

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6859351号
(P6859351)

(45) 発行日 令和3年4月14日 (2021.4.14)

(24) 登録日 令和3年3月29日 (2021.3.29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 Z
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00 Z
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077

請求項の数 32 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2018-531289 (P2018-531289)	(73) 特許権者	505270980
(86) (22) 出願日	平成28年1月19日 (2016.1.19)		ブリガム・アンド・ウイミンズ・ホスピタル・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-529379 (P2018-529379A)		アメリカ合衆国 02115 マサチューセッツ州、ボストン、フランシス・ストリート 75番
(43) 公表日	平成30年10月11日 (2018.10.11)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/013855	(74) 代理人	100134832
(87) 国際公開番号	W02017/044149		弁理士 瀧野 文雄
(87) 国際公開日	平成29年3月16日 (2017.3.16)	(74) 代理人	100165308
審査請求日	平成30年11月1日 (2018.11.1)		弁理士 津田 俊明
(31) 優先権主張番号	62/215,369	(74) 代理人	100115048
(32) 優先日	平成27年9月8日 (2015.9.8)		弁理士 福田 康弘
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板を産生するためのシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的産物を生成するためのシステムであって、
 長手方向に沿って延在する入口チャンネルが内部に形成された第1の基板、
 前記入口チャンネルに対応し、長手方向に沿って延在する出口チャンネルが内部に形成され、
 前記第1の基板と解放可能に係合するように構成された第2の基板および
 前記基板の隣接する表面の間に配置され、前記入口チャンネルと前記出口チャンネルとの間にマイクロ流体経路を形成し、生物学的産物を生成し得る生物源材料を選択的に捕捉するように構成された膜を含み、

前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つが、前記膜を通して灌流を調整する圧力差プロファイルを制御するために、第1の角度で長手方向に沿ってテーパ状であり、

流路が、前記入口チャンネルから前記出口チャンネルまでで画定されて、前記入口チャンネルに導入された流体媒体は、前記入口チャンネルから前記出口チャンネルまで前記流路に沿って流れるように構成されている、システム。

【請求項 2】

前記第1の基板は、長手方向に沿って延びる複数の入口チャンネルを含み、
 前記第2の基板は、前記複数の入口チャンネルに対応し、長手方向に沿って延びる複数の出口チャンネルを含み、

前記膜は、それぞれの入口チャンネルと出口チャンネルの間にマイクロ流体経路を形成する

10

20

ことを特徴とする請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記基板が、係合させた場合にそれぞれの入口チャンネルと出口チャンネルとの間にハーメチックシールを形成するよう構成される、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記第 1 の角度が 0 を除いてそれ以上で 5 度を含めてそれ以下の範囲である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 5】

前記複数の入口チャンネルが、前記第 1 の基板に形成された入口マニホールドに接続され、前記入口マニホールドが、生物源材料が導入される前記入口チャンネルにわたり均一にまたは異なって分布するように構成された、請求項 2 に記載のシステム。

10

【請求項 6】

前記システムがさらに、前記第 2 の基板に形成された出口マニホールドを含み、前記出口マニホールドが、前記出口チャンネルに接続され、少なくとも、生成された生物学的産物を含む流体媒体を出口へ導くよう構成された、請求項 2 に記載のシステム。

【請求項 7】

前記生物源材料が巨核球を含み、前記生物学的産物が血小板または巨核球成分産物を含む、請求項 5 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記システムがさらに、1 つ以上の生物学的物質を含む流体媒体を前記チャンネルに導入することにより、前記システムを選択的に機能化するように構成された供給源を含む、請求項 1 に記載のシステム。

20

【請求項 9】

前記 1 つ以上の生物学的物質が、巨核球、内皮細胞、骨髄細胞、血液細胞、肺細胞、基底膜を含む細胞、CCL5、CXCL12、CXCL10、SDF-1、FGF-4、S1PR1、メチルセルロース、コラーゲン、フィブロネクチン (fibrinectin)、フィブリノゲン、ラミニン、およびビトロネクチンの少なくとも 1 つを含む、請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 10】

前記流体媒体が、細胞培養培地、全血、血漿、血小板添加溶液、懸濁培地の少なくとも 1 つを含む、請求項 8 に記載のシステム。

30

【請求項 11】

前記供給源がさらに、生物学的産物の産生を容易にするために選択された所定の範囲内の切断速度を生成するよう、前記チャンネル内の流量を制御するように構成された、請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記基板が、PDMS、熱可塑性物、ゼオノアシクロオレフィンポリマー、ガラス、およびそれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記膜が透過性であって、PDMS、熱可塑性物、シルク、ハイドロゲル、またはポリカーボネートを含む、請求項 1 に記載のシステム。

40

【請求項 14】

前記膜が、3 マイクロメートル～10 マイクロメートルの範囲の大きさの細孔を含む、請求項 13 に記載のシステム。

【請求項 15】

前記第 1 の角度は、前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも 1 つの一方の第 1 の表面と前記長手方向との間で画定され、

前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも 1 つの他方は、前記他方の第 2 の表面と前記長手方向との間で画定される第 2 の角度で前記長手方向に対してテーパ状になっており、

50

前記第1の角度は負で、前記第2の角度は正であり、

前記第1の角度と前記第2の角度でテーパ状の前記他方のチャンネルが、前記入口および出口チャンネルの重なりによって前記膜において確定される活性領域の少なくとも一部にわたって均一である前記圧力差プロファイルをもたらし、請求項1に記載のシステム。

【請求項16】

生物学的産物を生成するための方法であって、

所望の生物学的産物を生成し得る生物源材料をバイオリアクタアセンブリに播種する工程であって、前記バイオリアクタアセンブリが、

長手方向に沿って延在する入口チャンネルが内部に形成された第1の基板、

前記第1の基板と解放可能に係合するように構成され、前記入口チャンネルに対応し、長手方向に沿って延在する出口チャンネルが内部に形成された第2の基板であって、前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つが内部の圧力差プロファイルを制御するよう第1の角度で長手方向に沿ってテーパ状になり、流路が、前記入口チャンネルから前記出口チャンネルまでで画定されて、前記入口チャンネルに導入された流体媒体は、前記入口チャンネルから前記出口チャンネルまで前記流路に沿って流れるように構成されている、第2の基板、

前記第1の基板と前記第2の基板の隣接する表面の間に配置され、前記入口チャンネルと前記出口チャンネルとの間にマイクロ流体経路を形成し、生物源材料を選択的に捕捉するように構成された膜、を含み、

前記所望の生物学的産物を生成するため、所定の流量で前記バイオリアクタアセンブリに流体媒体を導入する工程および

前記バイオリアクタアセンブリから前記所望の生物学的産物を収集する工程、を含む方法。

【請求項17】

前記第1の基板は、長手方向に沿って延びる複数の入口チャンネルを含み、

前記第2の基板は、前記複数の入口チャンネルに対応し、長手方向に沿って延びる複数の出口チャンネルを含み、

前記膜は、それぞれの入口チャンネルと出口チャンネルの間にマイクロ流体経路を形成することを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記生物学的産物が血小板を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

前記生物源材料が巨核球を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項20】

前記方法がさらに、骨髓、末梢血、臍帯血、胎児肝、卵黄囊、脾臓細胞、または多能性幹細胞から前記生物源材料を生成する工程を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項21】

前記方法がさらに、前記バイオリアクタアセンブリを1つ以上の生物学的物質で機能化する工程を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項22】

前記1つ以上の生物学的物質が、内皮細胞、骨髓細胞、血液細胞、基底膜を含む細胞、CCL5、CXCL12、CXCL10、SDF-1、FGF-4、S1PR1、メチルセルロース、コラーゲン、フィブネクチン(fibronectin)、フィブリノゲン、ラミニン、およびビトロネクチンの少なくとも1つを含む細胞外マトリックスタンパク質を含む小分子を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記流体媒体が、細胞培養培地、全血、血漿、血小板添加溶液、懸濁培地の少なくとも1つを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項24】

前記所定の流量が、血小板を生成するため、出口チャンネル内の生理的剪断速度を誘導す

10

20

30

40

50

るように構成された、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】

前記生理的剪断速度が $10 / \text{秒} \sim 2000 / \text{秒}$ の範囲である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記所定の流量が $5,000 \sim 150,000$ マイクロリットル／時間の範囲である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 27】

第1の角度が0を除いてそれ以上で5度を含めてそれ以下の範囲である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第1の角度は、前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つの一方の第1の表面と前記長手方向との間で画定され、

前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つの他方は、前記他方の第2の表面と前記長手方向との間で画定される第2の角度で前記長手方向に対してテーパ状になっており、

前記第1の角度は負で、前記第2の角度は正であり、

前記第1の角度と前記第2の角度でテーパ状の前記他方のチャンネルが、前記入口および出口チャンネルの重なりによって前記膜において確定される活性領域の少なくとも一部にわたって均一である前記圧力差プロファイルをもたらす、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第1の角度の大きさと前記第2の角度の大きさが同一である、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 30】

前記第1の角度の大きさと前記第2の角度の大きさが同一である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つが、前記長手方向に沿った前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つの長手方向寸法の全体に沿って前記第1の角度で先細になっている、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 32】

前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つは、前記長手方向に沿った前記入口チャンネルと前記出口チャンネルの少なくとも1つの長手方向寸法の全体に沿って前記第1の角度でテーパ状になっている、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年9月8日に出願された、「PLATELET BIOREACTOR」と題された米国仮特許出願第61/215,369号に基づくものであり、その利益を主張し、それを援用する。

連邦支援研究に関する声明

【0002】

本開示は、米国国立衛生研究所によって授与されたR00HL114719号の下で政府の支援を受けてなされたものである。米国政府は本開示において一定の権利を有する。

【0003】

本開示は、一般にマイクロ流体デバイス、そのようなデバイスを含むシステム、ならびにそのようなデバイスを使用する方法およびシステムを含む流体システムに関する。より詳細には、本開示は、生物学的産物を生成するためのデバイス、システム、および方法に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0004】

血小板 (blood platelet)、すなわち血小板 (thrombocyte) は、血液中を循環する不規則な円盤状の細胞フラグメントであり、止血、血管新生、および先天性免疫に不可欠である。インビボ (生体内) では、血小板は細胞により産生され、巨核球として知られる。図 1 に示すように、骨髄で生成された巨核球は移動し、血管を覆う内皮細胞に接触する。そこで、巨核球は、内皮の間隙を介して、血小板前駆細胞と呼ばれる長い分岐した細胞構造を血管空間に伸長させる。血流に起因する剪断速度を経験することにより、血小板前駆細胞は伸長し、血小板を循環系に放出する。一般的に、正常な血小板数は、1 マイクロリットルの血液あたり 150,000 ~ 400,000 個の範囲である。しかしながら、血小板数が低レベルに下がると、患者は、血小板減少症として知られる状態を発生し、出血による死亡の危険にさらされる。血小板減少症の既知の原因としては、悪性腫瘍およびそれを処置するために使用される化学療法、免疫障害、感染ならびに外傷が挙げられる。

10

【0005】

有害な免疫系反応、敗血症に起因する危険性、およびウイルス汚染に関する深刻な臨床上の懸念にもかかわらず、血小板減少症の処置は、一般的に、完全にヒトドナーから誘導される代替血小板を使用することを含む。しかしながら、輸血から血小板を得るプロセスは、時間がかかり、費用がかかり、そして多くの場合、複数の適合するドナーを見つけることを必要とする。さらに、収集した血小板の有用性は、細菌試験および劣化による短い貯蔵寿命のため制限される。そのうえ、存在が知られていないウイルスのスクリーニングは不可能である。需要の増加によるドナー不足とドナーのプールにほぼ動きがないことが組み合わさって、医療従事者が血小板減少症や低血小板数に関連する他の状態の患者を適切にケアすることが困難になってきている。輸血の代替としては人工的な血小板代替物の使用が挙げられるが、これまでのところ、生理的血小板産物の置換に失敗してきた。

20

【0006】

いくつかのアプローチでは、様々な細胞培養技術を用いた機能性ヒト血小板の産生が試みられてきた。具体的には、種々の幹細胞から得られた巨核球を使用して、実験室で血小板が産生されてきた。用いられる幹細胞としては、典型的には、胚性幹細胞、臍帯血幹細胞および誘導多能性幹細胞が挙げられてきた。他の幹細胞源としては、骨髄、胎児肝臓および末梢血中に見出される幹細胞が挙げられてきた。しかしながら、実験室において機能性血小板の産生に成功したにもかかわらず、臨床環境における使用には多くの制限が残っている。

30

【0007】

たとえば、最先端の培養方法を用いて、ヒト巨核球の約 10% のみが血小板前駆細胞の産生を開始することが示された。これにより、CD34⁺ 臍帯血由来または胚性幹細胞由来の巨核球当たり、10 ~ 100 個の血小板の収量が得られたが、CD34⁺ 臍帯血由来または胚性幹細胞由来の巨核球自体の入手可能性が制限されている。たとえば、平均的な単一のヒト臍帯血ユニットは、約 $5 \cdot 10^6$ 個の CD34⁺ 幹細胞を産生することができる。これは、エキソビボでの血小板産生において大きな制約となる。さらに、細胞培養物は、生理的微小環境を再現することができず、これにより、細胞外マトリックスの組成、骨髄の硬さ、内皮細胞の接触、および血管の剪断速度の個別制御は制限されていた。そのうえ、細胞培養物は血小板前駆細胞の産生を同期化することに成功せず、その結果、血小板の貯蔵寿命の道理である 6 ~ 8 日間にわたり、不均一な血小板が放出されていた。

40

【0008】

したがって、上記観点から、増加する臨床上の必要性を満たし、ドナー収集および貯蔵に関する危険および費用を回避することができる、臨床的に適切な血小板収量を産生する効率的な方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0009】

本開示は、血小板および他の生物学的産物の効率的かつ拡張性のある生産が可能なシステムおよび方法を提供することによって、上述の技術の欠点を克服するものである。具体的には、本開示は、臨床的および商業的に適切な生物学的産物の生成を目的とした多くの特徴および能力を含む様々なバイオリアクタの実施形態を記載する。いくつかの態様では、本明細書に記載のシステムおよび方法は、血小板注入に使用できる高い血小板収量を生成するために用いられ得る。このように、現在の置換療法の多くの重大な欠点は、主にヒトドナーからの輸血に依存しているため、克服することができる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

10

以下に説明するように、いくつかの態様では、提供されるバイオリアクタの実施形態は、ヒト体内における血小板産生に関する生理的状态およびプロセスを再現するように構成され得る。具体的には、提供されるバイオリアクタの実施形態は、血小板産生を促進することができる様々な材料および物質を使用した選択的機能化のために構成され得る。また、均一な生物学的材料の捕捉および制御可能な剪断応力のための能力を含むことにより、血小板および他の生物学的産物の効率的な産生が記載された、バイオリアクタの実施形態を用いて達成され得る。いくつかの設計において、提供されるバイオリアクタの実施形態は、迅速な組み立ておよび分解のために構成され、熱可塑性成形および他の大規模製造プロセスに適合させることができる。

【0011】

20

本開示の1つの態様によれば、生物学的産物を生成するためのシステムおよび方法が提供される。前記システムは、実質的に長手方向に沿って延在する複数の入口チャンネルが内部に形成された第1の基板と、前記複数の入口チャンネルに対応し、実質的に長手方向に沿って延在する複数の出口チャンネルが内部に形成された第2の基板とを含み、前記第2の基板は、前記第1の基板と解放可能に係合するように構成される。前記システムはまた、前記基板の間に配置され、それぞれの入口チャンネルと出口チャンネルとの間にマイクロ流体経路を形成し、生物学的産物を生成することができる生物源材料を選択的に捕捉するように構成された透過性膜を含み、少なくとも1つのチャンネルは、前記透過性膜を通して灌流を調節する圧力差プロファイルを制御するため、横方向にテーパ状である。

【0012】

30

本開示の別の態様によれば、生物学的産物を生成するための方法が提供される。この方法は、所望の生物学的産物を生成することができる生物源材料をバイオリアクタアセンブリに播種することを含み、前記バイオリアクタアセンブリは、実質的に長手方向に沿って延在する複数の入口チャンネルが内部に形成された第1の基板と、前記複数の入口チャンネルに対応し、実質的に長手方向に沿って延在する複数の出口チャンネルが内部に形成され、前記第1の基板と解放可能に係合するように構成された第2の基板とを含み、少なくとも1つのチャンネルは、内部の圧力差プロファイルを制御するため、横方向にテーパ状である。前記バイオリアクタアセンブリはまた、前記基板の間に配置され、それぞれの入口チャンネルと出口チャンネルとの間にマイクロ流体経路を形成し、生物源材料を選択的に捕捉するように構成された透過性膜を含む。前記方法はまた、所望の生物学的産物を生成するため、所定の流量で前記バイオリアクタアセンブリに流体媒体を導入すること、および前記バイオリアクタアセンブリから所望の生物学的産物を収集することを含む。

40

【0013】

本開示の上述および他の態様ならびに利点は、以下の説明から明らかになるであろう。以下の説明では、本明細書の一部を形成し、本開示の好ましい実施形態を例として示す添付の図面が参照される。しかしながら、そのような実施形態は必ずしも本開示の全範囲を表すものではなく、したがって、本開示の範囲を解釈するために特許請求の範囲および本明細書が参照される。

【0014】

以下に添付の図面を参照して本開示を説明し、ここで、同様の参照番号は同様の要素を

50

意味する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】骨髓におけるインビボでの血小板産生を示す図である。

【図2】本開示の態様による生物学的産物を産生するためのシステムの概略図である。

【図3】本開示の態様によるバイオリアクタの実施形態を示す図である。

【図4A】図3のバイオリアクタを含むバイオリアクタアセンブリの一実施形態を示す斜視図である。

【図4B】図4Aに示す実施形態の断面図である。

【図4C】図4Aに示す実施形態の別の断面図である。

10

【図5A】本開示の態様による例示的なシステムを示す。

【図5B】図5Aのシステムに含まれるバイオリアクタを示す。

【図6】本開示の態様によるバイオリアクタの実施形態を示す。

【図7A】本開示の態様による分解されたバイオリアクタアセンブリの実施形態を示す。

【図7B】図7Aのバイオリアクタアセンブリを示す。

【図8】本開示の態様によるシステムの別の実施形態を示す。

【図9A】本開示の態様によるバイオリアクタのさらに別の実施形態を示す。

【図9B】本開示の態様によるバイオリアクタのさらに別の実施形態を示す。

【図10】本開示の態様によるシステムを示す概略図である。

【図11】本開示の態様によるバイオリアクタのさらに別の実施形態を示す。

20

【図12】本開示の態様によるバイオリアクタのさらに別の実施形態を示す。

【図13】本開示の態様によるプロセスの工程を示すフローチャートである。

【図14A】静的培養を用いて産生された巨核球を示すグラフである。

【図14B】静的培養を用いて産生された血小板前駆細胞および血小板を示すグラフである。

【図14C】本開示の態様に従って産生された巨核球を示すグラフである。

【図14D】本開示の態様に従って産生された血小板前駆細胞および血小板を示すグラフである。

【図15】本開示の態様による血小板産生のタイムラインを示すグラフである。

【図16】本開示の態様によるバイオリアクタのさらに別の実施形態を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示は、血小板および他の生物学的産物の効率的かつ拡張性のある生産が可能なシステムおよび方法を提供する。

【0017】

図2を参照すると、血小板および他の生物学的産物を産生するための例示的なシステム100の概略図が示されている。一般的に、システム100は、生物源102、バイオリアクタアセンブリ104、および出力106を含み、生物源102および出力106は、アセンブリ104の種々の入力および出力にそれぞれ接続可能である。

【0018】

40

具体的には、生物源102は、血小板などの所望の生物学的産物を効率的に産生するために、異なる生物源材料、物質、気体または流体媒体をアセンブリ104に導入するための様々な能力を備えて構成され得る。たとえば、生物源102は、バイオリアクタアセンブリ104内の流体媒体を送達または維持するための1つ以上のポンプを含み得る。例としては、マイクロ流体ポンプ、シリンジポンプ、蠕動ポンプなどが挙げられる。

【0019】

図2に示すように、いくつかの実施例では、システム100はまた、生物源102を制御するためのコントローラ108を含み得る。具体的には、コントローラ108は、中に導入された生物源材料、物質、流体媒体またはガスのタイミング、量、およびタイプを含む、バイオリアクタアセンブリ104の運転を制御するように構成されたプログラム可能

50

なデバイスまたはシステムであってもよい。いくつかの態様では、コントローラ 108 は、ヒト体内における血小板産生に関する生理的状態およびプロセスを再現するために、アセンブリ 104 を選択的に機能化および／または操作するように構成され得る。たとえば、コントローラ 108 は、選択された数の巨核球をアセンブリ 104 に送達するようにプログラムされ得る。さらに、コントローラ 108 は、血小板前駆細胞の伸長および血小板産生を促進するために、バイオリアクタアセンブリ 104 内の流体流量または流体圧力を制御し得る。たとえば、コントローラ 108 は、バイオリアクタアセンブリ 104 内に構成された種々のチャンネルにおいて最大 150, 000 マイクロリットル／時間の流量を確立し得る。

【0020】

コントローラ 108 は、生物源 102 とは別個のものとして図 2 に示されているが、これらは単一のユニットに組み合わされてもよいことが理解されよう。たとえば、生物源 102 およびコントローラ 108 は、プログラム可能なマイクロ流体ポンプまたは注入システムで具体化され得る。さらに、いくつかの実施例では、コントローラ 108 および／または生物源 102 はまた、バイオリアクタアセンブリ 104 の温度、露光、振動、および他の条件を調節できるシステムまたはハードウェア（図 2 には示さず）を含み、それらと通信し、またはそれらからのフィードバックを受信してもよい。一例として、図 8 は、ヒータ 804 に接続されたコントローラ 802 と、温度を監視および制御するための熱電対 806 とを含むバイオリアクタシステム 800 を示す。図 8 に示す構成は非限定的であると理解されるべきであり、任意の数のヒータおよびヒータ配置が可能であり得る。

【0021】

再び図 2 を参照すると、一般的に、出力 106 は、バイオリアクタアセンブリ 104 内で生成された様々な生物学的産物を含む流体媒体を受け取るように構成される。しかしながら、いくつかの実施例では、以下に説明するように、そのような流出物はバイオリアクタアセンブリ 104 内に再送するかまたは循環させて戻してもよい。このようにして、より少ない流体体積を利用することができ、生成された生物学的産物をより濃縮することができる。いくつかの態様では、出力 106 はまた、受け取った流体媒体を収集し、格納し、および／またはさらに処理する能力を含み得る。

【0022】

上述のシステム 100 は、広範囲の機能を有し、生理的条件またはプロセスを複製すること、または血小板を産生することに限定される必要はないことが理解されよう。すなわち、システム 100 は、多種多様な生物学的産物を生成するために使用され得る。たとえば、システム 100 は、巨核球および他の細胞などの様々な生物源材料または物質を分離、分解または溶解し、それらの産物または内容物を収集するために使用され得る。具体的には、流体の流れおよび圧力ならびに他の条件を制御することによって、捕捉された生物源材料の種々の内容物が放出され、その後収集され得る。いくつかの態様では、システム 100 はまた、所望の生物学的産物を生成するのに必要な生物源材料を得るため、巨核球などの様々な細胞、生物学的物質または材料を分化および／または培養するのに利用され得る。生物学的産物の例としては、成長因子、および細胞内に見られる他の成分が挙げられる。本開示による産生された生物学的産物は、臨床用途に加えて、細胞培養培地、および化粧品、シャンプー、皮膚用添加物、クリームまたは洗浄剤などの美容製品の成分としての使用を含む様々な用途において使用され得る。

【0023】

次に、上記システム 100 の様々な実施形態を説明する。これらは非限定的な例であって、実際に様々な修正または組み合わせが可能であり、当業者によって本出願の意図された範囲内にあるとみなされることが理解されよう。

【0024】

ここで図 3 を参照すると、本開示の態様による非限定的なマイクロ流体バイオリアクタ 300 が示されている。一般的に、バイオリアクタ 300 は、第 1 の基板 302 と、第 2 の基板 306 と、これらの間に配置された透過性膜 304 とを含む。

【0025】

特に、第1の基板302は、その内部に形成された多数の入口チャンネル308または入口チャンバを含み得る。図3に示すように、いくつかの実施形態では、前記チャンネルは互いにほぼ平行に配置され、実質的に長手方向（たとえば、x方向）に沿って延在し得る。しかしながら、本開示に記載されているように、血小板および他の生物学的産物の産生を達成することができる任意のチャンネル配置が可能であり得ることが理解されよう。また、入口チャンネル308は、第1の基板302に形成された入口マニホールド312を介して入口ポート310に接続されてもよく、入口マニホールド312は、それを通過する流体媒体のための類似または同等の流体経路を提供するように構成される。このような構成は、バイオリアクタ300全体にわたって、均一に様々な生物学的物質または材料を分配する10ために有利であり得るか、または異なる流体経路内で様々な生物学的物質または材料を選択的または差別的に分配するように操作され得る。たとえば、流体媒体中に分散されたある濃度の血小板産生巨核球細胞は、1回の注入工程で入口ポート310に導入され、透過性膜304を通じて同様の密度または空間分布を達成することができる。代替的な構成では、各入口チャンネル308は、異なる大きさのまたは別個の入口ポートを含み得る。

【0026】

第1の基板306は、それぞれが各入口チャンネルに対応し、実質的に長手方向に沿って平行に延在する、複数の出口チャンネル310または出口チャンバを含み得る。同様に、第2の基板304も、内部に形成された出口マニホールド316を含むことができ、前記出口マニホールド316は出口チャンネル314に接続され、様々な生物学的産物、物質または材料を含む流体媒体が、出口ポート318を介して出力するように構成される。20

【0027】

一例として、上述の基板は、10mm～100mmの範囲の横方向寸法、および1～10mmの範囲の厚さを有し得るが、他の寸法をとることも可能である。また、入口チャンネル308および／または出口チャンネル314の長手方向寸法は、1000～30,000マイクロメートルの範囲であり、より具体的には1000～3000マイクロメートルの範囲内であり、少なくとも1つの横方向寸法は、100～3,000マイクロメートルの範囲であってもよく、より具体的には100～300マイクロメートルの範囲であってもよい。他の寸法をとることも可能である。以下に説明するように、いくつかの実施形態では、入口チャンネル308または出口チャンネル314は、透過性膜304を通して灌流を調節する活性接触領域にわたって、チャンネル間の剪断速度または圧力差を制御するために、全体的にまたは長手方向寸法の一部にわたって横方向にテーパ状であってもよい。30

【0028】

特定の用途または用途に応じ、バイオリアクタ300の様々な実施例が可能である。特に、いくつかの実施形態では、入口チャンネル308および出口チャンネル314は、バイオリアクタ300の他のマイクロ流体要素と共に、縦方向（たとえば、図3に示すx方向に沿って）および横方向（y方向およびz方向）に、骨髓および血管に見られるような生理的状态を再現する形状および寸法を有し得る。たとえば、チャンネルの形状および寸法は、図1を参照して説明したように、インビボでの血小板産生に関するものに類似した生理的な流量、剪断速度、流体圧力または圧力差を達成するように選択され得る。さらに、バイオリアクタ300の構成は、顕微鏡またはカメラなどの他の機器との連携を可能にするように選択され得る。たとえば、バイオリアクタ300は、標準的なマイクロプレートの寸法に接着するように構成され得る。40

【0029】

バイオリアクタ300のいくつかの構成において、図3に示すように、入口チャンネル308および出口チャンネル314は、それぞれの基板で終端し、入口ポート310から出口ポート318まで単一の流体導管320を形成する。すなわち、入口ポート310に導入された流体媒体は、出口ポート318から抽出される必要がある。しかしながら、バイオリアクタ300では追加の入口ポートおよび出口ポートも可能であり得ることが理解されよう。たとえば、第1の基板302は、入口チャンネル308に接続された1つ以上の出力50

を含むこともできる。同様に、第2の基板306は、出口チャンネル314に接続された1つ以上の入力を含むこともできる。このように、複数の流体経路が可能であってもよく、これによりバイオリアクタ300の種々の部分を独立して選択的に作製することが可能となる。

【0030】

図3には示されていないが、バイオリアクタ300はまた、チャンネルに接続され、入口ポート310と出口ポート318との間に延在する様々な流体経路に沿った様々なポイントに配置された、多数のマイクロ流体濾過要素および抵抗要素を含むこともできる。たとえば、1つ以上の濾過要素を入口ポート310に近接して配置して、入力流体媒体から汚染物質または望ましくない物質または物質を捕捉することができる。さらに、1つ以上の抵抗要素も、流量中の流力または湿度の変動を制御するために含まれ得る。抵抗要素および濾過要素に加えた要素も含まれ得る。たとえば、気泡トラップは、気泡がバイオリアクタ300に入ることを排除するために、1つ以上の入力で構成され得る。

10

【0031】

一例として、図6は、上記説明による例示的なバイオリアクタ600の入力604に結合されたマイクロ流体コネクタ602を示す。図示されるように、入力604は、メッシュ610によって分離された拡散領域606および円錐領域608を含む。たとえば、メッシュ610は約140マイクロメートルの大きさを有し得るが、他の値をとることも可能である。前記構成のように、入力604は、気泡がバイオリアクタ600に入るのを防止することができる。

20

【0032】

再び図3のバイオリアクタ300を参照すると、各基板は16個の入口チャンネル312と16個の出口チャンネル314とを含むよう示されている。より多くのまたはより少ないチャンネルまたはチャンバが可能であり得ることは容易に理解されよう。たとえば、図9Aのバイオリアクタ900に示されるように、2つの入口チャンネル902および2つの出口チャンネル904が利用され得る。入口チャンネルおよび出口チャンネルに加えて、図3のバイオリアクタ300の基板に追加の導管を形成することもできる。たとえば、図9Aおよび図9Bに示すように、灌流チャンネル906をバイオリアクタ900に含めることもできる。具体的には、灌流チャンネル906はガスの流れを可能とすることが考えられ、その後、基板材料を通してバイオリアクタ900の入口／出口チャンネルへ灌流され得る。たとえば、5%CO₂ガス混合物をチャンネルに灌流することができる。

30

【0033】

一般的に、図3の透過性膜304は、内部に形成されたマイクロ流体経路を介して、対応する入口チャンネル308および出口チャンネル314を接続するように構成された、任意の剛性または可撓性の層、フィルム、メッシュまたは材料構造を含み得る。一実施形態では、透過性膜304内のマイクロ流体経路は、透過性膜304の周りに、周期的または非周期的に、任意の密度で分布した、細孔、間隙またはマイクロチャンネルを用いて形成され得る。別の実施形態では、透過性膜304は、そこを通して流体を通過させるように配置された、織り合わされたマイクロ繊維またはナノ繊維を使用して形成された三次元構造を含み得る。図3では矩形で示されるが、透過性膜304は、円形、楕円形などを含む任意の形状を有し得ることが理解されよう。本開示の態様によれば、透過性膜304は、所望の生物学的産物を産生するために特定の生物源材料または物質を選択的に捕捉するように構成され得る。たとえば、透過性膜304は、血小板産生細胞を選択的に捕捉し、そこを通過して血小板前駆細胞の伸長を可能にするように構成され得る。

40

【0034】

一例として、透過性膜304は、1~100ミリメートルの範囲の長手方向および横方向の寸法を含み、0.1~20マイクロメートルの範囲の厚さを有するが、他の寸法をとることも可能である。また、透過性膜304は、約3マイクロメートル~10マイクロメートル、より具体的には約5マイクロメートル~8マイクロメートルの範囲の大きさの細孔、間隙またはマイクロチャンネルを含み得る。いくつかの態様では、細孔、間隙またはマ

50

イクロチャネルの大きさ、数、および密度は、所望の生物学的産物および産物収量ならびにフローインピーダンス、剪断速度、圧力差、流体流量、および他の運転パラメータを含む多数の因子に依存し得る。

【0035】

図3から理解されるように、入口チャネル308および出口チャネル314は重なって、透過性膜304内の活性接触領域を画定する。たとえば、活性接触領域326は、利用されるチャネルの寸法および数に依存して、他の値をとることもできるが、 $1\text{ mm}^2 \sim 20\text{ mm}^2$ の範囲内にあってもよい。いくつかの実施例では、所望の生物学的産物の収量を得るため、透過性膜304の特性から活性接触領域を最適化することができる。たとえば、47mmの直径、5%の活性接触領域、および $1 \cdot 10^5$ 個/ cm^2 の孔密度を有する透過性膜304は、所望の血小板収量などの所望の生物学的産物収量を生成する可能性がある200,000部位を提供し得ることが考えられる。いくつかの用途では、活性接触領域は、少なくとも約 $1 \cdot 10^4$ 個の巨核球を捕捉するように構成され得る。

10

【0036】

バイオリアクタ300は、生体適合性材料、不活性材料、ならびに、加圧ガスおよび流体の流れまたはガス拡散を支持し、構造的サポートを提供することができる材料の任意の組み合わせを用いて製造することができる。いくつかの態様では、バイオリアクタ300に利用される材料は、射出成形などの特定の製造プロセスと適合し得る。さらに、利用される材料は、流体媒体、およびバイオリアクタ300の様々な部分に存在するまたは流動する他の物質を可視化するため、光学的に透明であってもよい。

20

【0037】

一例として、第1の基板302もしくは第2の基板306、またはその両方、またはその一部は、ポリジメチルシロキサン（「PDMS」）などの細胞不活性シリコン系有機ポリマー材料、ゼオノアシクロオレフィンポリマー（「COP」）などの熱可塑性材料、ガラス、アクリル樹脂などを用いて製造され得る。一方、透過性膜304は、PDMS、熱可塑性樹脂、絹、シルク、ハイドロゲル、細胞外マトリックスタンパク質、ポリカーボネート材料、ポリエーテルスルホン材料、ポリ塩化ビニル材料、ポリエチレンテレフタレート材料、および他の合成または有機材料を用いて製造され得る。

【0038】

本開示の態様によれば、バイオリアクタ300は、様々な生物学的物質および材料を用いて選択的に機能化され得る。具体的には、バイオリアクタ300は、そこに導入される所望の生物学的物質および材料を含む流体媒体によって選択的に機能化され得る。あるいは、またはさらに、バイオリアクタ300またはその構成要素は、様々な作製または製造プロセスを用いて機能化されてもよい。たとえば、透過性膜304は、バイオリアクタ300の組み立て前に、血小板産生細胞で予め作製されてもよい。いくつかの態様では、バイオリアクタ300は、巨核球、および他の細胞、生物学的物質または材料を、分化および/または培養するために利用され得る。

30

【0039】

記載されるように、いくつかの態様では、バイオリアクタ300は、血小板または他の生物学的産物を産生するため、インビボでの生理的条件を複製するのに有利に機能化され得る。たとえば、1つの用途では、透過性膜304の上面322は、たとえば、細胞外マトリックスタンパク質で選択的にコーティングされてもよく、底面322はコーティングなしのままでよく、または異なるタンパク質または物質でコーティングされてもよい。これは、たとえば、細胞外マトリックスタンパク質を含有する第1の流体媒体に、第1の基板302における入力および出力を用いて注入することによって達成することができる。実質的に同時に、第2の流体媒体の流れは、それぞれの入力および出力を用いて第2の基板306内に維持することができ、第2の流体媒体は、タンパク質を全く含まないか、異なるタンパク質または物質を含まなくてもよい。好ましくは、第1および第2の流体媒体の流量は、流体の混合がほとんどまたは全く起こらないように構成され得る。このような選択的機能化は、導入された血小板産生細胞が、たとえば上面322に乗って、細胞外

40

50

マトリックスタンパク質に接触し、透過性膜 304 を通って伸びた血小板前駆細胞およびそこから放出された血小板が細胞外マトリックスタンパク質と接触しない、または異なるタンパク質もしくは生物学的物質と接触することを確実にする。

【0040】

バイオリアクタ 300 を機能化するための生物学的物質および材料の非限定的な例は、巨核球、内皮細胞、骨髄細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、幹細胞、血液細胞、間葉細胞、肺細胞および基底膜を含む細胞などのヒトおよび非ヒト細胞を含み得る。他の例は、CCL5、CXCL12、CXCL10、SDF-1、FGF-4、S1PR1、RGDS、メチルセルロースなどの小分子を含み得る。さらに他の例は、ウシ血清アルブミン、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、フィブロネクチン (fibronectin)、フィブリノゲン、ラミニン、ビトロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質を含み得る。特に、三次元細胞外マトリックス組織および生理的骨髄剛性を再現するため、細胞はヒドロゲル溶液中に注入されてもよく、その後当該ヒドロゲル溶液は重合されてもよい。ヒドロゲル溶液は、アルギン酸、マトリゲル、アガロース、コラーゲングル、フィブリン/フィブリノゲングルを含み得るが、これらに限定されない。

【0041】

いくつかの態様では、バイオリアクタ 300 の様々な部分は、組み立ておよび分解を可能にするように構成され得る。具体的には、図 3 に示すように、第 1 の基板 302、透過性膜 304、および第 2 の基板 306 は、互いに取り外し可能に連結されるように構成され得る。留め具、クリップ、または他の解除可能な係止機構を用いて係合させた場合、入力部 310 と出力部 318 との間の流体経路の完全性を回復させるため、基板および透過性膜 304 の様々な表面の間に、たとえば、ハーメチックシールを形成することができる。この性能により、上述のように、作製を容易にすることができ、また、繰り返し使用のための洗浄を容易にすることができる。さらに、分解により、様々な構成要素の迅速な交換、再利用または迅速なプロトタイピングが可能になる。たとえば、異なる孔径を有する透過性膜 304、または異なる作製物を、容易に交換することができる。

【0042】

あるいは、バイオリアクタ 300 は、射出成形技術を用いてサンプル用に単一のデバイスとして製造されてもよく、この場合、透過性膜 304 が基板に成形される。そのような実施例は、大規模製造技術に有利に組み込まれ得る。一例として、図 16 は、成形技術を用いて生成されたバイオリアクタ 1600 を示す。バイオリアクタ 1600 は、PDMS、熱可塑性樹脂 (コポリマー (「COP」)、環状オレフィンコポリマー (「COC」)、ポリメチルメタクリレート (「PMMA」)、ポリカーボネート (「PC」) など)、および他の材料を用いて形成され得る。図 16 に示すように、いくつかの実施形態では、バイオリアクタ 1600 は、バイオリアクタ 1600 の上部もしくは下部のいずれかまたは両方にガラス基板 1602 を含み得る。あるいは、バイオリアクタ 1600 は、単独で、またはガラスまたはアクリル基板と組み合わせて、アクリル上部基板 1604 を含み得る。これらの基板は、バイオリアクタ 1600 に構造的支持を提供するために使用することができる。

【0043】

一例として、図 7A~図 7B は、それぞれ、分解された、および組み立てられた例示的なバイオリアクタアセンブリ 700 を示す。図 7A に示すように、バイオリアクタアセンブリ 700 は、一般的に、ベースプレート 702、クランプアーム 704、上部クランプフレーム 706、留め具 708、およびバイオリアクタ 710 を含む。図 7B に示すように、バイオリアクタ 710 に圧縮がかけられ、バイオリアクタ 710 の各基板の間にハーメチックシールが形成される。いくつかの設計では、バイオリアクタアセンブリ 700 は、漏れを防止し、過圧縮を回避するために、バイオリアクタ 710 の上面および底面にわたって均一な圧力を加えることができるように、バネを有するハードストップを組み込んでもよい。たとえば図 5A または図 8 に示すように、他の固定機構またはその変形も可能である。

【0044】

ここで図4A～図4Cを参照すると、本開示の態様によるマイクロ流体バイオリアクタアセンブリ400の非限定的な実施形態が示されている。図4Bの断面図を特に参照すると、バイオリアクタアセンブリ400は、上部基板402、下部基板404、および、それぞれの基板に形成された多数の対応する入口チャンネル408および出口チャンネル410を接続する、基板間の膜406を含む。記載されるように、膜406は、たとえば、その中に含まれる細孔を介して、基板間に流体経路を形成するように構成される。図4Aに示すように、バイオリアクタアセンブリ400はまた、たとえばねじを使用して、膜406および基板を一緒に固定するように構成された基部412および頂部414を含み得る。簡略化のため、図4Aは、バイオリアクタアセンブリ400の一部のみを示す。固定されるとき、基部412および頂部414は、漏れることなくチャンネル内に流体またはガスが流れるよう、基板を、その間にハーメチックシールを形成できるよう調節された係合状態（たとえば、ガイド、溝または穴を使用して）とする。逆に、固定を解除したとき、バイオリアクタアセンブリ400の様々な部分は個別に作製、交換、洗浄、再使用され得る。

10

【0045】

記載されるように、いくつかの構成では、バイオリアクタアセンブリ400は、運転中に可視化できるよう構成され得る。図4Bに示すように、各基板は、近接して配置されたガラス層416を有することができ、ガラス／基板／膜／基板／ガラスを含む積層体を形成する。代替的な構成では、ガラス層は含まれず、基板および／または膜406が、適切な構造的完全性、および流体媒体の可視化を可能にするのに適した透明性などの、所望の材料特性を有するように構成されてもよい。理解されるように、バイオリアクタアセンブリ400およびその一部の特定の構成ならびに組み立て方法は、特定用途の仕様に変更または適合されてもよい。

20

【0046】

バイオリアクタアセンブリ400の入口チャンネル408および出口チャンネル410は、同じ寸法を有する必要はない。すなわち、図4Bに示すように、入口チャンネル408は、出口チャンネル410と比較して、少なくとも1つの横方向（または長手方向）の寸法において、より大きく（またはより小さく）することができる。一例として、入口チャンネルは、約0.1mmの第1の横方向寸法またはチャンネル高さ、または約0.7mmの第2の横方向寸法またはチャンネル幅を有していてもよく、出口チャンネルは、約0.1mmのチャンネル高さおよび約0.5mmのチャンネル幅を有していてもよい。チャンネルは、約25mmの長手方向寸法または長さを有していてもよい。様々な他の寸法をとることも可能であり得る。いくつかの態様では、チャンネルの深さおよび幅を含む寸法は、巨核球がチャンネルの中心で所望の剪断応力を受けるよう、また、チャンネル壁で捕捉されることを回避するように構成され得る。

30

【0047】

さらに、いくつかの態様では、少なくともいくつかの入口チャンネル408もしくは出口チャンネル410、またはその両方は、活性接触領域422を形成する長手方向寸法の少なくとも一部にわたって、横方向にテーパ状であってもよい。一例として、チャンネルの深さは0.5mmから始まり、ある点までテーパを形成することができる。記載されるように、このような構成は、活性接触領域422内の膜406を通した灌流を調節するために、チャンネル内での圧力差プロファイルを制御するのに有利であり得る。

40

【0048】

特に図4Cの断面図を参照すると、入口チャンネル408および出口チャンネル410は、横方向にテーパ状であり、長手方向xとテーパ角 α を形成することが示されている。すなわち、入口チャンネル408または出口チャンネル410の表面424、またはその両方は、図示されるように、長手方向すなわちx方向とテーパ角を形成する。一例として、テーパ角 α は、0～5度の値をとり得るが、他のテーパ角の値をとることも可能である。いくつかの態様では、入口チャンネル408および出口チャンネル410に関するテーパ角は同じである必要はない。チャンネルにおけるテーパの結果として、入口418を介して導入され、

50

出口４２０を介して抽出される流体媒体は、矢印によって示されるように、活性接触領域４２２にわたって均一な圧力差プロファイルを受ける。ここで、圧力差プロファイルとは、長手方向ｘに沿って異なる点に存在する入口チャンネル４０８と出口チャンネル４１０との間の様々な圧力差を指す。

【００４９】

一例として、図５Ａ～図５Ｂは、図２を参照して説明したバイオリアクタシステムの一実施形態を示す。具体的に図５Ａに示すように、システム５００は、図４Ａ～図４Ｃを参照して説明したように、プラスチックチューブ５０４を用いてバイオリアクタ・チップ・アセンブリ５０６に流体接続されたシリンジポンプ５０２を含み得る。特に、チューブ５０４は、シリンジポンプ５０２および外部出力へ、取り外し可能であり、かつ漏れが防止された接続を提供するため、ルアーロックコネクタ５０８を使用して取り付けてもよい。図示されるように、バイオリアクタ・チップ・アセンブリ５０６は、チップクランプ５１２を用いて標準的なマイクロプレート寸法の基材５１０に固定された、バイオリアクタ５５０を含む。特に図５Ｂを参照すると、バイオリアクタ５５０は、その中に含まれるＰＤＭＳ基板に形成され、それぞれの入口５５４および出口５５６のポートに接続された、複数のチャンネル５５２またはチャンバを含むことが示される。記載されるように、入口および出口チャンネル５５２は、透過性膜５５８によって分離される。バイオリアクタ５５０はまた、孔の有無にかかわらず、ガラススライド５６０を含み、ＰＤＭＳ基板の上部および底部に配置される。バイオリアクタ５５０は、ハーメチックシールを達成するためのＰＤＭＳ成形トラック５６２をさらに含む。

【００５０】

別の実施形態では、図２を参照して説明したバイオリアクタシステムは、図１０に示されている。具体的には、システム１０００は、生物学的入力源１００２、バイオリアクタ１００４、出力１００６、コントローラ１００８、および再循環器１０１０を含む。記載されるように、入力源１００２は複数の入口チャンネル１０１２に流体接続され、出力１００６は複数の出口チャンネル１０１４に流体接続され、入口チャンネルおよび出口チャンネルは透過性膜（図１０には示さず）によって分離される。記載されるように、血小板などの産生された生物学的産物を含む流出物は、出力１００６で受け取られ得る。

【００５１】

回収、貯蔵、またはさらなる処理のために出口チャンネル１０１４から出口１００６に流出物を誘導するように構成された出口ポート１０１６に加えて、図１０に示すバイオリアクタ１００４はまた、出口チャンネル１０１４に接続された別の出口ポート１０１８も含む。このような構成により、出口チャンネル１０１４から流出する流出物は、再循環器１０１０を使用して、図１０の矢印で示されるように、出口チャンネル１０１４に接続された入口ポート１０２０を介して出口チャンネル１０１４に戻される。これにより、運転量が削減され、産生される生物学的産物を濃縮する性能が得られる。さらに、チャンネル内の圧力差および剪断応力プロファイルは、コントローラ１００８によって独立して制御することができる。一例として、再循環器１０１０は蠕動ポンプであってもよく、生理的に適切な状態を達成するように構成され得る。

【００５２】

図示されていないが、バイオリアクタ１００４はまた、ＣＯ₂などのガスをチャンネルに灌流するための灌流チャンネルを含み得る。さらに、バイオリアクタ１００４は、組立および分解が可能なバイオリアクタアセンブリに含まれてもよい。

【００５３】

これまで説明したバイオリアクタシステムの実施形態は、平面形状に限定される必要はない。たとえば、図１１および図１２に示すように、円筒形状を実施することもできる。具体的に図１１を参照すると、例示的な円筒型バイオリアクタ１１００の断面図が示されており、これは、基板１１０６に形成された外側チャンバ１１０２および内側チャンバ１１０４を含む。図示されるように、チャンバは、記載されるようにチャンバを接続するマイクロ流体経路を形成するよう構成された多孔質膜１１０８によって分離される。チャン

バは、矢印で示されるように、そこを流れる流体媒体の注入および収集を容易にすることができる様々な入口ポートおよび出口ポート（図 1 1 には図示せず）にそれぞれ接続される。いくつかの態様では、図 1 1 に示すように、基板 1 1 1 2 の内面 1 1 1 0 は、チャンパ間の流体の流れを制御するよう構成された湾曲または連続テーパを含む。いくつかの態様では、湾曲は、透過性膜 1 1 0 8 の活性領域にわたって均一な圧力差を達成するように構成され得る。

【0054】

別の例では、図 1 2 は、円筒型バイオリアクタアセンブリ 1 2 0 0 の断面を示す。一般的に、バイオリアクタアセンブリ 1 2 0 0 は、透過性膜 1 2 0 6 によって第 2 の基板 1 2 0 4 から分離された第 1 の基板 1 2 0 2 を含む。理解されるように、この構成は、図 4 B を参照して説明したものと同様であるが、円筒形状に適合されている。具体的には、第 1 の基板 1 2 0 2 は、その内部に形成された複数の入口チャンネル 1 2 0 8 を含む。同様に、第 2 の基板 1 2 0 4 は、その内部に形成された複数の出口チャンネル 1 2 1 0 を含み、入口チャンネル 1 2 0 8 および出口チャンネル 1 2 1 0 は、図 1 2 に示す断面に垂直な長手方向に実質的に沿って延在し、活性接触領域上で重なり合う。チャンネルはテーパ状であってもよく、テーパ状でなくてもよい。入口チャンネル 1 2 0 8 を流れる流体媒体は、次に、矢印によって示されるように、透過性膜 1 2 0 6 を出口チャンネル 1 2 1 0 へと半径方向に横切る。

【0055】

バイオリアクタアセンブリ 1 2 0 0 のチャンネルは、図 3 を参照して説明した構成と同様に、様々な入口／出口ポート、および入口／出口マニホールド（図 1 2 には図示せず）に接続され得る。さらに、いくつかの態様では、チャンネルは、透過性膜 1 2 0 6 を通して灌流を調節する圧力差を制御するために、長手方向の少なくとも一部にわたって、横方向にテーパ状であってもよい。基板がベースプレート 1 2 1 2 および留め具 1 2 1 4 によって係合されると、均一な圧力が透過性膜 1 2 0 6 に加えられ、基板と透過性膜 1 2 0 6 との間にハーメチックシールが形成される。

【0056】

次に図 1 3 を参照すると、本開示の態様によるプロセス 1 3 0 0 の工程を示すフローチャートが示されている。プロセス 1 3 0 0 は、プロセスブロック 1 3 0 2 から、巨核球または前駆細胞または幹細胞のような生物源材料を提供して、開始することができる。いくつかの態様では、プロセスブロック 1 3 0 2 において生物源材料も生成されてもよい。たとえば、臍帯血からまず幹細胞を単離し、種々の試薬を用いてそれを拡大することによって、巨核球を生成することができる。そのような拡大された細胞は、次に巨核球系列に分化させることができ、その後、血小板を生成する使用可能な成熟した巨核球を生成するため、倍数化を誘導する工程が行われる。あるいは、巨核球は、誘導された多能性細胞から得ることができる。

【0057】

プロセスブロック 1 3 0 4 で示されるように、提供または生成された生物源材料は、たとえば、図 3 ～図 5 を参照して説明したように、バイオリアクタアセンブリに播種することができる。いくつかの態様では、この工程は、様々な成分のバイオリアクタアセンブリを作製することを含み得る。たとえば、デバイスの組み立て前に、様々な培養およびプレーティング技術を用いて、透過性膜に生物源材料を播種することができる。あるいは、またはさらに、生物源材料を有するバイオリアクタアセンブリを作製するために、多数の注入、培養、および他の工程を実施してもよい。たとえば、流体媒体中に分散された巨核球は、バイオリアクタアセンブリ内に選択的に注入され得る。次に、適切な大きさの細孔またはマイクロチャンネルにより、巨核球は透過性膜に捕捉され得る。

【0058】

いくつかの態様では、記載されるように、バイオリアクタアセンブリは、所望の生物学的産物の産生を最適化するために、様々な生物学的物質および組成物で機能化され得る。たとえば、インビボでの血小板産生を複製するため、骨髓および血管で見出される生理的

状態が再現され得る。これは、記載の工程のような選択的注入または他の作製法によって達成され得る。たとえば、バイオリアクタアセンブリは、内皮細胞、骨髄細胞、血液細胞、および基底膜を含む細胞を含む、様々な細胞で機能化されてもよい。バイオリアクタアセンブリはまた、CCL5、CXCL12、CXCL10、SDF-1、FGF-4、S1PR1、RGDS、メチルセルロースおよび細胞外マトリックスタンパク質、たとえば、コラーゲン、フィブロンectin（fibrinectin）、フィブリノゲン、ラミニン、ビトロネクチン、ビオチン、およびそれらの組み合わせなどを含む様々な小分子で機能化されてもよい。様々な生物学的組成物のそのような選択的注入は、連続的にまたは並行して達成され得る。いくつかの態様では、層流媒体の流れが混合しないように、複数の入口および出口を使用して並行注入を行ってもよい。任意の上記生物学的物質または組成物は、細胞培養培地、全血、血漿、血小板添加溶液、懸濁培地などを含む様々な液体媒体を用いて注入することができる。いくつかの態様では、適切な条件設定および対象範囲を検証するために、カメラ、顕微鏡などを使用して、上述の注入プロセスおよび播種プロセスを視覚的に監視することができる。さらに、プロセスブロック1302またはプロセスブロック1304のいずれかを実行中に、温度、光または振動を含む様々な条件を調整することができる。

10

【0059】

再び図13を参照すると、プロセスブロック1306において、流体媒体は、血小板などの所望の生物学的産物を産生するために、播種され、機能化されたバイオリアクタアセンブリに導入され得る。記載されるように、選択されたバイオリアクタアセンブリの実施形態における流体媒体流量および経路を制御することによって、条件を制御して、所望の生物学的産物の産生を促進または最適化することができる。特に、通過する流体による剪断応力に加えて、透過性膜を通る灌流量を制御することができる。一例として、流量は、用途、特定のバイオリアクタアセンブリの実施形態、および所望の生物学的産物に応じて他の値をとることも可能であるが、約5,000~150,000マイクロリットル/時の所定の範囲内であってもよい。たとえば、流量は、バイオリアクタアセンブリが準備されているか、または所望の生物学的産物を生成するように操作されているかに応じて変更され得る。

20

【0060】

いくつかの態様では、流量は、血小板などの所望の生物学的産物の効率的な産生に有利な所定の範囲の剪断速度を維持するように構成され得る。一般的に、そのような所定の範囲は、他の値をとることも可能であるが、10/秒~10,000/秒の範囲であってもよい。いくつかの態様では、インビボでの血小板前駆細胞伸長および血小板産生と一致する生理的剪断速度が望ましい場合がある。たとえば、生理的剪断速度は、500/秒~2500/秒であってもよい。

30

【0061】

次に、プロセスブロック1308において、バイオリアクタアセンブリ内で生成された生物学的産物が収集され得る。たとえば、生成された生物学的産物は、通過する流動媒体によって運ばれ、その後の使用のために流出物から回収され、分離され得る。いくつかの態様では、回収後処理を行ってもよい。たとえば、プロセスブロック1308は、血小板添加溶液などのFDAに認可された記憶媒体中でバイオリアクタ由来血小板を透析するプロセスも含んでもよい。特に、0.75mm、0.65µm PESルーメン（Spectrum Labs）を通して低剪断での連続流を使用する動的透析システムを使用することができる。したがって、培養培地は、ヒト患者に注入することができる媒体で置き換えることができる。さらに、いくつかの態様では、プロセスブロック1308における回収後処理は、生成された生物学的産物に照射するプロセスを含むこともできる。このような工程は、血小板をヒト患者に使用する前に、FDAによって要求されることが多い。

40

【0062】

要約すると、本開示は、血小板および他の生物学的産物の効率的かつスケーラブルな生産のための新規アプローチを提供する。一例として、図14A~Dは、従来の静的培養技

50

術を用いた成熟巨核球および血小板前駆細胞／血小板産生と本開示のアプローチを用いて得られたものとの動物での結果を比較するフローサイトメトリグラフを示す。特に、図14Aおよび14Bは、それぞれ静的培養で産生された成熟巨核球および血小板前駆細胞／血小板を示し、図14Cおよび14Dは、それぞれ、本アプローチを用いて産生に成功した成熟巨核球および血小板前駆細胞／血小板を示す。さらに、図14Cは、巨核球の閉じ込めが成功したことを示す。別の例として、図15は、記載されるように、バイオリアクタおよび方法を使用する細胞収量のタイムラインを示すグラフを示す。図示されるように、有意な数の血小板（「PLT」）を、バイオリアクタの運転の最初の1時間以内に生成することができる。これらの結果は、臨床的に適切な数の血小板を産生するために本アプローチが成功裏に実施され得ることを示す。

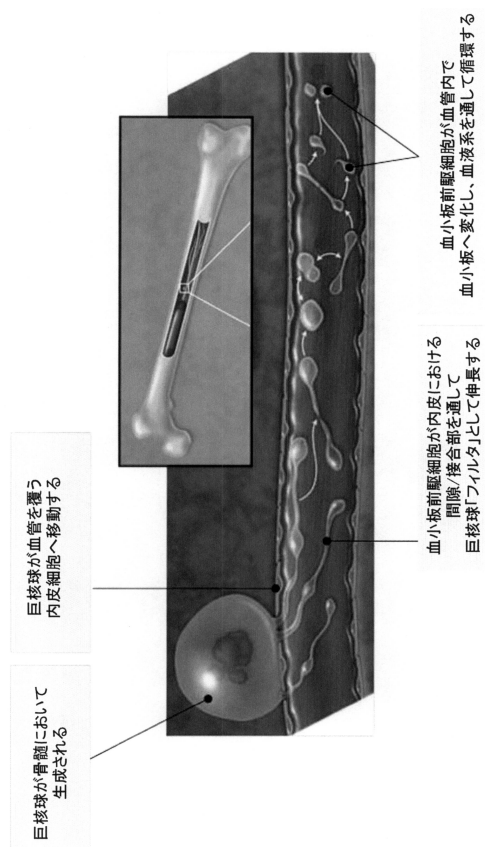
10

【0063】

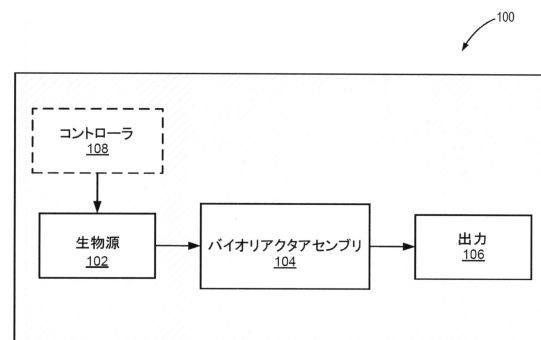
上に示された様々な構成は単なる例であり、決して本開示の範囲を限定するものではない。本明細書に記載された構成の変形は、当業者にとって明らかであり、そのような変形は本出願の意図された範囲内である。特に、上述の構成のうちの1つ以上からの特徴を選択して、上で明示的に説明していない特徴の部分的な組み合わせからなる代替の構成を作成してもよい。さらに、上述の構成のうちの1つ以上からの特徴を選択し、組み合わせて、上に明示的に説明していない特徴の組み合わせからなる代替の構成を作成してもよい。そのような組み合わせおよび部分的な組み合わせに適した特徴は、本出願を全体として検討した当業者にとって、直ちに明らかとなるであろう。本明細書および特許請求の範囲に記載される主題は、技術すべての適切な変更を網羅し、包含することを意図する。

20

【図1】



【図2】



【図 3】

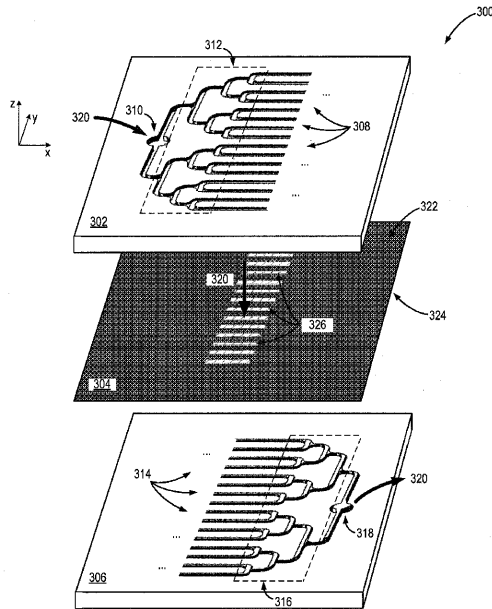


FIG. 3

【図 4 A】

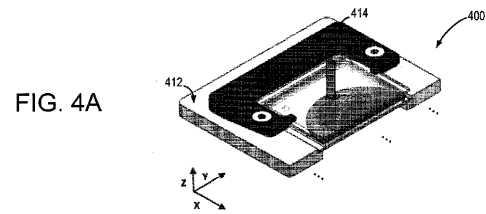


FIG. 4A

【図 4 B】

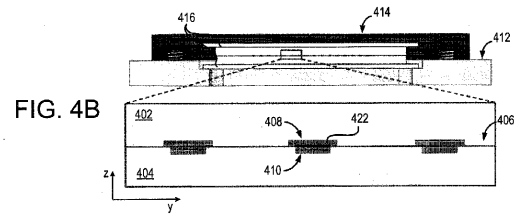


FIG. 4B

【図 4 C】

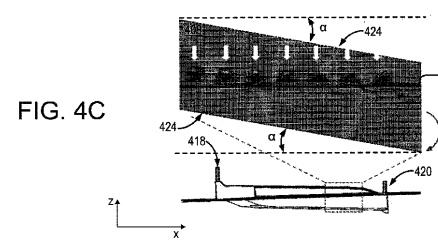


FIG. 4C

【図 5 A】

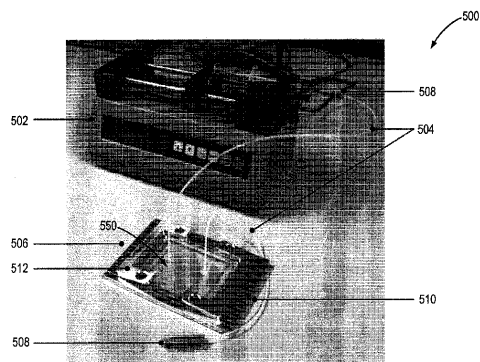


FIG. 5A

【図 5 B】

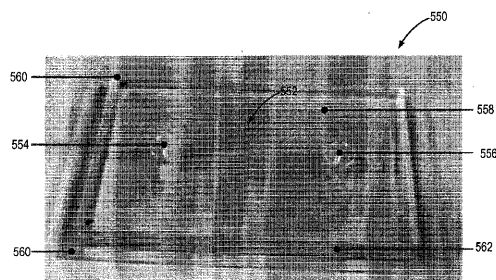


FIG. 5B

【図 6】

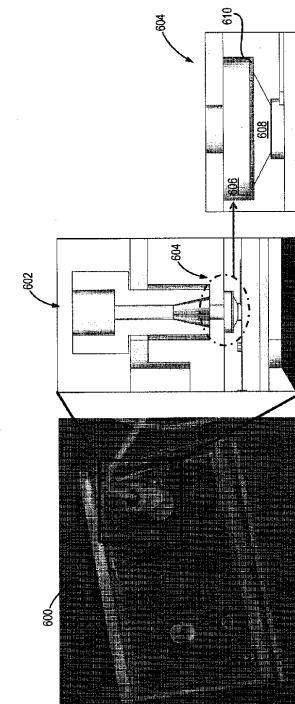
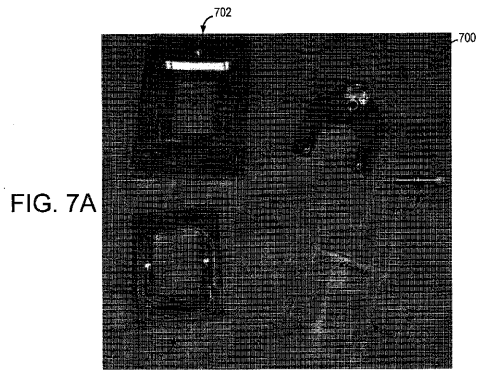
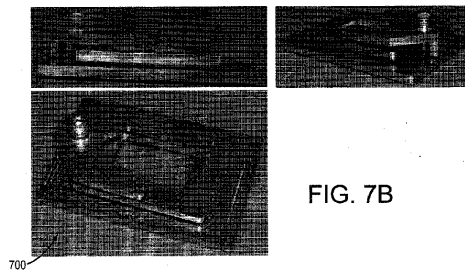


FIG. 6

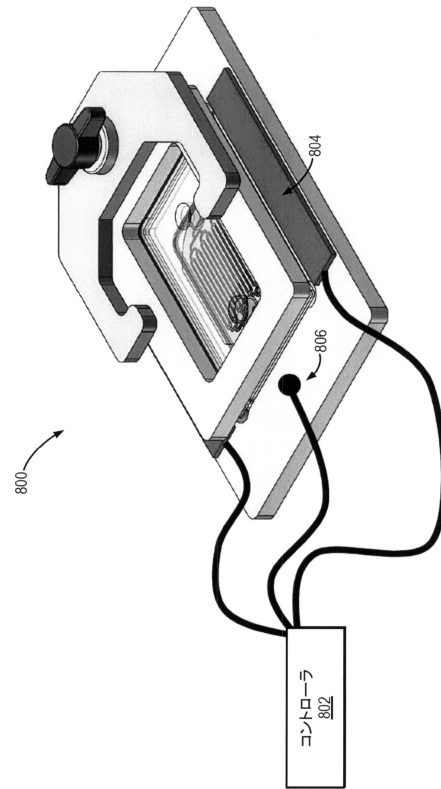
【図 7 A】



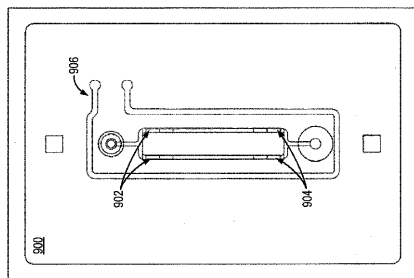
【図 7 B】



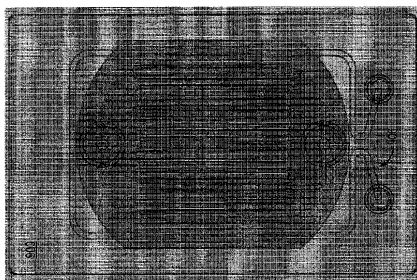
【図 8】



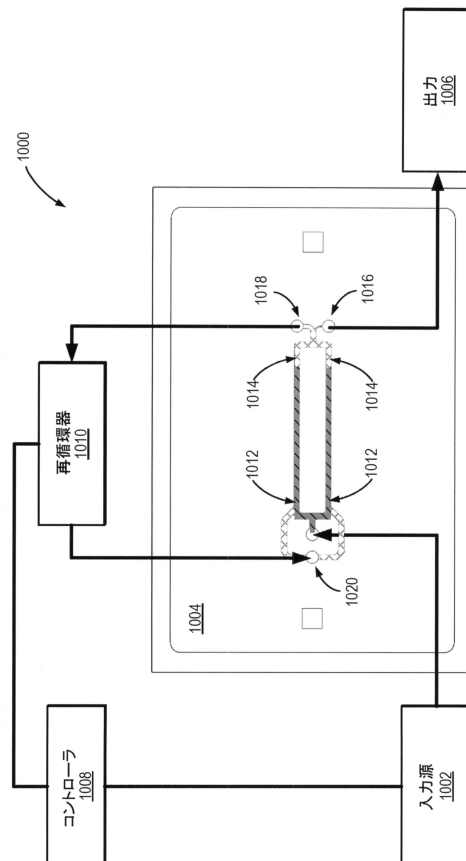
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 10】



【図 1 1】

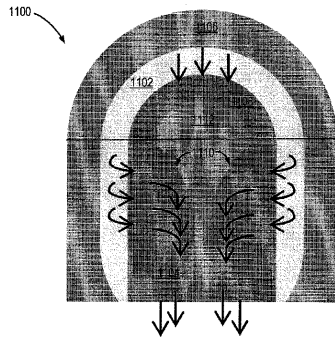


FIG. 11

【図 1 2】

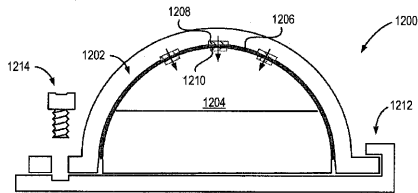
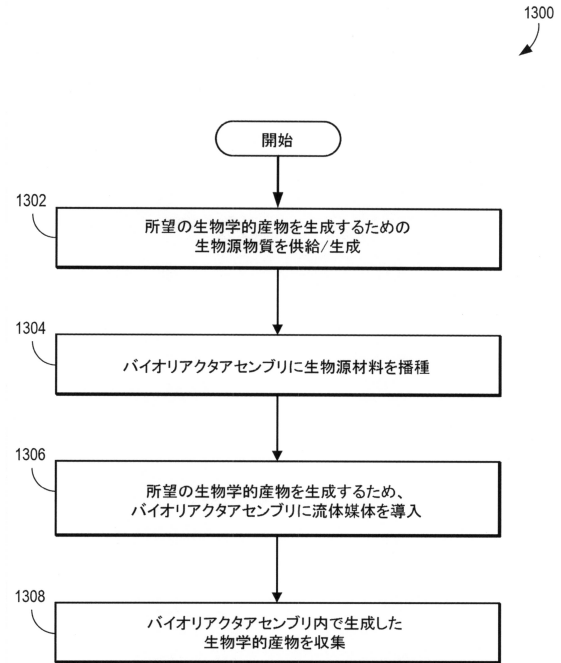
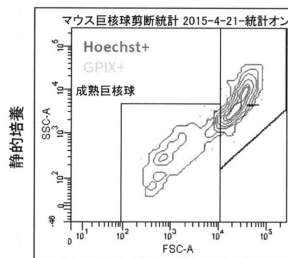


FIG. 12

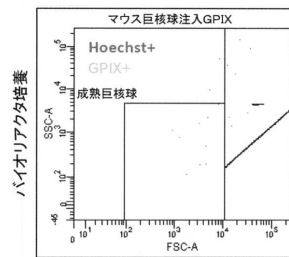
【図 1 3】



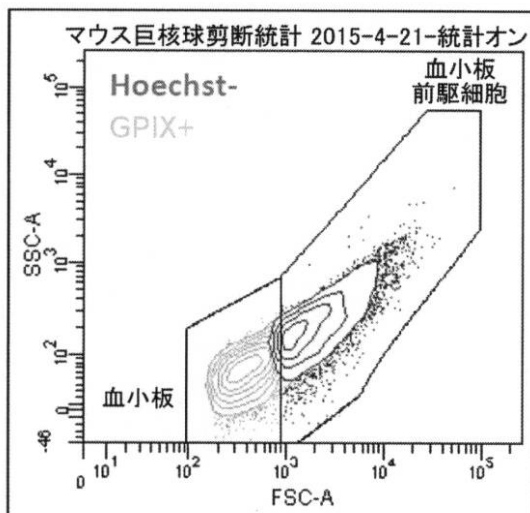
【図 1 4 A】



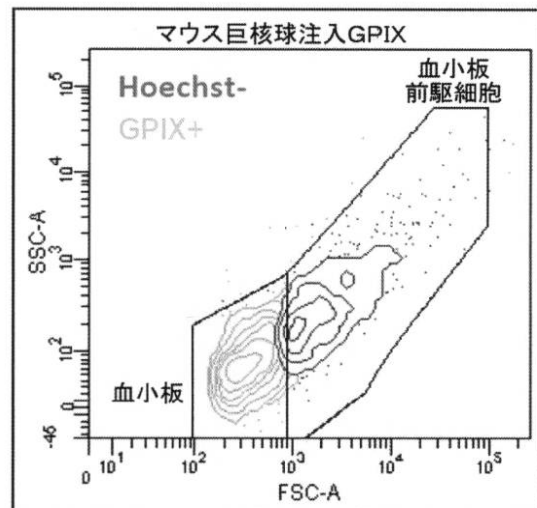
【図 1 4 C】



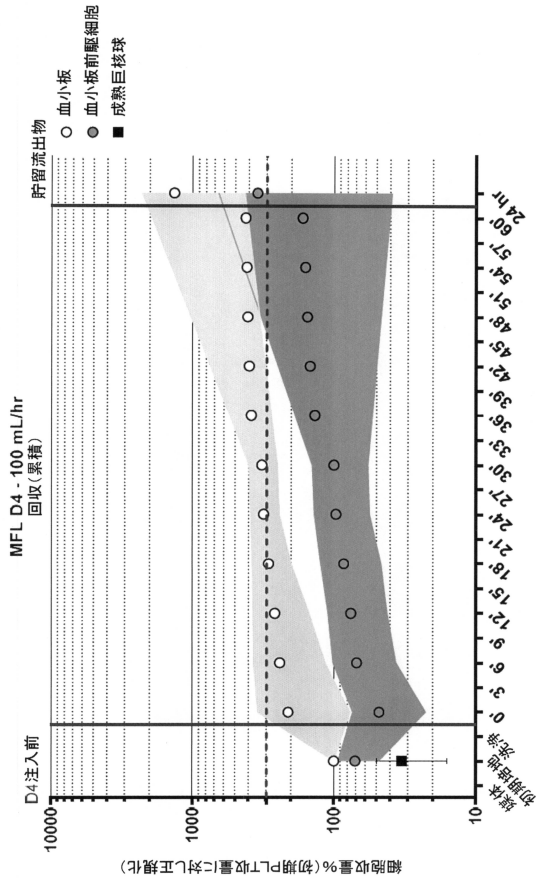
【図 1 4 B】



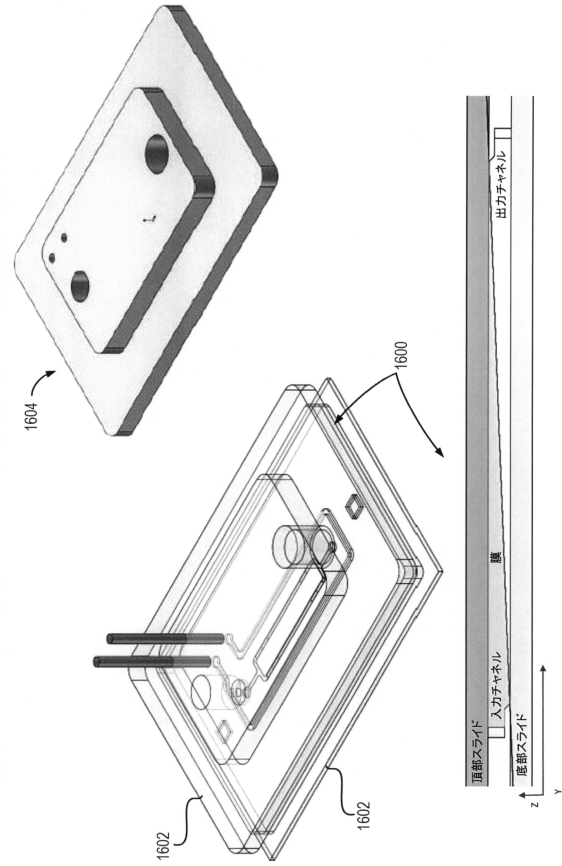
【図 1 4 D】



【図 15】



【図 16】



フロントページの続き

(72)発明者 トーン ジョナサン エヌ.
アメリカ合衆国 02125 マサチューセッツ州 ドーチェスター コンラッド ストリート
8 アパート 2

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表2011-528232 (JP, A)
国際公開第2014/110133 (WO, A1)
国際公開第2014/107240 (WO, A1)
国際公開第2014/061675 (WO, A1)
特開2010-011747 (JP, A)
国際公開第2014/034146 (WO, A1)
特開2014-073125 (JP, A)
特開2013-031428 (JP, A)
米国特許出願公開第2005/0224351 (US, A1)
国際公開第2011/040889 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12M 1/00-3/10
C12N 1/00-7/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)