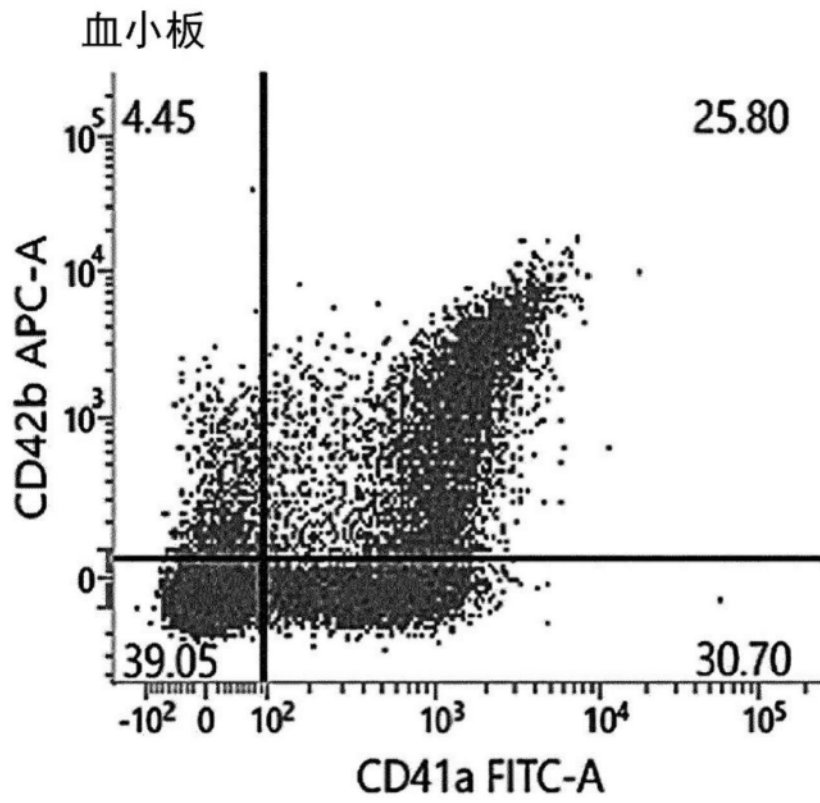


图19i

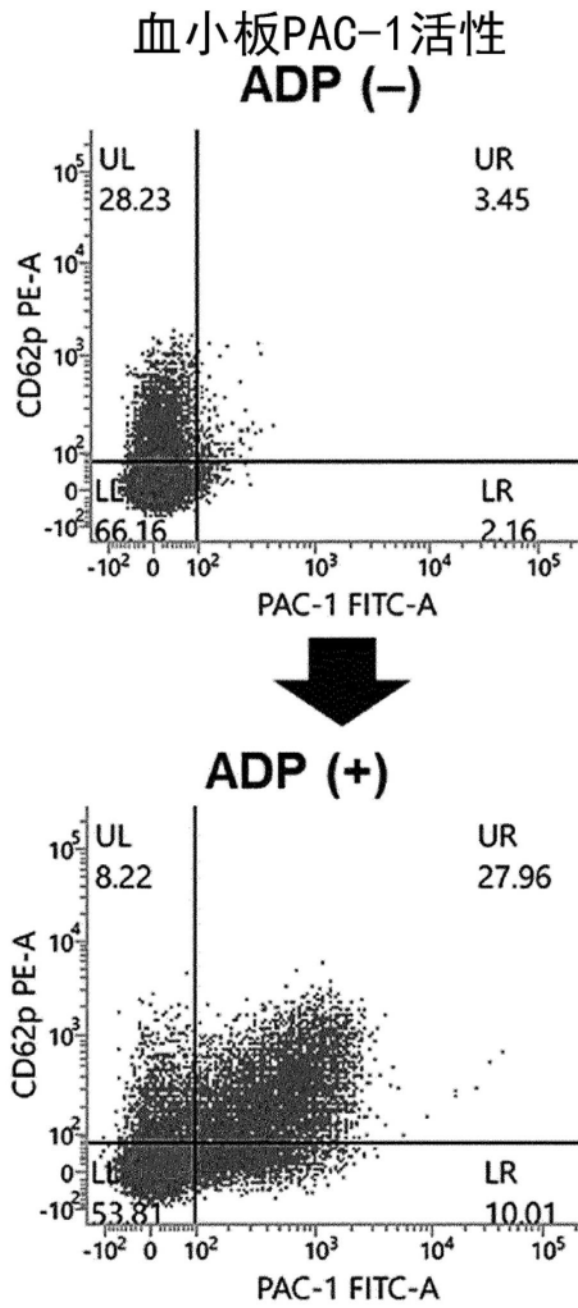


图19j

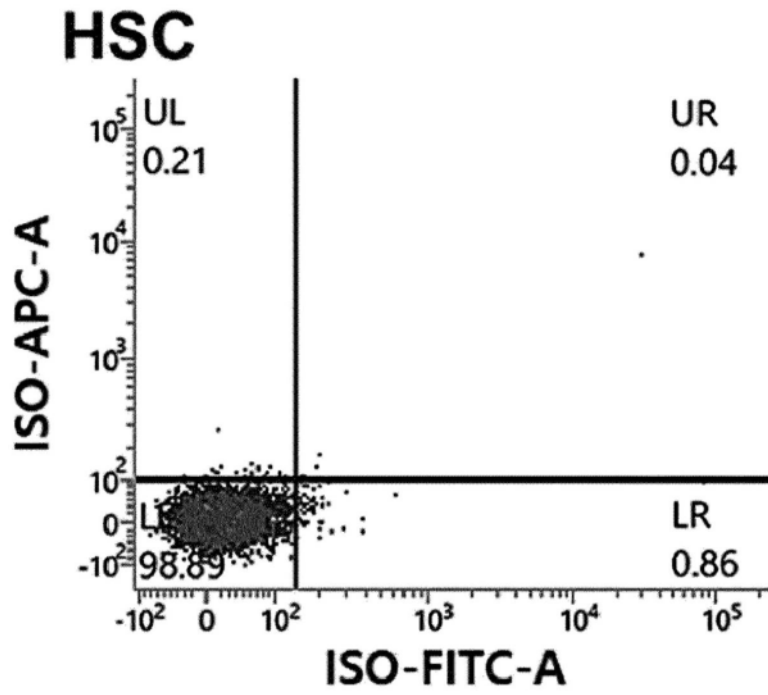


图20a

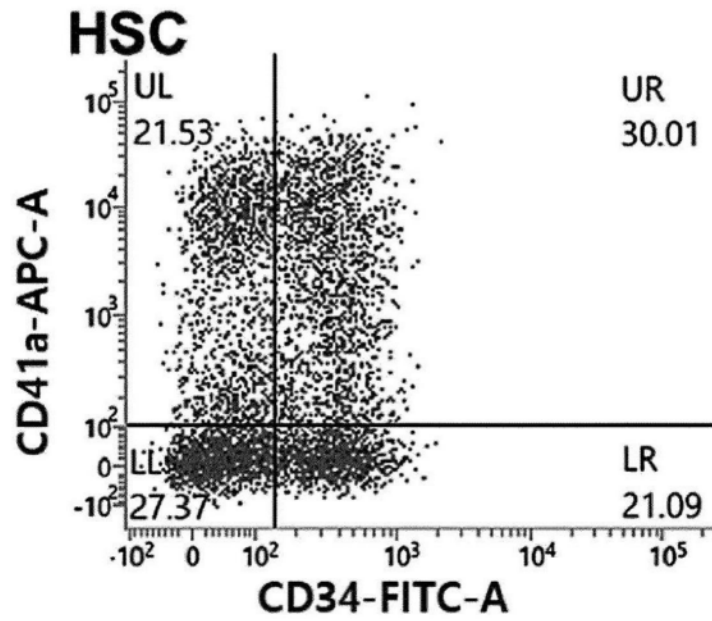


图20b

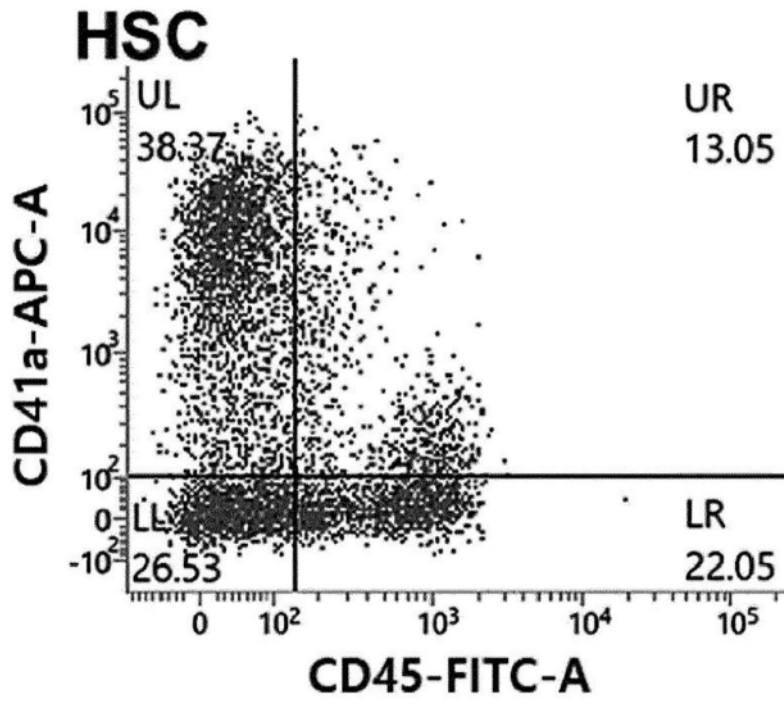


图20c

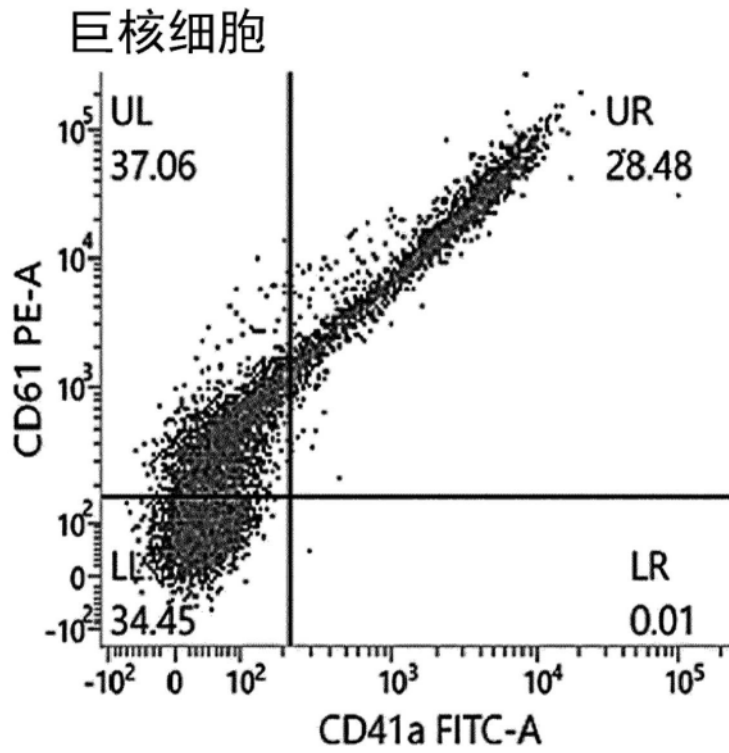


图20d

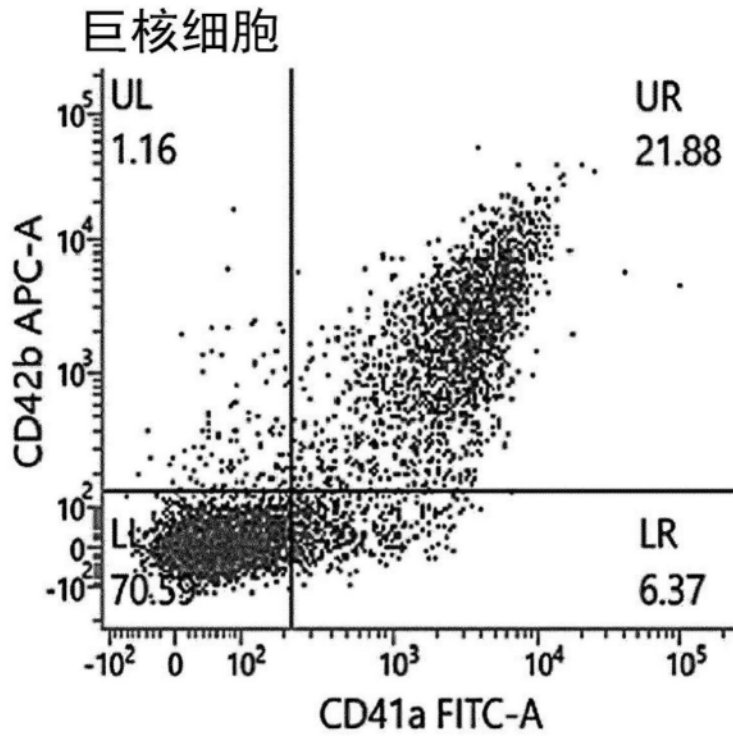


图20e

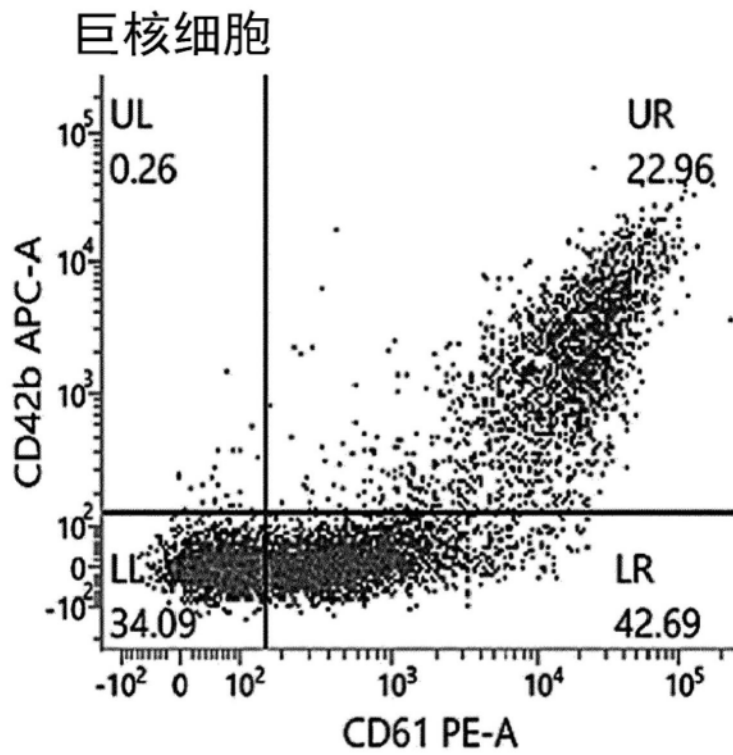


图20f

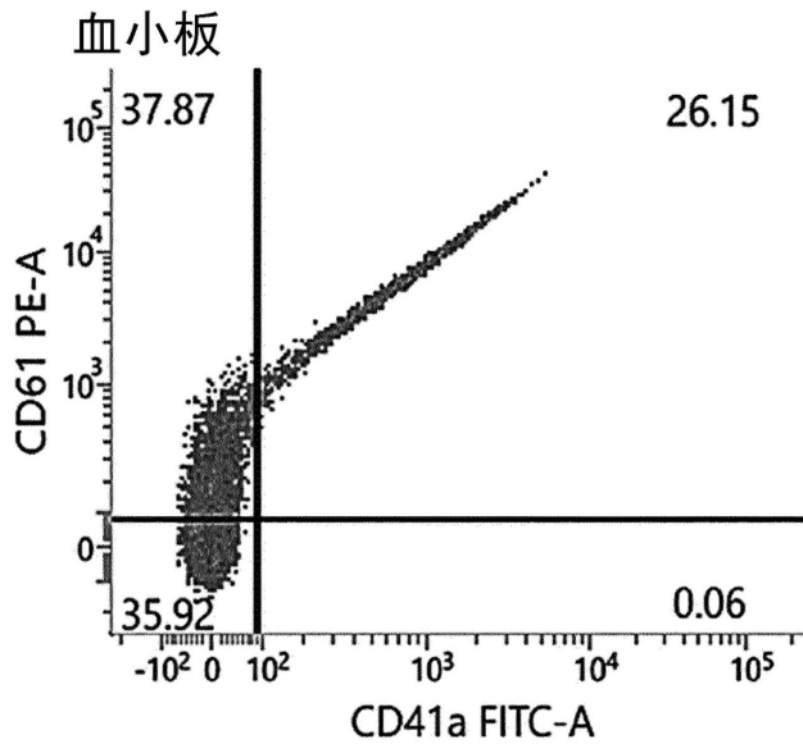


图20g

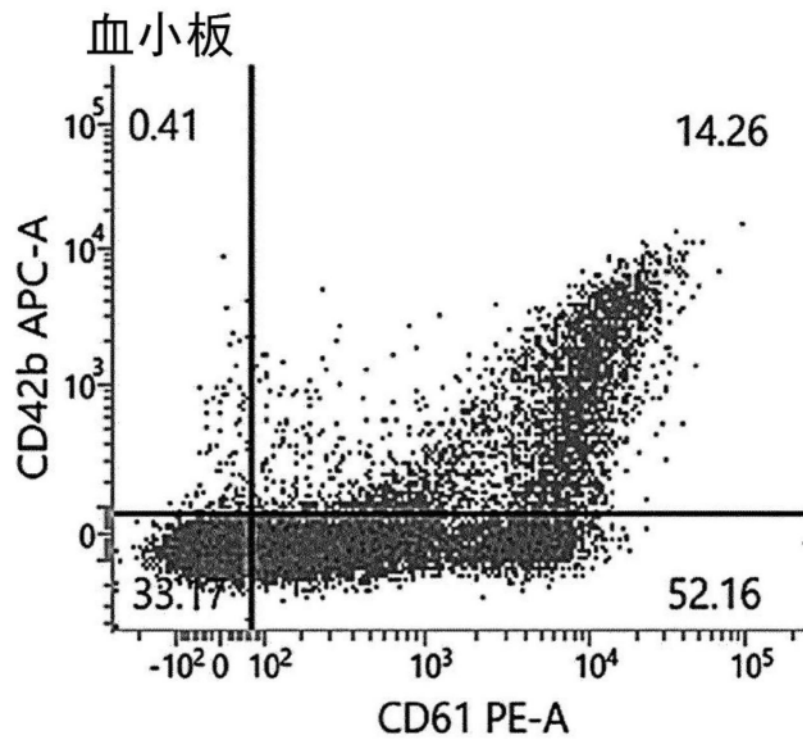


图20h

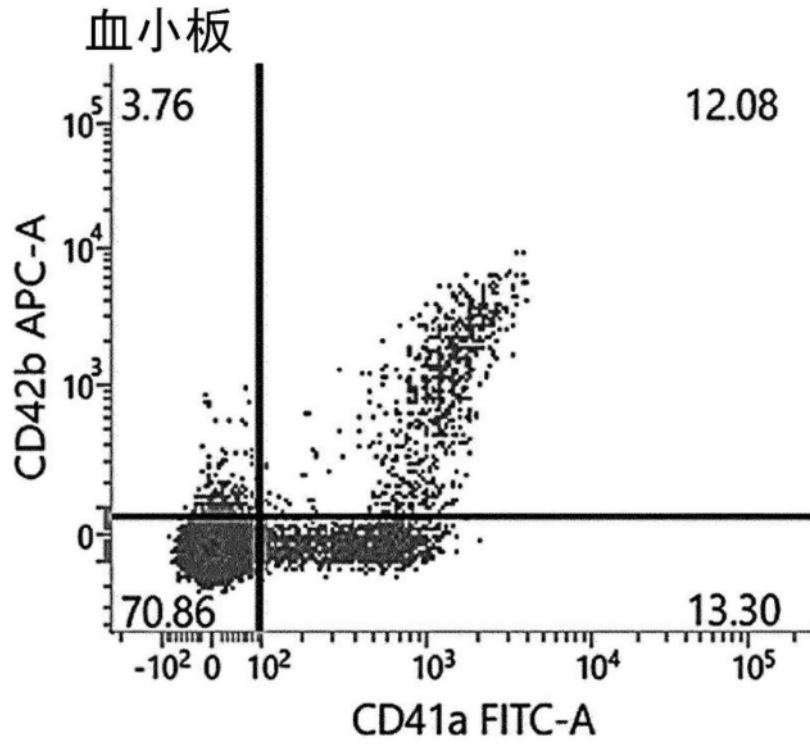
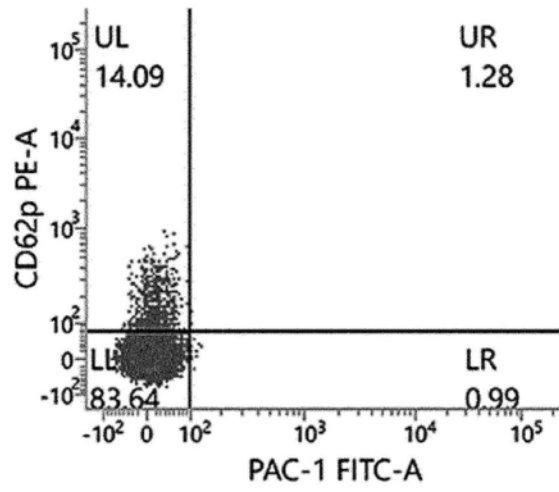


图20i

### 血小板PAC-1活性 ADP (-)



### ADP (+)

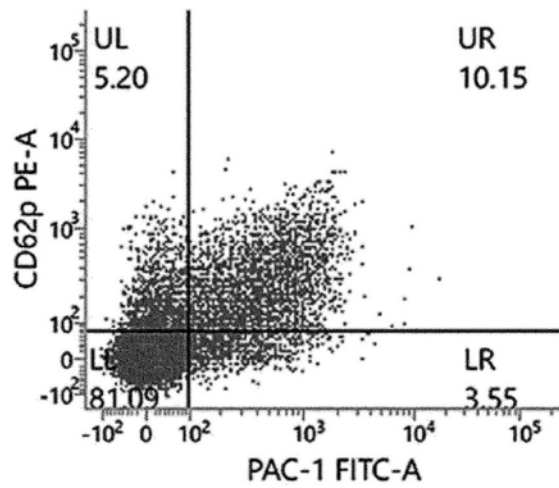


图20j

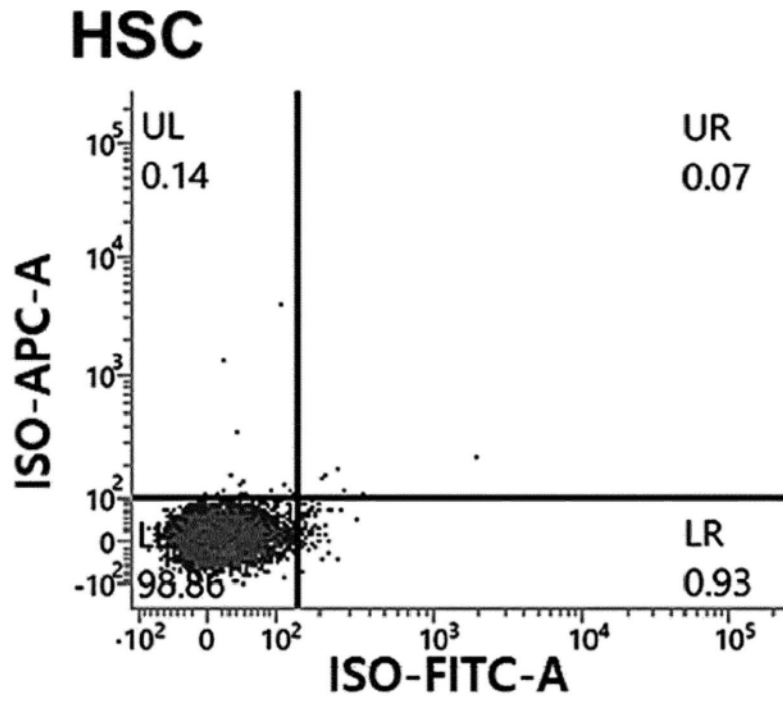


图21a

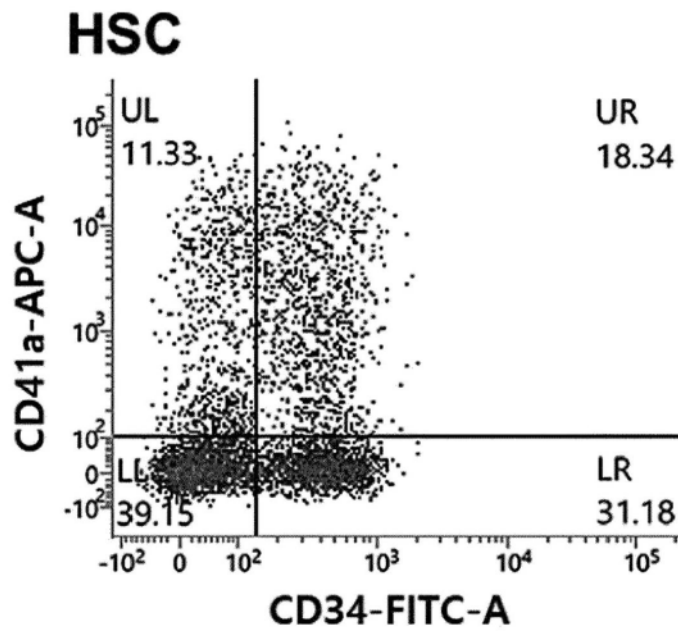


图21b

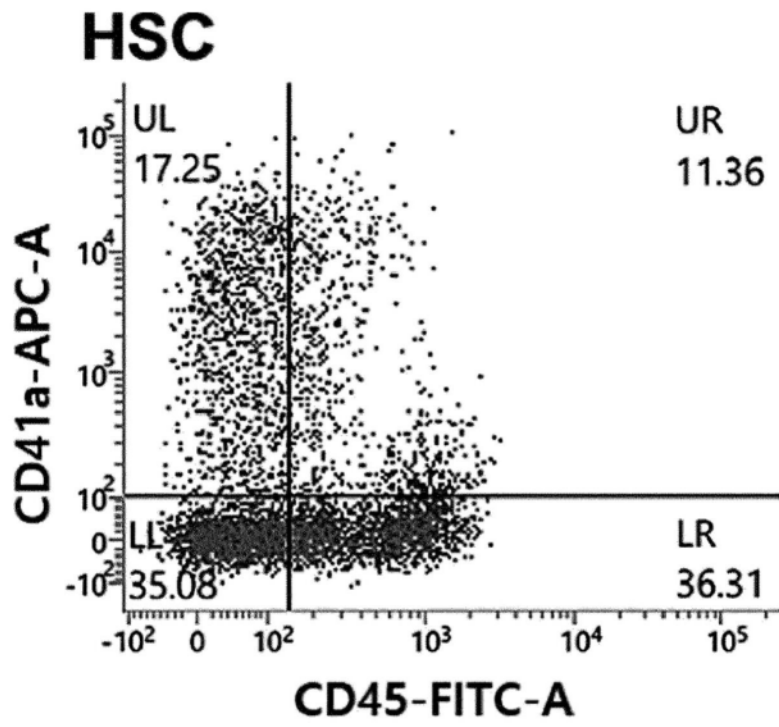


图21c

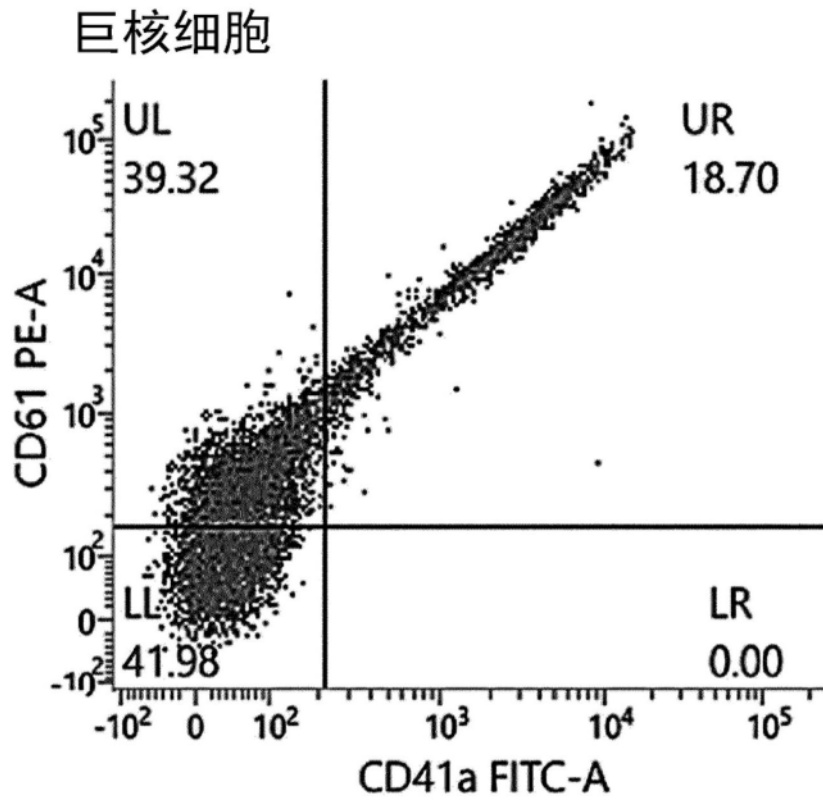


图21d

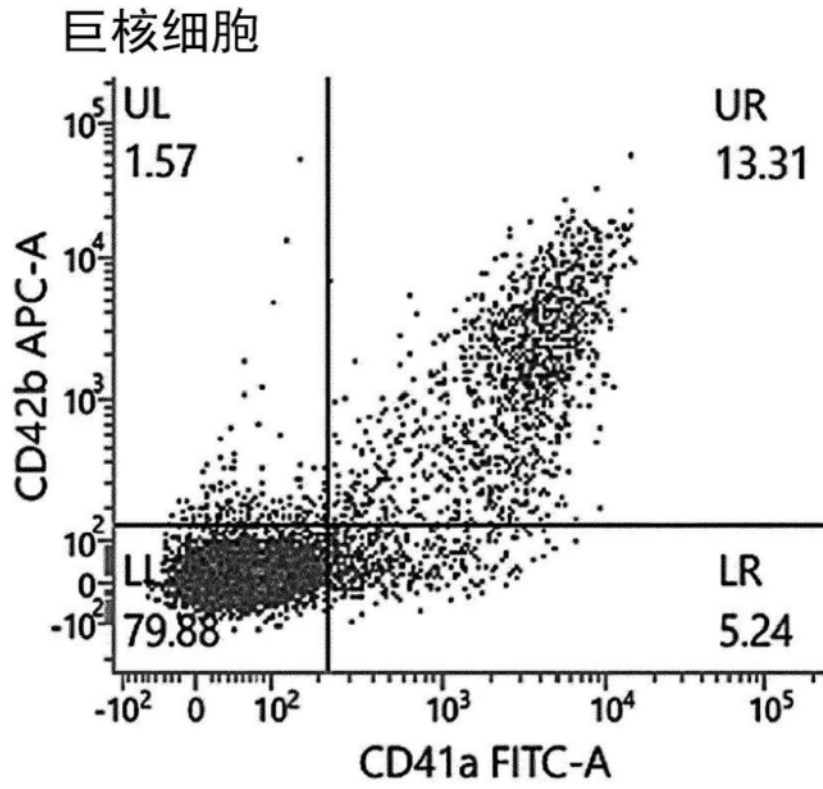


图21e

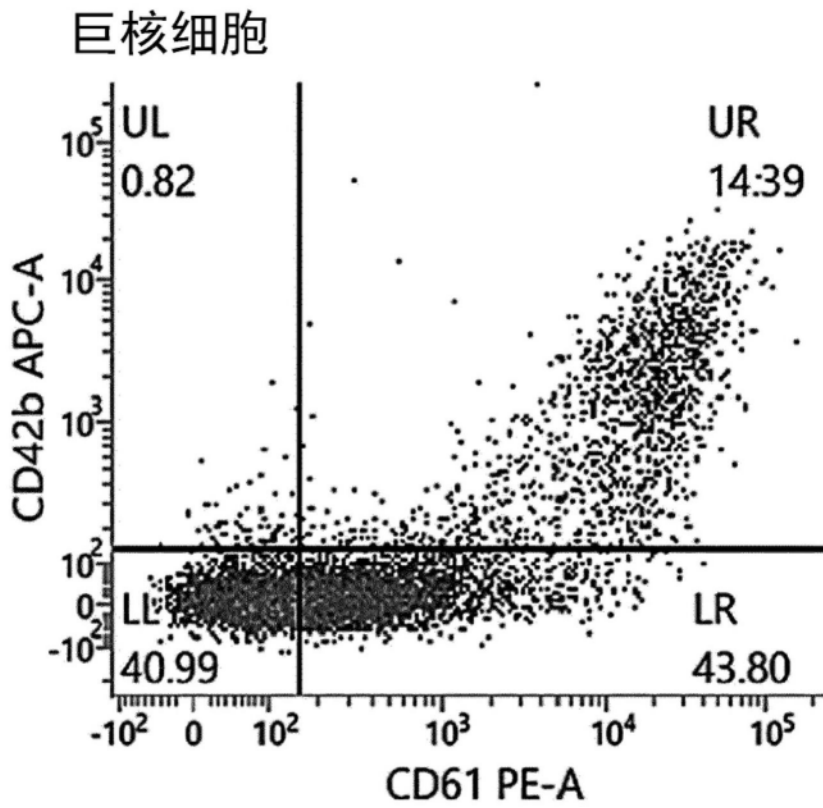


图21f

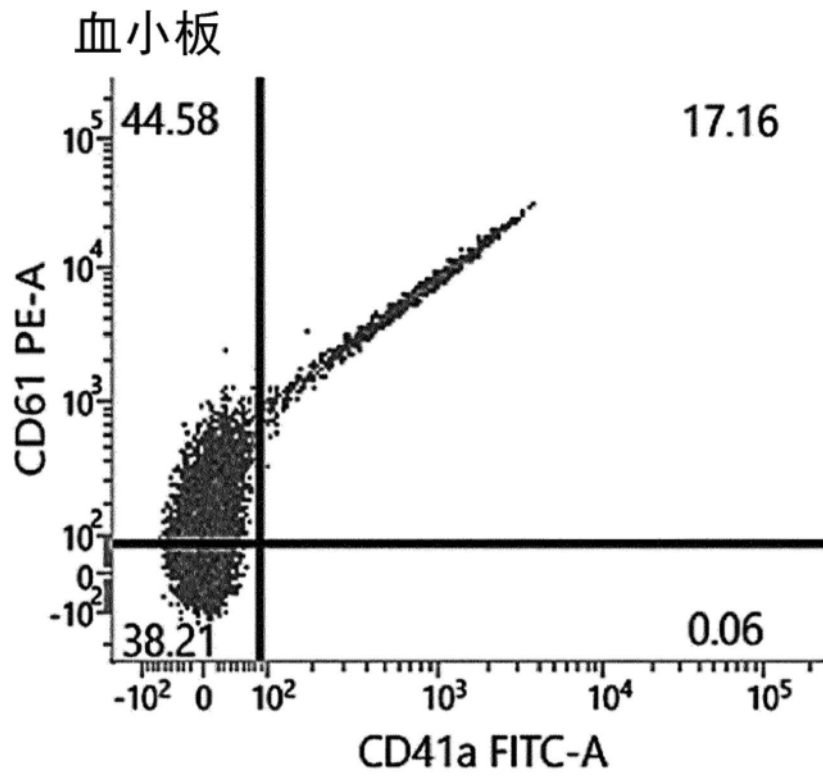


图21g

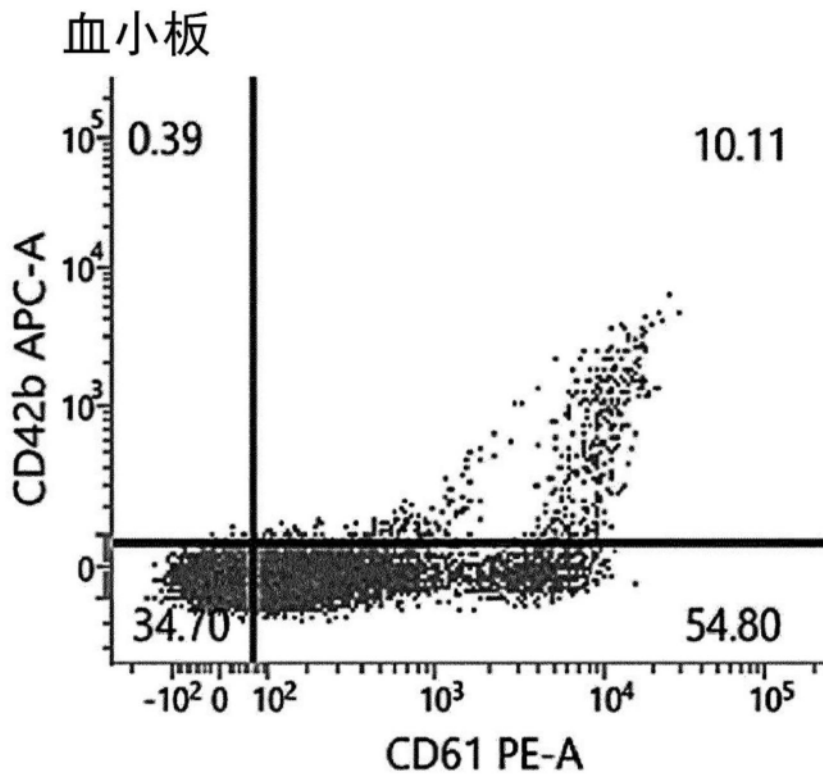


图21h

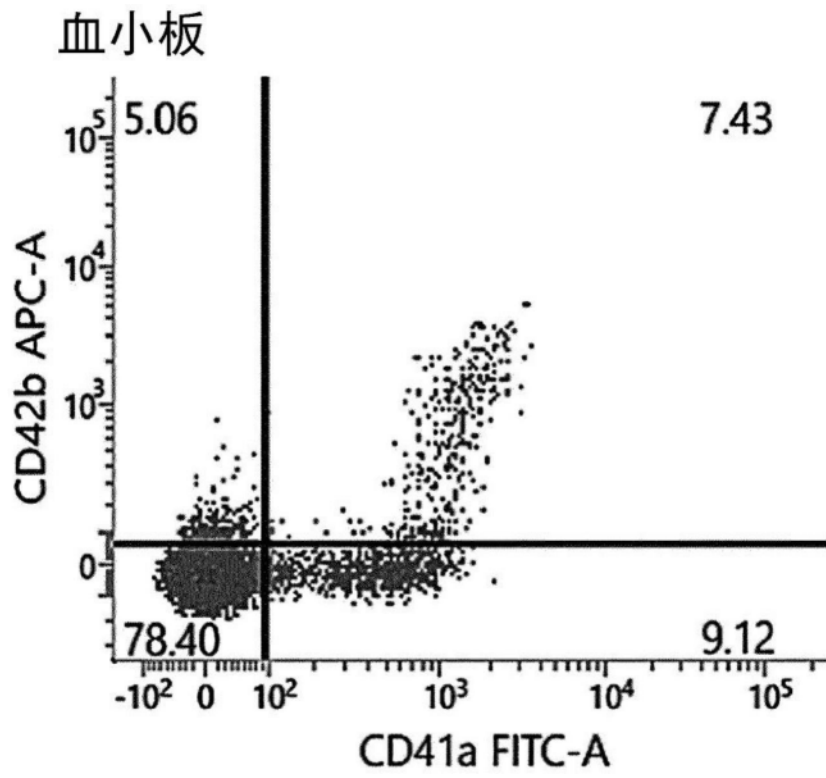


图21i

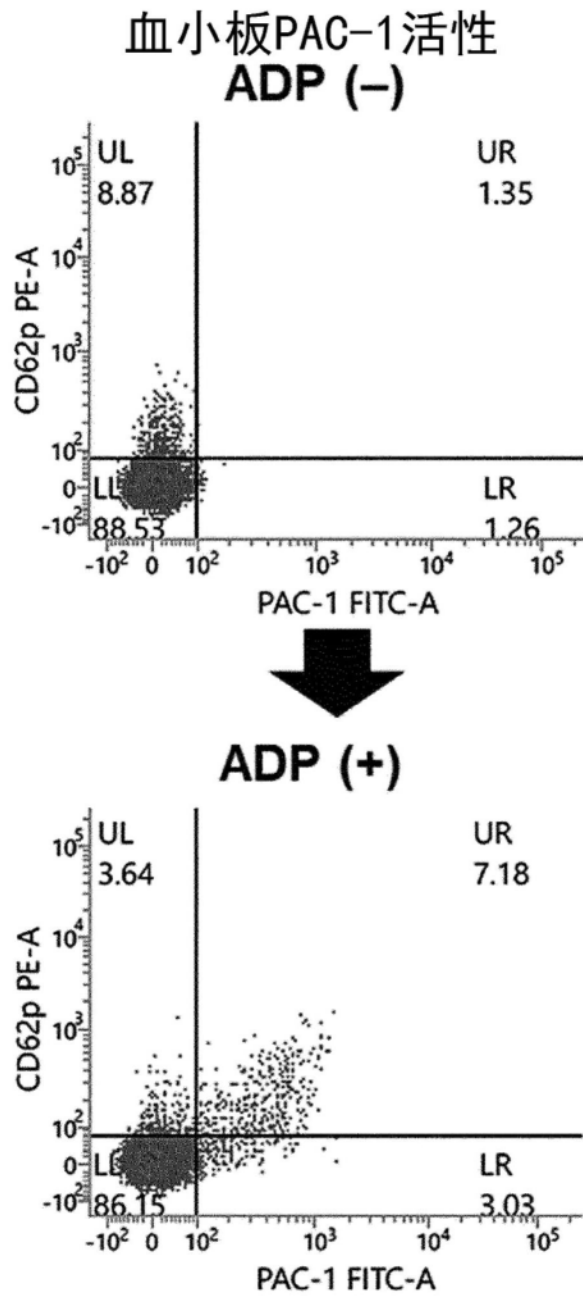


图21j

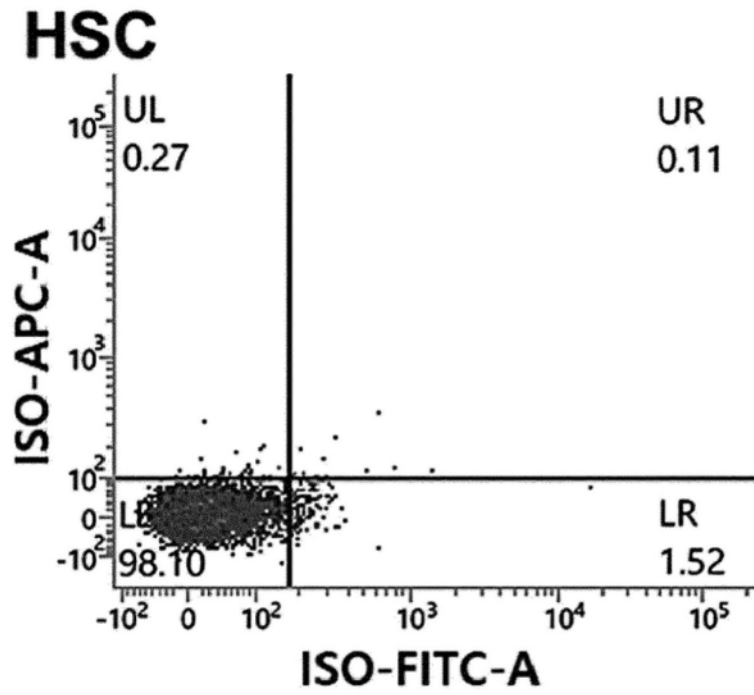


图22a

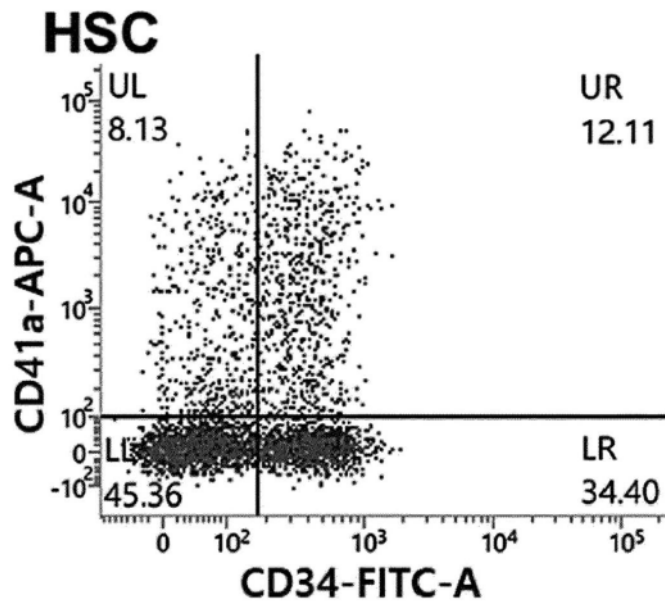


图22b

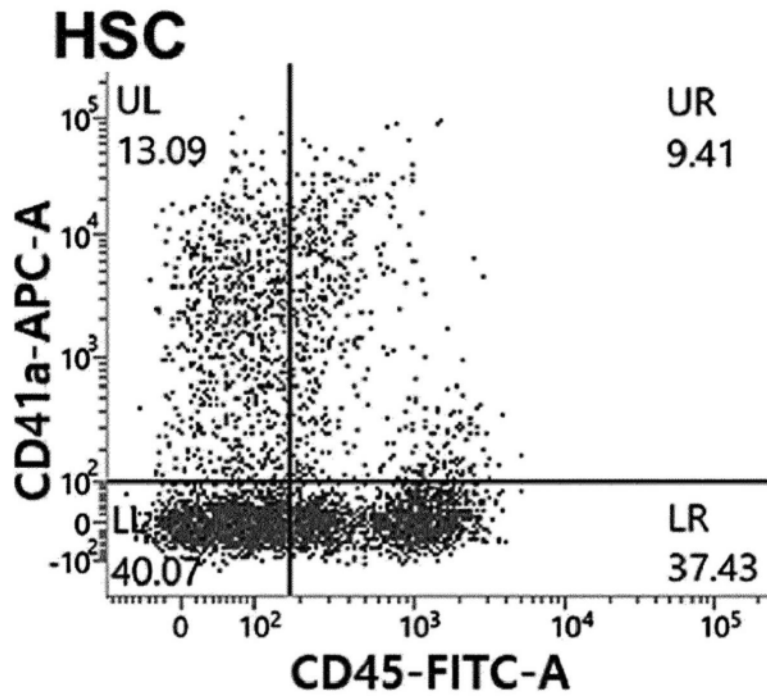


图22c

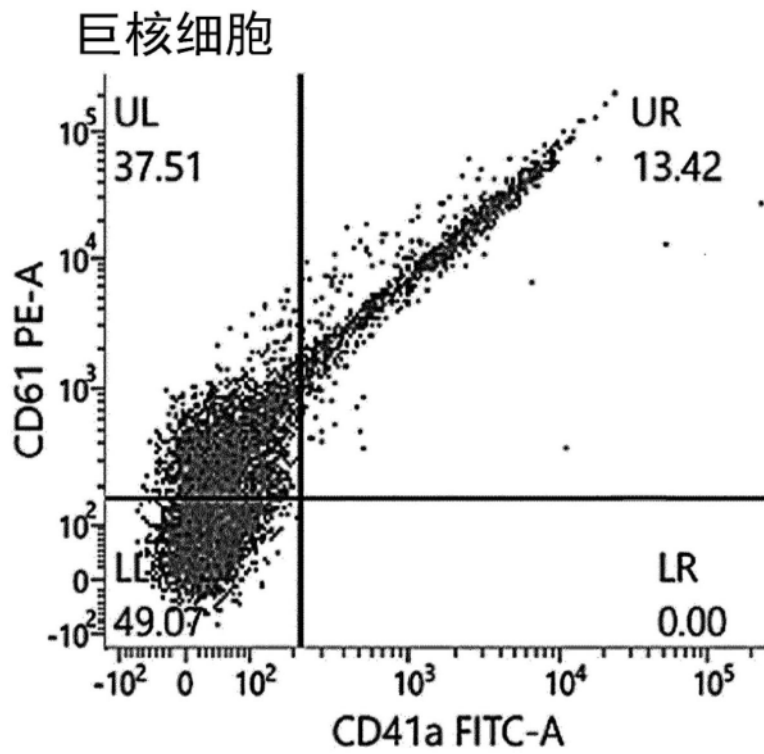


图22d

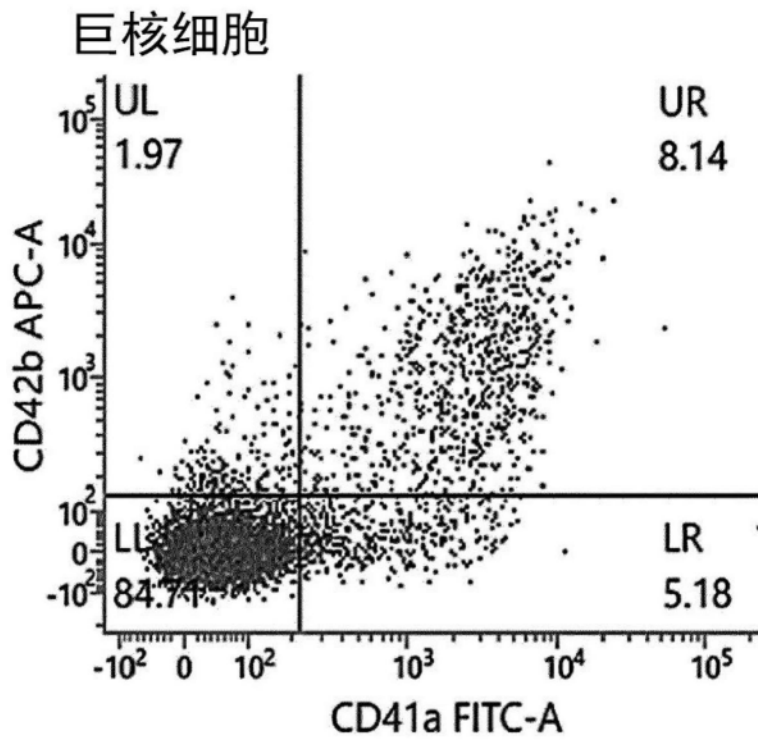


图22e

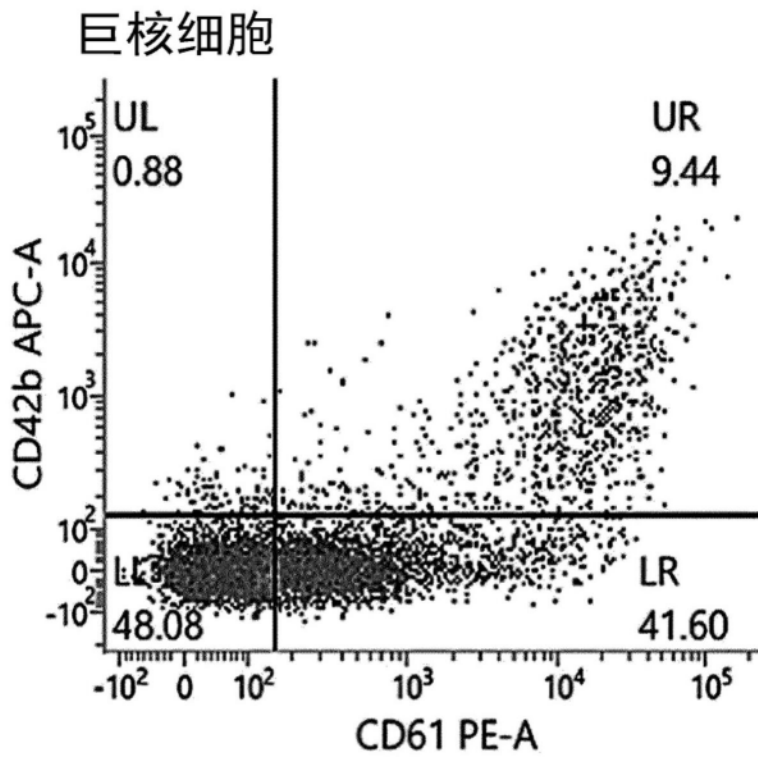


图22f

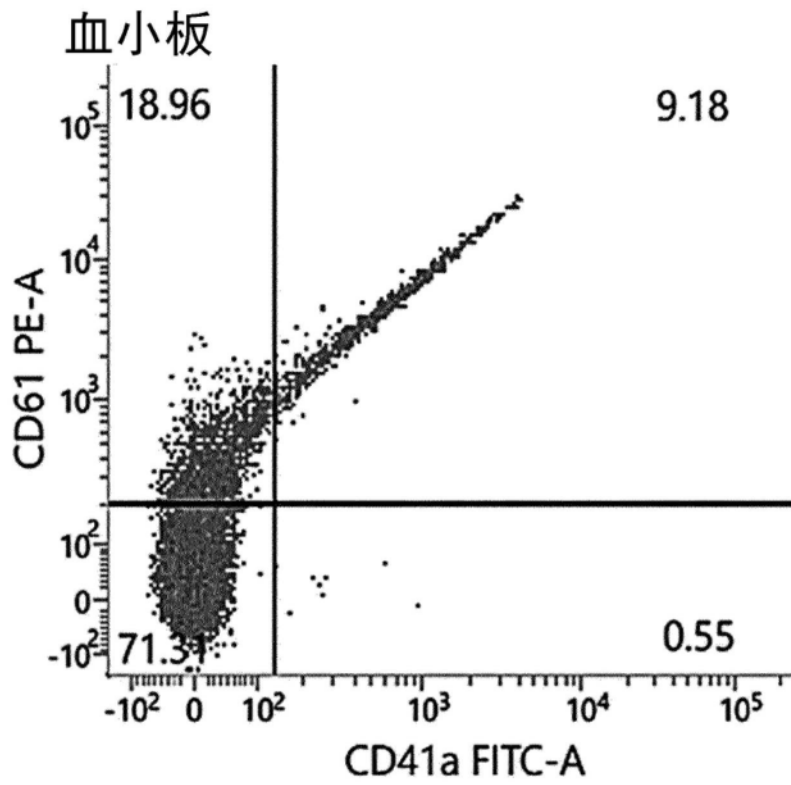


图22g

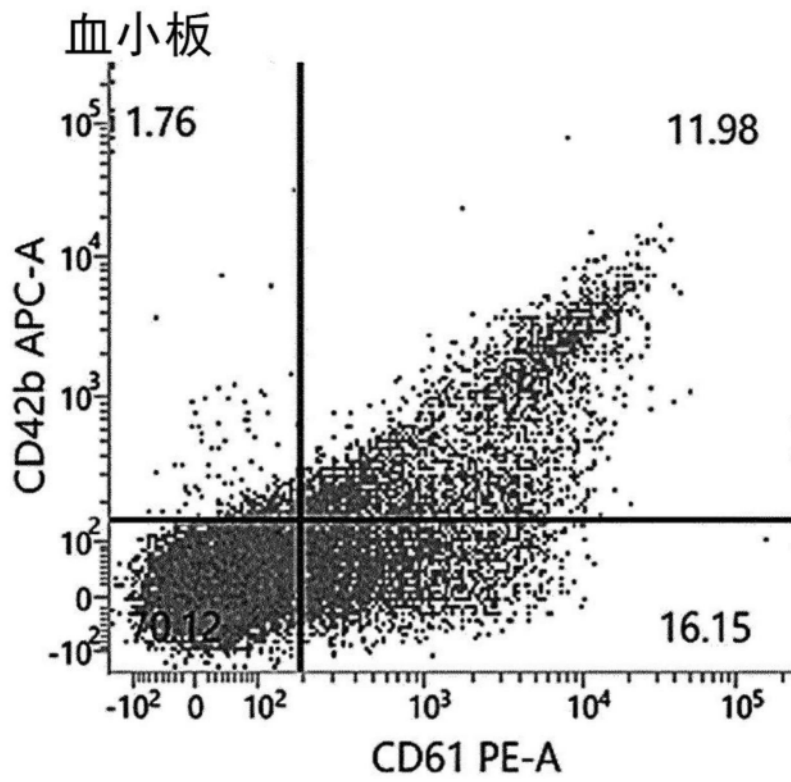


图22h

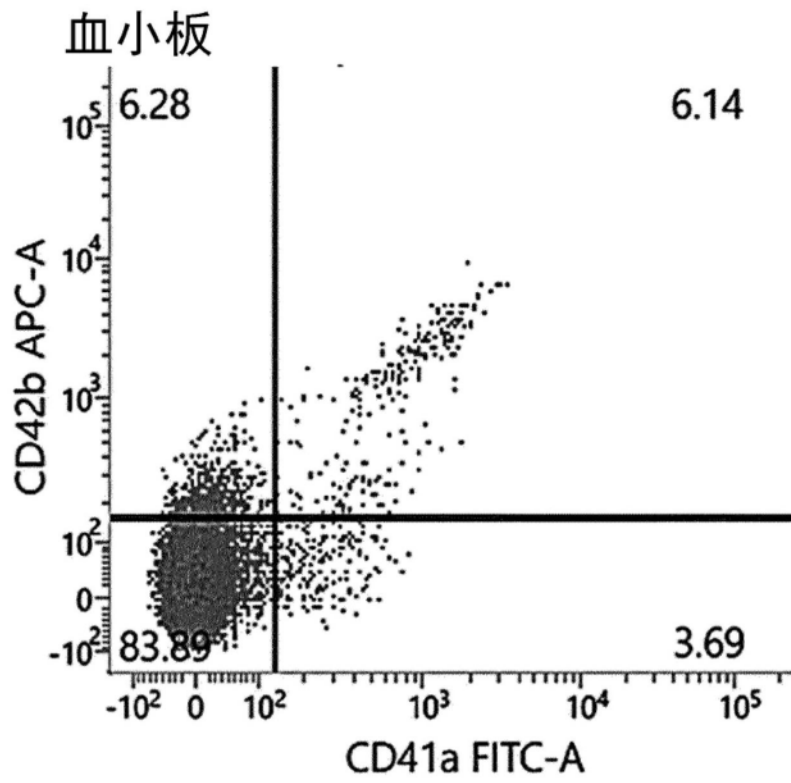
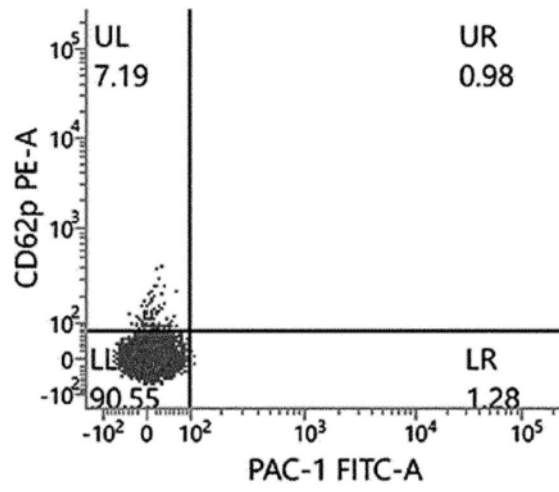


图22i

### 血小板PAC-1活性 ADP (-)



### ADP (+)

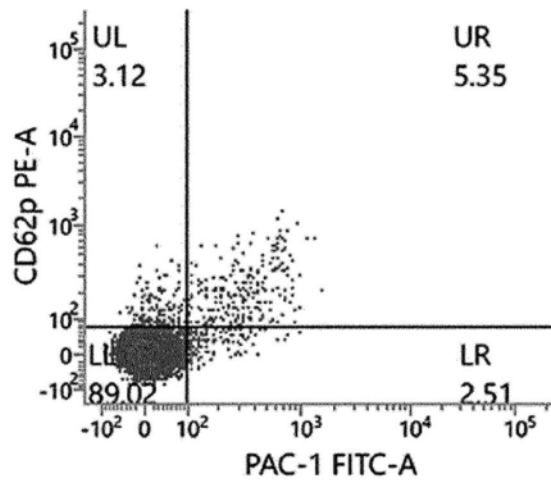


图22j

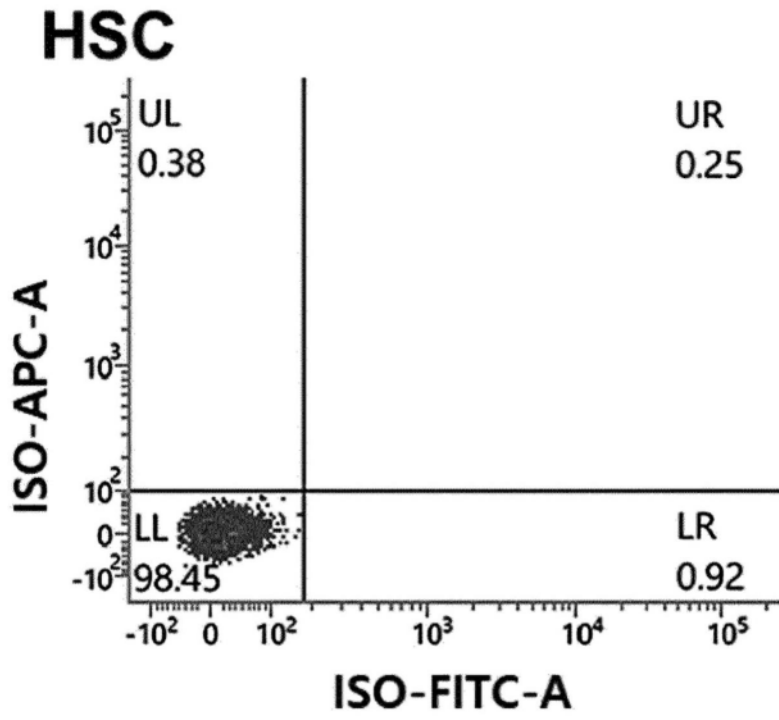


图23a

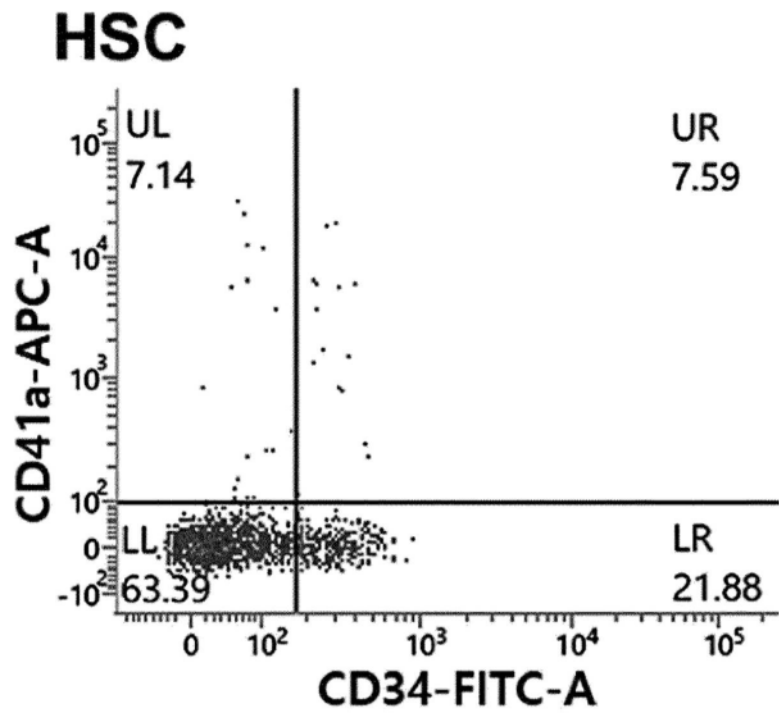


图23b

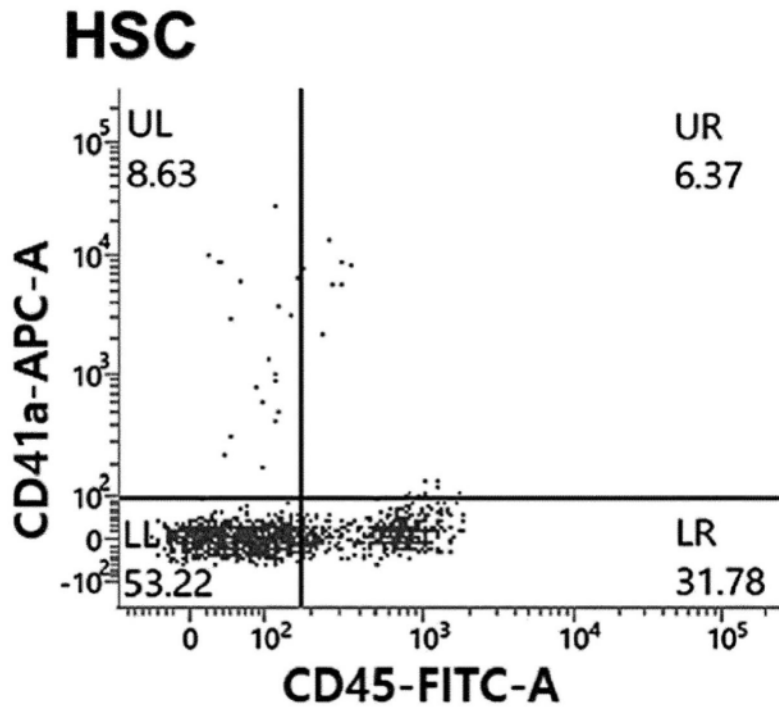


图23c

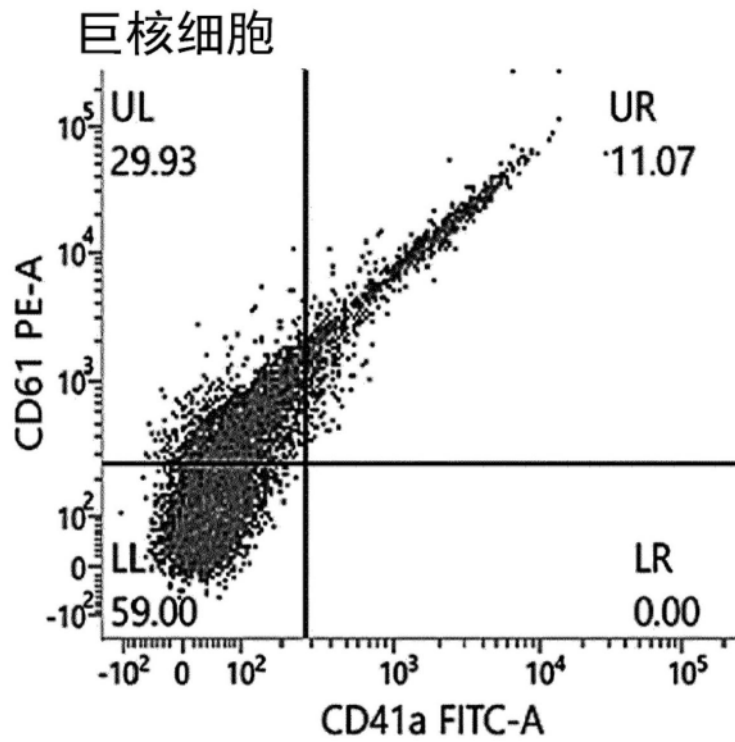


图23d

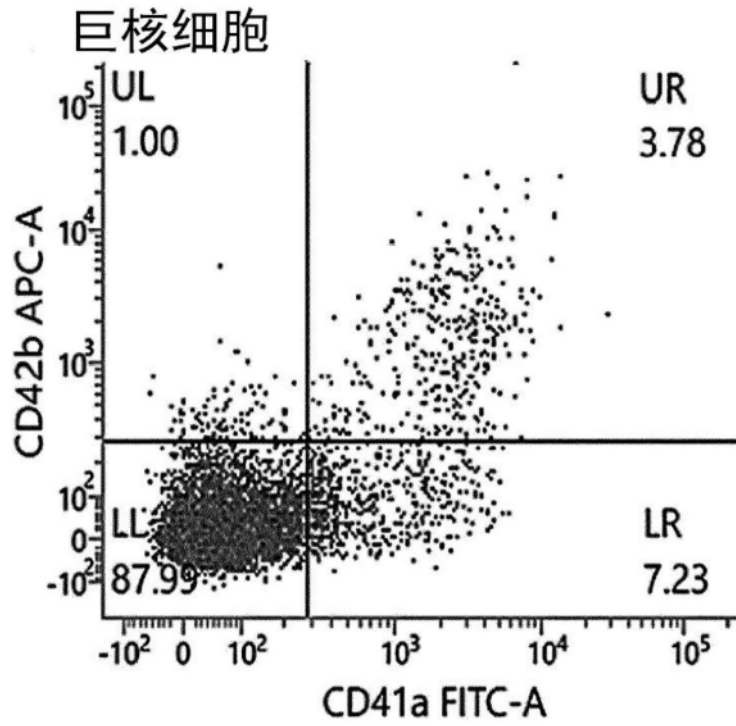


图23e

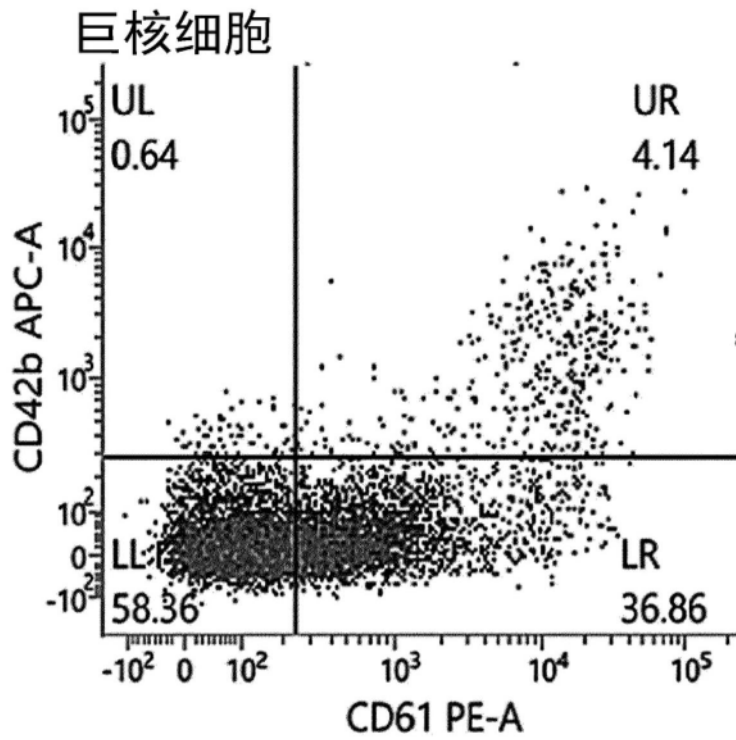


图23f

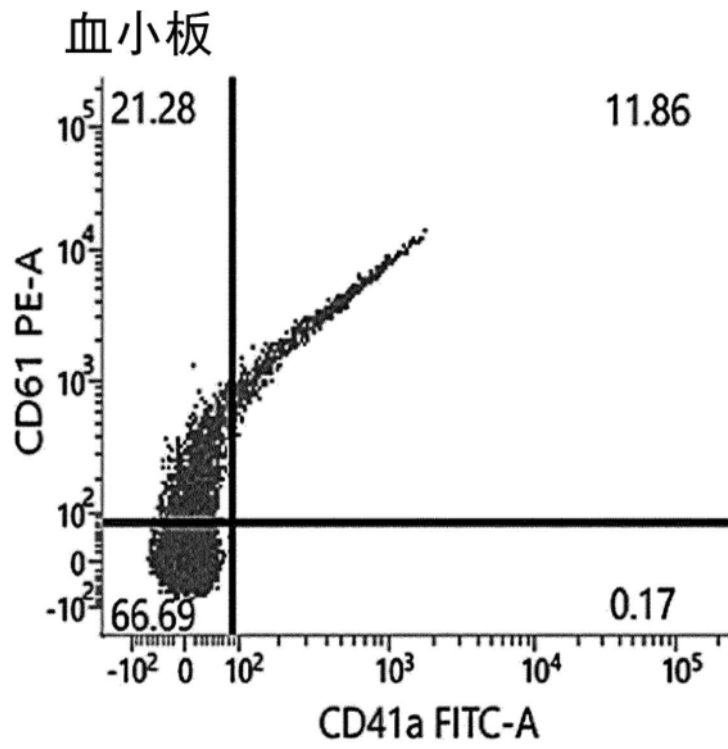


图23g

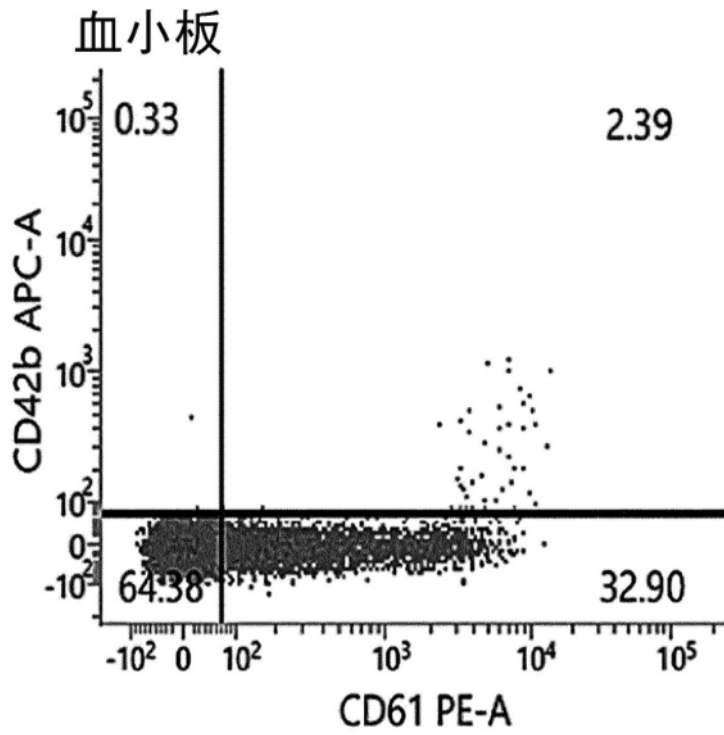


图23h

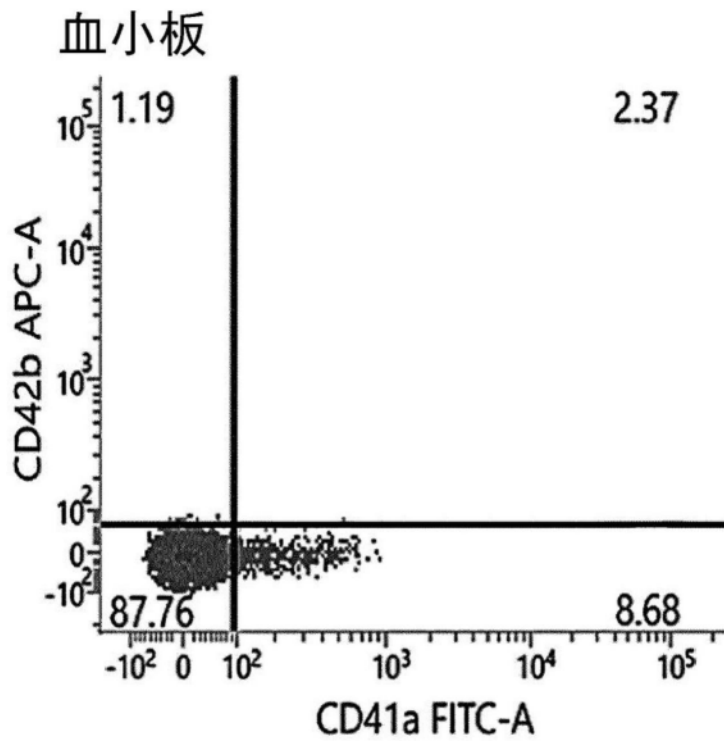
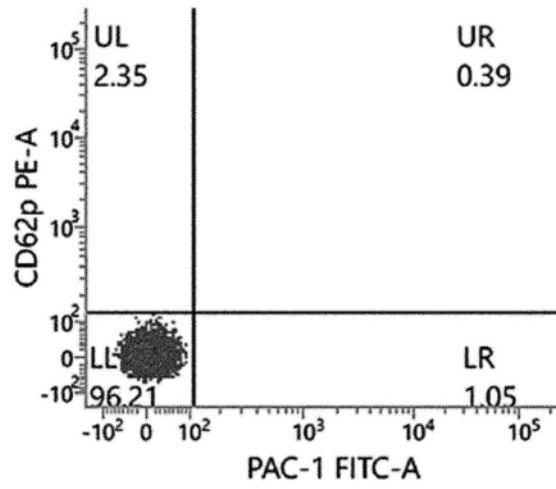


图23i

### 血小板PAC-1活性 ADP (-)



### ADP (+)

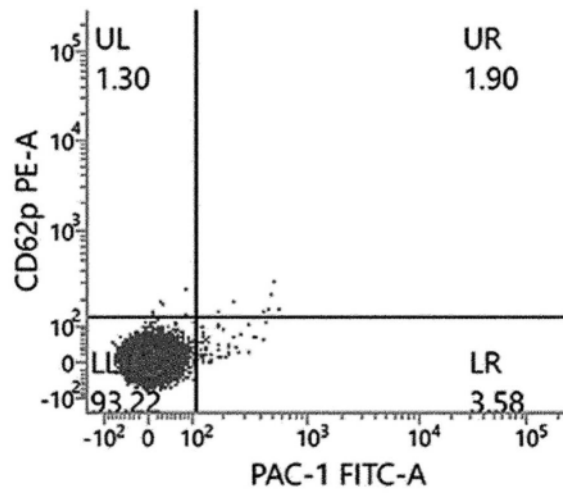


图23j

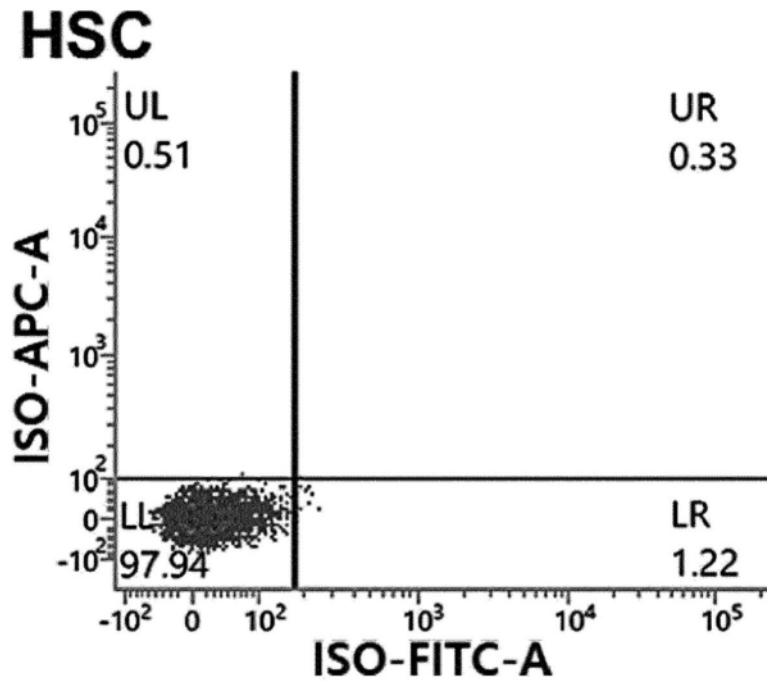


图24a

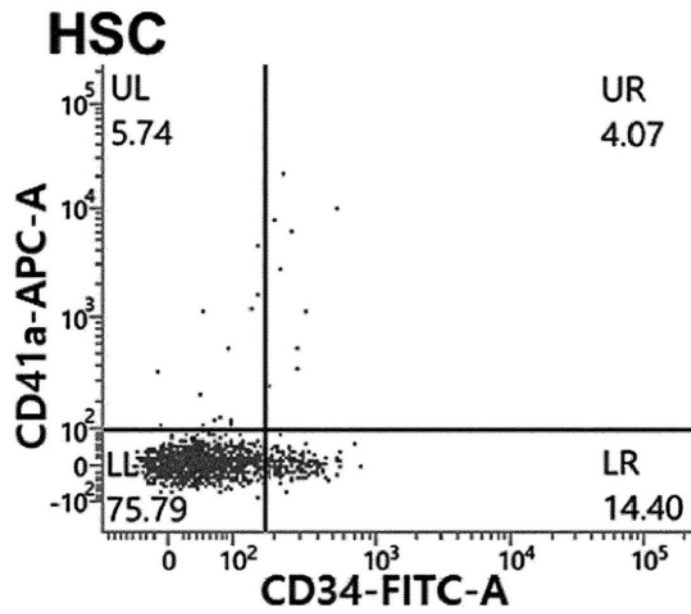


图24b

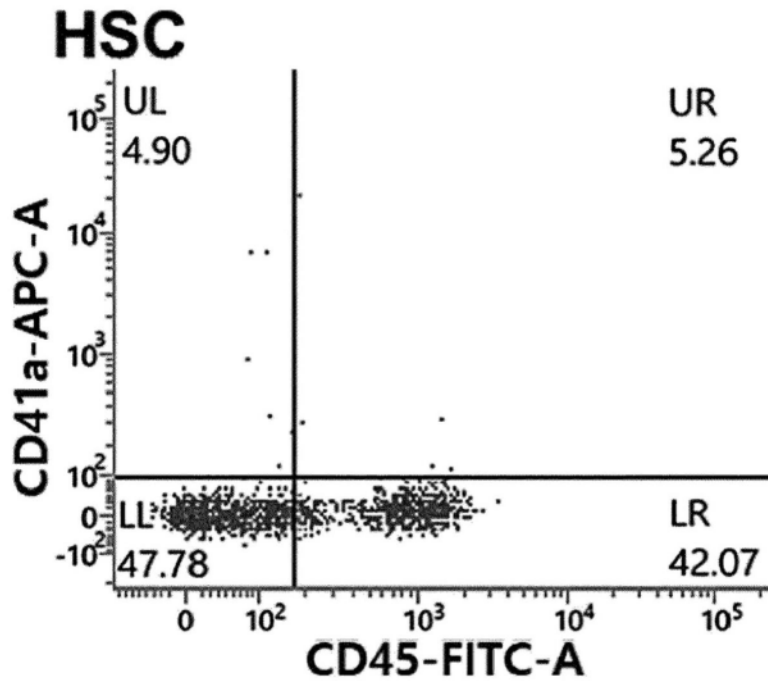


图24c

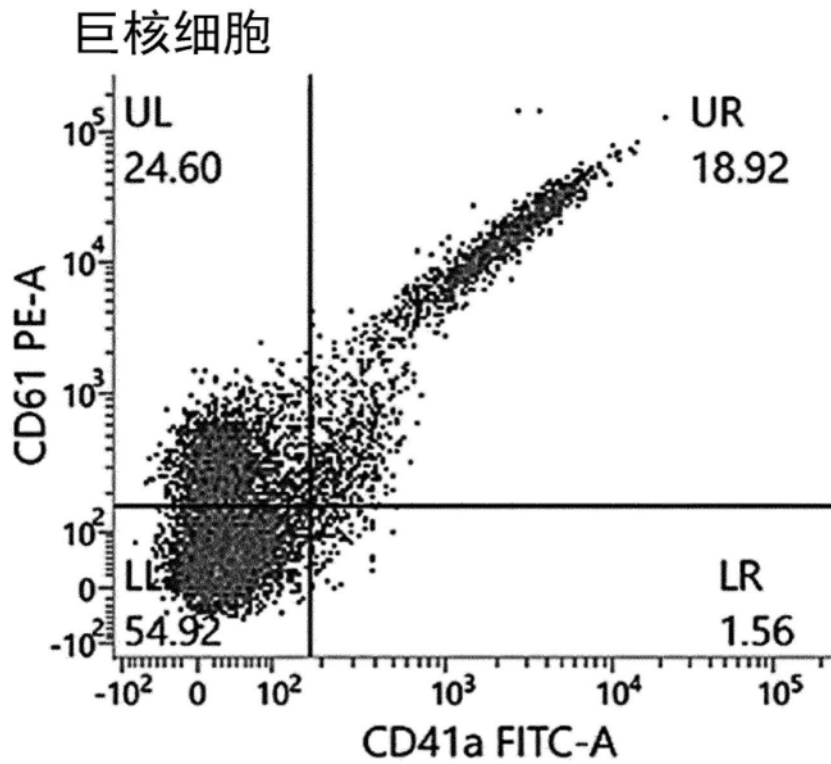


图24d

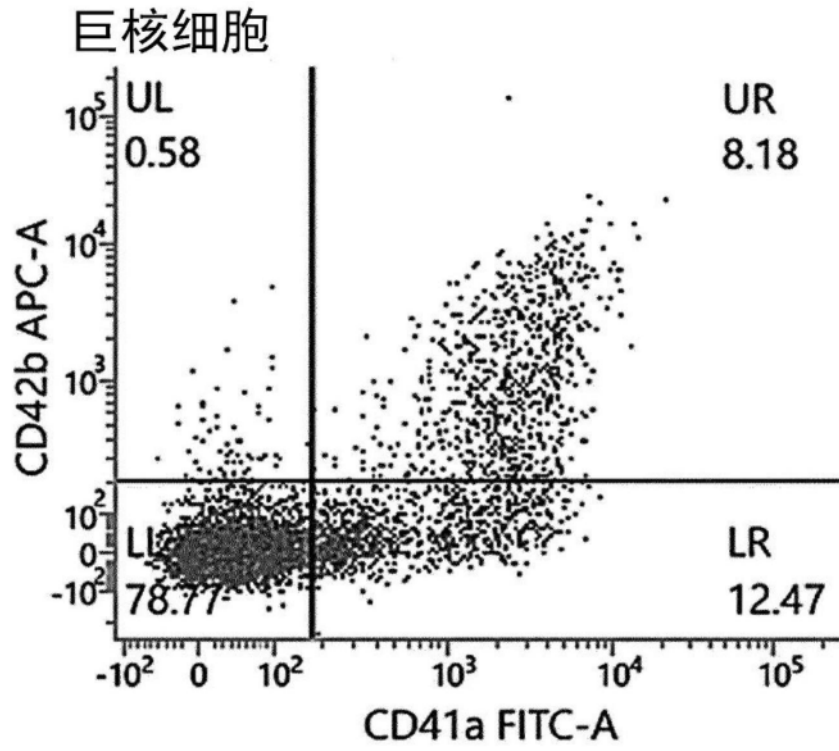


图24e

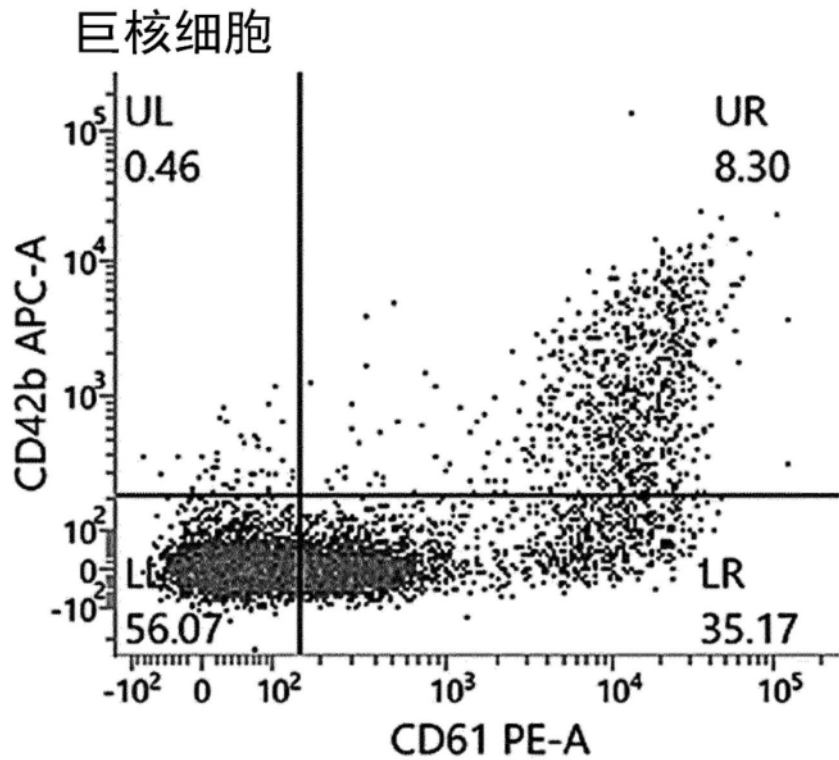


图24f

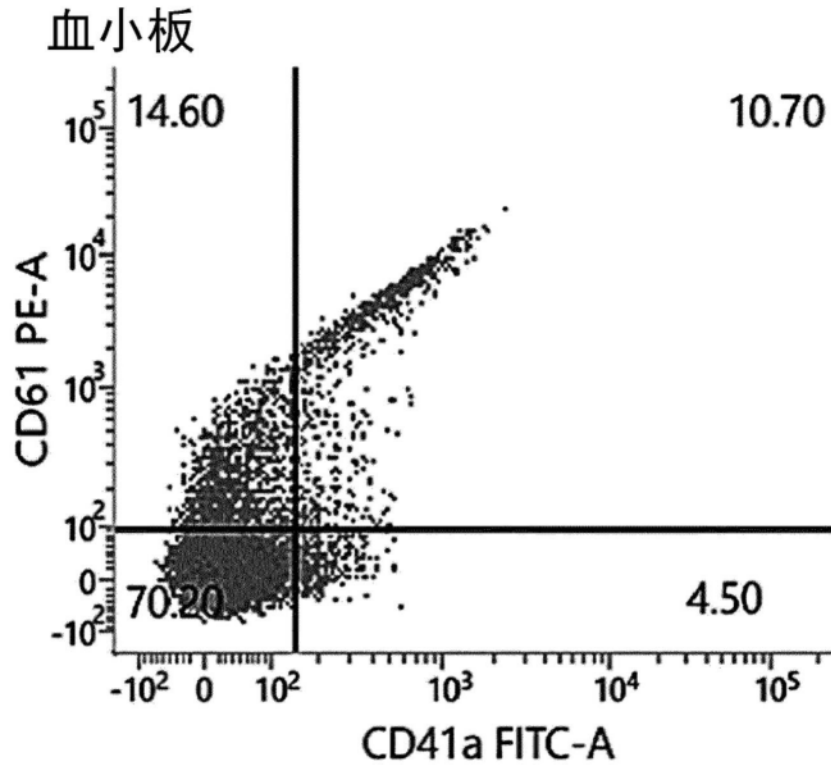


图24g

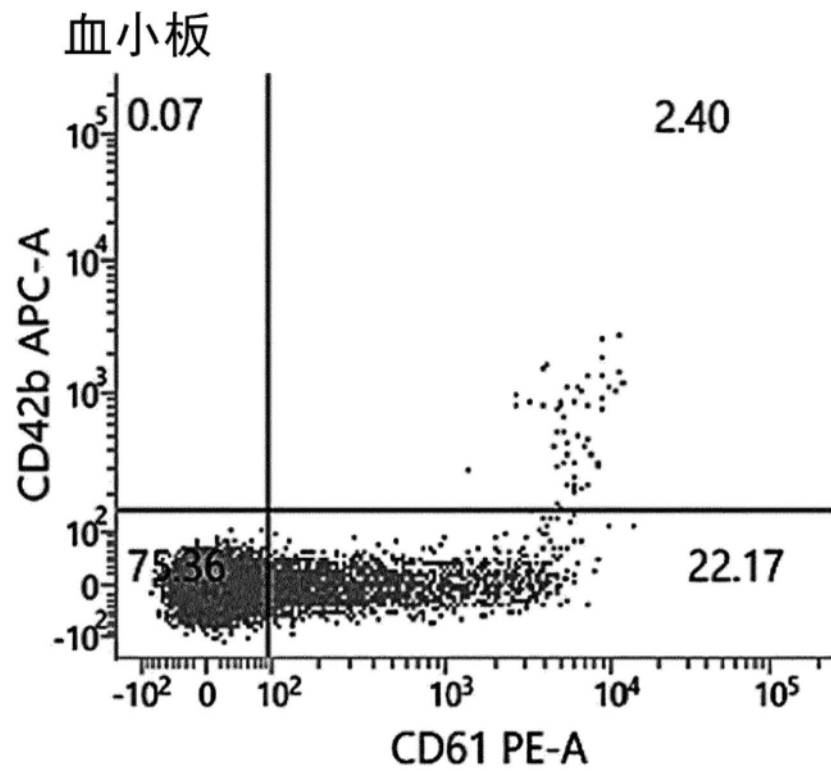


图24h

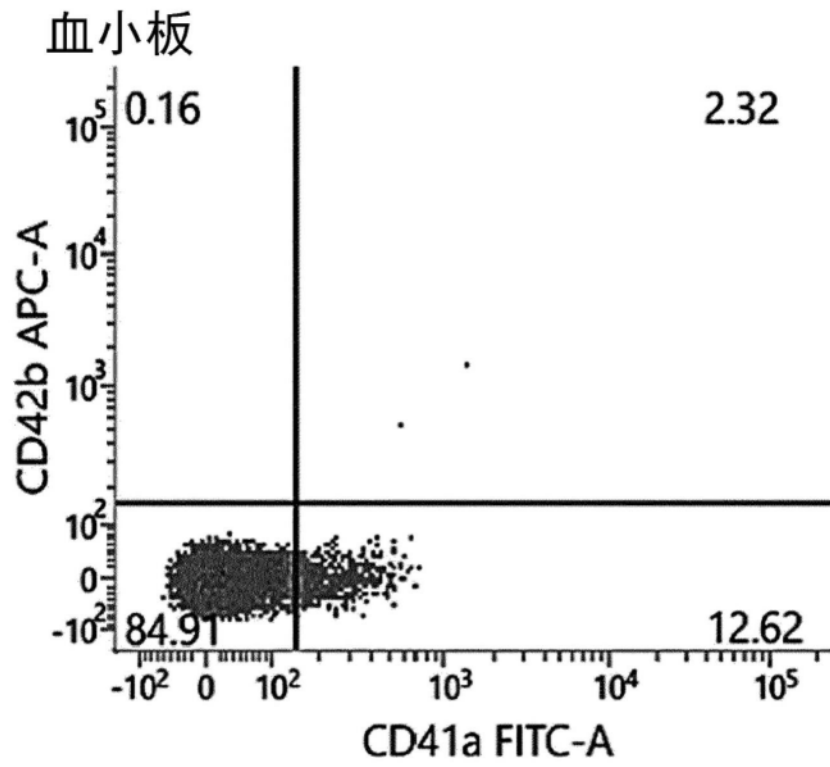


图24i

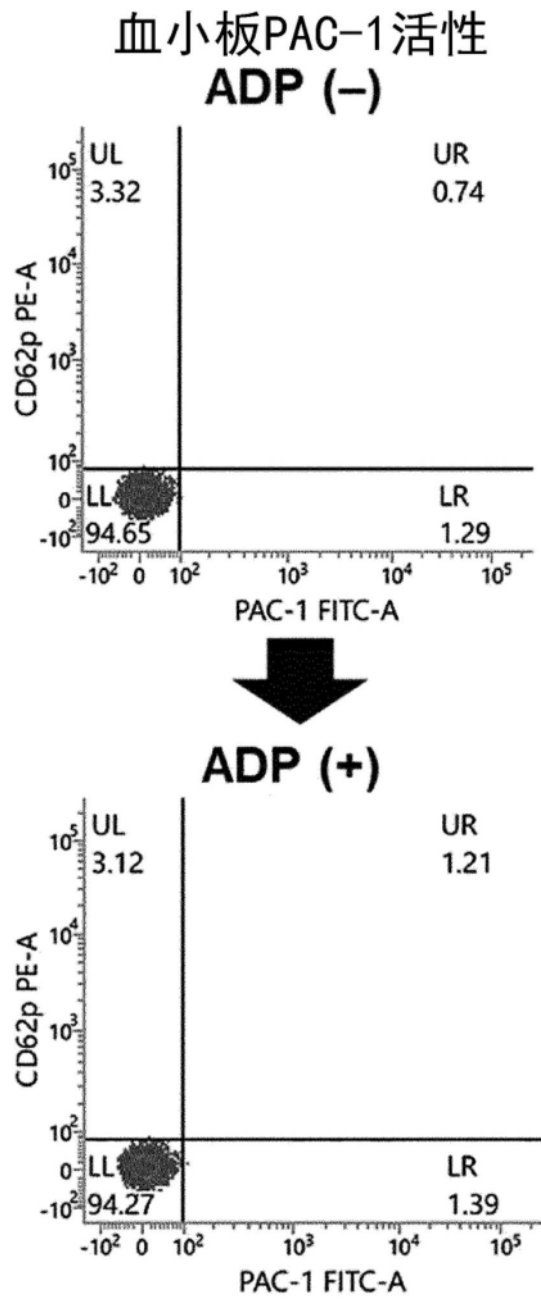


图24j