

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-205448

(P2019-205448A)

(43) 公開日 令和1年12月5日(2019.12.5)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/078 (2010.01) C 1 2 N 5/078 Z N A 4 B O 6 5

審査請求 有 請求項の数 22 O L 外国語出願 (全 90 頁)

(21) 出願番号	特願2019-128551 (P2019-128551)	(71) 出願人	509236520
(22) 出願日	令和1年7月10日 (2019.7.10)		アステラス インスティテュート フォー
(62) 分割の表示	特願2015-549848 (P2015-549848)		リジェネレイティブ メディシン
原出願日	平成25年12月21日 (2013.12.21)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1
(31) 優先権主張番号	61/740,699		752, マールボロウ, ロック ドラ
(32) 優先日	平成24年12月21日 (2012.12.21)	(74) 代理人	イブ 33
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	弁理士 葛和 清司	
(31) 優先権主張番号	61/787,476	(72) 発明者	フェン, チャン
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		760, ネイティック, メイン アベ
			ニュー 16
(特許庁注：以下のものは登録商標)			
1. TRITON			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞から血小板を生産するための方法およびその組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 多能性幹細胞から血小板を生産するための方法およびその組成物の提供。

【解決手段】 多能性幹細胞、例えばヒト胚性幹細胞 (hESC) および人工多能性幹細胞 (iPSC) から、胚様体も多能性幹細胞のクラスターも形成することなく、間質インデューサー細胞の使用を伴わずに実施される血小板の生産方法および生産された血小板を含む組成物。収量および/または純度は、多能性幹細胞から血小板を生成する以前の方法について報告されているよりも高くなり得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 10^8 個の血小板を含む、ヒト患者における使用に適切な医薬調製物であって、該調製物が白血球を実質的に含まず、該血小板の実質的に全てが機能的である、医薬調製物。

【請求項 2】

$10^9 \sim 10^{14}$ 個の血小板、任意選択で、 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個または 10^{14} 個の血小板を含む、請求項 1 に記載の医薬調製物。

【請求項 3】

前記血小板が、以下の属性： $9.7 \sim 12.8$ fL の平均血小板容量範囲；前記調製物中のサイズの単峰型分布；および / または 1 標準偏差が $2 \mu\text{m}^3$ 未満（好ましくは、 $1.5 \mu\text{m}^3$ 未満、 $1 \mu\text{m}^3$ 未満またはさらには $0.5 \mu\text{m}^3$ 未満）である対数正規型血小板容量分布のうち 1 つまたは複数を含む、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の医薬調製物。

10

【請求項 4】

前記血小板が、以下のマーカー：CD41a および CD42b のうち少なくとも 1 つについて陽性である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 5】

前記血小板がヒト血小板である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の調製物。

【請求項 6】

前記血小板の少なくとも 50%、60%、70%、80% または 90% が、室温での貯蔵後少なくとも 2、3 または 4 日間にわたって機能的である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の調製物。

20

【請求項 7】

フィーダー細胞なしに機能的血小板を生成する弱い接着性のまたは非接着性の巨核球を有するバイオリクター。

【請求項 8】

少なくとも 10^9 個の MLP を含む組成物。

【請求項 9】

MLP を含む凍結保存組成物。

30

【請求項 10】

凍結保存された MLP を含むバンク。

【請求項 11】

前記 MLP が、規定された HLA 型のものである、請求項 9 または 10 に記載の凍結保存組成物またはバンク。

【請求項 12】

患者に対して HLA がマッチしている、請求項 9 に記載の凍結保存組成物。

【請求項 13】

$10^9 \sim 10^{14}$ 個の MLP、任意選択で 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個または 10^{14} 個の MLP を含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の凍結保存組成物またはバンク。

40

【請求項 14】

巨核球から血小板を生成するための方法であって、

a) 巨核球の非接着性培養物を提供するステップ；

b) 該巨核球を TPO または TPO アゴニストと接触させて、培養において前血小板の形成を引き起こすステップであって、該前血小板が血小板を放出するステップ；および

c) 該血小板を単離するステップ

を含む方法。

【請求項 15】

巨核球から血小板を生成するための方法であって、

50

a) 巨核球の非接着性培養物を提供するステップ；

b) 該巨核球を、造血拡大増殖培地ならびに任意選択で(1) TPOもしくはTPOアゴニスト、SCF、IL-6およびIL-9または(2) TPOもしくはTPOアゴニスト、SCFおよびIL-11と接触させて、培養中において前血小板の形成を引き起こすステップであって、該前血小板が血小板を放出するステップ；および

c) 該血小板を単離するステップを含む方法。

【請求項16】

前記TPOアゴニストが、ADP、エピネフリン、トロンピン、コラーゲン、TPO-Rアゴニスト、TPO模倣物、第2世代血小板新生剤、ロミプロスチム、エルトロンボパグ(SB497115、Promacta)、組換えヒトトロンボポエチン(TPO)、ペグ化組換えヒト巨核球増殖発達因子(PEG-rHuMGDF)、Fab 59、AMG 531、Peg-TPOmp、TPO非ペプチド模倣物、AKR-501、モノクローナルTPOアゴニスト抗体、ポリクローナルTPOアゴニスト抗体、TPOミニボディ、VB22B sc(Fv)2、ドメインサブクラス変換TPOアゴニスト抗体、MA01G4G344、組換えヒトトロンボポエチン、組換えTPO融合タンパク質またはTPO非ペプチド模倣物のうち1つまたは複数を含む、請求項14または15に記載の方法。

10

【請求項17】

実質的に全ての前記単離された血小板が機能的である、請求項14～16のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項18】

巨核球の前記非接着性培養物が、フィーダーフリーの培養物である、請求項14～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

ステップ(b)における前記培養が、0.5～100 ng/mlの幹細胞因子(SCF)、10～100 ng/mlのトロンボポエチン(TPO)および10～100 ng/mlのインターロイキン-11(IL-11)、少なくとも1種のROCKインヒビター、ならびに/または2.5～25単位/mlのヘパリンのうち1つまたは複数を含む培地中である、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項20】

ステップ(b)における前記培養が、10～100 ng/mlのTPO、0.5～100 ng/mlのSCF、5～25 ng/mlのIL-6、5～25 ng/mlのIL-9、少なくとも1種のROCKインヒビター、および/または2.5～25単位/mlのヘパリンのうち1つまたは複数を含む培地中である、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記少なくとも1種のROCKインヒビターがY27632を含む、請求項19または20に記載の方法。

【請求項22】

前記Y27632が、2～20 μM、約3～10 μM、約4～6 μMまたは約5 μMの濃度内である、請求項21に記載の方法。

40

【請求項23】

前記巨核球を剪断力に供するステップをさらに含む、請求項14～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

巨核球1個当たり少なくとも2個、3個、4個または5個の血小板が生成される、請求項14～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

巨核球1個当たり少なくとも50個の血小板が生成される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

50

巨核球 1 個当たり少なくとも 1 0 0 個、5 0 0 個、1 0 0 0 個、2 0 0 0 個、5 0 0 0 個または 1 0 0 0 0 個の血小板が生成される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記血小板の少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % が、C D 4 1 a + および C D 4 2 b + である、請求項 1 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記血小板が、フィーダー細胞または間質フィーダー細胞の非存在下で生成される、請求項 1 4 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記血小板が、全ての異種細胞の非存在下で生成される、請求項 1 4 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記血小板がヒトのものである、請求項 1 4 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記巨核球が、外因的に添加されたプロテアーゼインヒビターの存在下で培養される、請求項 1 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記巨核球が、外因的に添加された M M P インヒビターの存在下で培養される、請求項 1 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記巨核球が、外因的に添加された M M P 8 インヒビターの存在下で培養される、請求項 1 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記巨核球が、外因的に添加された M M P 8 特異的インヒビターおよび汎 M M P インヒビターの存在下で培養される、請求項 1 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記巨核球が、約 3 9 °C の温度で培養される、請求項 1 4 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記巨核球が、

(a) 多能性幹細胞を培養して、造血性内皮細胞 (P V E - H E) を形成するステップ

;

(b) 該造血性内皮細胞を培養して、M L P を形成するステップ; および

(c) 該 M L P を培養して、巨核球を形成するステップ

を含むステップによって生成される、請求項 1 4 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

B E T インヒビターが、ステップ (b) における前記培養物に添加される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記 B E T インヒビターが I B E T 1 5 1 である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記多能性幹細胞がヒトのものである、請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

。

【請求項 4 0】

前記造血性内皮細胞が、胚様体形成なしに誘導される、請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞 (i P S C) である、請求項 3 6 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

前記 i P S C がヒトのものである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記造血性内皮細胞が、胚様体形成なしに誘導される、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記造血性内皮細胞が、1%～10%の酸素、2%～8%の酸素、3%～7%の酸素、4%～6%の酸素または約5%の酸素を含む低酸素条件下で、前記多能性幹細胞から分化させられる、請求項 3 6～4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 M L P が、38～40セルシウス度の間の温度、または約39セルシウス度の温度で培養されて、巨核球を形成する、請求項 3 6～4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

請求項 1 4～4 5 のいずれか一項に記載の方法によって生成された血小板を含む医薬調製物。

【請求項 4 7】

ヒト患者における使用に適切であり、少なくとも 10^8 個の血小板を含む、請求項 4 6 に記載の調製物。

【請求項 4 8】

ヒト患者における使用に適切であり、白血球を実質的に含まない、請求項 4 6 に記載の調製物。

【請求項 4 9】

前記請求項のいずれかに記載の組成物または前記請求項のいずれかに記載の方法によって生成された組成物の使用であって、それを必要とする患者あるいは凝固に影響する疾患もしくは障害に罹患している患者またはそれによって処置可能な疾患もしくは障害に罹患している患者の処置のための医薬の製造における使用。

【請求項 5 0】

前記疾患または障害が、血小板減少症、外傷、血液媒介寄生生物またはマラリアを含む、請求項 4 9 に記載の使用。

【請求項 5 1】

血小板輸血を必要とする患者を処置する方法であって、前記請求項のいずれかに記載の組成物または前記請求項のいずれかに記載の方法によって生成された組成物を、該患者に投与するステップを含む方法。

【請求項 5 2】

血小板減少症、外傷、血液媒介寄生生物またはマラリアを含む疾患または障害を処置するために有効である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

巨核球または M L P から血小板を生成するための方法であって、
プロテアーゼインヒビターの存在下において、剪断力条件下で、M L P の巨核球の非接着性集団を培養するステップ、および
該培養物から血小板を回収し、任意選択で単離するステップ
を含む方法。

【請求項 5 4】

前記プロテアーゼインヒビターが M M P インヒビターである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記剪断力条件が一定の剪断力条件である、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記剪断力条件が、 $1 \sim 4 \cdot 1$ ダイン / cm^2 の剪断力を含む、請求項 5 3～5 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 57】

前記巨核球またはMPLが、マイクロ流体デバイス中で培養される、請求項53～56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記巨核球またはMPLが、iPS細胞、ES細胞、または天然に存在するCD34⁺細胞、任意選択で、骨髄もしくは臍帯血CD34⁺細胞から誘導される、請求項53～57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記プロテアーゼインヒビターがGM6001である、請求項53～58のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 60】

前記プロテアーゼインヒビターがMMP8特異的インヒビターである、請求項53～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記MMP8特異的インヒビターが、MMP8-I((3R)-(+) - [2-(4-メトキシベンゼンスルホニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ヒドロキサメート])である、請求項60に記載の方法。

【請求項 62】

2種またはそれより多くのプロテアーゼインヒビターが使用される、請求項53～61のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 63】

前記2種のプロテアーゼインヒビターが、MMP一般的インヒビターおよびMMP8特異的インヒビターである、請求項62に記載の方法。

【請求項 64】

前記プロテアーゼインヒビターが、前記培養物内の血小板のピーク生成の時点で添加される、請求項53～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

前記巨核球またはMPLが、TPOまたはTPOアゴニストの存在下で培養されて、前血小板の形成を引き起こし、該前血小板が血小板を放出する、請求項53～64のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 66】

前記巨核球またはMPLが、造血拡大増殖培地中、および任意選択で
 (1) TPOもしくはTPOアゴニスト、SCF、IL-6およびIL-9または
 (2) TPOもしくはTPOアゴニスト、SCFおよびIL-11
 中で培養されて、培養において前血小板の形成を引き起こし、該前血小板が血小板を放出する、請求項53～65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 67】

前記巨核球またはMPLが、37よりも高く40と等しいかまたはそれより低い温度で培養される、請求項53～66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 68】

前記巨核球またはMPLが約39の温度で培養される、請求項67に記載の方法。

40

【請求項 69】

巨核球またはMPLから血小板を生成するための方法であって、
 37よりも高く40と等しいかまたはそれより低い温度で、iPS細胞またはES細胞から誘導された巨核球またはMPLの非接着性集団を培養するステップ、および該培養物から血小板を回収し、任意選択で単離するステップを含む方法。

【請求項 70】

前記巨核球またはMPLが約39の温度で培養される、請求項69に記載の方法。

【請求項 71】

50

P V E - H E 細胞から M P L を生成するための方法であって、
 B E T のインヒビターの存在下で、i P S 細胞または E S 細胞から誘導された P V E -
 H E 細胞の集団を培養するステップ、および
 該培養物から M P L を回収し、任意選択で単離するステップ
 を含む方法。

【請求項 7 2】

B E T の前記インヒビターが I - B E T 1 5 1 である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

P V E - H E 細胞から M P L を生成するための方法であって、
 c - m y c サプレッサーの存在下で、i P S 細胞または E S 細胞から誘導された P V E
 - H E 細胞の集団を培養するステップ、および
 該培養物から M P L を回収し、任意選択で単離するステップ
 を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2012年12月21日に出願された米国仮特許出願第61/740,699号および2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第61/787,476号（両方とも「多能性幹細胞から血小板を生産するための方法およびその組成物」と題される）に対する利益を主張し、これら両方の内容全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

血小板は、血液凝固という重要な高度に特化した機能を果たす小さな血液細胞である。平均的なヒトの血液ではほぼ1兆個の血小板が循環し、そのターンオーバーは、全血小板集団が10日毎に置き換えられるようなものである。これは、莫大な量の進行中の血小板生成を示す。血小板は、高度に組織化された細胞骨格および300を超えるタンパク質の細胞内貯蔵を有し、血管傷害の部位においてこれらを分泌する。血小板は、炎症、血管増殖および腫瘍転移においても役割を果たす。

【0003】

脈管傷害後、血小板は、損傷された血管に迅速に接着し、血栓形成を生じる複雑なカスケードの事象を惹起する。血小板輸血に対する需要は、過去数十年間増加し続けている（51）。従来の方法を使用すると、血小板は、1週間未満にわたってしか貯蔵できず、ドナー依存性のプログラムにとって絶え間ない課題を生んでいる。血小板の供給の不足は、生命を脅かす結果を潜在的に有し得る（特に、複数回の輸血が必要な患者において）。反復される輸血は、免疫媒介性の宿主反応に関連付けられる不応性の応答もまたもたらし得、費用のかかる患者マッチングを必要とし得る（52；53）。in vitroの血小板、特に患者にマッチした血小板を生成する能力は、これらの臨床的シナリオにおいて顕著な利益を提供する。

【0004】

血小板の供給における制約は、普通でない/稀な血液型を有する、輸血に依存する患者、特に同種免疫された患者、およびがんまたは白血病を有し、しばしば起きることであるが、血小板同種免疫を発達させる患者にとって、生命を脅かす結果を潜在的に有し得る。輸血されたヒト血小板の半減期は4～5日間であるので、血小板の頻繁な輸血が、これらの患者において臨床的に必要である。さらに、志願者ドナープログラム由来の血小板は、種々の病原体による汚染のリスクが絶えない。血小板は、従来技術を使用しては凍結貯蔵することができず、したがって、血小板をin vitroで生成する能力は、臨床状況における血小板置換療法に顕著な利益を提供する。

10

20

30

40

50

【0005】

10年より長くにわたって、骨髄(BM)、臍帯血(CB)または末梢血(PB)由来のヒト造血幹細胞(HSC、CD34+)が、巨核球(MK)および血小板の生成について研究されてきた。サイトカイン、増殖因子および/または間質フィーダー細胞の特定の組合せを使用して、機能的血小板が、顕著な成功を収めてHSCから生成されている(1;2)。しかし、HSCは、なおもドナーから収集され、現行の培養条件下で限定的な拡大増殖能力を有し、それが、大規模生成および将来の臨床的適用を妨げている。

ヒト胚性幹細胞(hESC)は、*in vitro*で無制限に繁殖および拡大増殖され得、ヒト治療のための細胞の、潜在的に無尽蔵のドナーなしの供給源を提供する。*in vitro*でのhESCの造血細胞への分化は、過去10年間にわたって広範囲に調査されてきた。hESCの方向付けられた造血分化は、2つの異なる型の培養系によって*in vitro*で首尾よく達成されている。これらのうち1つは、血清含有培地中での、hESCと間質フィーダー細胞との共培養を使用する(3;4)。第2の型の手順は、血清あり/なしのサイトカインの存在下での、超低細胞結合プレートにおける懸濁培養条件を使用する(5~7);その終点は、細胞凝集体または胚様体(「EB」)の形成である。造血先駆体ならびに赤血球、骨髄、マクロファージ、巨核球およびリンパ系の系列を示す成熟した機能的子孫が、上記分化するhESC培養系の両方において同定されている(3~6;8~14)。以前の研究でもまた、血清の存在下で間質細胞と共培養することによって、hESCから巨核球/血小板が生成した(15;16)。しかし、上記研究における巨核球/血小板の収量は低かった(15;16)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Reems JA, Pineault N, and Sun S. *In vitro* megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus. Med. Rev.* 2010; 24: 33-43.

【非特許文献2】Chockalingam P, Sacher RA. Management of patients' refractory to platelet transfusion. *J. Infus. Nurs.* 2007; 30: 220-225.

【非特許文献3】Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br. J. Haematol.* 2008; 142: 348-360.

【非特許文献4】Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98: 10716-10721.

【非特許文献5】Lu S-J, Li F, Vida L, Honig GR. CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an embryonic gene expression pattern. *Blood* 2004; 103: 4134-4141.

【非特許文献6】Chadwick K, Wang L, Li L et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003; 102: 906-915.

【非特許文献7】Chang KH, Nelson AM, Cao H et al. Definitive-like erythroid cells derive

10

20

30

40

50

d from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood* 2006; 108: 1515-1523.

【非特許文献8】Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* 2004; 32: 1000-1009.

【非特許文献9】Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005; 105: 617-626.

【非特許文献10】Wang L, Menendez P, Shojaei F et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 1603-1614.

【非特許文献11】Woll PS, Martin CH, Miller JS, Kaufman DS. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. *J. Immunol.* 2005; 175: 5095-5103.

【非特許文献12】Zambidis ET, Peault B, Park TS, Bunz F, Civin CI. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* 2005; 106: 860-870.

【非特許文献13】Qiu C, Hanson E, Olivier E et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp. Hematol.* 2005; 33: 1450-1458.

【非特許文献14】Zhan X, Dravid G, Ye Z et al. Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. *Lancet* 2004; 364: 163-171.

【非特許文献15】Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 85-98.

【非特許文献16】Gaur M, Kamata T, Wang S et al.

10

20

30

40

50

Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 436 - 442.

【非特許文献17】Takayama N, Nishikii H, Usui J et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 2008; 111: 5298 - 5306.

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本開示は、多能性幹細胞、例えば、ヒト胚性幹細胞(hESC)および人工多能性幹細胞(iPSCまたはiPS細胞)、例えばヒト人工多能性幹細胞(hiPSCまたはhiPS細胞)からの血小板の生成のための方法を提供する。これらの方法は、胚様体を形成することなく実施され得、間質インデューサー細胞の使用を伴わずに実施され得る。さらに、収量および/または純度は、多能性幹細胞から血小板を生成する以前の方法について報告されているよりも高くなり得る。血小板は、より高い効率およびより大きい規模で生成され得るので、本開示の方法および組成物は、医療上の輸血目的での使用についての大きな可能性を有する。さらに、血小板は、核を有さず、最小の遺伝子材料のみを含むので、本開示の調製物は、任意の汚染する有核細胞、例えば未分化hESCを効果的に排除するために、輸血前に照射され得る。したがって、有核細胞の起こり得る存在は、安全性の問題を示さないはずである。

20

【0008】

ドナーから収集された血小板は、非常に限定的な有効期限を有し、患者における予防的輸血にますます必要とされている。ドナー依存的な臍帯血または骨髄CD34+ヒト造血幹細胞とは対照的に、ヒト胚性幹細胞(hESC)は、制御された条件下での血小板の持続的な*in vitro*生成のための有望な代替的供給源であり得る。本明細書にさらに記載するように、本開示は、血清フリーおよび間質フリーの条件下で、多能性幹細胞から巨核球(MK)を生成するための系および方法を提供する。例示的な実施形態では、多能性幹細胞は、造血性内皮細胞(PVE-HE、これは以下にさらに記載する)の分化を介して巨核球に向けて方向付けられる。CD31、CD144およびCD105マーカーを発現する一過性の多分化能の細胞集団が、PVE-HE培養の最後に同定されている。フィーダーフリーおよび血清フリーの懸濁培養物中におけるTPO、SCFおよび他のサイトカインの存在下で、最大100倍の拡大増殖が、hESCまたはhiPSC細胞からMKへと、18~20日間で達成され得る。かかる方法は、多能性幹細胞からのMKの強い*in vitro*生成を提供し得る。フィーダーフリー条件下で培養した場合、多能性幹細胞由来のMKは、血小板様粒子(ヒト人工多能性幹細胞(hiPSC-PLT)またはヒト胚性幹細胞(ES-PLT)から生成された血小板または血小板様粒子)を生成するために使用され得る。これらのhiPSC-PLTおよびES-PLTは、トロンビン刺激に対して応答性であり、ミクロ凝集体形成に参与できる。

30

40

【0009】

一実施形態では、本開示は、少なくとも 10^8 個の血小板を含む、ヒト患者における使用に適切な医薬調製物を提供する。

であって、前記調製物が白血球を実質的に含まず、前記血小板の実質的に全てが機能的である、医薬調製物。

【0010】

50

さらに、本開示は、ヒト幹細胞から分化した血小板、例えば、少なくとも 10^8 個の血小板を含む医薬調製物を提供する。任意選択で、この調製物は白血球を実質的に含まなくてもよい。任意選択で、血小板の実質的に全てが機能的であってもよい。

【0011】

医薬調製物は、 $10^9 \sim 10^{14}$ 個の血小板、任意選択で、 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個または 10^{14} 個の血小板を含み得る。

【0012】

血小板は、以下の属性： $9.7 \sim 12.8$ fL の平均血小板容量範囲；調製物中のサイズの単峰型分布；および/または1標準偏差が $2 \mu\text{m}^3$ 未満（好ましくは $1.5 \mu\text{m}^3$ 未満、 $1 \mu\text{m}^3$ 未満またはさらには $0.5 \mu\text{m}^3$ 未満）である対数正規型血小板容量分布のうち1つまたは複数を含む。 10

【0013】

血小板は、以下のマーカー：CD41a および CD42b のうち少なくとも1つについて陽性であり得る。

【0014】

血小板はヒト血小板であり得る。

【0015】

血小板の少なくとも50%、60%、70%、80%または90%は機能的であり得、任意選択で、室温での貯蔵後、少なくとも2、3または4日間にわたって機能的であり得る。 20

【0016】

別の態様では、本開示は、フィーダー細胞なしで機能的血小板を生成する弱い接着性のまたは非接着性の巨核球を有するパイオリクターを提供する。

【0017】

別の態様では、本開示は、少なくとも 10^9 個の巨核球系列特異的前駆体 (MLP) を含む組成物を提供する。

【0018】

別の態様では、本開示は、MLPを含む凍結保存組成物を提供する。

【0019】

別の態様では、本開示は、凍結保存されたMLPを含むバンクを提供する。 30

【0020】

MLPは、規定されたHLA型のものであり得る。

【0021】

凍結保存組成物は、患者にマッチしたHLAであり得る。

【0022】

別の態様では、本開示は、 $10^9 \sim 10^{14}$ 個のMLP、任意選択で 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個または 10^{14} 個のMLPを含む、凍結保存組成物またはバンクを提供する。

【0023】

別の態様では、本開示は、巨核球またはMPLから血小板を生成するための方法であって、a) 巨核球の非接着性培養物を提供するステップ；b) この巨核球またはMPLをTPOまたはTPOアゴニストと接触させて、培養において前血小板の形成を引き起こすステップであって、この前血小板が血小板を放出するステップ；およびc) この血小板を単離するステップを含む方法を提供する。 40

【0024】

別の態様では、本開示は、巨核球またはMPLから血小板を生成するための方法であって、a) 巨核球またはMPLの非接着性培養物を提供するステップ；b) この巨核球またはMPLを、造血拡大増殖培地ならびに任意選択で(1) TPOもしくはTPOアゴニスト、SCF、IL-6およびIL-9または(2) TPOもしくはTPOアゴニスト、SCFおよびIL-11と接触させて、培養において前血小板の形成を引き起こし得るステ 50

ップであって、この前血小板が血小板を放出するステップ；およびc)前記血小板を単離するステップを含む方法を提供する。

【0025】

前記TPOアゴニストは、ADP、エピネフリン、トロンピン、コラーゲン、TPO-Rアゴニスト、TPO模倣物、第2世代血小板新生剤、ロミプロスチム、エルトロンボグ(SB497115、Promacta)、組換えヒトトロンボポエチン(TPO)、ペグ化組換えヒト巨核球増殖発達因子(PEG-rHuMGDF)、Fab 59、AMG 531、Peg-TPOmp、TPO非ペプチド模倣物、AKR-501、モノクローナルTPOアゴニスト抗体、ポリクローナルTPOアゴニスト抗体、TPOミニボディ、VB22B sc(Fv)2、ドメインサブクラス変換TPOアゴニスト抗体、MA01G4G344、組換えヒトトロンボポエチン、組換えTPO融合タンパク質またはTPO非ペプチド模倣物のうち1つまたは複数を含む。

10

【0026】

任意選択で、実質的に全ての単離された血小板は機能的であり得る。

【0027】

巨核球またはMPLの非接着性培養物はフィーダーフリー培養物であり得る。

【0028】

ステップ(b)における培養は、0.5~100ng/mlの幹細胞因子(SCF)、10~100ng/mlのトロンボポエチン(TPO)および10~100ng/mlのインターロイキン-11(IL-11)、少なくとも1種のROCKインヒビター、なら

20

【0029】

ステップ(b)における培養は、10~100ng/mlのTPO、0.5~100ng/mlのSCF、5~25ng/mlのIL-6、5~25ng/mlのIL-9、少なくとも1種のROCKインヒビター、および/または2.5~25単位/mlのヘパリンのうち1つまたは複数を含む培地中であり得る。

【0030】

この少なくとも1種のROCKインヒビターはY27632を含んでもよく、このY27632は、2~20μM、約3~10μM、約4~6μMまたは約5μMの濃度であり

30

【0031】

この方法は、巨核球を剪断力に供するステップをさらに含み得る。

【0032】

巨核球1個当たり少なくとも2個、3個、4個または5個の血小板が生成され得る。

【0033】

巨核球1個当たり少なくとも50個の血小板が生成され得る。

【0034】

巨核球1個当たり少なくとも100個、500個、1000個、2000個、5000個または10000個の血小板が生成され得る。

40

【0035】

前記血小板の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%は、CD41a+および/またはCD42b+、例えばCD41a+およびCD42b+であり得る。

【0036】

血小板は、フィーダー細胞の非存在下で生成されてもよく、そして/または間質フィーダー細胞の非存在下で生成されてもよい。

【0037】

血小板は、全ての異種細胞の非存在下で生成されてもよい。

【0038】

50

血小板はヒトのものであり得る。

【0039】

巨核球またはMPLは、外因的に添加されたプロテアーゼインヒビターの存在下で培養され得る。前記巨核球またはMPLは、外因的に添加されたMMPインヒビターの存在下で培養され得る。前記巨核球またはMPLは、外因的に添加されたMMP8インヒビターの存在下で培養され得る。前記巨核球またはMPLは、外因的に添加されたMMP8特異的インヒビターおよび汎MMPインヒビターの存在下で培養され得る。

【0040】

巨核球またはMPLは、約39の温度で培養され得る。

【0041】

巨核球またはMPLは、(a)多能性幹細胞を培養して、造血性内皮細胞(PVE-HE)を形成するステップ；(b)前記造血性内皮細胞を培養して、MLPを形成するステップ；および任意選択で(c)前記MLPを培養して、巨核球を形成するステップを含むステップによって生成され得る。この多能性幹細胞はヒトのものであり得る。

【0042】

造血性内皮細胞は、ステップ(b)において、BETインヒビターの存在下で培養され得る。このBETインヒビターはIBET151であり得る。

【0043】

造血性内皮細胞は、胚様体形成なしに誘導され得る。

【0044】

多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPSC)であり得る。前記iPSCはヒトのものであり得る。

【0045】

造血性内皮細胞は、胚様体形成なしに誘導され得る。

【0046】

造血性内皮細胞が、1%~10%の酸素、2%~8%の酸素、3%~7%の酸素、4%~6%の酸素または約5%の酸素を含む低酸素条件下で多能性幹細胞から分化させられ得る。

【0047】

巨核球は、MLPが、38~40セルシウス度の間の温度、または約39セルシウス度の温度でMLPから分化させられ得る。

【0048】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載される方法のいずれか、例えば上記方法のいずれかによって生成された血小板を含む医薬調製物を提供する。

【0049】

この調製物は、ヒト患者における使用に適切であり得る。例えば、この調製物は、ヒト患者における使用に適切であり得、白血球を実質的に含まなくてもよい。この調製物は、少なくとも 10^8 個の血小板を含み得る。

【0050】

さらなる一態様では、本開示は、それを必要とする患者あるいは凝固に影響する疾患もしくは障害またはそれによって処置可能な疾患もしくは障害に罹患している患者の処置のための医薬の製造における、血小板を含む組成物(例えば、上述の段落などにおいて本明細書に記載される組成物)または本明細書に記載される方法(例えば、上述の段落に記載された方法)によって生成された血小板を含む組成物の使用を提供する。

【0051】

この疾患または障害は、血小板減少症、外傷、血液媒介寄生生物またはマラリアを含み得る。

【0052】

別の態様では、本開示は、血小板輸血を必要とする患者を処置する方法を提供し、この方法は、血小板を含む組成物(例えば、上述の段落などにおいて本明細書に記載される組

10

20

30

40

50

成物)または本明細書に記載される方法(例えば、上述の段落に記載された方法)によって生成された血小板を含む組成物を、この患者に投与するステップを含む。

【0053】

この方法は、血小板減少症、外傷、血液媒介寄生生物またはマラリアを含む疾患または障害を処置するために有効であり得る。

【0054】

別の態様では、本開示は、任意選択で多能性幹細胞から誘導され、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離PVE-HE細胞を含む組成物を提供する。

【0055】

一態様では、本開示は、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離iPS-PVE-HE細胞を含む組成物を提供する。

10

【0056】

一態様では、本開示は、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離hES-PVE-HEを含む組成物を提供する。

【0057】

一態様では、本開示は、任意選択で多能性幹細胞から誘導され、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離PVE-HE-MLPを含む組成物を提供する。

【0058】

一態様では、本開示は、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離iPS-PVE-HE-MLPを含む組成物を提供する。

20

【0059】

一態様では、本開示は、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離hES-PVE-HE-MLPを含む組成物を提供する。

【0060】

一態様では、本開示は、任意選択で多能性幹細胞から誘導され、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離PVE-HE-MLP-MKを含む組成物を提供する。

【0061】

一態様では、本開示は、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離iPS-PVE-HE-MLP-MKを含む組成物を提供する。

30

【0062】

一態様では、本開示は、任意選択で本明細書に記載される方法に従って生成された単離hES-PVE-HE-MLP-MKを含む組成物を提供する。

【0063】

別の態様では、本開示は、少なくとも 10^8 個の血小板を含む、ヒト患者における使用に適切な医薬調製物を提供し、この調製物は白血球を実質的に含まず、血小板の実質的に全てが機能的である。

【0064】

種々の実施形態では、この医薬調製物は、有核細胞を除去または不活性化するために照射される。

40

【0065】

別の態様では、本開示は、少なくとも 10^8 個の機能的血小板を含む、ヒト患者における使用に適切な医薬調製物を提供し、この調製物中の機能的血小板の平均血漿半減期は、少なくとも4日間である。

【0066】

この医薬調製物は、 $10^9 \sim 10^{14}$ 個の血小板、任意選択で 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個または 10^{14} 個の血小板を含み得る。

【0067】

この医薬調製物は、以下の属性： $9.7 \sim 12.8$ fLの平均血小板容量範囲；調製物中のサイズの単峰型分布；および/または1標準偏差が $2 \mu\text{m}^3$ 未満(好ましくは 1.5

50

μm^3 未満、 $1\mu\text{m}^3$ 未満またはさらには $0.5\mu\text{m}^3$ 未満)である対数正規型血小板容量分布のうち1つまたは複数を有する血小板を含み得る。

【0068】

この医薬調製物は、以下のマーカー：CD41aおよびCD41bのうち少なくとも1つについて陽性である血小板を含み得る。

【0069】

血小板の少なくとも半分は、室温、例えば(22~25)での貯蔵後、少なくとも2、3、4または5日間にわたって機能的であり得る。例えば、少なくとも60%、70%、80%または90%が、少なくとも2日間にわたって機能的であり得る。血小板は、少なくとも5日間にわたって室温で貯蔵され得る。

10

【0070】

別の態様では、本開示は、MLPの凍結保存されたバンクまたは調製物を提供する。

【0071】

MLPは、懸濁物中で浮遊し始めたときに、PVE-HEから収集され得る。好ましくは、MLPはプレート形成して(plated)おらず、好ましくは、MLPは接着されておらず、それによって、他の細胞型への分化を回避し、MKの生成を促進する。

【0072】

このバンクまたは調製物は、 $10^9 \sim 10^{14}$ 個のMLP、任意選択で 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個または 10^{14} 個のMLPを含み得る。

【0073】

1個のMLPは、少なくとも2個、3個、4個、5個またはそれより多くの血小板を生じ得る。例示的な実施形態では、MLP1個当たり5個の血小板の収量で治療的用量の $300 \sim 600 \times 10^9$ 個の血小板を生成するのに十分な、 $6 \times 10^{10} \sim 1.2 \times 10^{11}$ 個のMLPの組成物が提供される。例示的な実施形態では、MLP1個当たり少なくとも100個の血小板の収量で治療的用量を生成するのに十分な、 $3 \sim 6 \times 10^9$ 個のMLPの組成物が提供される。

20

【0074】

別の態様では、本開示は、フィーダー細胞なしに機能的血小板を生成する弱い接着性のまたは非接着性の巨核球を有するパイオリクターを提供する。前記巨核球を含む弱い接着性の細胞は、互いからまたは表面から機械的に分離され得る(例えば、血清学的ピペットを使用して穏やかな力で洗浄することによって)。好ましくは、MKは、MK表現型の維持を促進すると考えられる非接着性条件下で培養される。血小板生成の効率を改善するために、剪断力がMK培養物に加えられ得る。例えば、マイクロ流体チャンバーまたはチップが、剪断応力を制御するために使用され得、MK1個当たりの血小板収量を増加させ得る。一態様では、MKは、マイクロ流体チップの1つのチャンネル中に播種され得、培地は、ほぼ生理学的速度で、MKのそばを通り過ぎて流され得る。

30

【0075】

別の態様では、本開示は、少なくとも 10^9 個のMLPを含む組成物を提供する。

【0076】

別の態様では、本開示は、MLPを含む凍結保存組成物を提供する。

40

【0077】

別の態様では、本開示は、巨核球から血小板を生成するための方法を提供し、この方法は、a)巨核球の非接着性培養物を提供するステップ；b)巨核球をTPOまたはTPOアゴニストと接触させて、培養において前血小板の形成を引き起こすステップであって、前血小板が血小板を放出するステップ；およびc)血小板を単離するステップを含む。

【0078】

トロンボポエチン(TPO)は、血小板新生および巨核球形成に関与する重要なサイトカインであると考えられ、血小板、巨核球および巨核球先駆体の表面上で発現されるトロンボポエチン受容体に対する内因性リガンドである。TPOは、2つのドメイン：受容体結合ドメイン(残基1~153)および高度にグリコシル化されており、タンパク質の安

50

定性のために重要である炭化水素リッチドメイン（残基154～332）を含む、332アミノ酸（95kDa）の糖タンパク質である。TPO受容体c-Mpl（CD110としても公知）は、典型的な造血サイトカイン受容体であり、2つのサイトカイン受容体相同性モジュールを含む。TPOは、遠位サイトカイン受容体相同性モジュールにのみ結合し、それによって、シグナル伝達を開始させる。この遠位サイトカイン受容体相同性モジュールの非存在下では、c-Mplは活性になり、これは、この遠位サイトカイン受容体相同性モジュールが、TPOによって結合されるまでc-Mplのインヒビターとして機能することを示唆している。TPOによる結合は、ヤヌスキナーゼ2（Jak2）シグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）シグナル伝達経路を活性化して、細胞の増殖および分化を駆動する。巨核球増殖発達因子（MGDF）は、別の血小板新生増殖因子である。ヒト形態およびペグ化形態を含む、TPOおよびMGDFの組換え形態が、巨核球および血小板の分化および成熟化を誘発するために使用され得る。TPO受容体活性化ペプチドおよび融合タンパク質（即ち、Fab 59、ロミプロスチム/AMG 531またはペグ化体（Peg-TPOmp））が、TPOの代わりに使用され得る。非ペプチド模倣物（エルトロンボパグ（SB497115、Promacta）およびAKR-501）は、TPOとは異なる機構によってTPO受容体と結合してそれを活性化し、TPOに対して相加効果を有し得る。TPO受容体を活性化するTPOアゴニスト抗体（即ち、MA01G4G344）またはミニボディ（minibody）（即ち、VB22B sc（Fv）2）もまた、TPOの効果を模倣するために使用され得る。例示的なTPOアゴニストは、各々その全体が参照によって本明細書に組み込まれるStasira、Blood Reviews 24巻（2010年）179～190頁およびKuter、Blood、2007年；109巻：4607～4616頁に開示されている。例示的なTPOアゴニストには以下が含まれる：ADP、エピネフリン、トロンピンおよびコラーゲン、ならびにTPO-RアゴニストもしくはTPO模倣物として文献中で同定されている他の化合物、第2世代血小板新生剤、ロミプロスチム、エルトロンボパグ（SB497115、Promacta）、第1世代血小板新生増殖因子、組換えヒトトロンボポエチン（TPO）、ペグ化組換えヒト巨核球増殖発達因子（PEG-rHuMGDF）、TPOペプチド模倣物、Fabの相補性決定領域中に挿入されたTPO受容体活性化ペプチド（Fab 59）、AMG 531（2つのジスルフィド結合したヒトIgG1-HC定常領域（Fc断片）（その各々がポリグリシンを介して連結された2つの同一のペプチド配列と残基228において共有結合している）から構成される「ペプチボディ（peptibody）」）、Peg-TPOmp（ペグ化TPOペプチドアゴニスト）、経口投与可能なTPOアゴニスト、TPO非ペプチド模倣物、AKR-501、モノクローナルTPOアゴニスト抗体、ポリクローナルTPOアゴニスト抗体、TPOミニボディ、例えばVB22B sc（Fv）2、ドメインサブクラス変換TPOアゴニスト抗体、例えばMA01G4G344、組換えヒトトロンボポエチン、または組換えTPO融合タンパク質、TPO非ペプチド模倣物。TPOが本発明の一実施形態としてどの場面で使用されても、例示的なTPOアゴニストは本発明のさらなる実施形態においてTPOの代用になり得る。

【0079】

別の態様では、本開示は、巨核球から血小板を生成するための方法を提供し、この方法は、a) 巨核球または巨核球前駆体の非接着性培養物を提供するステップ、b) 巨核球または巨核球前駆体を、造血拡大増殖培地を含む組成物と接触させて、培養において前血小板の形成を引き起こすステップであって、この前血小板が血小板を放出するステップ、およびc) 血小板を単離するステップを含む。

【0080】

例示的な実施形態では、実質的に全ての単離された血小板が機能的である。例示的な実施形態では、巨核球または巨核球前駆体の非接着性培養物は、フィーダーフリーの培養物である、および/または異種細胞を含まない。したがって、本開示は、フィーダー細胞なしに血小板を生成するための方法を提供する。

【0081】

10

20

30

40

50

ステップ (b) における培養は、幹細胞因子 (SCF)、トロンプオエチン (TPO)、インターロイキン - 11 (IL - 11)、ROCKインヒビター、例えば Y27632 および / またはヘパリンのうち1つまたは複数を含む培地中で実施され得る。ステップ (b) における培養は、TPO、SCF、IL - 6、IL - 9、ROCKインヒビター、例えば Y27632、および / またはヘパリンのうち1つまたは複数を含む培地中であり得る。

【0082】

一実施形態では、造血拡大増殖培地は、StemSpam (商標) ACF (ACF) (StemCell Technologies Inc. から入手可能) を含み、TPO (トロンプオエチン) またはTPOアゴニスト、SCF (幹細胞因子)、IL - 6 (インターロイキン6) およびIL - 9 (インターロイキン9) をさらに含み得、これはStemSpam (商標) CC220 サイトカインカクテル (CC220) (StemCell Technologies Inc. から入手可能) として提供され得る。この造血拡大増殖培地は、ROCKインヒビターおよび / またはヘパリンを任意選択で含み得る。TPO、SCF、IL - 6、IL - 9 およびIL - 11 は、公知の巨核球発達因子および成熟化因子である (Stasisら、Blood Reviews 24 巻 (2010年) 179 ~ 190 頁)。

10

【0083】

一実施形態では、造血拡大増殖培地は、Stemline - II 造血幹細胞拡大増殖培地 (Stemline - II) (Sigma Aldrich から入手可能) を含み、TPO またはTPOアゴニスト、SCF およびIL - 11 をさらに含み得る。この造血拡大増殖培地は、ROCKインヒビターおよび / またはヘパリンを任意選択で含み得る。このROCKインヒビターは、Y27632 であり得るがこれに限定されない。

20

【0084】

別の一実施形態では、造血拡大増殖培地は、基本培地としてのイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、ヒト血清アルブミン (組換えまたは精製)、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b - メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質 (LDL) およびコレステロール (これは、本明細書で限定成分培地と呼ばれ得る) を含み、TPO またはTPOアゴニスト、SCF およびIL - 11 をさらに含み得る。この造血拡大増殖培地は、ROCKインヒビターおよび / またはヘパリンを任意選択で含み得る。このROCKインヒビターは、Y27632 であり得るがこれに限定されない。

30

【0085】

別の一実施形態では、この造血拡大増殖培地は、基本培地としてのイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、ヒト血清アルブミン (組換えまたは精製)、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b - メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質 (LDL) およびコレステロール (これは、本明細書で限定成分培地と呼ばれ得る) を含み、TPO (トロンプオエチン) またはTPOアゴニスト、SCF (幹細胞因子)、IL - 6 (インターロイキン6) およびIL - 9 (インターロイキン9) をさらに含み得る。この造血拡大増殖培地は、ROCKインヒビターおよび / またはヘパリンを任意選択で含み得る。

40

【0086】

ステップ (b) における培養は、上述の段落のACF、Stemline - II または限定成分培地、ならびに (1) SCF (例えば、0.5 ~ 100 ng / ml)、TPO (例えば、10 ~ 100 ng / ml)、IL - 6 (例えば、5 ~ 25 ng / ml)、IL - 9 (例えば、5 ~ 25 ng / ml) およびヘパリン (例えば、2.5 ~ 25 単位 / ml) のうち1つまたは複数; (2) TPO (例えば、10 ~ 100 ng / ml)、SCF (例えば、0.5 ~ 100 ng / ml)、IL - 6 (例えば、5 ~ 25 ng / ml)、IL - 9 (例えば、5 ~ 25 ng / ml)、Y27632 (例えば、5 μM、または任意選択で2 ~ 20 μM、または任意選択で有効濃度の別のROCKインヒビター) およびヘパリン (例えば、0.5 ~ 25 単位 / ml) のうち1つまたは複数; (3) TPO (例えば、10 ~ 100 ng / ml)、SCF (例えば、0.5 ~ 100 ng / ml)、IL - 11 (

50

例えば、5 ~ 25 ng/ml)、Y27632 (例えば、5 μMまたは任意選択で2 ~ 20 μM、または任意選択で有効濃度の別のROCKインヒビター)およびヘパリン (例えば、2.5 ~ 25 単位/ml)のうち1つまたは複数;あるいは(4)TPO (例えば、10 ~ 100 ng/ml)、SCF (例えば、0.5 ~ 100 ng/ml)、IL-6 (例えば、5 ~ 25 ng/ml)、IL-9 (例えば、5 ~ 25 ng/ml)、Y27632 (例えば、5 μMまたは任意選択で2 ~ 20 μM、または任意選択で有効濃度の別のROCKインヒビター)およびヘパリン (例えば、2.5 ~ 25 単位/ml)のうち1つまたは複数を含む培地中で実施され得る。

【0087】

この方法は、巨核球を剪断力に供するステップをさらに含み得る。

10

【0088】

この方法は、巨核球1個当たり少なくとも2個、3個、4個もしくは5個の血小板、巨核球1個当たり少なくとも20個、30個、40個もしくは50個の血小板、または巨核球1個当たり少なくとも100個、500個、1000個、2000個、5000個もしくは10000個の血小板を生じ得る。

【0089】

前記血小板の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%が、CD41a+およびCD42b+であり得る。

【0090】

血小板は、フィーダー細胞または間質フィーダー細胞の非存在下で生成され得る。

20

【0091】

血小板は、任意の異種細胞の非存在下で生成され得る。

【0092】

血小板はヒトのものであり得る。

【0093】

血小板は、CD41a+および/またはCD42b+であり得る。

【0094】

別の態様では、本開示は、(a)多能性幹細胞を培養して、造血性内皮細胞(PVE-HE)を形成するステップ;および(b)造血性内皮細胞を培養して、巨核球前駆体(MLP)を形成するステップによって生成され得る巨核球前駆体(本明細書でMLPとも呼ばれる)(例えば、血小板を生成する方法においてまたは別の目的のために利用されるもの)を生成する方法を提供する。ステップ(a)は、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロール、骨形成タンパク質4(BMP4)(例えば、50 ng/ml)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)(例えば、50 ng/ml)および血管内皮増殖因子(VEGF)(例えば、50 ng/ml)から構成される動物成分フリーの培地の存在下で実施され得る。ステップ(b)は、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ラムF-12栄養混合物、AlbuCult(rhアルブミン)、ポリビニルアルコール(PVA)、リノール酸、SyntheChol(合成コレステロール)、モノチオグリセロール(a-MTG)、rhインスリン-トランスフェリン-セレン-エタノールアミン溶液、タンパク質フリーハイブリドーマ混合物II(PFHMI)、アスコルビン酸2ホスフェート、Glutamax I(L-アラニル-L-グルタミン)、ペニシリン/ストレプトマイシン、25 ng/mlの幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)(例えば、25 ng/ml)、Fms関連チロシンキナーゼ3リガンド(FL)(例えば、25 ng/ml)、インターロイキン-3(IL-3)(例えば、10 ng/ml)、インターロイキン-6(IL-6)(例えば、10 ng/ml)およびヘパリン(例えば、5 単位/ml)中で実施され得る。

30

40

【0095】

別の態様では、本開示は、実施例1および2に示されるように、(a)多能性幹細胞

50

を培養して、造血性内皮細胞（PVE-HE）を形成するステップ；（b）造血性内皮細胞を培養して、MLPを形成するステップ；および（c）MLPを培養して、巨核球を形成するステップによって生成され得る巨核球（例えば、血小板を生成する方法においてまたは別の目的のために利用されるもの）を生成する方法を提供する。ステップ（a）および（b）は、上述の段落に記載したように実施され得る。ステップ（c）は、基本培地としてのイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質（LDL）、コレステロール、TPO（例えば、30 ng/ml）、SCF（例えば、1 ng/ml）、IL-6（例えば、7.5 ng/ml）、IL-9（例えば、13.5 ng/ml）、ならびに任意選択でROCKインヒビター、例えば、これに限定されずY27632（例えば、5 μM）および/またはヘパリン（例えば、5～25単位/ml）中で実施され得る。

【0096】

別の一態様では、本開示は、上記方法によって生成された血小板を含む医薬調製物を提供する。この調製物は、ヒト患者における使用に適切であり得、および/または少なくとも 10^8 個の血小板を含み得、および/または白血球を実質的に含まなくてもよい。

【0097】

別の一態様では、本開示は、それを必要とする患者または凝固に影響する疾患もしくは障害に罹患している患者の処置のための医薬の製造における、本明細書に記載されるかまたは本明細書に記載される任意の方法によって生成された任意の組成物の血小板の使用を提供する。

【0098】

別の一態様では、本開示は、血小板輸血を必要とする患者を処置する方法を提供し、この方法は、本明細書に記載されるかまたは本明細書に記載される任意の方法によって生成された任意の組成物の血小板をこの患者に投与するステップを含み、これは、凝固および/もしくは他の血小板機能に影響する疾患もしくは障害、ならびに/または血小板減少症もしくは外傷などの、それによって処置され得る別の障害を処置するのに有効な量であり得る。血小板減少症は、血小板の生成、分布または破壊における乱れから生じる。血小板減少症は、肝硬変、HIV感染、自己免疫性疾患、特発性血小板減少性紫斑病、化学療法誘発性の骨髄機能抑制および骨髄障害を含む種々の医学的状態において頻繁に見出される。低い血小板計数は、出血のリスクの増加と関連している。それによって処置され得るさらなる例示的な疾患または障害は、マラリアおよび他の寄生生物感染症であり、理論に束縛されることは意図しないが、これは、寄生生物の消化胞を選択的に溶解させることによって赤血球内のマラリア寄生生物を死滅させるヒト血小板因子4の能力によって媒介されると考えられている（その全体が参照によって本明細書に組み込まれるLoveら、Cell Host Microbe 12巻（6号）：815～23頁を参照のこと）。

【0099】

別の一態様では、本開示は、薬物送達の方法を提供し、この方法は、本明細書に記載されるかまたは本明細書に記載される任意の方法によって生成された任意の組成物の血小板をこの患者に投与するステップを含み、この血小板が薬物を送達する。例えば、そのin vivo寿命、投与後の生着の欠如、およびホーミング特性に起因して、血小板は、薬物担体として有用であり得ると考えられる。hESC、hiPCおよびMLPは遺伝子改変され得、疾患の処置のための所望の薬物を発現する血小板を生成するために使用され得る。一態様では、hESC、hiPCまたはMLPは、抗腫瘍剤を発現するように遺伝子改変され得る。かかる遺伝子改変されたhESC、hiPCおよびMLPから生成された血小板は、新生物疾患の処置のために腫瘍にかかる抗腫瘍剤を送達するために使用され得る。

【0100】

本発明の血小板は、受動的様式（経時的な血小板からの拡散）または能動的様式（血小板の活性化および脱顆粒の際に放出される）のいずれかで血小板によって放出される1種

または複数の治療剤を含むように操作され得る。広範な薬物が使用され得る。操作された血小板は、シナプスおよび神経効果器接合部位において作用する薬物；中枢神経系に対して作用する薬物；炎症応答をモジュレートする薬物；腎機能および/もしくは心血管機能に影響する薬物；胃腸機能に影響する薬物；抗生物質；抗がん剤；免疫調節剤；血液および/もしくは血液形成性器官に対して作用する薬物；ホルモン；ホルモンアンタゴニスト；石灰化および骨のターンオーバーに影響する薬剤、ビタミン、遺伝子治療剤；または標的化剤などの他の薬剤などからなる群から選択される1種または複数の化合物を含むように調製され得る。

【0101】

ある特定の実施形態では、血小板は、例えば、血小板の顆粒（例えば - 顆粒）中に貯蔵され得、好ましくは、血小板の活性化の際に放出され得る1種または複数の治療剤、例えば小分子薬物、アプタマーもしくは他の核酸薬剤、または組換えタンパク質を含むように操作されている。

10

【0102】

ある特定の実施形態では、血小板は、正常な創傷治癒を促進もしくは加速する外因性薬剤、瘢痕を低減させる外因性薬剤、線維症を低減させる外因性薬剤1種もしくは複数、またはそれらの組合せを含む。

【0103】

ある特定の実施形態では、血小板は、1種または複数の外因性抗線維症剤を含む。抗血栓剤/抗再狭窄剤を送達するように操作された血小板は、血管形成および血栓溶解手順の間で使用され得る。ある特定の実施形態では、操作された血小板は、アテローム動脈硬化症の重症度を予防または低減するために使用され得る。ある特定の実施形態では、操作された血小板は、再狭窄の重症度を予防または低減するために使用され得る。なお他の実施形態では、操作された血小板は、固形腫瘍の処置の一環として使用され得る。操作された血小板は、1種または複数の免疫刺激剤を含み得る。

20

【0104】

本開示のさらなる一態様は、2マイクログロブリン発現を欠損するように操作された細胞、例えば2マイクログロブリンノックアウト多能性細胞から血小板を生成するための本明細書に開示された任意の方法の使用を含む、2マイクログロブリン欠損血小板、例えば、低減された免疫原性のまたは「ユニバーサル」な血小板を生成する方法を提供する。本開示は、2マイクログロブリンの発現を欠く2マイクログロブリン欠損血小板、巨核球または血小板前駆体もまた提供する。2マイクログロブリン欠損血小板は一般に、その原形質膜中に存在する、低いかまたは好ましくは検出不能なクラスI MHC分子を有し、それによって血小板の免疫原性を低減させる。

30

【0105】

別の一態様では、巨核球またはMLPから血小板を生成するための方法が提供され、この方法は、プロテアーゼインヒビターの存在下で、剪断力条件下で、MLPの巨核球の非接着性集団を培養するステップ、およびこの培養物から血小板を回収し、任意選択で単離するステップを含む。

40

【0106】

プロテアーゼインヒビターはMMPインヒビターであり得る。

【0107】

剪断力条件は一定の剪断力条件であり得る。剪断力条件は、 $1 \sim 4 \cdot 1 \text{ ダイン} / \text{cm}^2$ の剪断力を含み得る。

【0108】

巨核球またはMLPは、マイクロ流体デバイス中で培養され得る。

【0109】

巨核球またはMLPは、iPS細胞、ES細胞、または天然に存在するCD34⁺細胞、任意選択で骨髄もしくは臍帯血CD34⁺細胞から誘導され得る。

【0110】

50

プロテアーゼインヒビターはMMPインヒビター、例えばGM6001であり得る。

【0111】

プロテアーゼインヒビターはMMP8特異的インヒビター、例えばMMP8-I((3R)-(+) - [2-(4-メトキシベンゼンスルホニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ヒドロキサメート])であり得る。

【0112】

プロテアーゼインヒビターは2種またはそれより多くのプロテアーゼインヒビターであり得る。

【0113】

2種のプロテアーゼインヒビターは、MMP一般的(汎)インヒビターおよびMMP8特異的インヒビターであり得る。

【0114】

プロテアーゼインヒビターが、培養物内の血小板のピーク生成の時点で添加され得る。

【0115】

巨核球またはMPLは、TPOまたはTPOアゴニストの存在下で培養されて、前血小板の形成を引き起こし得、この前血小板は血小板を放出する。巨核球またはMPLは、造血拡大増殖培地、および任意選択で(1)TPOもしくはTPOアゴニスト、SCF、IL-6およびIL-9または(2)TPOもしくはTPOアゴニスト、SCFおよびIL-11中で培養されて、培養において前血小板の形成を引き起こし得、この前血小板は血小板を放出する。

【0116】

巨核球またはMPLは、37よりも高く40と等しいかまたはそれより低い温度で培養され得る。

【0117】

巨核球またはMPLは約39の温度で培養され得る。

【0118】

別の態様では、巨核球またはMPLから血小板を生成するための方法であって、37よりも高く40と等しいかまたはそれより低い温度でiPS細胞またはES細胞から誘導された巨核球またはMPLの非接着性集団を培養するステップ、およびこの培養物から血小板を回収し、任意選択で単離するステップを含む方法が提供される。

【0119】

巨核球またはMPLは約39の温度で培養され得る。

【0120】

別の態様では、PVE-HE細胞からMPLを生成するための方法であって、BETのインヒビターの存在下でiPS細胞またはES細胞から誘導されたPVE-HE細胞の集団を培養するステップ、およびこの培養物からMPLを回収し、任意選択で単離するステップを含む方法が提供される。

【0121】

BETのインヒビターはI-BET151であり得る。

【0122】

BETのインヒビターは、培養の最後の48時間、最後の36時間、最後の24時間、最後の18時間、最後の12時間または最後の6時間において、PVE-HE細胞に添加され得る。

【0123】

別の態様では、PVE-HE細胞からMPLを生成するための方法であって、c-mycサプレッサーまたはインヒビターの存在下でiPS細胞またはES細胞から誘導されたPVE-HE細胞の集団を培養するステップ、およびこの培養物からMPLを回収し、任意選択で単離するステップを含む方法が提供される。

【0124】

c-mycサプレッサーまたはインヒビターは、培養の最後の48時間、最後の36時

10

20

30

40

50

間、最後の24時間、最後の18時間、最後の12時間または最後の6時間において、PVE-HE細胞に添加され得る。

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1】多能性幹細胞からの血小板の生成を示す段階的プロセス。この図は、多能性幹細胞からの、多能性由来造血性内皮細胞(PVE-HE)を介し、巨核球系列特異的前駆細胞(MLP)を介し、巨核球(MK)を介した、分化の進行を示す。

【0126】

【図2】高度分化形態細胞(ADM)を介したiPS細胞の分化の進行。この図は、PVE-HEへ向けたiPS細胞の進行を示す。図2A、48時間後、付着した細胞は、フィーダーフリー条件下で典型的な多能性幹細胞形態を示す。図2B、多能性幹細胞形態から点在する小さい細胞クラスターへのほぼ完全な推移が示される。図2C、PVE-HE分化開始の96~146時間後、単層の上で増殖している小さいコンパクトな細胞クラスターを示す、高度分化形態が観察された。

10

【0127】

【図3A】図3。高度分化形態のPVE-HEの特徴付け。この図は、PVE-HEへ分化したADM細胞の表現型および形態を示す。ADM細胞は、分化のこの段階において、PVE-HE表現型CD31⁺CD144(VE-Cad)⁺CD105⁺を示す(図3A)。ADM細胞をまた、形態変化についても分析した(図3B)。

【図3B】図3。高度分化形態のPVE-HEの特徴付け。この図は、PVE-HEへ分化したADM細胞の表現型および形態を示す。ADM細胞は、分化のこの段階において、PVE-HE表現型CD31⁺CD144(VE-Cad)⁺CD105⁺を示す(図3A)。ADM細胞をまた、形態変化についても分析した(図3B)。

20

【0128】

【図4】フローサイトメトリーによる、iPS-PVE-HE由来巨核球系列特異的前駆体(MLP)の特徴付け。この図は、ヒトiPS-PVE-HE-MLP細胞の表現型をCD34⁺CD31⁺CD41a⁺CD43⁺CD13⁺CD14⁻CD42b⁻として示す。

【0129】

【図5】ヒトiPS-PVE-HE-MLP由来の成熟中のMK細胞の形態分析。この図は、MK細胞の内側の核(「N」によって示される)、および容易に観察可能な、伸長した仮足を有する前血小板形成性細胞(矢印によって示される)を示す。血小板分化の開始の72時間後、非常に大きい倍数性MK(50μM)は、成熟化の進行を伴って豊富になった(図5AおよびB。5A中のスケールバーは100μMであり、5B中のNはMKの内側の核を示す)。72~96時間から、伸長した仮足を有する前血小板形成性細胞が、顕微鏡により容易に観察された(図5Aおよび5C、矢印によって示される)。

30

【0130】

【図6】図6A~E。異なる供給源由来の血小板調製物の表現型および純度の比較。この図は、形態ならびに末梢血由来ヒト血小板およびiPS-PVE-HE-MLP-MK由来血小板上のCD41aおよびCD42bの細胞表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。開始後72~96時間の間、CD41a+CD42b+血小板の量は劇的に増加し、約70%もの高いレベルに達した(図6D)。図6A~6Bは、ドナー由来ヒト血小板(6A)および実施例3に記載したように生成したhES由来血小板(hES-PVE-HE-MLP)(6B)についての、前方散乱(「FSC-A」)および側方散乱(「SSC-A」)を示す。図6C~Eは、ドナー由来ヒト血小板(6C)、iPS由来血小板(iPS-PVE-HE-MLP)(6D)およびhES由来血小板(hES-PVE-HE-MLP)(6E)によるCD41aおよびCD42Bの発現を示し、後者の2つの試料は、実施例3に記載したように生成した。

40

【0131】

【図7】透過型走査顕微鏡による、末梢血由来ヒト血小板およびヒト人工多能性細胞の分

50

化によって生成された血小板 (h i P S C - P L T) の超微細構造的比較。この図は、末梢血由来ヒト血小板および本開示の h i P S C - P L T の細胞特徴における類似性を示す。h i P S C - P L T は円盤状である。

【0132】

【図8】末梢血由来ヒト血小板 (h P R P) および h i P S C - P L T の比較。この図は、血小板直径 (左パネル)、ならびに活性化で誘発された血小板形状変化に關与する細胞構造タンパク質ベータ1-チューブリンおよびF-アクチンの発現 (F I T C - ファロイジン結合を介する) (右パネル) における、2つの細胞調製物間の類似性を示す。陰性 H o e c h s t 染色 (右上) により、i P S C - P L T およびドナー由来 P L T における核 D N A の非存在が確認された。

10

【0133】

【図9】末梢血由来ヒト血小板および h i P S C - P L T の比較。この図は、微分干渉 (D I C) 生細胞顕微鏡を使用して、末梢血由来ヒト血小板および本開示の h i P S C - P L T の形態的特徴における類似性を示す。末梢血由来ヒト血小板および h i P S C - P L T の両方が、負に荷電したガラス表面に結合したときの活性化を示す仮足放出を示す。

【0134】

【図10】末梢血由来ヒト血小板および h i P S C - P L T の比較。この図は、トロンボスポンジン4 (T S P 4) および血小板因子4 (P F 4) 標識化によって実証されるように、アルファ-顆粒発現の類似性を示す。T S P 4 および P F 4 は、活性化された血小板のアルファ-顆粒から放出されるケモカインである。h i P S C - P L T (図10B) は、T S P 4 および P F 4 の標識化によって実証されるように、正常なヒト血小板 (図10A) と比較して、正常なアルファ-顆粒発現を有することがわかった。

20

【0135】

【図11】h i P S C - P L T の機能的評価。この図は、2種の接着分子 C D 6 2 p および I I b I I I の上方調節によって測定されるように (P A C - 1 A b によって測定されるように)、トロンビンによる h i P S C - P L T の i n v i t r o 活性化を示す。

【0136】

【図12】循環ヒト血小板ならびにヒト i P S C および E S C から誘導された血小板の機能的比較。この図は、循環ヒト血小板、h i P S C - P L T および h E S C - P L T の i n v i v o 血餅形成潜在力を示す。実験は、天然ヒト血小板 (「h P L T」)、i P S C - P L T および h E S 細胞由来血小板 (「h E S C - P L T」) を用いて実施した。図12Aは、マウス血管壁傷害モデルにおいて形成された血栓の代表的画像を示す。図12Bは、各実験において血栓に結合した血小板の平均数をグラフにより示す。血小板結合は、抗 I I b I I I 抗体断片 R e o P r o による処理によって阻害された。これは、結合が予測されたように I I b I I I に依存したことを示している (図12B)。

30

【0137】

【図13】注入後のマクロファージ除去 N O D / S C I D マウスにおける P L T の動態。この図は、8時間の h i P S C - P L T および h E S C - P L T の検出可能な循環を示す。

40

【0138】

【図14A】多能性幹細胞からの血小板の生成のための例示的なプロセスフローダイアグラム。

【図14B】多能性幹細胞からの血小板の生成のための例示的なプロセスフローダイアグラム。

【図14C】多能性幹細胞からの血小板の生成のための例示的なプロセスフローダイアグラム。

【図14D】多能性幹細胞からの血小板の生成のための例示的なプロセスフローダイアグラム。

【図14E】多能性幹細胞からの血小板の生成のための例示的なプロセスフローダイアグラム。

50

ラム。

【0139】

【図15】FACS分析(CD41a、CD42b) - hiPSCから誘導されたMLP。

【0140】

【図16】hiPSCから誘導された代表的MLP。

【0141】

【図17】FACS分析(CD31+、CD43+) - hiPSCから誘導されたMLP。

【0142】

【図18】hESCから誘導された代表的MK。

【0143】

【図19】MKからの前血小板形成。

【0144】

【図20】FACS分析(CD41a、CD42b)。

【0145】

【図21】1 - チューブリン染色と共にDIC顕微鏡法、ヒトドナーPLT(上)hESC-PLT(下)。

【0146】

【図22】一定の剪断力培養条件下で、DMSO(菱形)、MMPインヒビターGM6001(四角)、ならびにGM6001および8%デキストラン(「粘度」と称する)(三角)の存在下での、時間の関数として血小板純度。x軸は試料番号に対応し、試料は、6+時間の培養にわたって、30分毎に取り出した。

【0147】

【図23】一定の剪断力培養条件下で、DMSO(菱形)、MMPインヒビターGM6001(四角)、ならびにGM6001および8%デキストラン(「粘度」と称する)(三角)の存在下での、時間の関数としての血小板数。GM6001は0日目に培養物に添加した。

【0148】

【図24】一定の剪断力培養条件下でのDMSO(左の棒)およびMMPインヒビターGM6001(中央の棒)の存在下、ならびに静置培養条件下(MMPインヒビターGM6001の非存在下)(右の棒)での、血小板数。

【0149】

【図25】12マイクロリットル/分の流速(四角)および16マイクロリットル/分の流速(三角)で、マイクロ流体デバイス中におけるMMPインヒビターGM6001の存在下での時間の関数としての血小板純度。MMPインヒビターはDMSO中に溶解されるので、対照(菱形)はDMSOの存在下である。

【0150】

【図26】流速の関数としての血小板数。左の棒：12マイクロリットル/分、右の棒：16マイクロリットル/分。

【0151】

【図27】MMP8特異的インヒビターMMP8-I(第2の棒)、汎MMPインヒビターGM6001(第3の棒)、またはMMP8-IおよびGM6001の組合せ(第4の棒)の存在下での静置培養の結果としての血小板純度。MMP8-Iは、(3R)-(+) - [2-(4-メトキシベンゼンスルホニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ヒドロキサメート]であり、Millipore社から市販されている。第1の棒は対照である。

【0152】

【図28】MMP8特異的インヒビターMMP8-I(第2の棒)、汎MMPインヒビターGM6001(第3の棒)、またはMMP8-IおよびGM6001の組合せ(第4の

10

20

30

40

50

棒)の存在下での静置培養の結果としての血小板数。第1の棒は対照である。

【0153】

【図29】37 (対の左の棒)および39 (対の右の棒)での培養における、時間の関数としての血小板純度。温度は、培養の開始時に設定し、培養を通じて維持した。

【0154】

【図30】37 (対の左の棒)および39 (対の右の棒)での培養における、時間の関数としての血小板数。

【0155】

【図31】6+4日目(即ち、分化の10日目)において回収した、漸増用量の*iBET-151* (μM)の関数としての巨核球前駆体(*MLP*)数。*iBET*を、6+3日の時間枠において培養物に添加し、*MLP*を、その回収の前に約24時間の期間にわたって*iBET*に曝露させる。*iBET*濃度:0(左の棒)、0.1マイクロM(中央の棒)、0.25マイクロM(右の棒)。

10

【0156】

【図32】漸増用量の*iBET-151*の関数としての、6+4日目の*c-myc*および*GATA-1*の*mRNA*の相対的定量分析。*iBET*濃度:各三つ組について、0(左の棒)、0.1マイクロM(中央の棒)、0.25マイクロM(右の棒)。

【0157】

【図33】漸増用量の*iBET-151*の関数としての、6+4日目に回収された細胞集団における*CD14+*細胞の純度。*iBET*濃度:0(左の棒)、0.1マイクロM(中央の棒)、0.25マイクロM(右の棒)。

20

【発明を実施するための形態】

【0158】

発明の詳細な説明

本開示において使用する定義および略号のリストは、詳細な説明の最後に提供する。

【0159】

上述のように、血小板の供給における制約は、輸血に依存する患者にとって、生命を脅かす結果を潜在的に有し得る。多能性細胞は、*in vitro*で無制限に繁殖され得、ヒト治療のための血小板の、潜在的に無尽蔵のドナーなしの供給源を提示する。マッチしたまたは低減された不適合性を有する*hESC*株のバンクを創出する能力は、免疫抑制薬および/または免疫調節プロトコールの必要性を、潜在的に減少させるまたは排除することができた。例示的な実施形態は、患者特異的*iPS*細胞を(例えば、本明細書に記載される方法または当技術分野で公知の任意の他の方法を使用して)生成するステップ、およびこの患者特異的*iPS*細胞から患者特異的血小板を生成するステップを含む方法を提供し、この血小板は、血小板同種免疫を誘発させた患者またはそれを誘発させるリスクがある患者などの患者の処置のために使用され得る。

30

【0160】

例示的な実施形態は、血清フリーおよびフィーダーフリー条件下で多能性幹細胞から巨核球(*MK*)を生成するための効率的な方法を提供する。好ましくは、*MK*は、巨核球系特異的前駆細胞(*MLP*、これは、本明細書にさらに記載される)から生成される。好ましくは、*MK*は、米国特許第8017393号に開示されているもののような血管芽細胞または血管コロニー形成細胞(*hemangioblast*)からは生成されない。本明細書に開示される方法を使用して、多能性幹細胞(*iPSC*および*ESC*)を、*MK*分化に向けて方向付けた。*MLP*からの巨核球の分化の効率は、非常に高くなっていた(最大90%)。さらなる精製なしに、*MK*懸濁培養物由来の生細胞の85%は、*CD41a+CD42b+*であり、成熟*MK*は、*CD29+*および*CD61+*でもあった。これらの*in vitro*誘導された*MK*細胞は、核内分裂を起こすことができ、成熟した倍数体*MK*になることができる。重要なことに、伸長した仮足を有する前血小板形成性細胞は、*MK*培養の後期段階で観察された。これは、この系において生成された*MK*は、フィーダーフリー条件下で最終分化を起こすことができ、機能的

40

50

血小板を生成できることを示している。

【0161】

制御された条件下で、iPSCまたは他の多能性幹細胞を供給源細胞として使用した、大規模かつ効率的な*in vitro*巨核球生成に適合可能な効率的な系が、本明細書に記載される。さらに、血小板は、ドナー由来血小板に対する必要性を補完するまたはそれに取って代わるのに十分な量で、生成され得る。さらに、開示される方法は、予測可能な様式で血小板および血小板前駆細胞を生成するために利用され得、その結果、この細胞は、「オンデマンド」で、または予想された必要性を満たすのに望ましい量で、生成され得る。この細胞は、CD41aおよびCD42bを発現し、核内分裂を起こして、成熟倍数体MKを形成した。さらなる成熟化の際に、これらは、トロンピンによって刺激されて細胞接着分子CD62pおよびI1b I1Iについて陽性になった（活性化の際のI1b I1Iのコンフォメーション変化後のPAC-1結合部位の露出によって生じると考えられるが、CD62pは顆粒放出に起因して外側膜上に露出されると考えられる）、機能的または活性化された血小板を生成した。これらのマーカーは両方とも、活性化された血小板の表面上に発現されることが公知であり、PAC-1およびCD62p（p-セレクチン）結合アッセイを使用して、hiPSC-PLT上で検出された。間質インデューサー細胞は巨核球生成に必要とされないので、本明細書に記載される方法は、フィーダーフリーの血小板生成、例えば、異種細胞のいずれの使用も伴わない血小板生成を提供し得る。

10

【0162】

例示的な実施形態では、エストラジオール、ビタミンB3、マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビター（MMP）、c-myc発現のインヒビター、および細胞外マトリックスタンパク質を含むさらなる因子もまた、血小板生成を増強するために使用され得（例えば、巨核球成熟化を刺激することおよび/または血小板生成を刺激することによって）、これは間質細胞の非存在下で実施され得る。

20

【0163】

血清フリーおよび間質フリー条件下での巨核球の生成は、十分に規定された条件下で巨核球形成および血小板新生を調節することにおいて重要な因子についてのスクリーニングを可能にし得る。そうして同定された因子は、臨床適用に寄与し得る。この分野での進歩は、系列の傾倒、拡大増殖および成熟化を含む、巨核球形成の異なる態様を調節する細胞機構および分子機構に関する洞察を提供する可能性もまたあり得る。

30

【0164】

例示的な実施形態は、多能性幹細胞からの巨核球分化の段階的誘発を統合する。進行中の制御のさらなる最適化および確立が、臨床適用のためにこの系の一貫性および効率を改善するために実施され得る。巨核球成熟化を調節する、根底の細胞機構または細胞外機構は、これらの方法を実施するために完全に規定される必要はない。倍数体化および細胞質成熟化を促進する他の因子が同定され、*in vitro*誘導された巨核球の最終分化を促進するために含まれ得る。例えば、少なくとも1種のROCKキナーゼインヒビターが、初期段階で巨核球の核内分裂を誘発するために使用され得る。しかし、この効果は、分化している巨核球の組織化された細胞および核の成熟化ではなく、染色体分配および細胞質分裂の人工的遮断に起因する可能性が高いと考えられる。規定された条件下での最も高い*in vitro*巨核球収量、最終分化状況、および機能的血小板の下流の生成を達成するために拡大増殖と核内分裂と細胞質成熟化との間のバランスに達することが有利であり得る。

40

【0165】

これらの現在の結果は、多能性幹細胞から誘導された血小板が、正常な血液血小板の形態的特性および機能的特性を共有することを実証した。これらの多能性幹細胞由来ヒト血小板は、*in vivo*でも機能できる。

【0166】

さらなる血行力学的事象が、*in vitro*系によって完全には模倣することができ

50

ない生きた生物における血小板血栓の生成および繁殖の間に生じ得る。生体内画像化技術の利用可能性は、複雑な *in vivo* 系において脈管傷害後に生じる血小板依存的な血栓性プロセスを直接的に試験および定量するための手段を提供する。生体内高速広視野顕微鏡を使用して、本発明者らは、多能性幹細胞由来血小板は、正常なヒト血液血小板と同様に、生きたマウス中のレーザー誘発性の細動脈壁傷害の部位において発達しているマウス血小板血栓中に取り込まれることを実証した。ReoProによる多能性細胞由来血小板および対照血小板の事前処理は、血栓中に取り込まれている供与された血小板および多能性幹細胞由来血小板の両方の数を顕著に低減させ、この結合が IIb III インテグリンによって媒介されることが確認された。これらの結果は、多能性幹細胞由来血小板が、生きた動物における脈管傷害の部位において機能的であることを示す。

10

【0167】

血小板は、脈管傷害に応答して組織にかつ互いに接着する無核細胞である。このプロセスは、いくつかの接着性基質、例えば、フォン・ウィルブランド因子 (vWF) およびフィブリノーゲンに結合して、成長中の血栓において血小板を架橋しさらに活性化する、血小板インテグリン IIb III によって主に媒介される (36)。本明細書の結果は、多能性幹細胞から生成された血小板が、*in vitro* および生きた動物の両方において、正常な血液血小板と機能的に類似していることを実証する。多能性幹細胞由来血小板は、生理学的アゴニストで刺激された時に凝集する能力を含む、止血に關与する重要な機能を有することが示された。さらに、免疫蛍光および透過型電子顕微鏡の結果は、多能性幹細胞から生成された血小板が、正常な血液血小板と類似していることをさらに実証している。

20

【0168】

以下の例にさらに記載するように、多能性細胞由来血小板と精製された正常ヒト血小板との間の多数の類似性が観察された。これらの類似性には以下が含まれる。

【0169】

hiPSC-PLT は円盤状である (透過型電子顕微鏡によって実証されるように)。

【0170】

hiPSC-PLT は、循環ヒト *PLT* と大部分は超微細構造的に同一である (透過型電子顕微鏡によって実証されるように)。

【0171】

hiPSC-PLT のサイズは、DIC および 1-チューブリン IF 顕微鏡によって実証されるように、循環ヒト *PLT* のサイズに匹敵する ($2.38 \mu\text{m} \pm 0.85 \mu\text{m}$ 対 $2.27 \mu\text{m} \pm 0.49 \mu\text{m}$)

30

【0172】

hiPSC-PLT は、DIC 生細胞顕微鏡画像によって実証されるように、ガラス上に伸展することができ、糸状仮足および葉状仮足の両方を形成することができた。

【0173】

hiPSC-PLT は無核である - 循環ヒト *PLT* と同等である (Hoechst 標識化によって実証されるように)。

【0174】

hiPSC-PLT は、循環ヒト *PLT* と比較して、正常なチューブリン細胞骨格を有する (1-チューブリン標識化によって実証されるように)。

40

【0175】

hiPSC-PLT は、循環ヒト *PLT* と比較して、正常な線維状アクチンを有する (ファロイジン標識化によって実証されるように)。

【0176】

hiPSC-PLT は、循環ヒト *PLT* と比較して、正常なアルファ - 顆粒発現を有する (TSP4 および PF4 の標識化によって実証されるように)。

【0177】

別の科学的および臨床的な問題は、多能性幹細胞由来血小板が複雑な *in vivo* 環

50

境において機能的であるかどうかである。いくつかのグループによって近年使用されているレーザー傷害血栓症モデルを含む多数の実験モデルが、マウスにおいて血栓形成を調査するために過去10年間に確立された(37:38:39)。レーザー誘発性の血栓症モデルは、傷害の5~30秒後に早くも血小板血栓形成を開始する。したがって、このモデルは、迅速に排除されるヒト血小板およびhESC-PLTの、発達中のマウス血小板血栓中へのリアルタイム取り込みのモニタリングを可能にし、これは、多数のシグナル伝達経路、酵素カスケード、ならびに無数の細胞成分およびタンパク質成分の相互作用を含む。このモデルは、トロンピン誘発性血栓症と関連する炎症反応もまた反映する。

【0178】

レーザー誘発性脈管傷害モデルを使用して、生体内顕微鏡分析により、hiPSC-PLTおよびhESC-PLTが、血液血小板と同様、脈管傷害後にIIbIIIインテグリンを介して発達中のマウス血小板血栓中に取り込まれることが実証されている(図12A)。hiPSC-PLTおよびhESC-PLTの機能的な能力は、IIbIIIに特異的に結合して血小板機能を阻害するヒト-マウスキメラモノクローナル抗体のFab断片ReoProによる事前処理によって、IIbIIIによって媒介されることが決定された(図12B)。これらの結果は、hESC-PLTが脈管傷害の部位において*in vivo*で機能的であるという証拠を提供する。重要なことに、血清フリー条件およびフィーダーフリー条件下で多能性幹細胞から誘導された血小板は、凝血および血栓形成を*in vivo*で促進することができることが最初に示された。

10

【0179】

2つの以前の研究が、hESCからのMKの生成を報告している。これらの系における収量は非常に低く、本発明の系とは異なり、血清を補充した動物間質細胞との共培養に依存する(15、16)。さらに、*in vivo*での機能性は報告しなかった(15、16)。多能性幹細胞分化におけるこれら2つの変数の排除は、動物生成物への曝露なしでの血小板の生成を可能にする。さらに、本開示は、本明細書に記載されるフィーダーフリーの系が高い効率でMKを生成できること、および機能的な血小板がフィーダーフリー条件下で効率的に生成され得ることを実証している。

20

【0180】

血小板新生は、膜および微小管の洗練された再編成ならびに顆粒およびオルガネラの正確な分布を伴う、高度に複雑なプロセスである(40)。血小板生合成の理解における最近の進歩にもかかわらず、膜再編成、前血小板の開始、血小板オルガネラおよび分泌顆粒の輸送ならびに血小板サイズの制御の根底にある機能的詳細は、未だ解明されていない。血清およびフィーダーフリー条件下でMKを生成する能力は、十分規定された条件下で、系列の傾倒、拡大増殖および成熟化を含む巨核球形成の異なる態様を調節することにおいて重要な因子のスクリーニングを助けるはずである。

30

【0181】

本開示は、iPS由来またはESC由来であるPVE-HE細胞、MLP、MK、前血小板および血小板を*in vitro*(または*ex vivo*)で生成するための種々の方法を提供する。

【0182】

本開示は、iPS細胞またはES細胞からPVE-HE細胞へ、またはMLPへ、またはMKへ、または血小板へと推移させるための方法を提供する。本開示は、PVE-HE細胞からMLPへ、またはMKへ、または血小板へと推移させるための方法を提供する。本開示は、MLPからMKへ、または血小板へと推移させるための方法を提供する。本開示は、MKから血小板へと推移させるための方法を提供する。これらの種々の培養は、以下に簡潔に記載される。

40

【0183】

PVE-HE細胞は、基本培地としてのイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロールを含み、骨形成タンパク質4(

50

BMP4) (例えば、50 ng/ml)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF) (例えば、50 ng/ml)および血管内皮増殖因子(VEGF) (例えば、50 ng/ml)をさらに含む培養培地中でiPS細胞またはES細胞を培養するステップを含む方法を介して、iPS細胞またはES細胞から生成され得る。この培養期間は、平均して6日間持続し得る。

【0184】

MLPは、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ハムF-12栄養混合物、Albumin (rhアルブミン)、ポリビニルアルコール(PVA)、リノール酸、Synthetic Chol (合成コレステロール)、モノチオグリセロール(a-MTG)、rhインスリン-トランスフェリン-セレン-エタノールアミン溶液、タンパク質フリーハイブリドーマ混合物II(PFHMI)、アスコルビン酸2ホスフェート、Glutamax I(L-アラニル-L-グルタミン)、ペニシリン/ストレプトマイシンを含み、幹細胞因子(SCF) (例えば、25 ng/ml)、トロンボポエチン(TPO) (例えば、25 ng/ml)、Fms関連チロシンキナーゼ3リガンド(FL) (例えば、25 ng/ml)、インターロイキン-3(IL-3) (例えば、10 ng/ml)、インターロイキン-6(IL-6) (例えば、10 ng/ml)および任意選択でヘパリン(例えば、5単位/ml)をさらに含む培養培地中でPVE-HE細胞を培養するステップを含む方法を介して、PVE-HE細胞から生成され得る。この培養期間は、平均して3~4日間持続し得る。最後の48時間、最後の36時間、最後の24時間、最後の18時間、最後の12時間または最後の6時間を含む培養の後半で、BETのインヒビターが、培養物に、好ましくは細胞毒性未満のレベルで添加され得る。これらの培養物から回収されたMLPは、血小板生成またはその他分析のために凍結保存されてもよいし、または直ぐに使用されてもよい。

10

20

【0185】

巨核球は、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロールを含み、TPO(例えば、30 ng/ml)、SCF(例えば、1 ng/ml)、IL-6(例えば、7.5 ng/ml)、IL-9(例えば、13.5 ng/ml)ならびに任意選択で、ROCKインヒビター、例えばY27632(例えば、5 μM)および/またはヘパリン(例えば、5~25単位/ml)をさらに含む培地中でMLPを培養するステップを含む方法を介して、MLPから生成され得る。

30

【0186】

巨核球は、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロールを含み、TPO(例えば、10~100 ng/ml)、SCF(例えば、0.5~100 ng/ml)、IL-11(例えば、5~25 ng/ml)ならびに任意選択で、ROCKインヒビター、例えばY27632(例えば、5 μM)および/またはヘパリン(例えば、2.5~25単位/ml)のうち1種または複数を含み、培地中でMLPを培養するステップを含む方法を介して、MLPから生成され得る。

40

【0187】

この後者の培養は、培養の長さに依存して、MKおよび血小板を生成する。血小板は、典型的には、培養の約3~4日目までに観察される。この培養期間の間、MLPはMKへと成熟化しており、MKは前血小板へと成熟化しており、前血小板は血小板へと成熟化していると理解される。

【0188】

したがって、血小板は、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロールを含み、TPO(例えば、30 ng/ml)、SCF(例えば、1 ng/ml)、IL-6(例えば、7.5 ng/ml)、IL-9(

50

例えば、 13.5 ng/ml) ならびに任意選択で、ROCKインヒビター、例えばY27632 (例えば、 $5 \mu\text{M}$) および/またはヘパリン (例えば、 $5 \sim 25$ 単位/ ml) をさらに含む培地中でMLPまたはMKを培養するステップを含む方法を介して、MLPまたはMKから生成され得る。これらの培養期間は、 $4 \sim 8$ 日間の長さまたはそれより長くであり得る。

【0189】

血小板は、イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質 (LDL)、コレステロールを含み、TPO (例えば、 $10 \sim 100 \text{ ng/ml}$)、SCF (例えば、 $0.5 \sim 100 \text{ ng/ml}$)、IL-11 (例えば、 $5 \sim 25 \text{ ng/ml}$) ならびに任意選択で、ROCKインヒビター、例えばY27632 (例えば、 $5 \mu\text{M}$) および/またはヘパリン (例えば、 $2.5 \sim 25$ 単位/ ml) のうち1種または複数を含み、さらに含む培地中でMLPまたはMKを培養するステップを含む方法を介して、MLPまたはMKから生成され得る。

10

【0190】

これらの血小板生成法は、静置培養条件または剪断力培養条件下でのMLPまたはMKの培養を含む。静置培養条件は、培養されている細胞と接触する培養培地が、比較的静的である培養条件である。剪断力培養条件は、培養されている細胞と接触する培養培地の意図的な一定の動きを含む培養条件である。剪断力は dIN/cm^2 で測定される。一部の例では、この剪断力は、骨髄の造血環境において生じる剪断力に近い。BM類洞における剪断力は、約 $1.3 \sim 4.1 \text{ dIN/cm}^2$ であると報告されている。本開示は、剪断力培養が、約 $1 \sim 4.5 \text{ dIN/cm}^2$ 、または約 $1.3 \sim 4.1 \text{ dIN/cm}^2$ の範囲の剪断力、例えば、その間の任意の力または任意の範囲の力、例えば、約 1.5 、約 2.0 、約 2.5 、約 3.0 、約 3.5 、約 4.0 および約 4.1 dIN/cm^2 で実施され得ることを企図する。

20

【0191】

培養は、かかる剪断力を生じる流速で実施され得ることが理解される。所与の培養について、剪断力は、流速 (容量/時間) と関連する。剪断力は、当技術分野の知識を使用して、任意の所与の培養物または培養デバイスについて、流速の知識を用いて決定され得る。本明細書に提供される実験結果の一部は、 12 マイクロリットル/分および 16 マイクロリットル/分の流速での、所与のマイクロ流体デバイスにおける血小板生成を比較している。一部の例では、流速は、 $5 \sim 25$ マイクロリットル/分の範囲内、または $10 \sim 20$ マイクロリットル/分以内であり得る。一部の例では、流速は、 $10 \sim 15$ マイクロリットル/分の範囲内であり得、他の例では、 $16 \sim 20$ マイクロリットル/分の範囲内であり得る。

30

【0192】

剪断力培養が使用される場合、この血小板生成法は、 $3 \sim 4$ 日間または血小板が観察されるまでの静置培養での第1の培養期間と、その後の、マイクロ流体デバイスまたは剪断力を誘発することが可能な他のデバイスなどの剪断力環境中での第2の培養とを含み得る。

40

【0193】

一定分量がかかる培養物から回収され、血小板計数について測定され得ることを理解すべきである (例えばFACSを使用して)。これにより、ピーク血小板生成の期間が同定される。

【0194】

血小板生成法は、MLPおよびMKの混合物を出発材料として有するか、またはMLPおよびMKの混合物を、培養期間の間のいくつかの時点においてその培養培地中に含む場合が多いこともまた、理解すべきである。

【0195】

本開示は、マイクロ流体デバイスまたは剪断力条件が達成され得る他の培養デバイス中

50

でMLPまたはMKが培養されることを企図する。一部の例では、このデバイスは、MLPまたはMKが、このデバイス内で固定化されるがこのデバイスに付着しないように設計される。一部の例では、このデバイスは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)またはジメチコンなどの合成樹脂で製造される。これらは、マイクロ流体デバイスおよびチップにおいて一般に使用される。

【0196】

本開示は、血小板が剪断力培養条件を使用して生成される場合に、特定のプロテアーゼインヒビターが培養物に添加されるとき、より良い血小板の収量および機能性が得られることをさらに企図する。本開示によって、血小板が剪断力下に置かれた場合、細胞表面CD42bが血小板表面から喪失され得、血小板の活性を低くすることが見出された。これを回避し、剪断培養の利益をなおも得るために、本開示は、CD42bの剪断または喪失を防止するプロテアーゼインヒビターを使用することを企図する。かかるインヒビターの例には、マトロプロテアーゼインヒビターおよびより具体的にはマトリックスマトロプロテアーゼ(MMP)インヒビターが含まれる。剪断培養において使用され得るインヒビターの別の例は、プラスミノゲン活性化因子インヒビターである。これらのインヒビターは、汎インヒビターであり得、これは、単一のインヒビターが、そのクラス内の1種よりも多くのおよび場合によっては全てのプロテアーゼを阻害し得ることを意図する。あるいは、これらは特異的インヒビターであり得、これは、単一のインヒビターが、そのクラス内の1種のプロテアーゼを完全にまたは大部分阻害することを意図する。

10

【0197】

一部の例では、培養は、MMPインヒビターの存在下で実施される。インヒビターは、例えば、有機小分子、抗体または抗体断片、アンチセンスまたはRNAi核酸などの小分子であり得る。

20

【0198】

MMPインヒビターの例としては、以下が含まれるがこれらに限定されない：GM6001(汎インヒビター)、N-ダンシル-D-フェニルアラニン、4-エピ-クロルテトラサイクリン、ピリドキサチン塩酸塩(Hydrochloride Pyridoxatin)、ARP100、ARP101、パチマスタット、クロルヘキシジン、二塩酸塩、シス-ACCP、CL82198塩酸塩、ミノサイクリン、塩酸塩、アレンドロネート、ナトリウム塩、GM1489、TAPI-1、TAPI-2、GM6001、マリマスタット、MMPインヒビターII、MMPインヒビターIII、EGTA、MMPインヒビターV、MMP-13インヒビター、MMP-2インヒビターI、MMP-2インヒビターII、CP471474、MMP-2/MMP-3インヒビターI、MMP-2/MMP-3インヒビターII、MMP-2/MMP-9インヒビターI、MMP-2/MMP-9インヒビターII、MMP-2/MMP-9インヒビターV、エコチン、E.coli、MMP-3インヒビター、MMP-3インヒビターIII、MMP-3インヒビターIV、アクチノニン、MMP-3インヒビターV、MMP-3インヒビターVII、MMP-7アンチセンスオリゴヌクレオチド、ナトリウム塩、MMP-8インヒビターI、MMP-9インヒビターI、MMP-9/MMP-13インヒビターI、MMP-9/MMP-13インヒビターII、NNGH、NSC23766、PD166793、Pro-Leu-Glyヒドロキサメート塩酸塩、Ro32-3555、PF-356231、SB-3CT、ホスホラミドン、WAY170523、UK370106、UK356618、塩化バリウム二水和物(dehydrate)、ルテオリン、イソババカルコン(Isobavachalcone)、ドキシサイクリンヒクレート、コラゲナーゼインヒビターI、o-フェナントロリンおよびSanta Cruz Biotechnology, Inc.のTAPI-0。これらには、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4、GM6001、メチルプレドニゾロン、パチマスタット、マリマスタット、プリノマスタット、BAY12-9566、MMI270(B)、BMS-275291、メタスタット(metastat)およびMMP-1~MMP-26の他のインヒビターもまた含まれる。MMPインヒビターは、1種のMMP

30

40

50

ファミリーメンバーのみを阻害してもよいし、または1種よりも多いもしくは全てのMMPファミリーメンバーを阻害してもよいことを理解すべきである。

【0199】

特定の合成MMPインヒビターは一般に、MMP活性部位における触媒的亜鉛原子に緊密に結合するキレート基を含む。一般的なキレート基には、ヒドロキサメート、カルボキシレート、チオールおよびホスフィニルが含まれる。

【0200】

他のMMPインヒビターには、BB-94、Ro 32-3555、BB-1101、BB-2516、SE205、CT1746、CGS 27023A、AG3340、BAY 12-9566、D2163、D1927、PNU-142372、CMT-1およびアクチノニンが含まれる。

10

【0201】

多くのMMPインヒビターが市販されている。

【0202】

当技術分野では、MMPインヒビターが熟知されており、さらなる例は、その各々が参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第4,877,805号；第5,837,224号；第6,365,630号；第6,630,516号；第6,683,069号；第6,919,072号；第6,942,870号；第7,094,752号；第7,029,713号；第6,942,870号；第6,919,072号；第6,906,036号；第6,890,937号；第6,884,425号；第6,858,598号；第6,759,432号；第6,750,233号；第6,750,228号；第6,713,074号；第6,699,486号；第6,645,477号；第6,630,516号；第6,548,667号；第6,541,489号；第6,379,667号；第6,365,630号；第6,130,254号；第6,093,398号；第5,962,466号；第5,837,224号；第7,705,164号；第7,786,316号；第8,008,510号；第7,579,486号；第8,318,945号；および第7,176,217号；公開米国特許出願第20070037253号；第20060293345号；第20060173183号；第20060084688号；第20050058709号；第20050020607号；第20050004177号；第20040235818号；第20040185127号；第20040176393号；第20040067883号；第20040048852号；第20040034098号；第20040034086号；第20040034085号；第20040023969号；第20040019055号；第20040019054号；第20040019053号；第20040006137号；第20040006077号；第20030212048号；第20030004165号；第20020198176号；第20020177588号；第20020169314号；第20020164319号；第20020106339号；第20020061866号；第20020054922号；第20020049237号；第20020010162号；第20010039287号；および第20010014688号；ならびに公開されたPCT出願WO 02/064552、WO 05/1103399、WO 06/028523、WO 2008/024784、WO 02/064552、WO 05/110399、WO 06/028523、WO 01/62261およびWO 2008/024784において提供される。

20

30

40

【0203】

MMPインヒビターは、科学文献中にも記載されており、例えば、WhittakerらChem Rev. 99巻：2735~2776頁、1999年；WhittakerらCell transmissions 17巻(1号)：3~14頁(表AB)およびHarrison、Nature Reviews Drug Discovery 6巻：426~427頁、2007年(表AC)を参照されたいが、その具体的な教示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

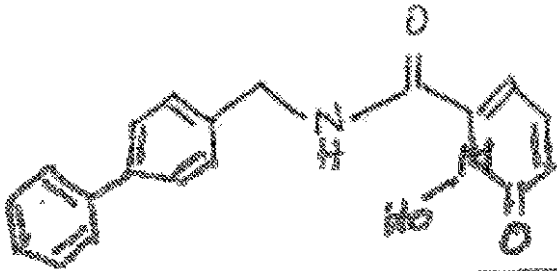
50

【0204】

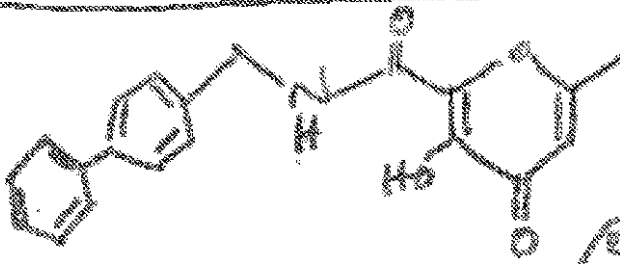
いくつかのMMPインヒビターは以下であり得る。

【0205】

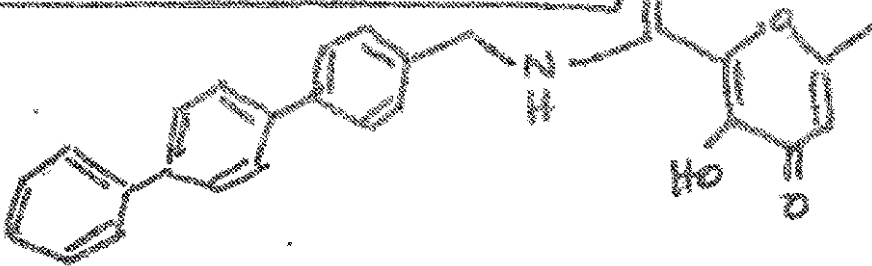
【化1】



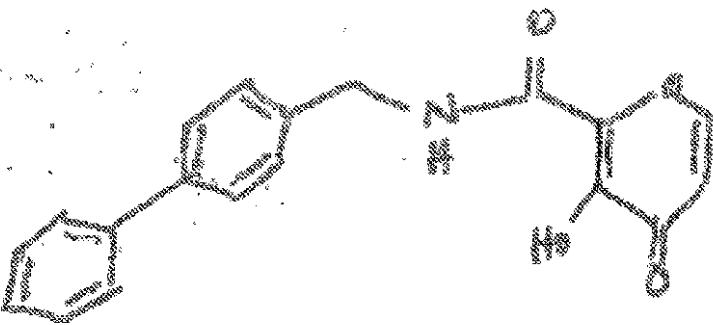
10



20



30



【0206】

一部の例では、MMP8インヒビター、例えば特異的MMP8インヒビターが、静置培養または剪断力培養において使用され得る。一部の例では、このMMP8インヒビターは、天然に存在するMLPおよびMK、例えば、骨髄または臍帯血由来のMLP（例えば、CD34⁺前駆細胞）またはMKの培養において使用され得る。

40

【0207】

MMP8特異的インヒビターの一例は、化学名(3R)-(+)-[2-(4-メトキシベンゼンスルホニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-ヒドロキサメート]を有するMMP8-Iであり、Milliporeから市販されている。

【0208】

一部の例では、このプロテアーゼインヒビターは、プラスミノゲン活性化因子インヒビターであり得る。プラスミノゲン活性化因子インヒビターの例には、プラスミノゲ

50

ン活性化因子インヒビター 1 (PAI-1)、プラスミノゲン活性化因子インヒビター 2 (PAI-2) および組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) インヒビターが含まれるがこれらに限定されない。他のプラスミノゲン活性化因子インヒビターには、その各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 4,923,807 号; 国際 PCT 出願 WO/13063331; WO/1316974; および参考文献 Fortenberry Y.M. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors: a patent review (2006-present). Expert Opin Ther Pat. 2013 年 7 月; 23 巻 (7 号): 801~15 頁; および Pannekoeckら、EMBO J. 1986 年; 5 巻 (10 号): 2539~44 頁に記載されるものが含まれる。

10

【0209】

一部の例では、2 種以上のプロテアーゼインヒビターが、培養物中で一緒に使用され得る。一例として、MMP インヒビター GM6001 は、MMP8 特異的インヒビター MMP8-I と一緒に使用され得る。

【0210】

一部の例では、培養は、37 を上回る温度で実施され得る。培養温度は、37 ~ 45 の範囲内、または 37 ~ 42 の範囲内、または 38 ~ 41 の範囲内、または 39 ~ 40 の範囲内、または約 39 もしくは約 40 であり得る。培養は、設定された温度で実施される。37 を上回る温度での培養は、本明細書で昇温培養と呼ぶ。

【0211】

一部の例では、PVE-HE 細胞から MLP を生成する方法は、BET ファミリーのプロモドメイン含有タンパク質のインヒビターの存在下で実施される。BET インヒビターは、BET ファミリーメンバーを阻害する任意の分子または化合物であり得、核酸、例えば DNA および RNA アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA および shRNA、小ペプチド、抗体または抗体断片、ならびに小分子、例えば、小さい化学物質化合物であり得る。BET インヒビターは、少なくとも 1 つの BET ファミリーメンバーのプロモドメインの、タンパク質のアセチル-リシン残基への結合を防止または低減させ得る。BET インヒビターは、1 種の BET ファミリーメンバーのみを阻害してもよいし、または 1 種よりも多くのもしくは全ての BET ファミリーメンバーを阻害してもよいことを理解すべきである。

20

30

【0212】

BET インヒビターの例は、参照によって本明細書に組み込まれる、US 2011143651、WO2009/084693A1、WO 2011143669、WO 2011143660、WO 2011054851 および JP 2008156311 に記載されている。

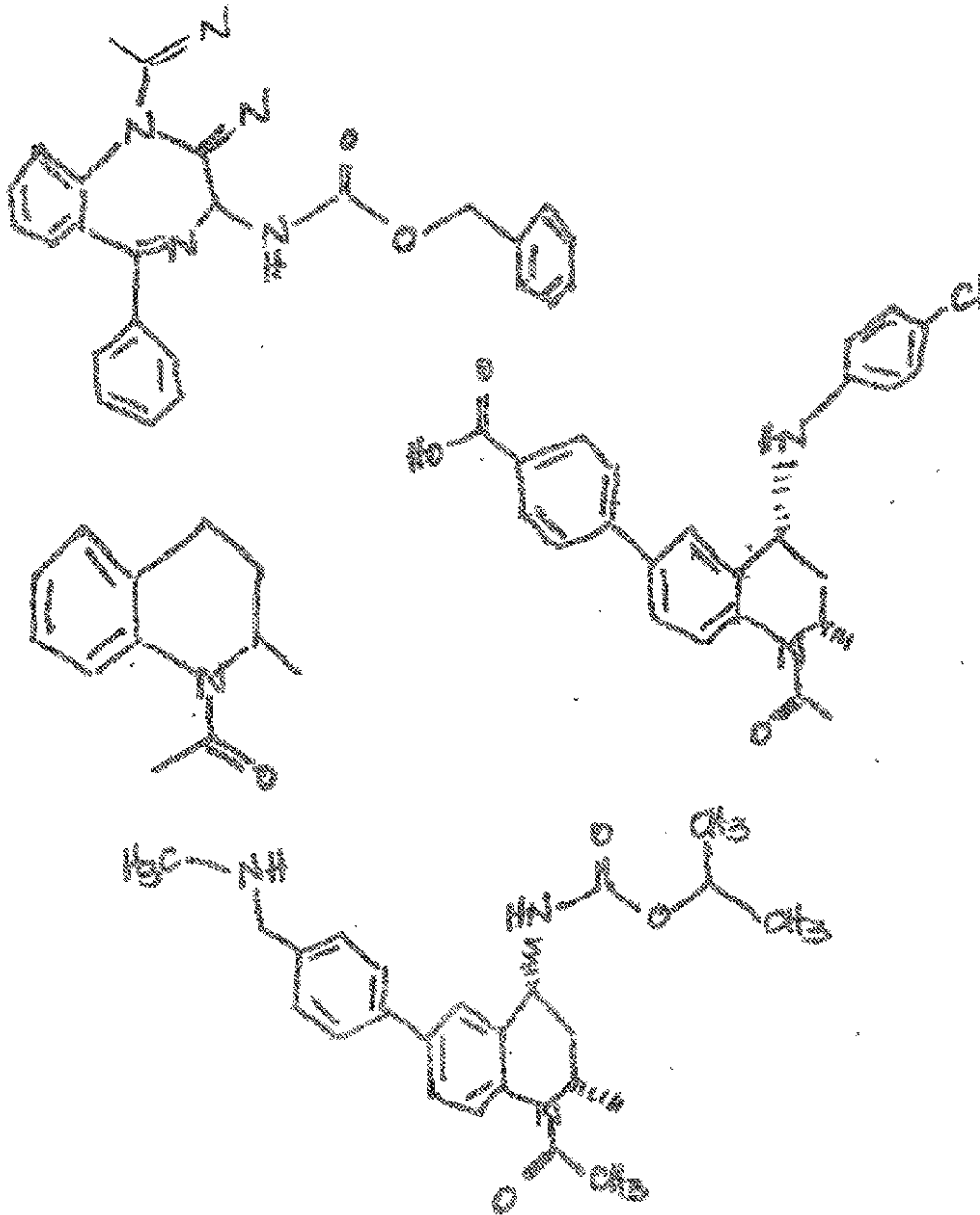
【0213】

当技術分野で公知の BET インヒビターの例には、以下が含まれるがこれらに限定されない: RVX-208 (Resverlogix)、PFI-1 (Structural Genomics Consortium)、OTX015 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation)、BzT-7、GSK525762A (iBET, GlaxoSmithKline)、JQ1 (Cell 2011 年 146 巻 (6 号): 904~17 頁) および以下の化合物 (WO 2011054851、GlaxoSmithKline):

40

【0214】

【化 2】



10

20

30

【0215】

一部の実施形態では、BETインヒビターは、BETファミリーメンバー（例えば、BRD1、BRD2、BRD3、BRD4、BRD7、BRDT；WO2011143669を参照のこと）の第1のプロモドメインの結合ポケットに結合する小分子化合物（例えば、JQ1またはその誘導体）である。他のBETインヒビターには、JQ1S、JQ1R、JQ20、JQ8、JQ6、JQ13、JQ19、JQ18、JQ11、JQ21、JQ24BおよびKS1が含まれる。

40

【0216】

BETインヒビター（本明細書でiBETと呼ぶ）の別の例は、GSK1210151A（本明細書でI-BET-151と呼ぶ）である。他のBETインヒビターには、IBET151およびIBET762が含まれる。

【0217】

多くのBETインヒビターは、抗白血病剤として有用である。本開示の方法において使用する場合、これらは、典型的には低濃度（即ち、その細胞毒性効果が観察されるレベル未満）で使用される。

50

【0218】

本開示は、BETインヒビターが、PVE-HE細胞をMLPに分化（または成熟化）させる培養期間の間に使用されることを企図する。この培養期間は、通常は約4日間持続する。BETインヒビターは、典型的には、培養の最後の48時間、最後の36時間、最後の24時間、最後の12時間または最後の6時間を含む、培養の後半に添加される。

【0219】

Mycインヒビターには、10058-F4およびCX-3543が含まれる。

【0220】

巨核球系列前駆体

【0221】

本開示の種々の実施形態は、多能性幹細胞（ヒトiPSおよびヒトESを含む）から巨核球系列前駆体（MLP）を生成する方法、ならびにMLPの組成物を提供する。

10

【0222】

初期系列造血性内皮細胞はCD41a陰性であり、造血前駆体への後期段階造血性分化の間にCD41aを発現する。CD42bは、成熟巨核球において排他的に発現される。MLP培養物は、高い割合のCD41+細胞および低い割合のCD42+細胞を伴って、不均一であり得る。

【0223】

MLPは、FACS分析によって、CD41aおよびCD42b二重陽性細胞の百分率について評価され得る。CD41aは、フィブリノーゲン受容体（IIb III）のサブユニットであり、CD42bは、フォン・ウィルブランド因子受容体（GPIb-V-IX）上のサブユニットである。両方の受容体の発現は、巨核球系列に特異的であり、両方とも、血小板機能に必要とされると考えられる。

20

【0224】

凍結保存のための回収前に、MLPは、付着細胞のおよその百分率および低い核対細胞質比を有する分化した大きい細胞の程度について評価され得る。付着細胞は、明確なコロニー境界を有さない拡散コロニーとして表れ得る。付着細胞集団の上に静止している豊富な浮遊MLPが存在し得る。生存浮遊MLPは、最小の複屈折で、平滑な細胞膜によって境界が定められて、明確に見え得る。

【0225】

MLPおよびその組成物は、任意選択で、凍結保存組成物として提供され得る。

30

【0226】

別の一実施形態では、本開示は、細胞分化のモジュレーターについてスクリーニングする方法を提供し、この方法は、ある量のPVE-HE細胞または巨核球前駆体（MLP）を提供するステップ；このPVE-HE細胞またはMLPを試験化合物と接触させるステップ；このPVE-HE細胞またはMLPとこの試験化合物との間の接触からの機能的影響の存在または非存在を決定するステップを含み、機能的影響の存在は、この試験化合物が細胞分化をモジュレートする巨核球形成因子、血小板新生因子および/または造血因子であることを示し、機能的影響の非存在は、この試験化合物が細胞分化をモジュレートする巨核球形成因子、血小板新生因子および/または造血因子ではないことを示す。他の実施形態では、巨核球形成因子、血小板新生因子および/または造血因子は、機能的血小板の拡大増殖、核内分裂、細胞質成熟化および最終分化に関連する。

40

【0227】

巨核球

【0228】

本開示の種々の実施形態は、間質フリー条件下および/または血清フリー条件下で多能性幹細胞（ヒトiPSおよびヒトESを含む）から巨核球を生成する方法を提供する。これらの実施形態は、巨核球を生成するステップを含む。さらなる実施形態は、多能性由来造血性内皮細胞から巨核球を生成する方法を提供する。前記巨核球は、好ましくは、血小板を生成できる（例えば、本明細書に記載される条件下で培養した場合）。

50

【0229】

一実施形態では、この方法は、多能性幹細胞を提供するステップ；および多能性幹細胞を巨核球に分化させるステップを含む。一実施形態では、多能性幹細胞はヒト細胞である。別の実施形態では、多能性幹細胞は、NE D 7株などの、胚の破壊なしに任意選択で生成されたhESCである。別の実施形態では、多能性細胞はヒトES細胞である。別の実施形態では、巨核球は、人工多能性幹細胞から誘導される。別の実施形態では、多能性幹細胞は、体細胞を再プログラミングすることから誘導されたヒトiPS細胞である。一実施形態では、体細胞は、胎仔組織由来である。別の実施形態では、体細胞は、成体組織由来である。

【0230】

別の実施形態では、本開示は、細胞分化のモジュレーターについてスクリーニングする方法を提供し、この方法は、ある量の巨核球(MK)を提供するステップ；このMKを試験化合物と接触させるステップ；およびこのMKとこの試験化合物との間の接触からの機能的影響の存在または非存在を決定するステップを含み、機能的影響の存在は、この試験化合物が細胞分化をモジュレートする巨核球形成因子、血小板新生因子および/または造血因子であることを示し、機能的影響の非存在は、この試験化合物が細胞分化をモジュレートする巨核球形成因子、血小板新生因子および/または造血因子ではないことを示す。他の実施形態では、巨核球形成因子、血小板新生因子および/または造血因子は、機能的血小板の拡大増殖、核内分裂、細胞質成熟化および最終分化に関連する。

【0231】

血小板

【0232】

本開示の他の実施形態は、ヒト胚性幹細胞および多能性幹細胞(iPSCおよびヒトiPSCを含む)から血小板を生成する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、ヒト胚性幹細胞(hESC)を提供するステップ；PVE-HE細胞を巨核球に分化させるPVE-HE細胞を形成するステップ；および巨核球を血小板に分化させるステップを含む。

【0233】

別の実施形態では、血小板を生成する方法は、PVE-HE細胞を提供するステップ；PVE-HE細胞をMLPまたは巨核球に分化させるステップ；および任意選択で、MLPを巨核球に分化させるステップ；ならびに次いで、典型的には前血小板ステップを介して、巨核球を血小板に分化(または成熟化)させるステップを含む。PVE-HE細胞を巨核球に分化させるプロセスは、上記のように実施され得る。一実施形態では、PVE-HE細胞は、ヒトES細胞から誘導される。別の実施形態では、PVE-HE細胞は、人工多能性幹細胞(iPSC)から誘導される。一実施形態では、iPS細胞は、体細胞を再プログラミングすることから誘導されたヒトiPS細胞である。一実施形態では、体細胞は、胎仔組織由来である。別の実施形態では、体細胞は、成体組織由来である。種々の実施形態では、巨核球を血小板に分化させるプロセスは、巨核球を血小板に分化させるために、巨核球を培養し続けるステップを含む。種々の実施形態では、巨核球を血小板に分化させるプロセスは、フィーダーフリー条件下であり、巨核球系列特異的前駆細胞から分化した巨核球を収集するステップを含む。

【0234】

さらなる実施形態では、血小板は、MK-M培地中、または基本培地としてのイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロール、TPO(例えば、30ng/ml)、SCF(例えば、1ng/ml)、IL-6(例えば、7.5ng/ml)、IL-9(例えば、13.5ng/ml)、ならびに任意選択で、ROCKインヒビター、例えばY27632(例えば、5μM)および/もしくはヘパリン(例えば、5~25単位/ml)を含む他の培地中における巨核球培養の4日目~10日目に収集される。好ましい一実施形態では、血小板は、MK-M培地中の

10

20

30

40

50

巨核球培養物中における前血小板形成性細胞の最初の出現の3～5日後から収集される。ある特定の実施形態では、血小板は、密度勾配遠心分離を使用して精製される。さらなる実施形態では、この密度勾配遠心分離はPercoll媒体を使用する。さらなる実施形態では、この密度勾配遠心分離はBSA/HSA媒体を使用する。別の一実施形態では、この血小板精製法は、CD41a陰性である粒子を分離する。別の一実施形態では、この血小板精製法は、CD42b陰性である粒子を分離する。別の一実施形態では、この血小板精製法は、細胞の生存度および形態学的完全性を保持する。他の実施形態では、血小板は、CD41aおよびCD42bを発現する。他の実施形態では、血小板は、トロンビン刺激に対して応答性である。別の一実施形態では、血小板は、フィブリノーゲンおよびフォン・ウィルブラント因子(vWF)表面上に伸展することができる。さらなる実施形態では、血小板は、PAC-1結合およびインテグリン活性化の能力を有する。別の一実施形態では、血小板は、ミクロ凝集体を形成し、血餅の形成および退縮を促進する。別の一実施形態では、血小板は、アピラーゼおよび/またはEDTAの存在下では活性化されない。

10

20

30

40

50

【0235】

本開示の種々の実施形態は、多能性幹細胞由来血小板を使用する方法を提供する。ある特定の実施形態では、多能性幹細胞由来血小板は、血小板輸血において使用される。この方法は、ある量の多能性幹細胞由来血小板を提供するステップ；およびこの量の多能性幹細胞由来血小板を、それを必要とする対象に投与するステップを含み得る。種々の実施形態では、多能性幹細胞由来血小板は、患者にマッチした血小板であり得る。別の一実施形態では、血小板は、iPSCから誘導される。ある特定の一実施形態では、血小板は、ヒトiPSC細胞から誘導される。他の実施形態では、血小板は、対象への血小板の投与の際に対象においてHLA同種免疫原性応答に寄与しない溶液中に貯蔵される。さらなる例示的な実施形態では、多能性幹細胞由来血小板は、白血球を実質的に含まなくてもよく、例えば、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満の白血球、好ましくは0.1%未満、0.001%未満またはさらには0.0001%未満を含む。さらなる例示的な実施形態は、調製物中に 10^6 個未満の白血球、より好ましくは、 10^5 個未満、 10^4 個未満またはさらには 10^3 個未満の白血球を含む、多能性幹細胞由来血小板の調製物を提供する。

【0236】

さらなる例示的な実施形態は、少なくとも 10^8 個の血小板、より好ましくは少なくとも 10^9 個、少なくとも 10^{10} 個または少なくとも 10^{11} 個の血小板を含む組成物を提供する。

【0237】

22～24における本発明の血液バンク貯蔵条件を使用すると、ヒト血小板(アフレススによって収集した)の生存度および機能は、5日間のみわたくして維持され得る - 限定的な貯蔵時間は、血小板の加齢および細菌増殖のリスクの増加に起因すると考えられる。本発明の方法によって生成された血小板は、バンクに保存された血小板よりも長い有効期限を有し、例えば、22～24で少なくとも6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間またはさらには15日間にわたくして維持され得、ヒト患者において使用されるための適切な生存度を維持することが予測される。

【0238】

ある特定の実施形態では、血小板は、単離後にまたは血小板生成をもたらす培養ステップの1つもしくは複数の間に、22～24における、冷蔵下における(例えば、4)および/または凍結下における血小板貯蔵を延長させる1つまたは複数の薬剤で処理され得る。

【0239】

例えば、本発明は、シアリダーゼ活性を低減させ、血小板生成物調製物における1種もしくは複数の細菌の増殖を(任意選択で)阻害する薬剤で血小板を処理すること、または

シアリダーゼ活性を低減させ、血小板生成物調製物における1種もしくは複数の細菌の増殖を(任意選択で)阻害する条件下で血小板を誘導することを企図する。この方法は、血小板生成物調製物がある量のシアリダーゼインヒビターと接触させ、それによって、シアリダーゼ処理された血小板生成物調製物を取得するステップを含み得る;ここで、シアリダーゼインヒビターに供されていない血小板生成物調製物と比較して、シアリダーゼ活性は低減され、1種または複数の細菌の増殖は阻害される。

【0240】

阻害される細菌の型には、血小板生成物調製物中に一般に見出されるものが含まれる。かかる細菌の例には以下が含まれる: *Aspergillus*、*Bacillus* sp、*Bacteroides eggerthii*、*Candida albicans*、*Citrobacter* sp、*Clostridium perfringens*、*Corynebacterium* sp、*Diphtheroid*、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter amnigenus*、*Enterobacter cloacae*、*Enterococcus avium*、*Enterococcus faecalis*、*Escherichia coli*、*Fusobacterium* spp.、*Granulicatella adiacens*、*Helicobacter pylori*、*Klebsiella* sp、(*K. pneumonia*、*K. oxytoca*)、*Lactobacillus* sp、*Listeria* sp、*Micrococcus* sp、*Peptostreptococcus*、*Proteus vulgaris*、*Pseudomonas* sp、*Pseudomyxoxalis*、*Propionibacterium* sp、*Salmonella* sp、*Serratia* sp、*Serratia marcescens*、*Staphylococcus* sp (コアグラゼ陰性 *Staphylococcus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus aureus*)、*Streptococcus* sp、(*S. gallolyticus*、*S. bovis*、*S. pyogenes*、*S. viridans*)および *Yersinia enterocolitica*。

10

20

【0241】

本発明で使用され得るシアリダーゼインヒビターには、例えば以下が含まれる: フェチユイン、2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルノイラミン酸(DANA)もしくはその薬学的に許容される塩; エチル(3R,4R,5S)-5-アミノ-4-アセトアミド-3-(ペンタン-3-イルオキシ)-シクロヘキサ-1-エン-1-カルボキシレート); (2R,3R,4S)-4-グアニジノ-3-(プロパ-1-エン-2-イルアミノ)-2-((1R,2R)-1,2,3-トリヒドロキシプロピル)-3,4-ジヒドロ-2H-ピラン-6-カルボン酸; (4S,5R,6R)-5-アセトアミド-4-カルバミミダミド(carbamimidamido)-6-[(1R,2R)-3-ヒドロキシ-2-メトキシプロピル]-5,6-ジヒドロ-4H-ピラン-2-カルボン酸; および(1S,2S,3S,4R)-3-[(1S)-1-アセトアミド-2-エチル-ブチル]-4-(ジアミノメチリデンアミノ)-2-ヒドロキシ-シクロペンタン-1-カルボン酸、またはそれらの薬学的に許容される塩。

30

40

【0242】

1種またはそれ以上のグリカン改変剤が、血小板に添加され得る。かかるグリカン改変剤には、例えば、CMP-シアル酸、CMP-シアル酸先駆体、UDPガラクトースまたはそれらの組合せが含まれる。一態様では、CMP-シアル酸先駆体をCMP-シアル酸に変換する酵素もまた、血小板に添加され得る。

【0243】

ある特定の実施形態では、血小板は、血小板の集団のクリアランスを低減させるのに有効な量の少なくとも1種のグリカン改変剤で処理され得る。一部の実施形態では、このグリカン改変剤は、UDP-ガラクトースおよびUDP-ガラクトース先駆体からなる群から選択される。一部の好ましい実施形態では、このグリカン改変剤はUDP-ガラクトー

50

スである。

【0244】

ある特定の実施形態では、血小板は、GP1b上に露出されたGlcNAc残基の糖化をもたらす特定の糖分子で処理され得、それによって、血小板クリアランスを低減させ、血小板食作用を遮断し、血小板循環時間を増加させ、かつ/または血小板貯蔵時間を増加させる。

【0245】

ある特定の実施形態では、血小板は、トレハロースまたは他の低分子量多糖で処理され得る。

【0246】

ある特定の実施形態では、血小板は、プロテアーゼインヒビター、例えばマトリックスメタロプロテアーゼインヒビターで処理され得る。

【0247】

一部の実施形態では、血小板の*in vivo*循環時間は、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、150%、200%またはそれより多く、増加させられる。

【0248】

本発明の血小板は、少なくとも約3日間、少なくとも約5日間、少なくとも約7日間、少なくとも約10日間、少なくとも約14日間、少なくとも約21日間または少なくとも約28日間にわたって、冷却貯蔵され得る。

【0249】

さらに、培養物中の幹細胞から血小板を誘導することは、血小板および巨核球を事前順化する機会、ならびにさらには、血小板の有効期限を延長させ、冷蔵および/または凍結保存貯蔵後の収量および生存度を増強する様式で、幹細胞または巨核球などの前駆細胞を遺伝子改変する機会を提供する。例えば、MKは、膜脂質比率、タンパク質グリコシル化パターン、ストレス誘発性タンパク質、14-3-3移行などに関与する遺伝子の発現のレベルの変更を有するように操作され得る。

【0250】

さらなる一実施形態では、血小板は、機能的血小板である。さらなる一実施形態では、機能的血小板の百分率は、少なくとも約60%であり、少なくとも約70%であり、少なくとも約80%であり、または少なくとも約90%である。なおさらなる一実施形態では、機能的血小板は、22~37で貯蔵した場合、少なくとも2日間にわたって活性である。

【0251】

本開示は、本明細書に提供される方法に従って生成された血小板が、受動的様式（例えば、経時的に血小板から拡散し得る）または能動的様式（例えば、血小板の活性化および脱顆粒の際に放出される）のいずれかで血小板によって放出される1種または複数の治療剤を含むように操作され得ることを、さらに企図する。広範な薬物が使用され得、これらには、抗生物質、抗ウイルス剤、麻酔薬、ステロイド性薬剤、抗炎症剤、抗新生物剤、抗原、ワクチン、抗体、鬱血除去薬、降圧薬、鎮静薬、受胎調節剤、プロゲステロン剤、抗コリン薬、鎮痛薬、抗うつ薬、抗精神病薬、 α -アドレナリン受容体遮断剤、利尿薬、心血管活性剤、血管作動性剤、非ステロイド性抗炎症剤、栄養剤などが含まれ得る。

【0252】

例えば、操作された血小板は、以下からなる群から選択される1種または複数の化合物を含むように調製され得る：シナプスおよび神経効果器接合部位において作用する薬物（例えば、アセチルコリン、メタコリン、ピロカルピン、アトロピン、スコポラミン、フィゾスチグミン、サクシニルコリン、エピネフリン、ノルエピネフリン、ドーパミン、ドブタミン、イソプロテレノール、アルブテロール、プロプラノロール、セロトニン）；中枢神経系に対して作用する薬物（例えば、クロナゼパム、ジアゼパム、ロラゼパム、ベンゾカイン、ピバカイン、リドカイン、テトラカイン、ロピバカイン、アミトリプチリン、

10

20

30

40

50

フルオキセチン、パロキセチン、バルプロ酸、カルバマゼピン、プロモクリプチン、モルヒネ、フェentanil、ナルトレキソン、ナロキソン）；炎症応答をモジュレートする薬物（例えば、アスピリン、インドメタシン、イブプロフェン、ナプロキセン、ステロイド、クロモリナトリウム、テオフィリン）；腎機能および/または心血管機能に影響する薬物（例えば、フロセミド、チアジド、アミロライド、スピロラク톤、カプトプリル、エナラプリル、リシノプリル、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、ジゴキシン、イソルジル（isorbidil）、ドブタミン、リドカイン、キニジン、アデノシン、ジギタリス、メバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、メバロネート）；胃腸機能に影響する薬物（例えば、オメプラゾール、スクラルファート）；抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クリンダマイシン、アンホテリシンB、キニーネ、メチシリン、バンコマイシン、ペニシリンG、アモキシシリン、ゲンタマイシン、エリスロマイシン、シプロフロキサシン、ドキシサイクリン、アシクロビル、ジドブジン（AZT）、ddC、ddI、リバビリン、セファクロル、セファレキシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、クロラムフェニコール、イソニアジド、フルコナゾール、アマンタジン、インターフェロン）；抗がん剤（例えば、シクロホスファミド、メトトレキセート、フルオロウラシル、シタラビン、メルカプトプリン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、マイトマイシンC、ヒドロキシウレア、プレドニゾン、タモキシフェン、シスプラチン、ダカルバジン（decarbazine））；免疫調節剤（例えば、インターロイキン、インターフェロン、GM-CSF、TNF、TNF、シクロスポリン、FK506、アザチオプリン、ステロイド）；血液および/または血液形成性器官に対して作用する薬物（例えば、インターロイキン、G-CSF、GM-CSF、エリスロポエチン、ビタミン、鉄、銅、ビタミンB12、葉酸、ヘパリン、ワルファリン、クマリン）；ホルモン（例えば、成長ホルモン（GH）、プロラクチン、黄体形成ホルモン、TSH、ACTH、インスリン、FSH、CG、ソマトスタチン、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）、チロキシン、トリヨードサイロニン）；ホルモンアンタゴニスト；石灰化および骨のターンオーバーに影響する薬剤（例えば、カルシウム、ホスフェート、副甲状腺ホルモン（PTH）、ビタミンD、ビスホスホネート、カルシトニン、フッ化物）、ビタミン（例えば、リボフラビン、ニコチン酸、ピリドキシン、パントテン酸、ピオチン、コリン、イノシトール、カルニチン（carnitine）、ビタミンC、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンK）；遺伝子治療剤（例えば、ウイルスベクター、核酸保有リボソーム、DNA-タンパク質コンジュゲート、アンチセンス剤）；または標的化剤などの他の薬剤。

10

20

30

【0253】

ある特定の実施形態では、血小板は、1種または複数の治療剤、例えば小分子薬物、アパタマー（apatamer）もしくは他の核酸薬剤、または組換えタンパク質を含むように操作されており、即ち、これらは、血小板の顆粒（例えば - 顆粒）中に貯蔵され得、好ましくは、血小板の活性化の際に、例えば、脈管傷害もしくは他の創傷、アテローム動脈硬化性プラークもしくは内皮細胞びらん、感染、または血小板活性化が可能な血栓形成促進性環境、例えば固形腫瘍の血管系、の部位において放出され得る。他の実施形態では、操作された血小板は、線維症の重症度を低減させるまたは線維症を予防するために、例えば、肺の線維症（即ち、肺線維症、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、喘息および嚢胞性線維症からなる群から選択され得るもの）の処置などにおいて、使用され得る。

40

【0254】

ある特定の実施形態では、血小板は、正常な創傷治癒を促進もしくは加速する外因性薬剤、癒痕を低減させる外因性薬剤、線維症を低減させる外因性薬剤1種もしくは複数、またはそれらの組合せを含む。巨核球において発現され、その巨核球から生成された血小板の顆粒中に詰め入れられ得る例示的な組換えタンパク質には、エリスロポエチンが含まれる。エリスロポエチンの局在化送達は、フィブリン誘発性の創傷治癒応答を加速させ、組換えEPO積載血小板は、糖尿病性潰瘍、熱傷などを含む開放創傷および痛み、ならびに

50

外科的手順（椎弓切除術、椎間板切除術、関節手術、腹部手術または胸部手術から生じるものなどの外科的病変）を含む閉鎖（内部）創傷の処置において使用され得る。MK細胞における発現および血小板顆粒における貯蔵が本発明に従って達成され得る他の創傷治癒性タンパク質、特に、非線維性増殖因子には、インスリン様増殖因子1（IGF-1）；塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）；トランスフォーミング増殖因子-3（TGF-3）、顆粒球コロニー刺激因子（GCSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GMCSF）、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、フィブロネクチン、ビトロネクチン、トロンボスポンジン、ラミニン、テネイシン（tenascin）が含まれる。

【0255】

ある特定の実施形態では、血小板は、TGF-1、TGF-2および/もしくはPDGFに対する抗体（特に単鎖抗体）；増殖因子自体への結合あるいは受容体（例えば、受容体結合部位配列を含むペプチド）または可溶性形態の増殖因子受容体もしくはこれらの受容体の増殖因子結合ドメインへの結合のいずれかによって、TGF-1、TGF-2および/もしくはPDGFがそれらの受容体に結合することを防止する結合タンパク質；あるいは受容体-リガンド相互作用を阻害するアプタマーなどが含まれるがこれらに限定されない、1種または複数の外因性抗線維症剤を含む。

10

【0256】

ある特定の実施形態では、血小板は、創傷治癒をモジュレートする1種もしくは複数の外因性薬剤、例えば、プロテアーゼ；血管作動性物質、例えばセロトニンおよび/またはヒスタミン；フィブロネクチン；コラゲナーゼ；プラスミノゲン活性化因子；中性プロテアーゼ；エラスチン；コラーゲン；プロテオグリカン（proteoglycan）；上皮増殖因子（EGF）；ホルモン、例えば、エストラジオール、テストステロンまたはプロゲステロン；マクロファージ由来増殖因子（MDGF）；アドレノメデュリン；アンジオゲニン；アンジオポエチン-1；アンジオポエチン（angiopoietin）関連増殖因子；脳由来神経栄養因子；コルチコトロピン放出ホルモン；Cyr16；フォリスタチン；肝細胞増殖因子；インターロイキン；ミッドカイン；ニューロキニンA；ニューロペプチドY（NPY）；プレイオトロフィン；プログラニユリン、プロリフェリン（proliferin）；セクレトニューリン（secretoneurin）；サブスタンスP；VG5Q；および周皮細胞をリクルートする因子；ならびにベカプレルミンを含む。

20

【0257】

ある特定の実施形態では、血小板は、創傷治癒を促進しかつ/または創傷の部位において線維症および瘢痕を低減させ得る、1種または複数の核アプタマーを含む。瘢痕は、持続性の炎症および過剰に豊富な線維芽細胞活性化の両方によって引き起こされると考えられている。オステオポンチン（OPN）は、細胞活性化を促進するサイトカインである。in vivoにおけるOPNの非存在は、皮膚の瘢痕を低減させる。RNAアプタマーは、高い親和性で標的タンパク質に結合する短いRNA分子である。アプタマーOPN-R3（R3）は、OPNのシグナル伝達を遮断する。ある特定の実施形態では、血小板には、血小板活性化のための部位において、能動的にまたは受動的に、好ましくは能動的に放出されるOPN-R3が積載され得る。例示的なOPN阻害アプタマーは、US20110190386に記載されている。

30

40

【0258】

ある特定の実施形態では、血小板は、創傷治癒を促進しかつ/または創傷の部位において線維症および瘢痕を低減させ得る、1種または複数の小さい（有機）薬剤を含む。例えば、切除術の創傷閉鎖は、A2A受容体アゴニスト、例えばCGS-21680によって顕著に加速され得る（Montesinosら JEM 1997年、186巻（9号）1615～1620頁）。したがって、単なる例示として、血小板には、能動的にまたは受動的に（好ましくは、血小板活性化のための部位において能動的に）放出されるA2A受容体アゴニストが積載され得る。他の小分子薬剤には、ステロイド、非ステロイド性抗炎症化合物（NSAID）、5-リポキシゲナーゼ（5-LO）インヒビター、ロイコトリエンB4（LTB4）受容体アンタゴニスト、ロイコトリエンA4（LTA4）ヒドロ

50

ラーゼインヒビター、5-HTアゴニスト、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A(HMG-CoA)インヒビター、H₂アンタゴニスト、抗新生物剤およびシクロオキシゲナーゼ-2インヒビターが含まれる。

【0259】

ある特定の実施形態では、血小板は、1種または複数の外因性抗生物質を含む。例示的な抗生物質には、クロラムフェニコール、クロルテトラサイクリン、クリンダマイシン(clyndamycin)、クリオキノール、エリスロマイシン、フラマイセチン、グラミシジン、フシジン酸、ゲンタマイシン、マフェニド、ムピロシcin(mupirocin)、ネオマイシン、ポリミキシンB、パシトラシン、スルファジアジン銀、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、トブラマイシン、アミカシン、バンコマイシン、ラモプラニン、レボフロキサシン、オフロキサシン、モキシフロキサシン、クリンダマイシンまたはそれらの組合せが含まれる。

10

【0260】

ある特定の実施形態では、血小板は、1種または複数の外因性鎮痛剤もしくは麻酔剤および/または抗炎症剤を含む。例示的な抗炎症剤は、アセトアミノフェン、アスピリン、イブプロフェン、ジクロフェナク、インドメタシン、ピロキシカム、フェノプロフェン、フルビプロフェン(flubiprofen)、ケトプロフェン、ナプロキセン、スプロフェン、ロキソプロフェン、シンノキシカム(cinnoxycam)、テノキシカムおよびそれらの組合せから選択され得る。

20

【0261】

抗血栓剤/抗再狭窄剤を送達するように操作された血小板は、血管形成手順および血栓溶解手順の間に使用され得る。

【0262】

ある特定の実施形態では、操作された血小板は、アテローム動脈硬化症の重症度を予防するまたは低減させるために使用され得、1種または複数の外因性抗アテローム動脈硬化症剤(即ち、アテローム動脈硬化性病変を低減させるまたは形成を予防する薬剤)を含み得、以下を含み得る:天然生成物を含む抗増殖/抗有糸分裂剤、例えばピンカアルカロイド(即ち、ピンラスチン、ピンクリスチンおよびビノレルピン)、パクリタキセル、エピポドフィロトキシン(epididipodophyllotoxin)(即ち、エトポシド、テニポシド)、抗生物質(ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)ダウノルピシン、ドキシソルピシンおよびイダルピシン)、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン(ミスラマイシン)およびマイトマイシン、酵素(L-アスパラギンを全身的に代謝し、それ自身のアスパラギンを合成する能力を有さない細胞を取り除く、L-アスパラギナーゼ);抗増殖/抗有糸分裂アルキル化剤、例えばナイトロジエンマスタード(メクロレタミン、シクロホスファミドおよびアナログ、メルファラン、クロラムブシル)、エチレンイミンおよびメチルメラミン(ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ)、スルホン酸アルキル-ブスルファン、ニトロソウレア(nirtosourea)(カルムスチン(BCNU)およびアナログ、ストレプトゾシン)、トラゼン(trazene)-ダカルバジン(dacarbazine)(DTIC);抗増殖/抗有糸分裂代謝拮抗薬、例えば葉酸アナログ(メトトレキサート)、ピリミジンアナログ(フルオロウラシル、フロクスウリジンおよびシタラビン)、プリンアナログおよび関連のインヒビター(メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチンおよび2-クロロデオキシアデノシン{クラドリピン});白金配位錯体(シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトタン、アミノグルテチミド;ホルモン(即ち、エストロゲン);血栓溶解剤(例えば、組織プラスミノゲン活性化因子、ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼ)、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ;抗遊走薬(antimigratory);抗分泌薬(antisecretory)(ブレフェルジン(brevealdin));抗炎症薬:例えば副腎皮質ステロイド(コルチゾール、コルチゾン、フルドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、6a-メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、ベタメタゾンおよび

30

40

50

デキサメタゾン)、非ステロイド性薬剤(サリチル酸誘導体、即ちアスピリン;パラ-アミノフェノール誘導体、即ちアセトアミノフェン;インドールおよびインデン酢酸(インドメタシン、スリンダクおよびエトドラク(etodalac))、ヘテロアリール酢酸(トルメチン、ジクロフェナクおよびケトロラク)、アリールプロピオン酸(イブプロフェンおよび誘導体)、アントラニル酸(メフェナム酸およびメクロフェナム酸)、エノール酸(ピロキシカム、テノキシカム、フェニルブタゾンおよびオキシフェントラゾン(oxyphenhatrazone))、ナブメトン、金化合物(オーラノフィン、オーロチオグルコース、金チオリンゴ酸ナトリウム);免疫抑制薬:(シクロスポリン、タクロリムス(FK-506)、シロリムス(ラパマイシン)、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル);血管新生剤:血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF);アンジオテンシン受容体ブロッカー;一酸化窒素供与体;アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびそれらの組合せ;細胞周期インヒビター、mTORインヒビターおよび増殖因子受容体シグナル伝達キナーゼインヒビター;レチノイド(retenoid);サイクリン/CDKインヒビター;HMG補酵素レダクターゼインヒビター(スタチン);ならびにプロテアーゼインヒビター。

【0263】

ある特定の実施形態では、操作された血小板は、再狭窄の重症度を予防するまたは低減させるために使用され得、活性剤として使用される、1種または複数の外因性抗増殖物質、消炎薬ならびに抗血栓化合物を含み得る。再狭窄に対する例示的な活性な活性剤には、以下が含まれる:シロリムス、エベロリムス、ソマトスタチン、タクロリムス、ロキシスロマイシン、ズナイマイシン(dunaimycin)、アスコマイシン、バフィロマイシン、エリスロマイシン、ミデカマイシン、ジョサマイシン、コンカナマイシン、クラリスロマイシン、トロレアンドマイシン、フォリマイシン(folimycin)、セリバスタチン、シンバスタチン、ロバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ピタバスタチン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン、エトボシド(etoboside)、テニボシド、ニムスチン、カルムスチン、ロムスチン、シクロホスファミド、4-ヒドロキシオキシシクロホスファミド、エストラムスチン、メルファラン、イホスファミド、トロホスファミド(tropfosfamide)、クロラムブシル、ベンダムスチン、ダカルバジン、ブスルファン、プロカルバジン、トレオスルファン、テモゾロミド(tremozolomide)、チオテパ、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、アクラルピシン、エビルピシン、ミトキサントロン、イダルピシン、プレオマイシン、マイトマイシン、ダクチノマイシン、メトトレキサート、フルダラビン、フルダラビン-5'-ジヒドロゲンホスフェート、クラドリピン、メルカプトプリン、チオグアニン、シタラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、カペシタピン、ドセタキセル、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、アムサクリン、イリノテカン、トポテカン、ヒドロキシカルバミド、ミルテホシン、ペントスタチン、アルデスロイキン、トレチノイン、アスパラギナーゼ、ペグアスパラーゼ(pegasparsase)、アナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、ホルメスタン、アミノグルテチミド(aminoglutethemide)、アドリアマイシン、アジスロマイシン、スピラマイシン、セファランチン(cepharantin)、smc増殖インヒビター-2w、エポチロンAおよびB、ミトキサントロン、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル(mycophenolatmofetil)、c-myc-アンチセンス、b-myc-アンチセンス、ベツリン酸、カンプトテシン、ラパコール、ラパコン、ポドフィロトキシン、ベツリン、ポドフィリン酸(podophyllinic acid)2-エチルヒドラジド、モルグラモスチム、ペグインターフェロン-2b、レノグラスチム;フィルグラスチム、マクロゴール、ダカルバジン、バシリキシマブ、ダクリズマブ、セレクチン、サイトカインアンタゴニスト、CETPインヒビター、カドヘリン、サイトカインインヒビター、COX-2インヒビター、NF- κ B、アンジオペプチン(angiopeptin)、シプロフロキサシン、カンプトテシン、フルロブラスチン(fluroblastin)、筋肉細胞の増殖を阻害するモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体、bFGFアンタゴニスト、プロブコール、プロスタグランジン、1,11-ジメトキシカンチン-6-オン、1-ヒドロキシ-11-メトキシカンチン-6-オン、スコポレクチン(scopolectin)、コルヒチン、NO供与体、四硝酸ペンタエリスリトール、シンドノエイミン(syndnoeimine)、S-ニトロソ誘導体、タモキシフェン、スタウロスポリン、
 -エストラジオール、
 -エストラジオール、エストリオール、エストロン、エチニルエストラジオール、ホスフェストロール、メドロキシプロゲステロン、シビオン酸エストラジオール、安息香酸エストラジオール、トラニラスト、カメバカウリン(kamebakaurin)および他のテルペノイド、これはがんの治療に適用される、ベラパミル、チロシンキナーゼインヒビター、チルホスチン、シクロスポリンA、パクリタキセルおよびその誘導体、バッカチン、タキソテール、ならびに他の合成により取得されたおよびネイティブ供給源から取得された亜酸化炭素(MCS)の大環状オリゴマーならびにそれらの誘導体、モフェブタゾン、アセメタシン、ジクロフェナク、ロナゾラク、ダブソン、o-カルバモイルフェノキシ酢酸、リドカイン、ケトプロフェン、メフェナム酸、ピロキシカム、メロキシカム、リン酸クロロキチン、ペニシラミン、ヒドロキシクロロキチン、オーラノフィン、金チオリンゴ酸ナトリウム、オキサセブロール、セレコキシブ、
 -シトステリン(-sitosterin)、アデメチオニン、ミルテカイン(myrtecaine)、ポリドカノール、ノニバミド(nonivamide)、レボメントール、ベンゾカイン、エスチン、エリプチシン、Calbiochem D-24851、コルセミド、サイトカラシンA~E、インダノシン(indanocine)、ノコダゾール(nocadazole)、S-100タンパク質、バシトラシン、ピトロネクチン受容体アンタゴニスト、アゼラスチン、グアニリル(guanidyl)シクラーゼ刺激因子 金属プロテイナーゼ-1および-2の組織インヒビター、遊離核酸、ウイルストランスミッター中に組み込まれた核酸、DNAおよびRNA断片、プラスミノゲン(plaminogen)活性化因子インヒビター-1、プラスミノゲン活性化因子インヒビター-2、アンチセンスオリゴヌクレオチド、VEGFインヒビター、IGF-1、抗生物質、抗血栓薬、アルガトロバン、アスピリン、アブキシマブ、合成アンチトロンピン、ビパリルジン、クマジン、エノキサパリン(enoxaparin)、脱硫酸化およびN-再アセチル化ヘパリン、組織プラスミノゲン活性化因子、GpIIb/IIIa血小板膜受容体、第Xa因子インヒビター抗体、ヒルジン、r-ヒルジン、PPACK、プロタミン、プロウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、ワルファリン、ウロキナーゼ、血管拡張薬、ジピラミドール(dipyramidole)、トラビジル、ニトロプルシド、PDGFアンタゴニスト、トリアゾロピリミジンおよびセラミン(seramin)、ACEインヒビター、カプトプリル、シラザプリル、リシノプリル、エナラプリル、ロサルタン、チオプロテアーゼインヒビター、プロスタサイクリン、バピプロスト、インターフェロン、
 および、ヒスタミンアンタゴニスト、セロトニンブロッカー、アポトーシスインヒビター、アポトーシス調節因子、p65 NF-
 . B およびBcl-xLアンチセンスオリゴヌクレオチド、ハロフジノン、ニフェジピン、トコフェロール、トラニラスト(tranirast)、モルシドミン、茶ポリフェノール、没食子酸エピカテキン、没食子酸エピガロカテキン、ボスウェル酸およびその誘導体、レフルノミド、アナキンラ、エタネルセプト、スルファサラジン、エトボシド、ジクロキサシリン、テトラサイクリン、トリアムシノロン、ムタマイシン(mutamycin)、プロカインイミド(procainimid)、レチノイン酸、キニジン、ジソピリミド(disopyrimide)、フレカイニド、プロバフェノン、ソタロール(sotalol)、アミドロロン(amidorone)、天然および合成により取得されたステロイド、ブリオフィリン(bryophyllin)A、イノトジオール(inotodiol)、マキノシド(maquiroside)A、ガラキノシド(ghalakinoside)、マンソニン(mansonine)、ストレブロシド(streblósíde)、ヒドロコルチゾン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、フェノプロフェン(fenopofen)、イブプロフェン、インドメタシン、ナプロキセン、フェニルブタゾン、抗ウイルス剤、抗真菌薬、抗原虫剤、天然テルペノイド、ヒポカエスクリン(hip

10

20

30

40

50

p o c a e s c u l i n)、バrintゲノール - C 2 1 - アンゲレート (b a r r i n g
 t o g e n o l - C 2 1 - a n g e l a t e)、1 4 - デヒドロアグロスタチン (1
 4 - d e h y d r o a g r o s t i s t a c h i n)、アグロスケリン (a g r o s k e
 r i n)、アグロスタチン (a g r o s t i s t a c h i n)、1 7 - ヒドロキシア
 グロスタチン、オバトジオリド (o v a t o d i o l i d)、4 , 7 - オキシシクロ
 アニソメリック酸 (4 , 7 - o x y c y c l o a n i s o m e l i c a c i d)、バツ
 カリノイド (b a c c h a r i n o i d) B 1、B 2、B 3 および B 7、ツベイモシド (10
 t u b e i m o s i d e)、ブルセアノール (b r u c e a n o l) A、B および C、ブル
 セアンチノシド (b r u c e a n t i n o s i d e) C、ヤダンジオシド (y a d a n
 z i o s i d e) N および P、イソデオキシエレファントピン (i s o d e o x y e l e
 p h a n t o p i n)、トメンファントピン (t o m e n p h a n t o p i n) A および
 B、コロナリン (c o r o n a r i n) A、B、C および D、ウルソール酸、ヒプタチン
 酸 (h y p t a t i c a c i d) A、ゼオリン (z e o r i n)、イソイリドゲルマナ
 ール (i s o - i r i d o g e r m a n a l)、メイテンフォリオール (m a y t e n f
 o l i o l)、エフサンチン (e f f u s a n t i n) A、エクシサニン (e x c i s a
 n i n) A および B、ロンギカウリン (l o n g i k a u r i n) B、スカルポネアチン
 (s c u l p o n e a t i n) C、カメバウニン (k a m e b a u n i n)、ロイカメニ
 ン (l e u k a m e n i n) A および B、1 3 , 1 8 - デヒドロ - 6 - - セネシオイル
 オキシカパリン (1 3 , 1 8 - d e h y d r o - 6 - - s e n e c i o y l o x y c h
 a p a r r i n)、タキサマイリン (t a x a m a i r i n) A および B、レジェニロー
 ル (r e g e n i l o l)、トリプトライド、シマリン、アボシマリン、アリストロキア
 酸、アノプテリン (a n o p t e r i n)、ヒドロキシアノプテリン、アネモニン、プロ
 トアネモニン、ベルベリン、塩化ケリブリン (c h e l i b u r i n c h l o r i d e
)、シクトキシン (c i c t o x i n)、シノコクリン (s i n o c o c u l i n e)、
 ボンブレスタチン (b o m b r e s t a t i n) A および B、クドライソフラボン (c u
 d r a i s o f l a v o n e) A、クルクミン、ジヒドロニチジン (d i h y d r o n i
 t i d i n e)、塩化ニチジン (n i t i d i n e c h l o r i d e)、1 2 - - ヒ
 ドロキシプレグナジエン - 3 , 2 0 - ジオン、ピロボール、ギンコール、ギンコール酸、
 ヘレナリン、インジシン、インジシン - N - オキシド、ラシオカルピン (l a s i o c a
 r p i n e)、イノトジオール、グリコシド 1 a、ポドフィロトキシン、ジュスチシジン
 (j u s t i c i d i n) A および B、ラレアチン (l a r r e a t i n)、マロテリン
 (m a l l o t e r i n)、マロトクロマノール (m a l l o t o c h r o m a n o l)
 、イソブチリルマロトクロマノール、マキロシド A、マルカンチン A、メイタンシン、リ
 コリジシン (l y c o r i d i c i n)、マルゲチン (m a r g e t i n e)、パンクラ
 チスタチン、リリオデニン、ビスパルテノリジン (b i s p a r t h e n o l i d i n e
)、オキソウシンスニン (o x o u s h i n s u n i n e)、アリストラクタム (a r i
 s t o l a c t a m) - A I I、ビスパルテノリジン、ペリプロコシド (p e r i p l o
 c o s i d e) A、ガラキノシド、ウルソール酸、デオキシブソロスベルミン (d e o x
 y p s o r o s p e r m i n)、サイコルビン (p s y c o r u b i n)、リシン A、サ
 ンギナリン、マヌーコムギ酸 (m a n w u w h e a t a c i d)、メチルソルビフォ
 リン (m e t h y l s o r b i f o l i n)、スファテリアクロメン (s p h a t h e l
 i a c h r o m e n)、
 スチゾフィリン (s t i z o p h y l l i n)、マンソニン、ストレプロシド、アカゲリ
 ン (a k a g e r i n e)、ジヒドロウサンバレンシン (d i h y d r o u s a m b a r
 a e n s i n e)、ヒドロキシウサンバリン (h y d r o x y u s a m b a r i n e)、
 ストリクノペンタミン (s t r y c h n o p e n t a m i n e)、ストリクノフィリン (30
 s t r y c h n o p h y l l i n e)、ウサンバリン (u s a m b a r i n e)、ウサン
 バレンシン (u s a m b a r e n s i n e)、ベルベリン、リリオデニン、オキソウシン
 スニン、ダフノレチン (d a p h n o r e t i n)、ラリシレシノール、メトキシラリシ
 レシノール、シリンガレシノール、ウンベリフェロン、アフロモソン (a f r o m o s o
 40
 50

n)、アセチルビスミオン(acetylvismione)B、デスアセチルビスミオン(desacetylvismione)A、またはビスミオン(vismione)AおよびB。

【0264】

なお他の実施形態では、操作された血小板は、固形腫瘍の処置の一環として使用され得る。固形腫瘍は、血小板活性化が可能な血栓形成促進性環境を生成する。最近の知見は、活性化された血小板が、腫瘍出血を予防するという点において、腫瘍脈管恒常性の重要な調節因子であることを示している。驚くべきことに、この効果は、血栓を形成する血小板の能力からは独立しており、その代り、その顆粒内容物の分泌に依存する。したがって、抗腫瘍剤および/または抗血管新生剤の放出を標的化する血小板分泌活性を使用することは、腫瘍細胞を特異的に死滅させるおよび/または腫瘍血管系を不安定化させるためのアプローチの代表となる。ある特定の好ましい実施形態では、操作された血小板には、抗血管新生剤および/または腫瘍脈管構造の破壊を引き起こす薬剤が充填され得る。

10

【0265】

さらに例示するために、操作された血小板には、(a)アルキル化剤、例えばメクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン(melphaan)、クロラムブシル、ヘキサメチルメラミン、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジンなど；(b)代謝拮抗薬、例えばメトトレキサート、5-FU、FudR、シタラビン、6MP、チオグアニン、ペントスタチンなど；(c)天然生成物、例えばタキソール、ビンブラスチン、ピンクリスチン、エトポシド、テニポシドなど；(d)抗生物質、例えばダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシンcなど；(e)酵素、例えばL-アスパラギナーゼ、ヘパリナーゼ、コンドロイチナーゼなど；(f)インターフェロンおよびインターロイキン、例えばインターフェロン-、インターフェロン-、腫瘍壊死因子など；(g)白金配位錯体、例えばシスプラチン、カルボプラチンまたはそれらの誘導体；ならびに(h)その他種々の薬剤、例えばミトキサントロン、ビスクロロエチルニトロソウレア、ヒドロキシウレア、クロロエチル-シクロヘキシルニトロソウレア、プレドニゾン、ジエチルスチルベストロール、メドロキシプロゲステロン、タモキシフェン、ミトタン、プロカルバジン、アミノグルテチミド、プロゲステン、アンドロゲン、抗アンドロゲン薬(antiandrogen)、リユープロリドなどが含まれ得る、抗新生物または化学療法剤などの抗がん剤が充填され得る。

20

30

【0266】

例示的な一実施形態では、操作された血小板は、VEGFのインヒビター(即ち、VEGFアンタゴニスト)として作用する組換えタンパク質を含む。かかるタンパク質には、抗体および抗体アナログ(例えば、単鎖抗体、モノボディ(monobody)、抗原結合部位など)、例えば、ラニズマブ、VEGF受容体由来のリガンド結合ドメインを含む可溶性タンパク質であるVEGF-トラップ、例えばアフリベルセプト(これらは、VEGFまたはVEGF受容体のいずれかに結合し、受容体活性化を遮断する)が含まれる。好ましい実施形態では、ポリペプチドVEGFアンタゴニストは、血小板の顆粒、特に-顆粒中に取り込まれ血小板の活性化の際に放出される様式で、MK細胞中で発現される。

40

【0267】

しかし、操作された血小板組成物の好ましい使用は固形および骨髄の両方の腫瘍治療における使用であり、同じ原理が他の異常な血管形成ベースの病理の処置において具体化される。他の病理には、関節炎、網膜症、乾癬、固形腫瘍、良性腫瘍、カポジ肉腫および血液学的悪性疾患が含まれ得る。これは、上に記載した薬物を含み得る；または例えば関節炎の場合、疾患改変薬物(DMARD)、非ステロイド性抗炎症薬物(NSAIDs)、コルヒチン、メトトレキサートなどから構成され得る。

【0268】

例示的な実施形態では、操作された血小板には、アシピシン、アクラルピシン、アコダ

50

ザール (acodazole)、アクロニシン (acronycine)、アドゼレシン、アラノシン、アルデスロイキン、アロプリノールナトリウム、アルトレタミン、アミノグルテチミド、アモナフィド、アンブリジェン、アムサクリン、アンドロゲン、アンゲイジン、アフィジコリングリシネート、アサレイ (asaley)、アスパラギナーゼ、5-アザシチジン、アザチオプリン、カルメット・ゲラン桿菌 (BCG)、ベーカーズアンチフォール (Baker's Antifol) (可溶性)、ベータ-2'-デオキシチオグアノシン、ピサントレンHCl、硫酸ブレオマイシン、プスルファン、プチオニンスルホキシミン、BWA 773U82、BW 502U83.HCl、BW 7U85メシレート、セラセミド (ceracemide)、カルベチマー、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、クロロキノキサリン-スルホンアミド、クロロゾトシン、クロモマイシンA3、シスプラチン、クラドリピン、コルチコステロイド、Corynebacterium parvum、CPT-11、クリスナトール、シクロシチジン、シクロホスファミド、シタラピン、シテンベナ (cytembena)、ダビスマレアート (dabismaleate)、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシンHCl、デアザウリジン、デクスラゾキサシ、ジアンヒドロガラクチトール、ジアジコン (diaziquone)、ジブロモダルシトール、ジデムニンB、ジエチルジチオカルバメート、ジグリコアルデヒド、ジヒドロ-5-アザシチジン、ドキシソルピシン、エキノマイシン、エダトレキセート、エデルフォシン (edelfosine)、エフロルニチン、Elliott溶液、エルサミトルシン (elsamitrucin)、エビルピシン、エソルピシン、リン酸エストラムスチン、エストロゲン、エタニダゾール、エチオフォス (ethiofos)、エトポシド、ファドラゾール (fadrazole)、ファザラビン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナステリド、フラボン酢酸、フロクスウリジン、リン酸フルダラビン、5-フルオロウラシル、フルオゾール (Fluosol.)、フルタミド、硝酸ガリウム、ゲムシタピン、酢酸ゴセレリン、ヘプスルファミン (hepsulfam)、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ホモハリントニン、硫酸ヒドラジン、4-ヒドロキシアンドロステンジオン、ヒドロキシウレア (hydrozyurea)、イダルピシンHCl、イホスファミド、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、インターロイキン-1アルファおよびベータ、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-6、4-イポメアノール (4-ipomeanol)、イプロプラチン、イソトレチノイン、ロイコボリンカルシウム、酢酸リュープロリド、レバミゾール、リボソームダウノルピシン、リボソーム封入ドキシソルピシン、ロムスチン、ロニダミン、メイタンシン、メクロレタミン塩酸塩、メルファラン、メノガリル、メルバロン (merbarone)、6-メルカプトプリン、メスナ、カルメット・ゲラン桿菌のメタノール抽出残渣、メトトレキサート、N-メチルホルムアミド、ミフェプリストン、ミトグアゾン、マイトマイシン-C、ミトタン、ミトキサントロン塩酸塩、単球/マクロファージコロニー刺激因子、ナビロン、ナフォキシジン、ネオカルチノスタチン、酢酸オクトレオチド、オルマプラチン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パラ (pala)、ペントスタチン、ピペラジンジオン、ピボプロマン、ピラルピシン、ピリトレキシム、ピロキサントロン塩酸塩、PIXY-321、プリカマイシン、ポルフィマーナトリウム、プレドニムスチン、プロカルバジン、プロゲスチン、ピラゾフリン (pyrazofurin)、ラゾキサシ、サルグラモスチム、セムスチン、スピロゲルマニウム、スピロムスチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌル、スラミンナトリウム、タモキシフェン、タキソテール、テガフル、テニボシド、テレフタルアミジン、テロキシロン (teroxirone)、チオグアニン、チオテパ、チミジン注射、チアゾフリン、トポテカン、トレミフェン、トレチノイン、トリフロペラジン塩酸塩、トリフルリジン、トリメトトレキサート、腫瘍壊死因子、ウラシルマスタード、硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン、ビンゾリジン (vinzolidine)、Yoshi 864、ゾルピシン、およびそれらの混合物から選択され得る抗がん薬などが充填され得る。

10

20

30

40

50

操作された血小板は、腫瘍細胞に対する免疫活性化を促進するために、1種または複数の免疫刺激剤を含み得、したがって、*tol1*様受容体(TLR)アゴニスト、TLR4、TLR7、TLR9、N-アセチルムラミル-L-アラニン-D-イソグルタミン(MDP)、リポポリサッカリド(LPS)、遺伝子改変および/または分解されたLPS、ミョウバン、グルカン、コロニー刺激因子、EPO、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、ペグ化G-CSF、SCF、IL-3、IL6、PIXY 321、インターフェロン、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、インターロイキン、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、MHCクラスII結合性ペプチド、サポニン、QS21、非メチル化CpG配列、I-メチルトリプトファン、アルギナーゼインヒビター、シクロホスファミド、もしくは免疫抑制機能を遮断する抗体、抗CTLA4抗体、またはそれらの2つ以上の混合物などの薬剤を含み得る。

10

【0270】

特定の例では、特に、小分子薬物および/または核酸を含む操作された血小板を創出するために、活性剤(複数可)は、分化経路に沿って巨核球、前血小板もしくは他の細胞のための培養培地に添加することによって、血小板中に導入され得るか、または血小板がインキュベートされる培地/溶液中に提供され得る。

【0271】

他の例では、特に、タンパク質治療薬を含む操作された血小板を創出するために、活性剤(複数可)は、分化経路に沿って巨核球、前血小板または他の細胞によって組換え発現され得、したがって、得られる血小板中に存在し得る。好ましい実施形態では、この組換えタンパク質は、血小板顆粒(特に α -顆粒)中に詰め入れられる。第VII因子などの特定の組換えタンパク質は、顆粒中に自動的に輸送され、さもなければ、その融合タンパク質を血小板顆粒に輸送する顆粒標的化部分を含む融合タンパク質の使用を必要とし得る。例示的な顆粒標的化部分は、血小板因子4(PF4)、または得られた融合タンパク質を血小板顆粒に輸送するのに十分なその一部分である。例えば、Briguet-Laugierら、*J Thromb Haemost*、2004年2巻(12号):2231~40頁;El Golliら、*J Biol Chem*、2005年280巻(34号):30329~35頁を参照のこと。

20

【0272】

さらなる顆粒輸送部分を必要としない組換えタンパク質の例示的な一実施形態は、第VII因子である。本発明は、その α -顆粒中に貯蔵された第VII因子を有するように操作されており、創傷の部位などにおいて活性化の際にその組換えタンパク質を放出する血小板を企図する。血友病Aは、第VII因子(FVII)遺伝子における欠損によって引き起こされ、およそ1:5000の雄性個体が罹患する、X染色体連鎖した出血障害である。現行の処置は、プールされたFVII濃縮物または組換え生成物を使用することによる因子置換からなる。これらの生成物の制限には、その高価さ、および厳密な予防レジメンにおいて使用される場合を除きこれらの生成物が長期後遺症を予防する限定的な能力が含まれる。血友病Aを有する集団の約10%は、注入生成物に対するインヒビターを発達させ、代替的な、さらに高価で有効性が低い形態の治療を必要とする。血液由来置換生成物からの感染性合併症に関する懸念は、新たな調製技術を用いても、問題であり続けている。処置の高い費用、治療の感染性合併症および免疫性合併症、ならびに血友病Aの長期合併症を予防する際の制限は、血友病Aの処置のための血小板送達戦略を、治療の魅力的な代替的形態にしている。

30

40

【0273】

さらに例示するために、Yarovoiら、*Blood*、2003年102巻(12号):4007頁は、本発明の第VII因子操作された血小板を生成するために使用され得る発現構築物を記載している。特に、(ヒト)第VII因子のコード配列は、巨核球特異的糖タンパク質Ib(GPIb)近位プロモーター領域の調節的制御下に配置され得る。Fujitaら、*Blood*、1998年;92巻:488~495頁を参照のこと。発生中の巨核球において異所的に発現された第VII因子は α -顆粒中に貯蔵さ

50

れ、これはM Kによって生成される血小板内に含まれ、次いで活性化の際に循環血小板から放出される。

【0274】

医薬調製物

【0275】

本開示の例示的な組成物は、発熱物質を含まない、または発熱物質を本質的に含まない、および病原体を含まないなどの、ヒト患者を処置する際の使用に適した製剤であり得る。投与されるとき、本開示における使用のための医薬調製物は、発熱物質を含まず、病原体を含まず、生理学的に許容される形態であり得る。

【0276】

本開示のさらなる例示的な組成物は照射され得る（例えば、投与の前に）。例えば、この細胞は、ガンマ線照射で照射され得る（例えばおよそ25 Gyの線量で）。例えば、この組成物は、組成物中に含まれる任意の有核真核生物細胞および/または病原体を有糸分裂的に不活性化するのに十分な線量で、例えば、この組成物の中に含まれ得る任意の多能性幹細胞、M K、白血球および/またはP V E - H Eを有糸分裂的に不活性化するのに十分な線量で、照射され得る。

【0277】

血小板の送達

【0278】

それらの製造のための種々のメンブレン、デバイスおよび方法が、細胞およびそれらの分泌された生成物をヒト身体中に移植する手段として提案および評価されてきており、特許文献中でバイオ人工移植片として集合的に言及される。典型的には、これらは、操作の一般的原則を共有する、即ち、細胞は、半透膜によって仕切られたチャンバーの内側に隔離される。長期細胞生存度は、隣接する脈管化した組織との、栄養素および廃棄生成物の持続的な拡散性の交換に依存すると考えられる（米国特許第6,372,244号、米国特許第6,113,938号、米国特許第6,322,804号、米国特許第4,911,717号、米国特許第5,855,613号、米国特許第6,083,523号、米国特許第5,916,554号、米国特許第6,511,473号、米国特許第6,485,723号）。種々の組織区画への細胞の移植について科学文献および特許文献中に記載されるデバイスには、以下を含む3つの主要な型が存在する：平面ディスク設計、中空繊維ベースの設計および幾何学的立体ベースの設計。これらのデバイスは、典型的には、体腔中に配置されるように設計される。

【0279】

定義

【0280】

「胚様体」とは、非付着条件下で、例えば、低接着性基材上または「懸滴」中で多能性細胞を培養することによって形成され得る、多能性細胞（例えば、i P S CまたはE S C）の凝集塊またはクラスターを指す。これらの培養において、多能性細胞は、胚様体と命名された細胞の凝集塊またはクラスターを形成し得る。その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、I t s k o v i t z - E l d o r ら、M o l M e d . 2000年2月；6巻（2号）：88～95頁を参照のこと。典型的には、胚様体は、多能性細胞の固体凝集塊またはクラスターとして最初に形成し、時間と共に、胚様体のうちいくつかは、流体で満たされた腔を含むようになり、文献中で、後者の前者は「単純な」E Bとして言及され、後者は「嚢胞性」胚様体として言及される。

【0281】

用語「胚性幹細胞」（E S細胞）は、当技術分野で使用されるように本明細書中で使用される。この用語は、ヒト胚盤胞または桑実胚の内部細胞塊から誘導された細胞を含み、細胞株として連続的に継代されたものを含む。E S細胞は、卵細胞と精子との受精から、ならびにD N A、核移植、単為生殖を使用して、またはH L A領域中にホモ接合性を有するE S細胞を生成するための手段によって、誘導され得る。E S細胞はまた、細胞を生成

10

20

30

40

50

するための、精子および卵細胞の融合、核移植、単為生殖、雄性発生、またはクロマチンの再プログラミングおよび再プログラミングされたクロマチンの原形質膜中への引き続く取り込みによって生成された、接合体、卵割球または胚盤胞段階の哺乳動物胚から誘導された細胞である。胚性幹細胞は、その供給源またはそれらを生成するために使用される特定の方法に関わらず、(i) 3種全ての胚葉の細胞へと分化する能力、(ii) 少なくともOct 4およびアルカリホスファターゼの発現、ならびに(iii) 免疫不全動物中に移植した場合に奇形腫を生成する能力、に基づいて同定され得る。本発明の実施形態において使用され得る胚性幹細胞には、ヒトES細胞(「ESC」または「hES細胞」)、例えばMA01、MA09、ACT-4、No. 3、H1、H7、H9、H14およびACT30胚性幹細胞が含まれるがこれらに限定されない。さらなる例示的な細胞株には、NED1、NED2、NED3、NED4、NED5およびNED7が含まれる。NIH Human Embryonic Stem Cell Registryもまた参照のこと。使用され得る例示的なヒト胚性幹細胞株は、MA09細胞である。MA09細胞の単離および調製は、Klimanskayaら(2006年)「Human Embryonic Stem Cell lines Derived from Single Blastomeres」Nature 444巻: 481~485頁中に以前に記載された。本開示に従って使用され得る他のES細胞の単離および調製もまた、Chungら(2008年)「Human Embryonic Stem Cell Line Generated Without Embryo Destruction」、Cell Stem Cell、2巻: 113~117頁中に以前に記載されている。本発明の例示的な実施形態に従って使用されるヒトES細胞は、GMP標準に従って誘導および維持され得る。

10

20

【0282】

本明細書で使用する場合、用語「多能性幹細胞」は、その多能性幹細胞が誘導される方法に関わらず、胚性幹細胞、胚由来幹細胞および人工多能性幹細胞を含む。多能性幹細胞は、以下である幹細胞として機能的に定義される: (a) 免疫不全(SCID)マウス中に移植した場合に奇形腫を誘発することが可能である; (b) 3種全ての胚葉の細胞型へと分化することが可能である(例えば、外胚葉、中胚葉および内胚葉の細胞型に分化することができる); および(c) 胚性幹細胞の1つまたは複数のマーカーを発現する(例えば、Oct 4、アルカリホスファターゼ、SSEA-3表面抗原、SSEA-4表面抗原、nanog、TRA-1-60、TRA-1-81、SOX2、REX1などを発現する)。ある特定の実施形態では、多能性幹細胞は、OCT-4、アルカリホスファターゼ、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60およびTRA-1-81からなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを発現する。例示的な多能性幹細胞は、例えば当技術分野で公知の方法を使用して生成され得る。例示的な多能性幹細胞には、胚盤胞段階の胚のICMから誘導された胚性幹細胞、ならびに卵割段階または桑実胚段階の胚の1つまたは複数の卵割球から(任意選択で胚の残部を破壊することなく)誘導された胚性幹細胞が含まれる。かかる胚性幹細胞は、受精によって、または体細胞核移植(SCNT)、単為生殖および雄性発生を含む無性生殖的手段によって生成された胚性材料から生成され得る。さらなる例示的な多能性幹細胞には、因子(本明細書で再プログラミング因子と称される)の組合せを発現させることによって体細胞を再プログラミングすることによって生成された人工多能性幹細胞(iPSC)が含まれる。iPSCは、胎仔、出生後、新生仔、若年または成体の体細胞を使用して生成され得る。

30

40

【0283】

ある特定の実施形態では、体細胞を多能性幹細胞へと再プログラミングするために使用され得る因子には、例えば、Oct 4(時にOct 3/4と呼ばれる)、Sox2、c-MycおよびKlf4の組合せが含まれる。他の実施形態では、体細胞を多能性幹細胞へと再プログラミングするために使用され得る因子には、例えば、Oct 4、Sox2、NanogおよびLin28の組合せが含まれる。ある特定の実施形態では、少なくとも2種の再プログラミング因子が、体細胞を首尾よく再プログラミングするために、体細胞に

50

において発現される。他の実施形態では、少なくとも3種の再プログラミング因子が、体細胞を首尾よく再プログラミングするために、体細胞において発現される。他の実施形態では、少なくとも4種の再プログラミング因子が、体細胞を首尾よく再プログラミングするために、体細胞において発現される。他の実施形態では、さらなる再プログラミング因子が同定され、体細胞を多能性幹細胞へと再プログラミングするために、単独で、または1種もしくは複数の公知の再プログラミング因子と組み合わせて使用される。人工多能性幹細胞は、機能的に定義され、これには、種々の方法（組み込みベクター、非組み込みベクター、化学的手段など）のいずれかを使用して再プログラミングされた細胞が含まれる。多能性幹細胞は、寿命、有効性、ホーミングを増加させるため、同種免疫応答を予防もしくは低減させるため、またはかかる多能性細胞から分化した細胞（例えば、血小板）中に所望の因子を送達するために、遺伝子改変または他の方法で改変され得る。

10

【0284】

「人工多能性幹細胞」（iPS細胞またはiPSC）は、体細胞中への再プログラミング因子のタンパク質形質導入によって生成され得る。ある特定の実施形態では、少なくとも2種の再プログラミングタンパク質が、体細胞を首尾よく再プログラミングするために、体細胞中に形質導入される。他の実施形態では、少なくとも3種の再プログラミングタンパク質が、体細胞を首尾よく再プログラミングするために、体細胞中に形質導入される。他の実施形態では、少なくとも4種の再プログラミングタンパク質が、体細胞を首尾よく再プログラミングするために、体細胞中に形質導入される。

20

【0285】

多能性幹細胞は、任意の種由来であり得る。胚性幹細胞は、例えば、マウス、複数の種の非ヒト霊長類、およびヒトにおいて首尾よく誘導されており、胚性幹様細胞は、多数のさらなる種から生成されている。したがって、当業者は、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット）、有蹄動物（ウシ、ヒツジなど）、イヌ（飼いイヌおよび野生のイヌ）、ネコ（飼いネコおよび野生のネコ、例えば、ライオン、トラ、チーター）、ウサギ、ハムスター、スナネズミ、リス、モルモット、ヤギ、ゾウ、パンダ（ジャイアントパンダを含む）、ブタ、アライグマ、ウマ、シマウマ、海洋哺乳動物（イルカ、クジラなど）などが含まれるがこれらに限定されない任意の種から、胚性幹細胞および胚由来幹細胞を生成できる。ある特定の実施形態では、この種は、絶滅危惧種である。ある特定の実施形態では、この種は、現在絶滅した種である。

30

【0286】

同様に、iPS細胞は、任意の種由来であり得る。これらのiPS細胞は、マウスおよびヒトの細胞を使用して首尾よく生成されている。さらに、iPS細胞は、胚性、胎仔、新生仔および成体の組織を使用して首尾よく生成されている。従って、任意の種由来のドナー細胞を使用して、iPS細胞を容易に生成することができる。したがって、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（マウス、ラット）、有蹄動物（ウシ、ヒツジなど）、イヌ（飼いイヌおよび野生のイヌ）、ネコ（飼いネコおよび野生のネコ、例えば、ライオン、トラ、チーター）、ウサギ、ハムスター、ヤギ、ゾウ、パンダ（ジャイアントパンダを含む）、ブタ、アライグマ、ウマ、シマウマ、海洋哺乳動物（イルカ、クジラなど）などが含まれるがこれらに限定されない任意の種から、iPS細胞を生成することができる。ある特定の実施形態では、この種は、絶滅危惧種である。ある特定の実施形態では、この種は、現在絶滅した種である。

40

【0287】

人工多能性幹細胞は、任意の発生段階の事実上任意の体細胞を出発点として使用して生成され得る。例えば、この細胞は、胚、胎仔、新生仔、若年性または成体のドナー由来であり得る。使用され得る例示的な体細胞には、線維芽細胞、例えば、皮膚試料もしくは生検によって取得される皮膚線維芽細胞、滑膜組織由来の滑膜細胞、包皮細胞、頬細胞または肺線維芽細胞が含まれる。皮膚および頬は、適切な細胞の容易に入手可能で容易に取得可能な供給源を提供するが、事実上任意の細胞が使用され得る。ある特定の実施形態では、体細胞は、線維芽細胞ではない。

50

【0288】

人工多能性幹細胞は、体細胞において1種もしくは複数の再プログラミング因子を発現させるまたはかかる1種もしくは複数の再プログラミング因子の発現を誘発することによって生成され得る。この体細胞は、線維芽細胞、例えば、皮膚線維芽細胞、滑膜線維芽細胞もしくは肺線維芽細胞、または非線維芽細胞性体細胞であり得る。この体細胞は、少なくとも1、2、3、4、5種の再プログラミング因子の発現を（例えば、ウイルス形質導入ベクター、組込みベクターまたは非組込みベクターなどを介して）引き起こすこと、および/または少なくとも1、2、3、4、5種の再プログラミング因子との接触を（例えば、タンパク質形質導入ドメイン、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、カチオン性両親媒性物質、脂質二重層含有との融合、界面活性剤透過処理などを使用して）引き起こすことによって、再プログラミングされ得る。再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、NANOG、Lin28、cMycおよびKlf4から選択され得る。再プログラミング因子の発現は、体細胞を、再プログラミング因子の発現を誘発する少なくとも1種の薬剤、例えば有機小分子薬剤と接触させることによって誘発され得る。

10

【0289】

さらなる例示的な多能性幹細胞には、因子（「再プログラミング因子」）の組合せを発現させることまたはかかる因子の組合せの発現を誘発することによって体細胞を再プログラミングすることによって生成された人工多能性幹細胞が含まれる。iPS細胞は、細胞バンクから取得され得る。iPS細胞の作製は、分化した細胞の生成における最初期ステップであり得る。iPS細胞は、組織にマッチした巨核球および血小板を生成することを目的として、特定の患者またはマッチしたドナー由来の材料を使用して特異的に生成され得る。iPSCは、意図したレシピエントにおいて実質的に免疫原性でない細胞から生成され得、例えば、自家細胞からまたは意図したレシピエントに対して組織適合性の細胞から生成され得る。

20

【0290】

体細胞は、再プログラミング因子が（例えば、ウイルスベクター、プラスミドなどを使用して）発現され、その再プログラミング因子の発現が（例えば、有機小分子を使用して）誘発される組み合わせのアプローチを使用しても、再プログラミングされ得る。例えば、再プログラミング因子は、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを使用する感染によって、体細胞において発現され得る。また、再プログラミング因子は、非組込みベクター、例えばエピソームプラスミドを使用して、体細胞において発現され得る。例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、Yura, Science, 2009年5月8日; 324巻(5928号): 797~801頁を参照のこと。再プログラミング因子が非組込みベクターを使用して発現される場合、この因子は、ベクターを用いた体細胞のエレクトロポレーション、トランスフェクションまたは形質転換を使用して、この細胞において発現され得る。例えば、マウス細胞では、組換えウイルスベクターを使用した4種の因子（Oct3/4、Sox2、cmycおよびKlf4）の発現が、体細胞を再プログラミングするために十分である。ヒト細胞では、組換えウイルスベクターを使用した4種の因子（Oct3/4、Sox2、NANOGおよびLin28）の発現が、体細胞を再プログラミングするために十分である。

30

40

【0291】

再プログラミング因子が細胞において発現されると、この細胞は培養され得る。時間と共に、ES特徴を有する細胞が培養皿中に出現する。この細胞は、例えば、ES形態に基づいて、または選択可能もしくは検出可能なマーカーの発現に基づいて、選択および継代培養され得る。この細胞は、ES細胞と似た細胞の培養物を生成するために培養され得る - これらは、推定iPS細胞である。

【0292】

iPS細胞の多能性を確認するために、この細胞は、多能性の1つまたは複数のアッセ

50

イにおいて試験され得る。例えば、この細胞は、ES細胞マーカーの発現について試験され得る；この細胞は、SCIDマウス中に移植した場合に奇形腫を生成する能力について評価され得る；この細胞は、3種全ての胚葉の細胞型を生成するように分化する能力について評価され得る。多能性iPSCが取得されると、これは、巨核球細胞および血小板を生成するために使用され得る。

【0293】

用語「造血性内皮細胞」(PVE-HE)は、本明細書で使用する場合、PECAM1、VE-カドヘリンおよび/またはエンドグリンを発現し得(例えば、PECAM1+VE-Cad+エンドグリン+造血性PVE-HE)、任意選択で、多能性幹細胞から誘導され得る、造血細胞型または内皮細胞型を生じるように分化することが可能な細胞を指す。これらの細胞は、1つまたは複数のマーカーの発現(RNAまたはタンパク質)または発現(RNAまたはタンパク質)の欠如が含まれるがこれらに限定されない多数の構造的および機能的特性に基づいて記述され得る。PVE-HE細胞は、マーカーCD31(PECAM1)の発現を特徴とする。例えば、少なくとも約90%、少なくとも約95%または少なくとも約9付加、免疫蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡の結果は、集団中のPVE-HE細胞の9%がCD31+であり得ることをさらに実証する。PVE-HE細胞は、マーカーCD105(エンドグリン)およびCD144(VE-カドヘリン)もまた発現し得る。例えば、集団中のPVE-HE細胞の少なくとも約70%、約少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または少なくとも約99%は、CD105+、CD144+およびCD31+であり得る。ある特定の実施形態では、PVE-HE細胞は、互いに緩く接着性である。CD31、血小板内皮細胞接着分子-1(PECAM-1)は、内皮細胞前駆体の発生、脈管形成および血管形成についてのマーカーとして使用されてきた。CD31は、成体および胚性の内皮細胞の表面上で恒常的に発現され、内皮細胞細胞間接着部(ここには、最大 10^6 個のPECAM-1分子が濃縮される)の主要な構成要素であり、多くの末梢白血球および血小板上で弱く発現される。

【0294】

例示的な実施形態では、PVE-HEは、以下の特徴のうち1つまたは複数、好ましくは全てを示し得る：(1)顕著な量のCD31+PVE-HE細胞が、PVE-HE分化の開始の72時間後に早くも検出され得る。(2)これは、PVE-HE分化の開始のほぼ120~146時間後において、ピークレベルに達する。(3)CD31+PVE-HE細胞集団は、単離および凍結保存され得る。(3)これらは、ほぼ全ての内皮前駆細胞表面マーカー、例えばCD31、CD105(エンドグリン)、CD144(VE-カドヘリン)を発現する。これらは、CD34、CD309(KDR)およびCD146もまた発現し得る。(4)CD31+PVE-HE細胞の分集団はCXCR4(CD184)もまた発現する。(5)内皮系列の潜在能力が、内皮細胞(EC)特異的培地(例えば、EGM-2またはEndoGro)中でフィブロネクチン上でCD31+PVE-HE細胞を培養して、典型的な内皮形態を有する細胞の単層を得ることによって確認され得る。(6)PVE-HE由来内皮細胞(PVE-HE-EC)は、CD31(細胞-細胞接合部において局在化)を発現するだけでなく、フォン・ウィルブランド因子(vWF)もまた発現し、LDL取り込みが可能である。(7)PVE-HE-ECは、Matrigelの上で培養した場合、3Dネットワーク構造を形成することが可能である。(8)EC特異的培地中でフィブロネクチン上に非常に低密度でプレート形成させた(plating)場合、CD31+PVE-HE細胞は、それらのクローン原性能を裏付ける典型的な内皮形態を有するコロニーを形成することが可能である。(9)芽細胞-コロニー増殖のためのメチルセルロース培地中でプレート形成させた場合、芽細胞コロニーは、CD31+画分からのみ生成され得る。CD31-細胞とは異なり、CD34-およびCD105-は共に、芽細胞コロニーを生成することが可能であり、これは、造血性の能力がCD31画分のみにおいて排他的に維持されることを示唆している。(10)新たに誘導されたPVE-HE-ECは、造血性の潜在能力を維持し、造血系列に有利な条件下で培養した

10

20

30

40

50

場合、造血性細胞を生じる。

【0295】

用語「巨核球系列特異的前駆細胞」(「MLP」)とは、本明細書で使用する場合、少なくとも巨核球系列に傾倒した単核造血幹細胞を指し、これには、臍帯血、骨髄および末梢血中の細胞、ならびに造血幹細胞、ヒト胚性幹細胞から誘導された細胞、および人工多能性幹細胞から誘導された細胞が含まれるがこれらに限定されない。これらの細胞は、1つまたは複数のマーカーの発現(RNAまたはタンパク質)または発現(RNAまたはタンパク質)の欠如が含まれるがこれらに限定されない多数の構造的および機能的特性に基づいて記述され得る。本開示のMLPは、未成熟細胞および成熟細胞の混合物であり得る。成熟MLP対未成熟MLPの百分率は、MLP-誘導および拡大増殖培地(MLP-DEEM、本明細書でAPELとも呼ぶ)(実施例2に記載される)中での培養における時間の長さに基づいて変動し得る。未成熟MLPは、マーカーCD41a、CD31、CD34、CD13の発現、ならびにCD14およびCD42bマーカー発現の欠如を特徴とする。本開示の例示的な方法は、CD13の発現を検出するステップおよび/またはCD13陽性細胞を濃縮もしくは精製するステップを含む方法による、MLPの検出および/または精製を提供する。任意選択で、これらの方法では、CD13の発現は、本明細書に記載される未成熟MLPまたは成熟MLPの1種または複数のさらなるマーカーの発現と組み合わせ、検出され得るおよび/または細胞精製のための基礎として使用され得る。成熟MLPは、マーカーCD41a、CD31、CD34、CD13、CD42bの発現およびCD14発現の欠如を特徴とする。ある特定の実施形態では、フィーダーフリーの培養において生成されたMLPは、半剥離または完全に剥離されていてもよく、培養培地中に浮遊していてもよい。例えば、MLPは、懸濁物中で浮遊し始めたときに、PVE-HEから収集され得る。好ましくは、MLPは、プレート形成しておらず接着されておらず、MK系列以外の系列または非MK系列(例えば、内皮細胞)への分化を容認し得る。MLPは、好ましくは、MKを生成するために、懸濁物中で増殖させられる。任意選択で、MLPは凍結保存され得る。

10

20

【0296】

用語「巨核球」(MK)とは、本明細書で使用する場合、血小板を生じる大きい倍数体の造血細胞、ならびに二倍体であるが血小板を生成することが完全に可能であり得るより小さいMK(これは、主題の方法によって生成され得る)を指す。成熟MKの1つの主要な形態学的特徴は、大きな倍数体核の発達である。成熟MKは、増殖を停止しているが、核内分裂を介してそのDNA含量を増加させ続ける;細胞サイズが並行して増加する。MKの大きな倍数体核、大きな細胞容量および豊富な細胞質は、細胞1個当たり何千もの血小板の生成を可能にする。MKは、1つまたは複数のマーカーの発現(RNAまたはタンパク質)または発現(RNAまたはタンパク質)の欠如が含まれるがこれらに限定されないこれらおよび多数の他の構造的および機能的特性に基づいて記述され得る。成熟MKは、マーカーCD41aおよびCD42bを発現する。成熟MKは、CD61およびCD29もまた発現し得る。例えば、本開示のMKは、好ましくは、血小板を生成することができるという意味において機能的である(例えば、本明細書に記載される条件下で培養した場合に)。例示的な実施形態は、CD29の発現を検出するステップおよびCD29陽性細胞を成熟MKと同定するステップを含む、成熟MKを検出する方法を提供する。さらなる例示的な実施形態は、集団からのCD29陽性細胞の精製を含むMKを精製する方法を提供する(例えば、磁気ビーズサブトラクション、FACS、他の免疫親和性ベースの方法などを使用して)。任意選択で、これらの方法では、CD29の発現は、表1(成熟MKのさらなる例示的な細胞表面マーカー発現を提供する)中に示されたマーカーなどの、成熟MKの1種または複数のさらなるマーカーの発現と組み合わせ、検出され得るおよび/または細胞精製のための基礎として使用され得る。

30

40

【0297】

*in vivo*では、MKは、骨髄中の造血幹細胞先駆細胞から誘導される。これらの多分化能幹細胞は、骨髄類洞中に存在し、それらが受容するシグナルに依存して全ての型

50

の血液細胞を生成することが可能である。MK生成のための主要なシグナルはTPOである。TPOは、骨髄中で最終的なMK表現型に向かう前駆細胞の分化を誘発する。MKは、以下の系列を介して発生する：CFU-ME（多能性造血幹細胞または血球芽細胞）、巨核芽球、前巨核球、巨核球。この細胞は、最終的に巨核芽球段階に達し、分裂する能力を喪失する。しかし、この細胞は、そのDNAを依然として複製でき、発生を続けて、倍数性になる。細胞質は、拡大し続け、DNA相補体は、64Nよりも大きくなるまで増加し得る。

【0298】

この細胞は、分化を完了して成熟巨核球になると、血小板を生成するプロセスを開始する。TPOは、小さい前血小板突起を形成するようにMKを誘発することにおいて役割を果たす。血小板は、MKの細胞質内のこれらの内部膜内に保持される。血小板放出に関して2つの機構が提案されている。1つのシナリオでは、これらの前血小板突起は、爆発的に崩壊して血小板になる。あるいは、この細胞は、血管中に血小板リボンを形成し得る。リボンは、仮足を介して形成され、循環中に血小板を持続的に排出することができる。いずれのシナリオでも、これらの前血小板突起の各々は、崩壊の際に2000～5000個の新たな血小板を生じ得る。全体として、これらの新たに生成された血小板の75%よりも多くが循環中に残留するが、残りは脾臓によって捕捉される。

10

【0299】

用語「血小板」とは、本明細書で使用する場合、血餅の形成をもたらす一次止血の細胞機構に参与する、細胞から誘導された無核の細胞質体を指す。血小板(pla₁telet₂s(thrombocytes))は、直径が2～3µmの小さい不規則な形状の透明な細胞断片であり、これはin vivoでは先駆巨核球(MK)の断片化から誘導される。血小板は、1つまたは複数のマーカーの発現(RNAまたはタンパク質)または発現(RNAまたはタンパク質)の欠如が含まれるがこれらに限定されない多数の構造的および機能的特性に基づいて同定され得る。血小板は、マーカーCD41aおよびCD42bを発現する。血小板は、脈管傷害に応答して組織にかつ互いに接着する。

20

【0300】

用語「機能的血小板」または「機能的である血小板」とは、本明細書で使用する場合、トロンピンによって活性化され、血餅退縮に参与し得る血小板を指す。例示的な実施形態では、血小板が機能的血小板であるかどうかは、動物モデルを使用して決定され得る(例えば実施例4(図12)に記載されるように、例えば、同じ種のものであり得る天然に誘導された血小板との比較によって)。さらに、活性化された血小板は、CD62pおよびIIb IIIの発現によって同定され得、機能的血小板は、トロンピンによる活性化の際などの活性化の際のこれらのマーカーの発現によって(任意選択で定量的に)同定され得る。語句「実質的に全ての血小板が機能的である」とは、例えば、血小板の少なくとも60%が機能的血小板である、または血小板の少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%が機能的血小板である、血小板を含む組成物または調製物を指す。機能的血小板は、22～37で貯蔵した場合、少なくとも5日間にわたって活性であり得る。

30

40

【0301】

PECAM1(CD31)は、循環血小板、単球、好中球および特定のT細胞サブセットの表面上に発現される免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのメンバーである。これは、内皮細胞細胞間接着部の主要な構成要素でもあり、ここでは最大で推定百万個の分子が濃縮されている。この細胞発現パターンに起因して、PECAM1は、白血球の経内皮遊走、血管形成およびインテグリン活性化を含むいくつかの機能に参与する。Igスーパーファミリーは、細胞接着(例えば、NCAM1、ICAM1およびVCAM1)または抗原認識(例えば、免疫グロブリン、T細胞受容体およびMHC分子)を媒介する。さらに、その細胞質ドメイン内における1つまたは複数の免疫受容体チロシン抑制性モチーフ(ITIM)の存在を特徴とする30のメンバーを含む部分群もまた、認識されてい

50

る。その細胞質ドメイン内に6つのITIMを有するPECAM1は、このサブファミリーのメンバーである。

【0302】

エンドグリン(ENG)は、CD105とも呼ばれ、ヒト脈管内皮と主に関連するホモダイマー膜糖タンパク質である。これは、骨髄前赤芽球、活性化単球、線維芽細胞、平滑筋細胞および小児白血病におけるリンパ芽球上にも見出される。エンドグリンは、トランスフォーミング増殖因子-ベータ(TGFβ)受容体複合体の成分であり、高い親和性でTGFβ1に結合する。エンドグリンは、心血管系の発生などのプロセスおよび脈管リモデリングにおいて、細胞の形態および遊走に影響する細胞骨格組織化に参与する。その発現は、心臓の発生の間に調節される。エンドグリン遺伝子を有さない実験マウスは、心血管異常に起因して死亡する。

10

【0303】

VE-カドヘリン(CD144)は、カドヘリンスーパーファミリーからの古典的カドヘリンである。VE-カドヘリンは、接着の制御および細胞間接着部の組織化を介して内皮細胞の生物学において重要な役割を果たし、したがって、内皮の完全性を維持する。VE-カドヘリンは、適切な脈管発生にとって不可欠である。トランスジェニックマウスモデル研究により、VE-カドヘリン欠乏が、脈管の欠陥に起因して、胎生致死であることが確認された。VE-カドヘリンは、新たに形成された血管を維持する目的を果たす。

【0304】

用語「ROCKインヒビター」とは、本明細書で使用する場合、細胞においてRho関連キナーゼまたはそのシグナル伝達経路の機能を阻害するまたは低減させる任意の物質、例えば、小分子、siRNA、miRNA、アンチセンスRNAなどを指す。「ROCKシグナル伝達経路」は、本明細書で使用する場合、ROCK関連シグナル伝達経路、例えば、細胞中のRho-ROCK-ミオシンIIシグナル伝達経路、その上流のシグナル伝達経路、またはその下流のシグナル伝達経路に参与する任意のシグナルプロセッサーを含み得る。使用され得る例示的なROCKインヒビターは、StemgentのStemolecule Y27632、rho関連タンパク質キナーゼ(ROCK)インヒビターである(Watanabeら、Nat Biotechnol、2007年6月;25巻(6号):681~6頁を参照のこと)。他のROCKインヒビターには、例えば、H-1152、Y-30141、Wf-536、HA-1077、ヒドロキシル-HA-1077、GSK269962AおよびSB-772077-Bが含まれる。その全体が示されるかのようにその各々が参照によって本明細書に組み込まれる、Doeら、J. Pharmacol. Exp. Ther.、32巻:89~98頁、2007年;Ishizakiら、Mol. Pharmacol.、57巻:976~983頁、2000年;Nakajimaら、Cancer Chemother. Pharmacol.、52巻:319~324頁、2003年;およびSasakiら、Pharmacol. Ther.、93巻:225~232頁、2002年。ROCKインヒビターは、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開2012/0276063号に記載されるように、当技術分野で公知の濃度および/または培養条件で利用され得る。例えば、ROCKインヒビターは、約0.05~約50マイクロM、例えば、少なくともまたは約0.05、0.1、0.2、0.5、0.8、1、1.5、2、2.5、5、7.5、10、15、20、25、30、35、40、45または50マイクロMの濃度を有し得、その中の誘導可能な任意の範囲または細胞の増殖もしくは生存を促進するのに有効な任意の濃度を含む、。

20

30

40

【0305】

例えば、多能性幹細胞の生存度は、ROCKインヒビターを含めることによって改善され得る。例示的な一実施形態では、多能性幹細胞は、フィーダーフリー条件下で維持され得る。別の一例では、巨核球系列特異的前駆細胞の生存度は、ROCKインヒビターを含めることによって改善され得る。別の一例では、巨核球の生存度は、ROCKインヒビターを含めることによって改善され得る。別の例示的な一実施形態では、この巨核球系列特

50

異的前駆細胞は、フィーダーフリー条件下で維持され得る。

- 【0306】
略号
- 【0307】
iPS：人工多能性幹
- 【0308】
iPSC：人工多能性幹細胞
- 【0309】
hiPSC：ヒト人工多能性幹細胞
- 【0310】 10
hES：ヒト胚性幹
- 【0311】
hESC：ヒト胚性幹細胞
- 【0312】
MK：巨核球
- 【0313】
MLP：巨核球系列特異的前駆体、巨核球前駆体（MKP）とも呼ばれる
- 【0314】
PVE-HE：造血性内皮細胞、任意選択でPECAM1+VE-カドヘリン+エンド
グリン+であり、任意選択で多能性幹細胞から誘導されている 20
- 【0315】
iPS-PVE-HE：iPS細胞由来造血性内皮細胞（例えば、PECAM1+VE
-カドヘリン+エンドグリン+細胞）
- 【0316】
hES-PVE-HE：hES細胞由来造血性内皮細胞（例えば、PECAM1+VE
-カドヘリン+エンドグリン+細胞）
- 【0317】
PVE-HE-MLP：造血性内皮細胞から生成された巨核球系列特異的前駆体
- 【0318】 30
iPS-PVE-HE-MLP：iPS細胞から生成されたPVE-HE-MLP
- 【0319】
hES-PVE-HE-MLP：hES細胞から生成されたPVE-HE-MLP
- 【0320】
PVE-HE-MLP-MK：造血性内皮細胞から生成された巨核球系列特異的前駆体
から生成された巨核球
- 【0321】
iPS-PVE-HE-MLP-MK：iPS細胞から生成されたPVE-HE-ML
P-MK
- 【0322】 40
hES-PVE-HE-MLP-MK：hES細胞から生成されたPVE-HE-ML
P-MK
- 【0323】
PLT：血小板
- 【0324】
hiPSC-PLT：ヒト人工多能性幹細胞から生成された血小板または血小板様粒子
- 【0325】
hESC-PLT：ヒト胚性幹細胞から生成された血小板または血小板様粒子
- 【0326】
ADM：高度分化形態。
- 【0327】 50

参考文献

- 【 0 3 2 8 】
1. Guerriero R, Mattia G, Testa U et al. Stromal cell-derived factor 1 alpha increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2001;97:2587-2595.
- 【 0 3 2 9 】
2. Matsunaga T, Tanaka I, Kobune M et al. Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34+ cells. *Stem Cells* 2006;24:2877-2887.
- 【 0 3 3 0 】
3. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001;98.: 10716-10721.
- 【 0 3 3 1 】
4. Lu S-J, Li F, Vida L, Honig GR. CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an embryonic gene expression pattern. *Blood* 2004;103:4134-4141.
- 【 0 3 3 2 】
5. Chadwick K, Wang L, Li L et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003 2003;102:906-915.
- 【 0 3 3 3 】
6. Chang KH, Nelson AM, Cao H et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood* 2006; 108: 1515-1523.
- 【 0 3 3 4 】
7. Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp.Hematol.* 2004;32: 1000-1009.
- 【 0 3 3 5 】
8. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005;105:617-626.
- 【 0 3 3 6 】
9. Wang L, Menendez P, Shojaei F et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J.Exp. Med.* 2005;201 : 1603-1614.
- 【 0 3 3 7 】
10. Woll PS, Martin CH, Miller JS, Kaufman DS. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. *J.Immunol.* 2005;175:5095- 5103.
- 【 0 3 3 8 】
11. Zambidis ET, Peault B, Park TS, Bunz F, Civin CI. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* 2005;106:860-870.
- 【 0 3 3 9 】
12. Qiu C, Hanson E, Olivier E et al. Differentiation of human emb

10

20

30

40

50

ryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp.Hematol.* 2005;33: 1450-1458.

【 0 3 4 0 】

13. Zhan X, Dravid G, Ye Z et al. Functional antigen-presenting leukocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. *Lancet* 2004; 364: 163-171.

【 0 3 4 1 】

14. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 2008;3:85-98.

10

【 0 3 4 2 】

15. Gaur M, Kamata T, Wang S et al. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J.Thromb.Haemost.* 2006;4:436-442.

【 0 3 4 3 】

16. Takayama N, Nishikii H, Usui J et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 2008; 111 :5298-5306.

20

【 0 3 4 4 】

17. Lu SJ, Feng Q, Caballero S et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat.Methods* 2007;4:501-509.

【 0 3 4 5 】

18. Klimanskaya I, McMahon J. Approaches of derivation and maintenance of human ES cells: Detailed procedures and alternatives. In: Lanza Rea, ed. *Handbook of Stem Cells. Volume 1 : Embryonic Stem Cells.* New York, USA: Elsevier/ Academic Press; 2004:437-449.

【 0 3 4 6 】

19. Lu SJ, Luo C, Holton K et al. Robust generation of hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cells. *Regen.Med.* 2008;3:693-704.

30

【 0 3 4 7 】

20. Lu SJ, Feng Q, Park JS et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 112:4475-4484.

【 0 3 4 8 】

21. Fujiki H, Kimura T, Minamiguchi H et al. Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture. *Exp.Hematol.* 2002;30: 1373-1380.

40

【 0 3 4 9 】

22. Jeanpierre S, Nicolini FE, Kaniewski B et al. BMP4 regulation of human megakaryocyte differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood* 2008;112:3154-3163.

【 0 3 5 0 】

23. Lordier L, Jalil A, Aurade F et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/ROCK signaling. *Blood* 2008;112:3164-3174.

【 0 3 5 1 】

24. Chang Y, Aurade F, Larbret F et al. Proplatelet formation is r

50

regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood* 2007;109:4229-4236.

【 0 3 5 2 】

25. Taguchi K, Saitoh M, Arai Y et al. Disparate effects of interleukin 11 and thrombopoietin on megakaryocytopoiesis in vitro. *Cytokine* 2001;15:241-249.

【 0 3 5 3 】

26. Philipp CS, Remmler J, Zucker-Franklin D. The effects of Mpl-ligand, interleukin-6 and interleukin- 11 on megakaryocyte and platelet alpha-granule proteins. *Thromb.Haemost.* 1998;80:968-975.

【 0 3 5 4 】

27. Kanaji T, Russell S, Cunningham J et al. Megakaryocyte proliferation and ploidy regulated by the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba1. *Blood* 2004;104:3161-3168.

【 0 3 5 5 】

28. Santoso S, Kalb R, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. The presence of messenger RNA for HLA class I in human platelets and its capability for protein biosynthesis. *Br.J.Haematol.* 1993;84:451-456.

【 0 3 5 6 】

29. Lalezari P, Driscoll AM. Ability of thrombocytes to acquire HLA specificity from plasma. *Blood* 1982;59: 167-170.

【 0 3 5 7 】

30. Sullenbarger B, Bahng JH, Gruner R, Kotov N, Lasky LC. Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds. *Exp.Hematol.* 2009;37: 101-110.

【 0 3 5 8 】

31. Giammona LM, Fuhrken PG, Papoutsakis ET, Miller WM. Nicotinamide (vitamin B3) increases the polyploidisation and proplatelet formation of cultured primary human megakaryocytes. *Br.J.Haematol.* 2006;135:554-566.

【 0 3 5 9 】

32. Nagata Y, Yoshikawa J, Hashimoto A et al. Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine-synthesized estradiol. *Genes Dev.* 2003;17:2864-2869.

【 0 3 6 0 】

33. Larson MK, Watson SP. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIB beta3. *Blood* 2006;108: 1509-1514.

【 0 3 6 1 】

34. Klimchenko O, Mori M, Distefano A et al. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* 2009;114: 1506-1517.

【 0 3 6 2 】

35. Nishikii H, Eto K, Tamura N et al. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J.Exp. Med.* 2008;205: 1917-1927.

【 0 3 6 3 】

36. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl.J.Med.* 2008; 359: 938-949.

【 0 3 6 4 】

37. Day SM, Reeve JL, et al. Murine thrombosis models. *Thromb.Haemost.* 2004; 92: 486-494.

10

20

30

40

50

【 0 3 6 5 】

38. Sachs UJ and Nieswandt B. In vivo thrombus formation in murine models. *Circ.Res.* 2007; 100: 979-991.

【 0 3 6 6 】

39. Furie B and Furie BC. In vivo thrombus formation. *J.Thromb.Haemost.* 2007; 5 Suppl 1 : 12-17.

【 0 3 6 7 】

40. Junt T, Schulze H, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007; 317: 1767-1770.

【 0 3 6 8 】

41. Yu J, Hu J, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324: 797-801.

【 0 3 6 9 】

42. Takahashi K, Tanabe K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131 : 861-872.

【 0 3 7 0 】

43. Yu J, Vodyanik MA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-1920.

【 0 3 7 1 】

44. Kim D, Kim CH, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 472-476.

【 0 3 7 2 】

45. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside -out integrin signalling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1992; 4: 766-771.

【 0 3 7 3 】

46. Chen YP, O'Toole TE, et al. A point mutation in the integrin beta 3 cytoplasmic domain (S752 - >P) impairs bidirectional signaling through alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* 1994 ; 84: 1857-1865.

【 0 3 7 4 】

47. Cho J, Furie BC, et al. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J.Clin.Invest* 2008; 118: 1123-1131.

【 0 3 7 5 】

48. Collier BS. Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 427-443.

【 0 3 7 6 】

49. Cho J, Mosher DF. Enhancement of thrombogenesis by plasma fibrinogen cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. *Blood* 2006: 107; 3555-3563.

【 0 3 7 7 】

50. Falati S, Gross P, et al. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat.Med.* 2002; 8: 1175-1181.

【 0 3 7 8 】

51. Reems JA, Pineault N, and Sun S. In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus. Med.Rev.* 2010 ; 24: 33-43.

10

20

30

40

50

【 0 3 7 9 】

52. Chockalingam P, Sacher RA. Management of patients' refractory to platelet transfusion. *J.Infus.Nurs.* 2007; 30 : 220-225.

【 0 3 8 0 】

53. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br.J.Haematol.* 2008; 142: 348-360.

【 0 3 8 1 】

54. Tian X, Kaufman DS. Differentiation of embryonic stem cells towards hematopoietic cells: progress and pitfalls. *Curr.Opin.Hematol.* 2008; 15: 312-318.

10

【 0 3 8 2 】

55. Wang L, Menendez P, et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J.Exp. Med.* 2005; 201 : 1603-1614.

【 0 3 8 3 】

56. Robert et al., Megakaryocyte and platelet production from human cord blood stem cells. *Methods Mol Biol.* 2012; 788:219-47.

【 0 3 8 4 】

57. Piper et al., In vivo recovery of human platelets in severe combined immunodeficient mice as a measure of platelet damage. *Transfusion*, 47:1540-1549, 2007.

20

【 0 3 8 5 】

58. Hu et al., Full reconstitution of human platelets in humanized mice after macrophage depletion. *Blood* 120:1713-1716, 2012.

【 0 3 8 6 】

59. Klimanskaya et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444: 481 - 485, 2006.

【 0 3 8 7 】

60. Chung et al. Human embryonic stem cell line generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*, 2:113-117, 2008.

30

【 0 3 8 8 】

本明細書中の全ての刊行物は、各個々の刊行物または特許出願が参照によって組み込まれると具体的かつ個々に示されるのと同程度まで、参照によって組み込まれる。以下の説明は、本発明を理解する際に有用であり得る情報を含む。これは、本明細書に提供されるいずれかの情報が先行技術であるか、もしくは特許請求された本発明と関連すること、または具体的もしくは暗示的に参照されたいずれかの刊行物が先行技術であることを自認するものではない。

【実施例】

【 0 3 8 9 】

以下の実施例は、特許請求された発明をより良く例示するために提供されているのであって、本発明の範囲の限定として解釈すべきではない。具体的な材料が言及される程度まで、これは、例示のみを目的としており、本発明を限定することは意図しない。当業者は、発明能力の行使なしに、本発明の範囲から逸脱することなく、等価な手段または反応物を開発し得る。

40

【 0 3 9 0 】

(実施例 1)

多能性由来造血性内皮細胞 (PVE-HE) の生成。

【 0 3 9 1 】

多能性由来造血性内皮細胞 (PVE-HE) を、人工多能性幹 (iPS) 細胞から生成した。

50

【0392】

第1に、iPS細胞を、フィーダーフリー多能性幹細胞培養培地mTeSR1中においてMatrigel(Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)マウス肉腫細胞由来の可溶性調製物)上で培養することによって拡大増殖させた。簡潔に述べると、ヒトiPS細胞を、唯一の活性成分としてEDTAを含む化学的に規定された細胞解離緩衝液(CDB)を使用する解離によって回収した。酵素またはいずれの他の動物生成物も、培養培地中またはCDB中で使用しなかった。別の化学的に規定されたマトリックス、例えば組換えビトロネクチンもしくはSyntheMax II、または培地、例えばmTeSR2、あるいは他の適合性の細胞解離試薬を使用することが可能であることが、当業者に理解されるはずである。

10

【0393】

第2に、回収したヒトiPS細胞を、PECAM1+VE-カドヘリン+エンドグリン+である多分化能PVE-HEへの分化のために調製した。胚様体(EB)形成は必要としなかった。簡潔に述べると、回収した細胞を、mTeSR1中に再懸濁し、細胞外マトリックスヒトIV型コラーゲン(Advanced BioMatrix、カタログ番号5022)の上でプレート形成させた。小分子ROCKインヒビターY27632を、10 μ Mで培養物に添加したが、これは、回収したiPS細胞がIV型コラーゲン被覆表面に付着するのを助けると考えられた。iPS細胞を、5%CO₂中37 $^{\circ}$ Cで12~48時間付着させた。図2Aに示すように、48時間後、付着した細胞は、フィーダーフリー条件下で典型的な多能性幹細胞形態を示す。

20

【0394】

第3に、調製したヒトiPS細胞を、PVE-HE細胞に分化させた。簡潔に述べると、Y27632を含むmTeSR1培地を除去し、分化開始培地(DIM)を添加した。DIMは、基本培地としてのイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロール、骨形成タンパク質4(BMP4)50ng/ml、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)50ng/mlおよび血管内皮増殖因子(VEGF)50ng/mlから構成される動物成分フリーの培地(ACF)である。5%CO₂中37 $^{\circ}$ Cで48時間インキュベートした後、所望のPVE-HE分化の初期形態を観察した。多能性幹細胞形態から点在する小さな細胞クラスターへのほぼ完全な推移が、図2Bにおいて見られ得る。PVE-HE分化開始の96~146時間後に、単層の上で増殖している小さくコンパクトな細胞クラスターを示す高度分化形態を観察した(図2C)。

30

【0395】

第4に、PVE-HE分化開始の120時間後、高度分化形態(ADM)細胞を、形態変化(図3B)および首尾よいPVE-HE分化について分析した。簡潔に述べると、細胞の小さな試料を、系列特異的マーカーCD31(PECAM)、CD105(エンドグリン)、CD144(VE-カドヘリン)のフローサイトメトリー分析に供した。ADM細胞は、分化のこの段階においてPVE-HE表現型CD31⁺CD144⁺CD105⁺を示す(図3A)。

40

【0396】

(実施例2)

ヒトiPS由来PVE-HE細胞から、剥離した巨核球系列特異的前駆体(MLP)を生成する。

【0397】

第1に、MLP分化の開始を、PVE-HE分化を開始した120時間後に実施した。簡潔に述べると、50ng/mlのBMP4、50ng/mlのbFGFおよび50ng/mlのVEGFを含むDIM培地を除去し、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ラムF-12栄養混合物、Albucult(rhアルブミン)、ポリビニルアルコール(PVA)、リノール酸、SyntheChol(合成コレステロール)、モノチオグ

50

リセロール (a - M T G)、 r h インスリン - トランスフェリン - セレン - エタノールアミン溶液、タンパク質フリーハイブリドーマ混合物 I I (P F H M I I)、アスコルビン酸 2 ホスフェート、 G l u t a m a x I (L - アラニル - L - グルタミン)、ペニシリン / ストレプトマイシン、幹細胞因子 (S C F) 2 5 n g / m l、トロンボポエチン (T P O) 2 5 n g / m l、 F m s 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (F L) 2 5 n g / m l、インターロイキン - 3 (I L - 3) 1 0 n g / m l、インターロイキン - 6 (I L - 6) 1 0 n g / m l およびヘパリン 5 単位 / m l から構成される M L P 誘導および拡大増殖培地 (M L P - D E M、 A P E L または S t e m l i n e I I と呼ばれる、図 1 に示すとおり) で置き換えた。次いで、細胞を、 5 % C O ₂ 中 3 7 ° C で最大 8 日間インキュベートした。 M L P 分化を 8 日間維持した。

10

【 0 3 9 8 】

【 表 1 】

	成熟MLP	成熟MK
CD43	95.9%	98.5%
CD41	89.3%	91.4%
CD61	77.2%	89.7%
CD42a	66.3%	88.8%
CD144	57.6%	15.1%
CD31	57.0%	80.6%
CD29	40.4%	96.2%
CD45	40.3%	66.1%
CD13	40.4%	59.4%
CD34	30.3%	44.1%
CD309	28.4%	73.2%
CD71	26.4%	59.6%
CD90	19.8%	2.0%
CD105	7.5%	46.0%
CD56	3.5%	3.3%
CD14	4.4%	4.7%
CD143	2.2%	6.8%
CD15	1.6%	11.0%
CD3	2.8%	4.2%
CD117	2.7%	10.2%
CD184	0.6%	8.5%
CD11c	0.4%	2.5%
CD73	0.0%	1.5%

20

30

【 0 3 9 9 】

表 1 は、成熟 M L P および成熟 M K 細胞によるマーカー発現の比較フローサイトメトリー分析を示す表である。この分析は、凍結保存および規定された表現型の M K 細胞への引き続く分化の前の P V E - H E 由来 M L P 細胞の表現型を特徴付ける。

【 0 4 0 0 】

第 2 に、付着した細胞集団の上の浮遊 M L P および半剥離 M L P を、血清学的ピペットを使用して穏やかな力で洗浄することによって収集した。これらの M L P を含む培地を、コニカルチューブ中に移し、 3 0 0 × g で 5 分間遠心分離して、 M L P を収集した。培地を廃棄し、 M L P ペレットを、リン酸緩衝食塩水中に再懸濁し、形態 (図 5) について、および表 1 に示されるマーカーを使用するフローサイトメトリーによって分析した。選択された結果が図 4 に示される。結果は、この段階で収集した M L P が、 2 つの集団から主に (9 0 % を超えて) 構成されることを実証しており、 1 つは、 C D 4 1 a ⁺ C D 3 1 ⁺ C D 3 4 ⁺ C D 1 4 ⁻ C D 1 3 ⁺ C D 4 2 b ⁻ によって示される比較的未成熟の M L P 集団を特徴とし、 1 つは、 C D 4 1 a ⁺ C D 3 1 ⁺ C D 3 4 ⁺ C D 1 4 ⁻ C D 1 3 ⁺ C D 4 2 b ⁺ によって示されるより成熟した M L P 集団を特徴とする。

40

【 0 4 0 1 】

50

第3に、MLP細胞を凍結保存した。簡潔に述べると、MLPの凍結保存を、10% DMSOを含む細胞凍結培地CS10 (Sigma)を使用して達成した。

【0402】

(実施例3)

ヒトiPS-PVE-HE-MLP由来巨核球(MK)からの成熟血小板の生成。

【0403】

第1に、血小板分化の開始を、上記のとおりヒトiPS-PVE-HE由来MLP細胞を使用して実施した。MLPを、基本培地としてのイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ヒト血清アルブミン、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、b-メルカプトエタノール、可溶性低密度リポタンパク質(LDL)、コレステロール、TPO 30 ng/ml、SCF 1 ng/ml、IL-6 7.5 ng/ml、IL-9 13.5 ng/ml、Y27632 5 μMおよびヘパリン5~25単位/mlから構成されるMK培地(MK-M)中で非接着性表面上に播種した。次いで、細胞を、5% CO₂中37℃で3日間インキュベートした。

10

【0404】

一部の例では、このMLPを、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、ハムF-12栄養混合物、Albumin (rhアルブミン)、ポリビニルアルコール(PVA)、リノール酸、リノレン酸、Synthetol (合成コレステロール)、モノチオグリセロール(a-MTG)、rhインスリン-トランスフェリン-セレン-エタノールアミン溶液、タンパク質フリーハイブリドーマ混合物II (PFHMI)、アスコルビン酸2ホスフェート、Glutamax I (L-アラニル-L-グルタミン)、ペニシリン/ストレプトマイシン、TPO 30 ng/ml、SCF 1 ng/ml、IL-6 7.5 ng/ml、IL-9 13.5 ng/ml、Y27632 5 μMおよびヘパリン5~25単位/mlから構成される培養培地中で非接着性表面上に播種した。次いで、細胞を、5% CO₂中37℃で3日間インキュベートした。

20

【0405】

第2に、iPS-PVE-HE-MLP由来の成熟化中のMK細胞を分析した。血小板分化の開始の72時間後に、非常に大きな倍数体MK (50 μM)が、成熟化の進行と共に豊富になった(図5AおよびB。5A中のスケールバーは100 μMであり、5B中のNはMKの内側の核を示す)。72~96時間の間から、伸長した仮足を有する前血小板形成性細胞が、顕微鏡により容易に観察され(図5Aおよび5C、矢印によって示される)、CD41a+CD42b+血小板粒子の新たに現れてくる量を、フローサイトメトリ分析によって検出した(図6)。図6中、「A」中の細胞は、循環ヒト血小板であった、「B」はhES-PVE-HE-MLPである、「C」は末梢血由来ヒト血小板である、「D」はiPS-PVE-HE-MLPである、および「E」はhES-PVE-HE-MLP)である。開始の84時間後、CD41a+CD42b+血小板の量は劇的に増加し、70%もの高いレベルに達した(図6D)。

30

【0406】

第3に、高品質の血小板を、少なくとも連続する3~5日間および場合によってはそれより長くにわたる培養において成熟化中のMKを害することなく回収し、MLPからの血小板の収量を少なくとも3~5倍に最大化した。血小板含有培地から大きなMKを分離するために、細胞懸濁物を50×gで10分間遠心分離し、上清を除去し、MK細胞ペレットを新たなMK-Mで再懸濁して、より多くの血小板を後に生成させた。前血小板、大きな細胞デブリおよび小さなMKから血小板を分離するために、BSA/HSA勾配沈降法を適用して、50×gの遠心分離の上清から血小板のより純粋な集団を取得した。精製した血小板を、MK-Mで懸濁し、室温で維持した。粒度、透明度、サイズおよび細胞表面マーカー発現に関する血小板の品質を、FACS分析によって特徴付け、末梢血由来ヒト血小板と比較した(図6A~E)。精製した血小板を、非接着性表面内で室温でMK-M培地中で貯蔵し、機能的血小板の最小の喪失を確保した。

40

【0407】

50

(実施例4)

iPSC-PVE-HE-MLP由来巨核球(MK)由来の成熟血小板の分析。

【0408】

第1に、iPSC-PVE-HE-MLP由来血小板(hiPSC-PLT)を、形態について分析した。免疫蛍光および透過型電子顕微鏡分析を、以前に記載された方法に従って実施した(Cell Research 2011年21巻:530~45頁)。hiPSC-PLTは、円盤状であり、循環ヒトPLTと大部分は超微細構造的に同一であることが見出された(透過型電子顕微鏡によって実証されるように、図7)。hiPSC-PLTは、DICおよび1-チューブリンIF顕微鏡によって実証されるように、平均サイズで循環ヒトPLTに匹敵した($2.38\mu\text{m} \pm 0.85\mu\text{m}$ 対 $2.27\mu\text{m} \pm 0.49\mu\text{m}$)(図8)。hiPSC-PLTは、ガラス上で伸展した糸状仮足および葉状仮足の両方を形成する(図9に示されるDIC生細胞顕微鏡画像によって実証されるように)。hiPSC-PLTは無核であり、循環ヒトPLTと同等であった(Hoechst染色によって実証されるように、図8)。hiPSC-PLTは、循環ヒトPLTと比較して、正常なチューブリン細胞骨格を有するようには見えなかった(1-チューブリン標識化によって実証されるように、図8)。hiPSC-PLTは、循環ヒトPLTと比較して、正常な線維状アクチンを有するようには見えなかった(ファロイジン標識化によって実証されるように、図8)。hiPSC-PLTは、循環ヒトPLTと比較して、正常なアルファ-顆粒発現を有するようには見えなかった(図10Aおよび10B中でTSP4およびPF4標識化によって実証されるように)。

10

20

【0409】

第2に、hiPSC-PLTを、活性化された血小板上の細胞接着分子発現を測定するin vitro活性化アッセイを使用して機能性について分析した。簡潔に述べると、2種の接着分子を、抗CD62p抗体およびPAC-1抗体を使用して分析した。PAC-1は、IIb IIIインテグリンを認識する。CD62pおよびIIb IIIは共に、活性化された血小板の表面上で発現される。このアッセイを、以前に記載された方法に従って実施した(Cell Research 2011年21巻:530~45頁)。トロンビン曝露に反応して、PAC-1およびP-セレクチン結合は共に増加した(図11)。

【0410】

第3に、hiPSC-PLTを、マクロファージ除去NOD/SCIDマウスにおける血栓形成を測定するin vivoアッセイ系を使用して、機能性について分析した。簡潔に述べると、精巣拳筋細動脈の生体内顕微鏡を、以前に記載されたように実施した(Cell Research 2011年21巻:530~45頁)。マクロファージ除去NOD/SCIDマウスを、ケタミン($125\text{mg}/\text{kg}$)およびキシラジン($25\text{mg}/\text{kg}$)の腹腔内注射によって麻酔した。気管挿入し、マウスを、熱制御したブランケット上に配置した。陰嚢の切開後、精巣拳筋を生体内顕微鏡トレイ上に露出させた。筋肉調製物を、実験を通じて熱制御し(37°C)通気した($95\% \text{N}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$)炭酸水素塩緩衝食塩水で灌流した。精巣拳筋細動脈壁を、Micropoint Laser System(Photonics Instruments)を使用してマイクロポイント(micropoint)レーザー焼灼によって傷害した。発達中のマウス血小板血栓を、頸静脈カニューレを介したDyLight 649コンジュゲート化抗マウスCD42c抗体(Emfret Analytics、 $0.05\mu\text{g}/\text{g}$ 体重)の注入によって可視化した。カルセインAM標識したhPLT、iPSC-PLTおよびESC-PLT、 3×10^6 個もまた、 $100 \times \text{g}$ のReoProありまたはなしで、マウス中に注入した。2~4つの血栓が、1匹のマウスにおいて生成された。蛍光画像および明視野画像を、増幅器(Video Scope International)を介して $60 \times / 1.0 \text{NA}$ 水浸対物レンズおよび高速カメラ(Hamamatsu C9300)を備えたOlympus BX61W顕微鏡を使用して記録した。データを、血管壁傷害の後5分間にわたって収集し、Slidebook v5.0(Intelligent Image

30

40

50

ging Innovations) を使用して分析した。図 12 A に示される結果は、*in vivo* 環境において *hiPSC-PLT* が血餅形成に寄与することを示す。*hiPSC-PLT* の機能的な能力もまた、*IIb III* によって媒介されることが決定された。具体的には、*hiPSC-PLT* を、*IIb III* に特異的に結合し血小板機能を阻害するヒト-マウスキメラモノクローナル抗体の Fab 断片 *ReoPro* で事前処理した (図 12 B)。アスタリスクは、*ReoPro* で処理していない対照と比較した統計的に有意な差異を示す (対照と比較して $p < .01$ 、スチューデント *t* 検定)。

【0411】

第 4 に、注入後のマクロファージ除去 *NOD/SCID* マウスにおける *hiPSC-PLT* の動態を決定した。*hiPSC-PLT* および *ESC-PLT* の動態が *in vivo* の *hPLT* の動態と類似しているかどうかを決定するために、*iPSC-PLT* または *ESC-PLT* を、マクロファージ除去 *NOD/SCID* マウス中に注入し、種々の時点で収集した血液を、フローサイトメトリーによって分析した。簡潔に述べると、マクロファージを、以前に記載されたように、リボソーム封入クロドロネートの静脈内注射によって除去した。クロドロネート-リボソームを、0 日目 ($100 \mu\text{l}$) および 2 日目 ($50 \mu\text{l}$) に尾部静脈を介してマウス中に注射した。3 日目に、ヒト血小板リッチ血漿を、 $200 \times g$ で 25 分間の、クエン酸ナトリウム処理血液の遠心分離によって取得し、 $0.5 \mu\text{M}$ *PGE1* および 10% クエン酸塩緩衝液の存在下で $800 \times g$ で 10 分間遠心分離した。ペレットを、 $0.15 \mu\text{M}$ *PGE1* および 10% クエン酸塩緩衝液を含む *HEPES-Tyrode* 緩衝液で再懸濁し、 $800 \times g$ で 5 分間遠心分離した。血小板を、 0.1% 脂肪酸フリー *BSA* を含む *HEPES-Tyrode* 緩衝液中に再懸濁した。単離されたヒト血小板 (*hPLT*、 1.5×10^7 個)、本開示の人工多能性幹細胞由来血小板 (*hiPSC-PLT*、 1.5×10^7 個) および本開示の胚性幹細胞由来血小板 (*ESC-PLT*、 1.0×10^7 個) を、マクロファージ除去マウス中に静脈内注入した。マウス血液 $30 \mu\text{l}$ を、異なる時点 (10 分、30 分、60 分、120 分、240 分、360 分および 480 分) において頸静脈を介して収集し、*APC* コンジュゲート化抗ヒト *CD41* および *Dylight 488* コンジュゲート化抗マウス *CD42c* 抗体を使用するフローサイトメトリーによって分析した。結果は、マクロファージ除去 *NOD/SCID* マウスにおいて、数時間にわたって *hiPSC-PLT* が循環することを実証している (図 13)。

【0412】

(実施例 5)

多能性細胞からの血小板の生成。

【0413】

この実施例は、多能性幹細胞から血小板を生成するさらなる例示的な方法を提供する。

【0414】

上述のように、*hESC-PLT* および *hiPSC-PLT* は、ヒト胚性幹細胞および人工多能性幹細胞から *ex vivo* で生成されたヒト血小板である。上記初期の *in vitro* および *in vivo* の特徴付けにより、*hESC-PLT* および *hiPSC-PLT* の両方が、ヒトドナー血小板と形態学的および機能的に同等であることが実証されている。例えば、*hiPSC-PLT* は、ガラス基材上で伸展することができた。

【0415】

バルク中間体 (*MK* 前駆体) の生成は、承認された *hiPSC* または *hESC* マスター細胞バンク (*MCB*) からのバイアルの解凍で開始する。バルク中間体の生成のためのプロセスのフローチャートが図 14 A ~ E に示される。1 ~ 2 百万個の *hiPSC* または *hESC* マスターあるいは作業用細胞バンクを含むクライオバイアルを、*cGMP* 液体窒素貯蔵の蒸気相から取り出し、クリーンルーム (*ISO* クラス 7) に移す。全ての処理を、認可されたバイオセーフティーキャビネット (*ISO* クラス 5 *BSC*) 中で実施する。解凍および *DMSO* を除去するための洗浄の後; 細胞を、*mTeSR1* 規定培養培地中の *Matrigel* 被覆容器上に播種する。細胞を凝集体として維持するように注意を払う

。プレートを、日付、ロット番号および継代数で標識し、各ウェルの蓋を固有の数（例えば、1～6）で標識する。播種したプレートを、37℃、5%CO₂インキュベーター中に配置する。培養物を、立体顕微鏡および倒立光学顕微鏡を使用して毎日点検する。コロニーサイズ、分化の程度を含む細胞形態および培地の色に関する観察を、ワークシート上に記録する。mTeSR1培地を、典型的には、培養物が60～90%コンフルエントになるまで、1～2日毎に交換する。形態およびコンフルエンス評価がその培養物の継代の必要性を示す場合、コロニーを細胞解離緩衝液を使用して回収する。細胞を凝集体として維持するように再度注意を払う。培養物を、mTeSR1培地中のMatrigel被覆容器上に再播種する。回収されたcm²および播種されるcm²に基づいて、細胞を、典型的には、必要とされる幹細胞の収量に依存して、3～7日毎に1：4～1：8の比率で分割する。播種した培養物を、37℃、5%CO₂インキュベーター中に戻す。幹細胞は、必要とされるロットサイズに依存して、造血性分化の誘発の前に1～6回継代され得る。

10

【0416】

造血性細胞分化のための播種の3日後、培養物を試験して、細胞の付着および成長を確認する。この段階では、培養物は、総表面積の10%未満をカバーする付着した細胞を伴って、典型的には低密度である。十分に付着した細胞は、多能性幹細胞形態から、分化した細胞（明確なコロニー境界を有さずより拡散的に増殖し、核のサイズと比較して顕著により多い細胞質を有する大きな細胞）への顕著な推移を伴う成長を実証するはずである。

【0417】

幹細胞の拡大増殖期が細胞収量の要件を満たすと推定されるときに、造血性分化を開始させる。代表の容器を、回収のために犠牲にし、単一細胞の懸濁物を創出する。その細胞濃度を定量して、培養物播種パラメータを確立し、残りの細胞は廃棄する。コロニーを、細胞解離緩衝液を使用して注意深く回収し、10μM Y27632（ROCKインヒビター）を補充したmTeSR1培地中において5,000細胞/cm²の密度でIV型コラーゲン被覆容器中に再播種する。播種した容器を、37℃、5%CO₂インキュベーター中に配置する。

20

【0418】

次の日、いずれの浮遊細胞クラスターの除去も最小化するように注意を払いつつ培地を除去し、組換えヒト（rh）BMP-4 50ng/ml、rh VEGF 50ng/mlおよびrh bFGF 50ng/mlを補充したStemSpan ACF（StemCell Technologies Inc.）で置き換える。培養物を、低O₂（約5%）、37℃、5%CO₂環境に移し、2日間静置する。2日後、培養物を細胞の付着および成長について形態学的に評価する。いずれの浮遊細胞クラスターの除去も最小化するように注意を払いつつ培地を除去し、新たな培地で置き換える。培養物を、さらに2日間にわたって、低O₂（約5%）、37℃、5%CO₂環境に戻す。この期間の後、培地をもう1回交換し、培養物を正常酸素圧培養条件中に配置する。2日間の正常酸素圧培養の後、いずれの浮遊細胞クラスターの除去も最小化するように注意を払いつつ培養培地を除去し、5単位/mlヘパリン、rh 25ng/ml TPO、25ng/ml rh SCF、25ng/ml rh FL、rh IL-6およびrh IL-3を補充したSTEMdiff APEL（StemCell Technologies Inc.）を含むMLP培地で置き換える。これらの条件を、次の2～6日間にわたって維持する。培養物は、浮遊MK前駆体の品質を評価するための形態学的評価を毎日受ける。培地交換は実施されないが、培養物が培地の枯渇を示し始めたとき（培養培地が黄色を呈する）に、さらなる培地を追加する。培養物を、定期的に試料採取し、CD41a、CD42b発現についてFACSによってアッセイする。培養物の形態およびCD41a、CD42b発現（約15%が二重陽性）が適切である場合、培養物を回収する。次いで、細胞を、10%ジメチルスルホキシド、90%胎仔ウシ血清凍結保存培地（HyClone）中において3～5百万個の生存MLP/ml/クライオバイアルで凍結保存する。凍結保存を、凍結コンテナ（Nalgene）中にバイアルを配置し、次いで-80℃のフリー

30

40

50

ザー中に1～3日間貯蔵し、その後、cGMP液体窒素貯蔵システムの蒸気相に移すことによって、達成する。

【0419】

最終生成物hESC-PLTまたはhiPSC-PLTの生成プロセスを、承認されたバルク中間体の解凍で開始する。バルク中間体品質試験を合格した3～5百万個のMLPを含むクライオバイアルを、cGMP液体窒素貯蔵の蒸気相から取り出し、クリーンルームに移す。細胞を、30ng/ml rh TPO、1ng/ml rh SCF、7.5ng/ml rh IL-6、13.5ng/ml rh IL-9および5uM Y27632 (ROCKインヒビター)を補充したStemSpan ACF培地中でおおよそ 2.3×10^5 個/cm²で超低付着(ULA)容器中に播種する。培養容器を、日付およびロット番号で標識し、各容器の蓋を固有の数(例えば、1～6)で標識する。培養物を、加湿10%CO₂雰囲気中で39℃で維持する。典型的には、この培養期の間顕著な細胞拡大増殖は存在しない。培養に入っておおよそ3～4日で、大きな成熟中の巨核球(MK)が明白になる。培養物を、定期的な試料収集およびCD41a、CD42b発現についてのFACS分析によってモニタリングする。前血小板形成は、典型的には、5日間の培養の後に最初に観察される。前血小板形成が進行し、CD41a、CD42b発現がおおよそ30%～70%に増加した時に、培養物は回収され得る(6～7日目)。

10

【0420】

回収した培地を、50×gで遠心分離して巨核球スラリーを除去する。上清を取り出し、1000×gで遠心分離して血小板を濃縮する。血小板を再懸濁し、次いで、非連続的アルブミン(ヒト)(HSA)勾配(12%、10%、7%、5%および2%)上にロードして、血小板をさらに単離する。血小板HSA勾配を、80×gで15分間遠心分離する。血小板をこの勾配から回収し、PGE₁を懸濁物に添加して、活性化を防止する。血小板を、1000gで10分間の遠心分離によって濃縮する。現在、hESCおよびhiPSC血小板は、培養培地中に貯蔵されている。提案した研究を目的のために、48～72時間の標的生成物安定性が調査される。予備研究は、貯蔵の前および後のPAC1結合結果によって決定したとき、最低24時間の安定性を示している。

20

【0421】

バルク中間体におけるMLP細胞集団のFACS分析(CD31およびCD43)は、細胞のおおよそ98%が、造血性内皮系列または造血系列に傾倒しており、したがって、多能性を越えて分化したことを示している。

30

【0422】

このプロセスのさらに下流では、製造のMK分化およびPLT回収期の間存在する細胞が、vWF(フォン・ヴィルブランド因子)発現によって試験されている。製造のこの期にある細胞は、おおよそ100%がvWF+である。高度に分化した細胞集団の維持は、この培養物が、未分化前駆体のクローン性拡大増殖を経験していないことを示している。

【0423】

予備研究は、OCT4、NANOG、TRA-1-60、TRA-1-81 SSE3、SSE4およびアルカリホスファターゼについてのIFA染色によって分析したhiPSC由来MK細胞集団中の多能性細胞の完全な非存在を示している。多能性マーカーについてのIFA染色を使用したさらなる研究では、hESC由来およびhiPSC由来のMLPおよびMKの集団、ならびにMKから誘導された精製PLTを試験して、多能性細胞の存在についてスクリーニングしている。スパイキング研究が、種々の細胞集団中の幹細胞を検出するためにこのアッセイのLODを決定するために実施される。

40

【0424】

予備研究が実施され、多能性マーカー(SSEA4およびTRA-1-60)についてのFACS分析を使用して、MK集団を特徴付けている。hESC細胞を1%および0.1%の濃度でMKと混合したスパイキング研究が実施されている。それらの結果は、0.1%の検出限界を示す。SSEA4およびTRA-1-60についてMKを特徴付ける最初期研究は、MK集団において<0.1%(検出のアッセイレベルを下回る)SSEA4/

50

TRA-1-60陽性細胞という結果を提供した。

【0425】

図14のステップ2~3を参照すると、解離緩衝液で回収された幹細胞は、細胞凝集塊として取り除かれるので、正確な細胞計数は不可能である。この理由のために、代表の培養容器をTrypsin-EDTAを使用して回収し、単一細胞の懸濁物を確保する。この懸濁物を、血球計数器において計数し、回収された細胞数を、 cm^2 当たりで標準化する。次いで、計数に使用した細胞は廃棄する。残りの生成物培養物を解離緩衝液を使用して回収し、細胞収量を標準化された細胞/ $\text{cm}^2 \times$ 回収した cm^2 に基づいて計算する。計算した細胞収量を使用して、造血性細胞分化を誘発するために播種容器についての必要とされる細胞密度/ cm^2 を設定する。

10

【0426】

図14のステップ10を参照して、MLP培地中の2日目を開始してMLP培地中の6日目まで、細胞試料を代表の培養容器から採取し、プールし、FACS分析によってCD41aおよびCD42b二重陽性細胞の百分率について評価する。CD41aは、フィブリノーゲン受容体 (IIb III) のサブユニットであり、CD42bは、フォン・ヴィルブランド因子受容体 (GPIb-V-IX) 上のサブユニットである。両方の受容体の発現は、MK系列に特異的であり、両方とも血小板機能に必要とされる。初期系列の造血性内皮細胞はCD41a陰性であり、造血前駆体における後期段階の造血性分化の間にCD41aを発現する。CD42bは、成熟MKにおいて排他的に発現される。この時点で、培養物は、高い割合のCD41+細胞および低い割合のCD42+細胞を伴って、不均一である (Pineaultら、Megakaryocyte and platelet production from human cord blood stem cells. Methods Mol Biol. 2012年; 788巻: 219~47頁)。

20

【0427】

試料調製およびFACS分析を、以下のように実施する。簡潔に述べると、浮遊細胞を収集し、プールする。血清学的ピペットを使用して、増殖培地の穏やかな流れを、培養物表面に向けて方向付けて、全ての緩い接着性のMLPを剥離させ、自由に浮遊する細胞と共にプールする。十分に懸濁しプールした細胞の試料 (100~200 μL) を収集し、遠心分離する (160 $\times g$ で5分間)。そのペレットを、DPBS中に再懸濁し、再度遠心分離し、CD41a-APCコンジュゲート化 (アロフィコシアニン) およびCD42b-PEコンジュゲート化 (フィコエリトリン) (BD Bioscience, San Jose, CA) を含むDPBS+3%FBS (FACS緩衝液) 中に再懸濁する。蛍光コンジュゲート化抗体および適切なアイソタイプ対照 (マウスIgG1k-APCおよびマウスIgG1k-PE) を、室温で15分間存在下でインキュベートする。次いで、標識された細胞を、FACS緩衝液中に希釈し、遠心分離し、FACS緩衝液中に再懸濁する。FACS分析を、10,000の事象をモニタリングすることによって実施する。二重陽性 (CD41a+CD42b+) MLPを発現する細胞の許容可能な百分率を有する培養物を、回収し、凍結保存する。暫定の最低仕様は、10%二重陽性細胞である。hiPSCから誘導されたMLPについての代表的な2次元ドットプロットが、図15に示される。この図では、細胞集団は、二重陽性染色集団29.9%で、86.4%CD41a+; 31.2%CD42b+である。

30

40

【0428】

凍結保存のための回収の前に、MLP培養物を、付着した細胞のおよその百分率、および低い核対細胞質比を有する分化した大きな細胞の程度について評価する。付着した細胞は、明確なコロニー境界を有さない拡散コロニーとして表れるはずである。付着した細胞集団の上に静止している豊富な浮遊MLPが存在するはずである。生存浮遊MLPは、最小の複屈折で、平滑な細胞膜によって境界が定められて、明確に目に見えるはずである。典型的には、1 cm^2 の表面積が、1日当たり5,000~15,000個のMLPを生成する。hiPSC株MA-iPS-01から誘導されたMLPの代表的集団の顕微鏡写

50

真を図16に示す(Hoffman Modulation Contrast、 $\times 400$)。

【0429】

凍結保存のMLPの前に、生存細胞計数を、血球計数器を使用したトリパンブルー排除によって実施する。細胞を、生存細胞数およびパーセント生存度について評価する。代表のバイアルを、マイコプラズマおよび無菌性について試験する。

【0430】

さらに、凍結保存されたMLPの代表のバイアルを、以下のように、CD31およびCD43発現について評価する。CD31は、内皮系列および造血系列の両方において発現される造血性内皮細胞のマーカである。CD43の発現によって、造血傾倒が確認される。凍結保存されたMLPの試料バイアルを解凍し、リンスし、DPBS+3%FBS(FACS緩衝液)中に再懸濁し、遠心分離する($160 \times g$ で5分間)。そのペレットを、CD31-APCコンジュゲート化(アロフィコシアニン)およびCD43-FITCコンジュゲート化(BD Bioscience, San Jose, CA)を含むDPBS+3%FBS(FACS緩衝液)中に再懸濁する。解凍したMLPの試料を、蛍光コンジュゲート化抗体および適切なアイソタイプ対照(マウスIgG-APCおよびマウスIgG-FITC)と共に、室温で15分間インキュベートする。次いで、標識された細胞を、FACS緩衝液中に希釈し、遠心分離し、FACS緩衝液中に再懸濁する。FACS分析を、10,000の事象をモニタリングすることによって実施する。許容可能なMLPバンクは、 $> / = 50\%$ のCD31陽性細胞および $> / = 50\%$ のCD43陽性細胞を有する。hiPSC株MA-iPS-01から誘導されたMLPについての代表的な2次元ドットプロットが、図17に示される。示される実施例では、細胞集団は、二重陽性染色集団98.4%で、99.8%CD31+; 98.5%CD43+である。

10

20

【0431】

さらに、凍結保存されたMLPの代表のバイアルを、多能性マーカー、例えばSSEA4、TRA-1-60を利用してFACS分析によって評価して、多能性細胞の非存在を確認する。

【0432】

凍結保存されたMLPの試料クライオバイアルを解凍し、解凍後の生存度および回復について評価する。MLPを、前血小板形成の時点までさらに処理し、MK成熟化の間の形態MK形態、ならびにCD41a+およびCD42b+についてのFACS分析について評価した。培養物を、前血小板形成および血小板形成ならびに二重染色された(CD41a+およびCD42b+)細胞についてのFACS分析による特徴付けについてモニタリングする。許容基準には以下が含まれる:無菌性(<USP21>浸漬試験で陰性)、マイコプラズマについて陰性(直接(寒天およびプロス)、間接(細胞培養物)によって試験する)、FACSによってCD31およびCD43について少なくとも90%陽性、トリパンブルーによって少なくとも70%の生存度、ならびに多能性細胞マーカーの発現について陰性。

30

【0433】

図14のステップ13~14を参照して、MLPの解凍および播種の2~3日後、培養物を、MK系列である自由に浮遊する細胞の出現について評価する。この時点で、細胞は、直径10~50ミクロンの範囲で、サイズが不均一である。生存細胞のおよその割合を、明るい細胞質および平滑な細胞膜を示す健康なMK先駆細胞およびMKについて、倒立光学顕微鏡での視覚的観察によって評価する。hESCから誘導されたMKの代表的集団の顕微鏡写真を図18に示す(Hoffman Modulation Contrast、 $\times 400$)。

40

【0434】

図14のステップ13~14を参照して、MLPの解凍の2~3日後、細胞試料を、代表の培養容器から取り出し、プールし、処理し、CD41aおよびCD41bに対する蛍光コンジュゲート化抗体で標識し、FACS分析を受けさせる。CD41a+およびCD

50

4 2 b + の両方の M L P を発現する細胞の許容可能な百分率を有する培養物を、さらに処理する（好ましくは少なくとも 10 % の二重陽性細胞）。

【0435】

図 1 4 のステップ 1 5 を参照して、M L P の解凍後 3 日目に開始して 5 日目まで、M K 培養物を、前血小板の出現について評価する。図 1 9 中の矢印は、前血小板形態を示す。前血小板を示す M K は、断片化の前に、細胞から伸びいくらかのビーズ化および枝分かれを示す長い突起を示す。

【0436】

図 1 4 のステップ 1 5 ~ 1 6 を参照して、前血小板の存在を確認する際に、M L P の解凍後 3 日目に開始して 8 日目まで、前血小板および血小板の試料を、代表の培養物から収集する。簡潔に述べると、10 mL の血清学的ピペットを使用して、試料を、50 mL のコニカルチューブに移し、少なくとも 5 回吸い上げ、吐き出して、前血小板を砕くのに十分な剪断力を生成する。試料を、10 % CO₂ でガス供給した 3 9 のインキュベーターに戻し、30 分間静置させる。懸濁された血小板を含むおよそ 250 μL の上清を染色し、C D 4 1 a および C D 4 2 b についての F A C S 分析を受けさせる。血小板の回収および引き続き処理を、血小板のピークレベルが検出されたとき、典型的には、血小板の 30 ~ 70 % が二重陽性染色 (C D 4 1 a + C D 4 2 b +) されたときに、開始する。

10

【0437】

h i P S C - P L T および h E S C - P L T を、p H、血小板計数および正体 (C D 6 1、C D 4 1 a、C D 4 2 b の発現によって決定される)、血小板活性化マーカー (C D 6 2 P、P A C 1、血小板因子 4) の発現、生理学的応答 (凝集 (マイクロプレートアッセイ)、T E G (トロンボエラストグラフィー) および伸展) について特徴付け、電子顕微鏡ならびに 1 チューブリン染色と共に D I C 顕微鏡によって形態学的に評価する。

20

【0438】

細胞を、無菌性 (< U S P 2 1 > 浸漬試験の陰性結果)、内毒素 (5 E U / m l 未満のゲル血餅 U S P < 8 5 >)、マイコプラズマ (ヨーロッパ薬局方および米国薬局方の試験による陰性結果)、正体 (F A C S によるものであり、少なくとも 70 % の C D 4 1 a +、C D 4 2 b +)、P L T 計数 / m p P L T (C D 6 1 についての F A C S)、形態 (1 チューブリン染色と共に D I C 顕微鏡)、および P A C 1 結合 (活性化) による潜在力について、さらに試験する。

30

【0439】

精製した血小板を、C D 4 1 a および C D 4 1 b に対する蛍光コンジュゲート化抗体で染色し、上記のように F A C S 分析を受けさせた。i P S - 0 1 から誘導された P L T の代表的な 2 次元ドットプロットが以下に示される。図 2 0 に示される実施例では、集団は、二重陽性染色集団 6 8 . 2 % で、8 1 . 8 % C D 4 1 a + ; 6 9 . 2 % C D 4 2 b + である。

【0440】

図 2 0 で実施した C D 4 1 a +、C D 4 2 b + F A C S と併せて、ヨウ化プロピジウム (p r o p i d i u m i o d i n e) (P I) を、C D 染色の間に試料に添加して、生存度を評価する。F A C S 分析を、以前に記載したように、10,000 の事象を計数して実施し、さらなる事象を、フローチャネル 3 において収集して、P I 陽性事象 (非生存血小板) を検出する。データを分析して、C D 4 1 a + / C D 4 1 b + 血小板の百分率、およびパーセント生存度 (検出された総血小板 - P I + 血小板 / 検出された総血小板) を得る。

40

【0441】

血小板の各最終生成物ロットを、フローサイトメトリー分析を使用して C D 6 1 陽性事象を検出することによって、血小板の数および血小板微粒子の数について評価する。このアッセイを、既知の数の蛍光ビーズを使用して実施して、データを標準化し、P L T / μ L および m p P L T / μ L の絶対数を取得する。簡潔に述べると、血小板の 5 ~ 10 μ L 試料を、0 . 9 % 生理食塩水中に希釈し、2 つのチューブのそれぞれの中に分配する：

50

1) 60 μ L / チューブの最終反応容量中に、既知の数の蛍光ビーズおよびフィコエリトリンコンジュゲート化抗CD61 IgGと共に凍結乾燥ペレットを含む1つのTruCount (BDカタログ番号340334) チューブ、ならびに

2) 60 μ L / チューブの最終反応容量中に、非特異的二次抗体結合を説明するためにPEコンジュゲート化マウスIgGを含む1つのアイソタイプ対照チューブ。

【0442】

チューブを穏やかに混合し、20~24 で20分間インキュベートし、その後400 μ Lの冷(2~8) 1%ホルムアルデヒドを添加し、冷所で貯蔵し、2時間にわたって光から保護する。固定した血小板試料を分析する前に、データ獲得の適切な領域についてのピークチャンネル、ゲーティング、軸、象限位置およびマーカー境界に関するFACS機械設定を、0.9%生理食塩水中に希釈した1 μ Mの均一な直径を有する新たに超音波処理したラテックスビーズ(CMLカタログ番号C37483)の試料から、最低10,000の事象を収集することによって決定する。これらの設定を適用した後に、最低100,000の事象を、アイソタイプ対照およびCD61染色試料について獲得する。CD61試料で取得された計数は、CD-61陽性蛍光染色PLT、CD-61陽性mpPLTについて、および検出されたTruCount蛍光ビーズの数についての事象を登録する。予め設定した領域中で計数された事象を、血小板サイズ範囲2~4ミクロンにおいて、およびアイソタイプ対照において検出された非特異的結合に対して補正されたmpPLT象限において分析する。データを、製造業者によって提供されるチューブ1つ当たりのTruCountビーズの既知の数に基づき、以下の式を使用して、検出されたTruCountビーズの効率に対して標準化する。

10

20

【0443】

計数された事象数 / 計数されたビーズ数 \times チューブ1つ当たりのTruCountビーズ数 / 試料容量 = mpPLT / μ L または PLT / μ L。

【0444】

さらに、顕微鏡検査を利用して、hESC-PLTおよびhiPSC-PLTの形態を評価する。形態を、微分干渉顕微鏡(DIC)によって、および血小板に固有の微小管の特徴的外周バンドにおける1-チューブリンについての染色を確認することによって、評価する。簡潔に述べると、血小板を、4%ホルムアルデヒド中で固定し、1 μ g/mlポリ-L-リシン被覆カバーガラス上に遠心分離し、0.5% Triton X-100で透過処理し、免疫蛍光ブロッキング緩衝液(50ml PBS中、0.5g BSA、0.25mlの10%アジ化ナトリウムおよび5ml FCS)中で抗体標識化前に最低2時間ブロッキングする。透過処理した細胞の境界を確定するために、試料を、C末端ペプチド配列CKAVLEEDVEEVAEMEPEDEKGH(Genemed Synthesis, Inc.) (配列番号1)に対して生成されたヒト1-チューブリンに対するウサギポリクローナル一次抗体と共にインキュベートする。次いで、試料を、Alexa Fluor 568nm (Invitrogen; Molecular Probes)にコンジュゲート化した二次ヤギ抗ウサギ抗体で処理し、インキュベーションの間およびインキュベーションの後に、PBSで広範に洗浄する。カバーガラスを、顕微鏡スライド上にマウントする(Aqua Polymount; Polysciences)。背景対照として、スライドを、二次抗体単独と共にインキュベートし、画像を調整して抗体の非特異的結合を説明する。試料を、油浸対物レンズまたは微分干渉対物レンズを備えた顕微鏡で試験する。画像を、電荷結合素子カメラを使用して取得する。画像を、MetaMorph画像分析ソフトウェア(Molecular Devices)およびImageJ(National Institutes of Health)を使用して分析した。静止血小板の特徴的特性を、以下のように評価する：微分干渉(DIC)顕微鏡：ディスク形状、直径およそ2~3 μ M 1-チューブリン染色：静止血小板と類似した直径を有する微小管の顕著な外周バンド。図21を参照のこと。

30

40

【0445】

血小板(hESC-PLTおよびhiPSC-PLT)をさらに試験して、多能性細胞

50

の非存在を（例えば、多能性マーカーを検出するためのPCR、免疫蛍光および/またはFACSによって）確認する。感度を増強するために、検出方法は、低速遠心分離と併せたフィルター、マトリックスまたは勾配で捕捉することによって潜在的な細胞汚染物を濃縮して細胞をペレット化する一方、上清中に血小板を残す手順と組み合わせられ得る。

【0446】

血小板（hESC-PLTおよびhiPSC-PLT）を、浸漬方法、USP<21>、CFR 610.12に従って、微生物の存在についてさらに試験する。

【0447】

血小板（hESC-PLTおよびhiPSC-PLT）を、内毒素についてさらに試験する。グラム陰性細菌内毒素を、Pyrotek（登録商標）Gel Clot Endotoxin System（Associates of Cape Cod, Inc.）を使用して定量する。適切な陰性対照、陽性対照および陽性生成物対照を調製する。陽性生成物対照は阻害対照であり、標準的な内毒素が添加される標本または標本の希釈物からなる。試料を、Pyrotek（登録商標）試薬に直接添加し、完全に混合する。反応チューブを、 37 ± 1 で 60 ± 2 分間インキュベートする。陽性試験は、チューブを反転させたときに崩壊しないゲルの形成によって示される。内毒素を、一連の標本希釈物の中から終点を見出すことによって定量する。一連の内毒素の非存在下では、既知の濃度の陽性対照が、この試験に含まれ得る。この内毒素アッセイは、PLT試料に対する使用について検証され、内毒素検証に関する1987年のFDAガイダンスと一致する様式で実施される。

10

20

【0448】

血小板（hESC-PLTおよびhiPSC-PLT）を、マイコプラズマについてさらに試験する。HSA勾配を実施する前の血小板の遠心分離後、上清（例えば、順化StemSpan ACF培地からなる）を収集し、プールする。最終生成物バッチおよび順化培地から精製した血小板の試料を、マイコプラズマ試験に送る。マイコプラズマ検出を、指標細胞培養物上での間接的培養ならびに寒天プレート上およびブロス中への直接的接種を用いて、ヨーロッパ薬局方および米国薬局方のガイドラインに従って実施する。

【0449】

（実施例6）

血小板潜在力およびPAC-1結合についてのアッセイ。

30

【0450】

本開示の血小板は、この実施例に記載する方法を使用して、潜在力および/またはPAC-1結合について評価され得る。

【0451】

血小板活性化は、GPIIb/IIIa複合体のフィブリノーゲン受容体機能を活性化して増強されたリガンド結合をもたらす、IIIb₃インテグリンにおけるコンフォメーション変化を*in vivo*で誘発する。活性化された血小板は、脈管傷害の部位においてフィブリノーゲンおよびフォン・ヴィルブランド因子を含む基質に結合し、血栓形成を刺激する。血小板活性化の際に生じる機能的IIIb₃インテグリン発現の程度を決定するために、hESC-PLT、iPSC-PLTおよび精製正常ヒト血小板を活性化し、静止対照PLTと比較したPAC-1結合の程度について評価する。PAC-1は、IIIb₃インテグリンの活性化コンフォメーションに排他的に結合するフィブリノーゲン模倣物である。

40

【0452】

PLTを計数し、最低100,000個のPLTを取り出し、およそ20PLT/uLの密度まで、さらなる培地で希釈する。PAC1-FITC（BD、1:100希釈）ならびに抗体（CD41a-APCコンジュゲート化（アロフィコシアニン）1:100およびCD42b-PEコンジュゲート化（フィコエリトリン）1:100（BD Bioscience、San Jose、CA）を、PLT試料に添加する。試料の半分（250uL）を、2つの5mL FACSチューブの各々中に分配する。1つのチューブに

50

、トロンビン (Sigma) を、1 U / mL の最終濃度になるように添加する。トロンビンに曝露させた活性化 P L T および対照試料を、室温で 15 ~ 20 分間インキュベートする。試料は、対照としてヒト血液血小板を使用して決定される前方散乱対側方散乱ゲーティングを用いた F A C S 分析を受ける。活性化したものにおける C D 4 1 a および P A C - 1 陽性事象の数を、非活性化対照における C D 4 1 a および P A C - 1 陽性事象の数と比較することによって、P A C - 1 結合 (活性化) を定量する。

【0453】

(実施例7)

剪断力下で生成された血小板の収量および純度を改善するための MMP インヒビターなどのプロテアーゼの使用。

10

【0454】

本開示は、剪断力条件を使用する血小板生成法もまた包含する (例えば、培養培地は培養の間流れている)。この培養を、数十マイクロリットル / 分の範囲内の流速が造血の間の骨髓腔中の剪断力に近いマイクロ流体デバイスを使用して実施した。一部の例では、この流速は、5 ~ 25 マイクロリットル / 分の範囲内である。本開示に従って i P S 細胞または E S 細胞から生成された巨核球は、剪断力下で培養した場合、はるかにより効率的に、血小板を脱落することが見出されている。

【0455】

M L P を培養するために使用されるデバイスは、付着なしに M L P を固定化することができなければならない。一部の例では、これは、M L P が、動いている培養培地にアクセス可能であるがそれら自体は顕著に動くことができないデバイスの領域またはチャンバー内に位置付けられることを意味する。

20

【0456】

本開示では、血小板の収量および純度がこれらの培養系において改善され得ることを認識している。一態様では、この改善は、剪断力培養の間の1種または複数の特定のプロテアーゼインヒビターの使用によって達成される。この実施例は、これらの培養条件の間にマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) インヒビターを添加することの利益を実証している。MMP インヒビターは、プラスミノゲン活性化因子インヒビターなどであるがこれに限定されない、これらの方法で同様に使用され得る他のプロテアーゼインヒビターの代表であることを理解すべきである。

30

【0457】

別の一態様では、血小板の収量および純度における改善は、増加した剪断力で培養を実施することによって達成される。この剪断力は、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 または 4.5 $\text{d} \cdot \text{in} / \text{cm}^2$ であり得る。

【0458】

H A - i P S および M A 0 9 h E S 株から誘導した成熟 M K を使用した。M K 特異的培地中に懸濁した等しい数の M K を、20 μM の MMP インヒビター G M 6 0 0 1 の存在下または非存在下でマイクロ流体デバイス中にロードした。一定の剪断力を、培養期間を通じて M K に適用した。M K の下流の M K - 培地を、6 時間の期間にわたって 30 分間隔で収集した。収集した培地中の血小板の数および純度 (即ち、C D 4 1 a + C D 4 2 b + である総細胞の百分率) を、フローサイトメーターを使用して測定した。

40

【0459】

図 2 2 ~ 2 4 は、H A - i P S から誘導された M K からの血小板生成の結果を提供する。血小板を、[提供してください (PLEASE PROVIDE)] $\mu \text{L} / \text{分}$ の流速によって規定される一定の剪断力下で生成した。培養の開始時での MMP インヒビター G M 6 0 0 1 の添加は、新たに生成された血小板の純度 (図 2 2) および収量 (図 2 4) を顕著に改善した。純度は、C D 4 1 a + C D 4 2 b + である回収された総細胞の百分率で表される。8% デキストランを添加することによって培養培地の粘度を増加させることは、血小板形成に対して負の影響を有した。

【0460】

50

図23は、MMPインヒビターGM6001が存在する場合に、顕著により多い血小板が剪断力培養下でMKから生成されたことを実証している。

【0461】

図24は、MMPインヒビターGM6001もしくはDMSOの存在下での剪断力培養における、または静置培養下での、血小板収量における差異を実証している。

【0462】

図25は、MA09(ES)由来MKを使用して血小板を生成した場合に同様の結果が達成されることを実証している。図25および26は、剪断力の中程度の変化(12~16 μ L/分の流速変化によって示される)もまた、血小板の純度および収量を改善することも実証している。

【0463】

(実施例8)

静置培養での血小板形成において有用な保護的インヒビターとしての、MMP8特異的インヒビター。

【0464】

プロテアーゼ、例えばMMPは、GPIbとも呼ばれるCD42bの脱落に關与する。血小板CD42bは、vWFの受容体であり、創傷治癒における初期の血小板関与を媒介する。したがって、CD42bの喪失は、低い血小板品質を生じ得る。広域スペクトルのMMPインヒビターGM6001は、血小板からのCD42bの脱落を阻害することが報告されている。

【0465】

いくつかの特異的MMPインヒビターを使用した比較研究では、MMP8インヒビターは、血小板機能を保護することにおいて、GM6001よりも高い潜在力を有すると識別された。図26に示すように、MKの血小板生成のピーク時におけるMMP8特異的インヒビターの添加は、iPS由来血小板の純度を、43.7%から65.5%に顕著に改善し、後者は、GM6001処理した培養物から取得されたものよりも、およそ10%高い。顕著により多いCD41a⁺CD42b⁺血小板が、GM6001と比較して、MMP8特異的インヒビターの存在下で生成される。MMP8特異的インヒビターおよびGM6001を組み合わせで使用した場合、純度レベルは影響を受けないように見えるが(図27)、血小板収量は増加される(図28)。血小板生成のピークは、培養物中の血小板含有量を測定することによって決定される(例えば、数日間にわたり毎日)。これは、典型的には、MLP分化培養期間の開始の4~7日後であるが、より長くてもよく、またはシフトしていてもよい。

【0466】

図27および28中のデータは、iPS由来巨核球を使用して生成したものであるが、本開示は、骨髄および臍帯血CD34⁺前駆細胞などの、血小板の天然に存在する供給源の培養におけるMMP8特異的インヒビターの使用を提供する。

【0467】

(実施例9)

昇温でのiPS血小板生成。

【0468】

図29および30は、穏やかな温熱条件下で巨核球を培養することで、血小板の純度および収量の両方が顕著に改善されたことを実証している。CD41a⁺CD42b⁺血小板の百分率は、37よりも39でインキュベートした培養物において有意に高い。この効果は、血小板生成のピークに達する前に最も明白である。純度を改善することに加えて、巨核球のより高い温度でのインキュベーションは、同じ出発数の巨核球に由来する血小板のより高い収量にも寄与し、これは、昇温が本明細書で提供される培養系において巨核球または血小板に対して有害な影響を有さないことを示している。

【0469】

(実施例10)

10

20

30

40

50

iBETは、c-myc遺伝子の下方調節を介して、巨核球傾倒を促進し、全体的血小板収量を増加させる。

【0470】

巨核球系列特異的分化の本発明者らの新たな方法では、血小板生成に最も適した巨核球前駆体の出現が、PVE-HE細胞培養期間の開始から3~4日の短い期間中でのみ回収され得る。骨髄系列CD14⁺細胞の段階的増加は、巨核球の品質および血小板の収量における減少と関連するようである。巨核球前駆体のより高くより良い収量を達成するための試みにおいて、c-myc遺伝子を、新規巨核球促進性因子を同定することを目的として、初期巨核球形成の間の重要な調節遺伝子として標的に定めた。

【0471】

GSK1210151A (I-BET151)は、プロモドメインのBETファミリーの経口投与可能なイミダゾロキノリン(imidazolonoquinoline)ベースのインヒビターである。I-BET151は、初期細胞周期停止およびアポトーシスの誘発を介して、ヒトおよびマウスのMLL-融合白血病細胞株に対して著明な効力を有することが示された。作用の様式は、クロマチンを介したBRD3/4、PAF_cおよびSEC成分の置き換えを介した重要な遺伝子(BCL2、C-MYCおよびCDK6)の転写の阻害に、一部起因する。

【0472】

高用量のi-BET-151は、大量のアポトーシスを惹起するが、マイクロモル濃度範囲(またはマイクロモル濃度未満の範囲)のより低い用量で*in vitro*の巨核球形成を起こしている細胞を処置することで、MK前駆体の数の増加が生じた。図31は、定量的mRNA分析を介して、i-BET-151によるc-myc遺伝子発現の用量依存的阻害を実証している。対照的に、前MK遺伝子GATA1遺伝子は、i-BET-151に応答して上方調節された(図32)。i-BET-151による処理は、CD14⁺骨髄細胞の数における用量依存的減少もまた生じた。

【0473】

したがって、iPS由来(およびES由来)巨核球および血小板の*in vitro*の生成のために本明細書に提供される方法を使用して、巨核球形成を起こしている細胞における内因性c-myc遺伝子発現の抑制が、MK系列に有利な細胞分化のバランスを変化させ得ることが、さらに発見されている。

10

20

30

【 図 1 】

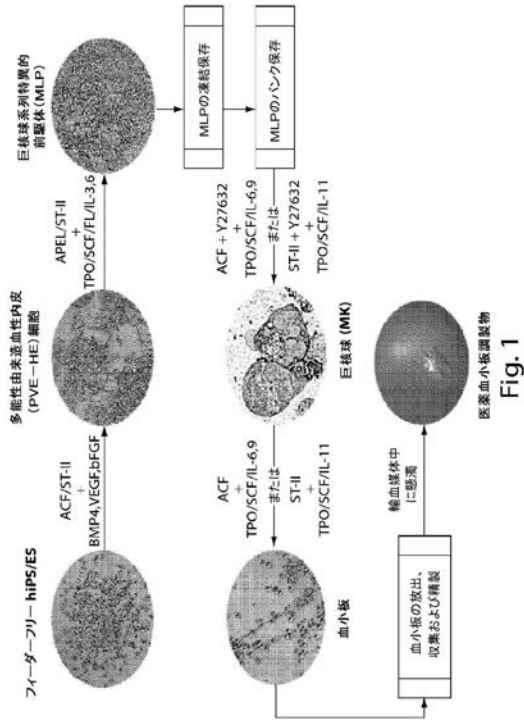


Fig. 1

【 図 2 】

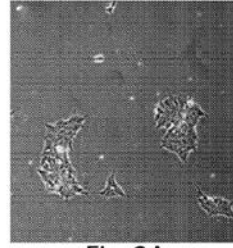


Fig. 2A

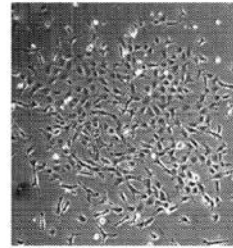


Fig. 2B

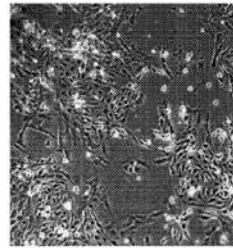


Fig. 2C

【 図 3 A 】

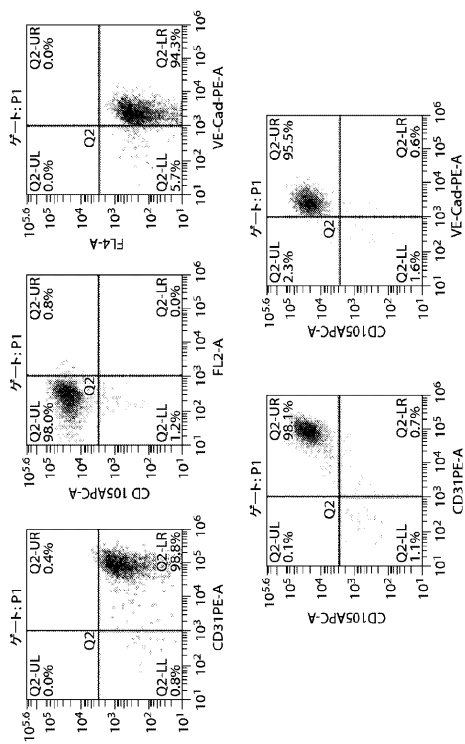


Fig. 3A

【 図 3 B 】

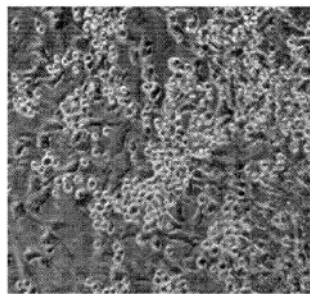


Fig. 3B

【 図 4 】

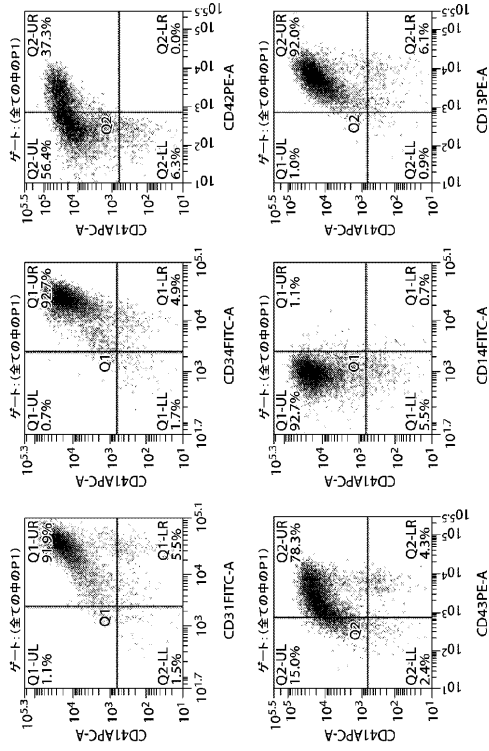


Fig. 4

【 図 5 】

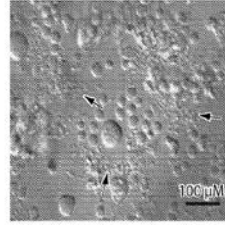


Fig. 5A

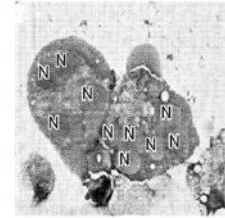


Fig. 5B

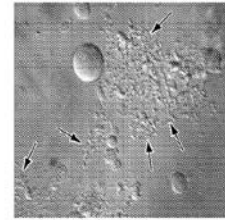


Fig. 5C

【 図 6 】

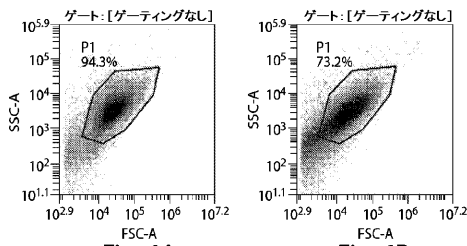


Fig. 6A

Fig. 6B

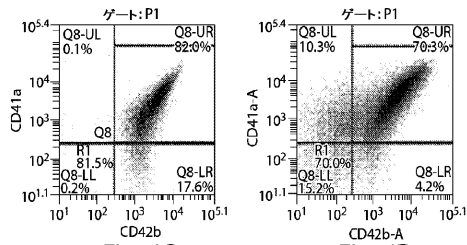


Fig. 6C

Fig. 6D

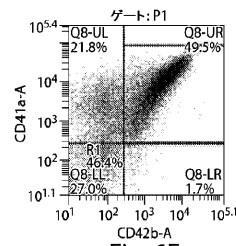


Fig. 6E

【 図 7 】

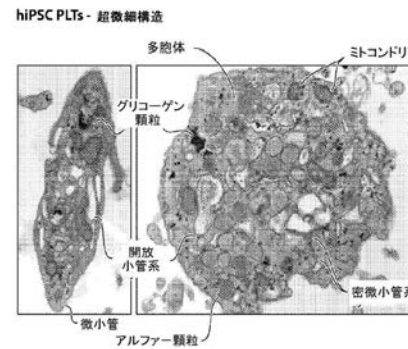
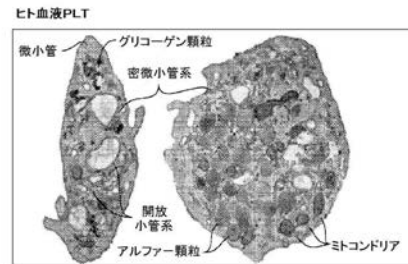


Fig. 7

【 図 8 】

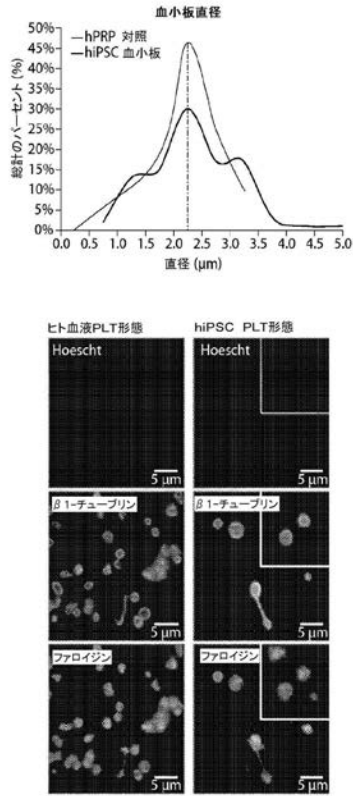


Fig. 8

【 図 9 】

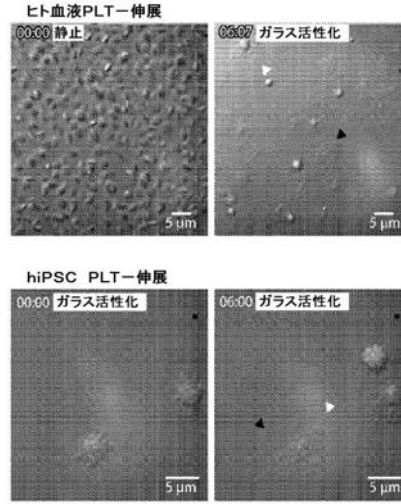


Fig. 9

【 図 1 0 】

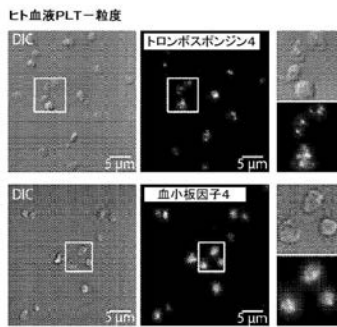


Fig. 10A

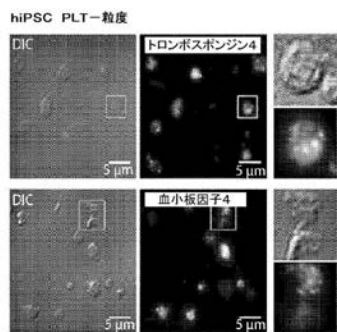


Fig. 10B

【 図 1 1 】

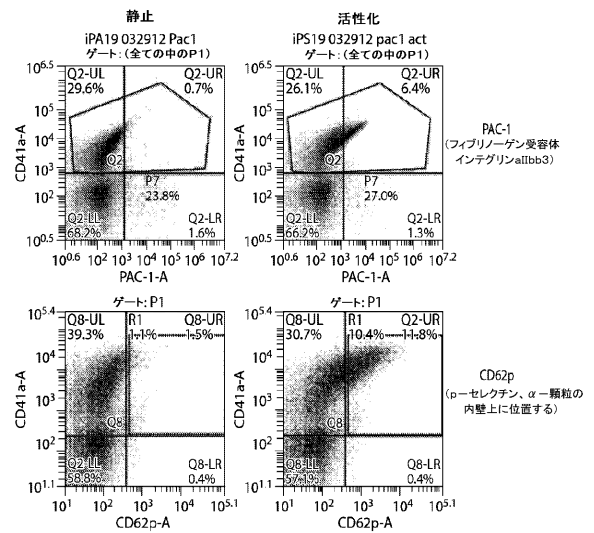


Fig. 11

【 図 1 2 】

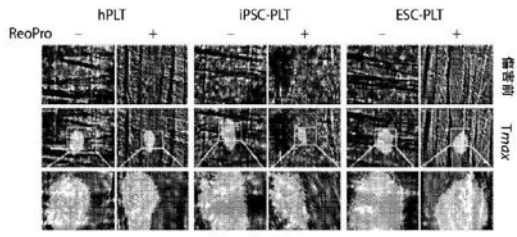


Fig. 12A

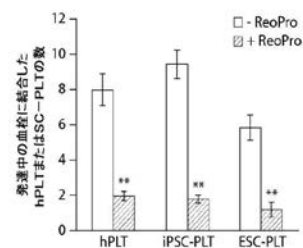


Fig. 12B

【 図 1 3 】

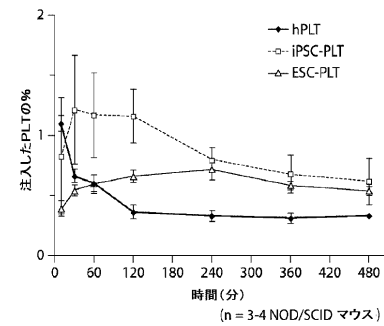


Fig. 13

【 図 1 4 A 】

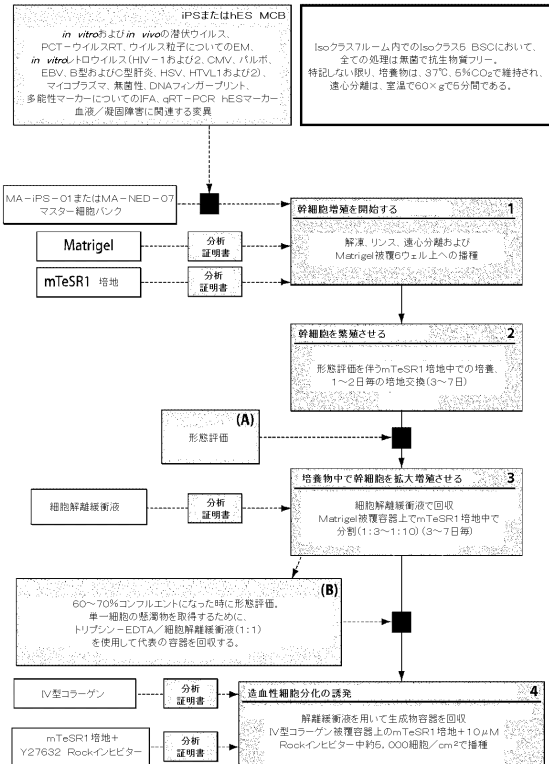


Fig. 14A

【 図 1 4 B 】

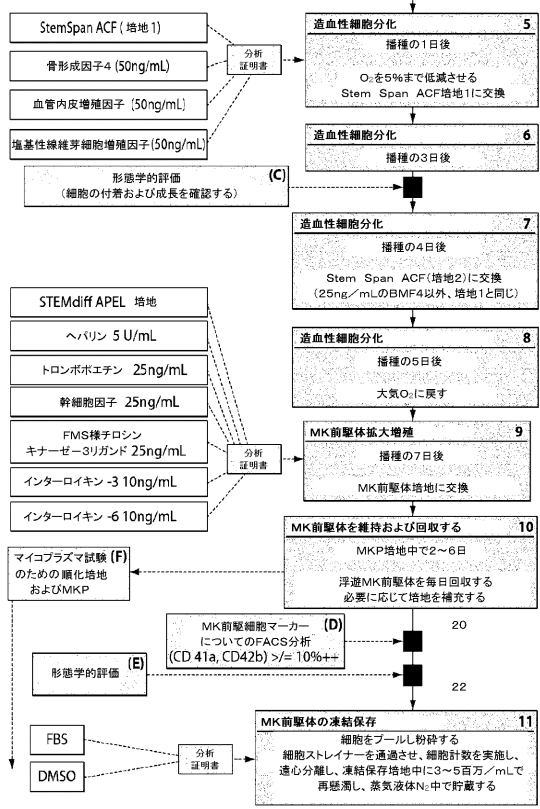


Fig. 14B

【 図 1 4 C 】

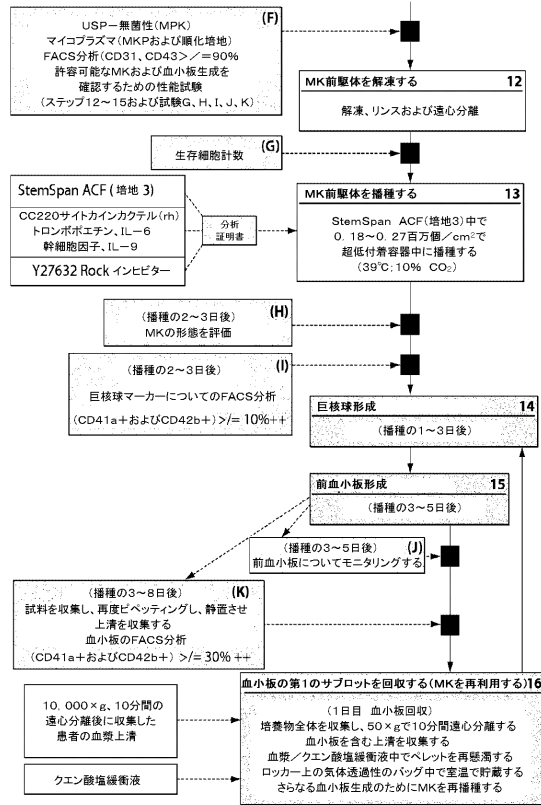


Fig. 14C

【 図 1 4 D 】

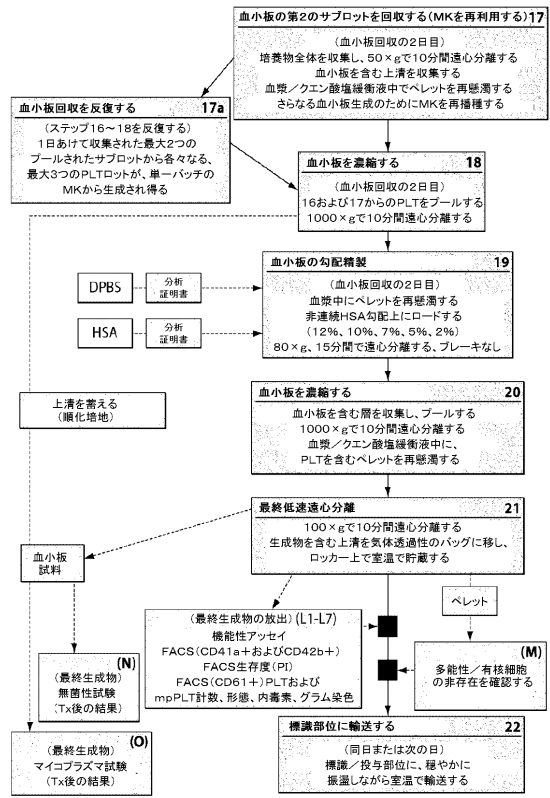


Fig 14D

【 図 1 4 E 】

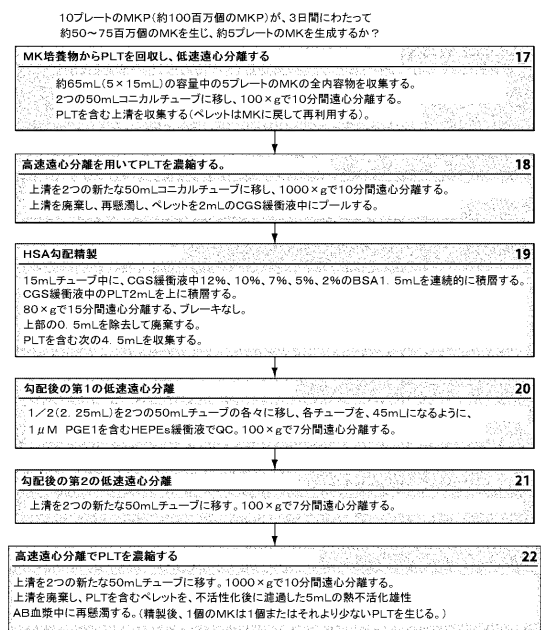


Fig. 14E

【 図 1 5 】

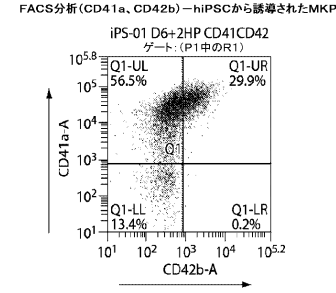


Fig. 15

【 図 1 6 】

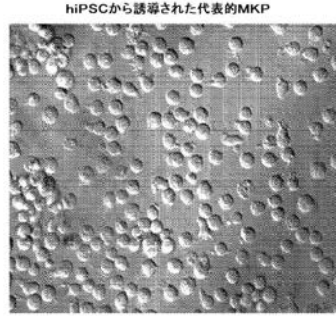
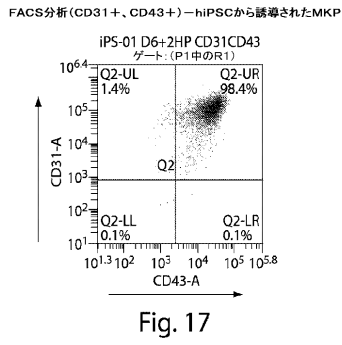
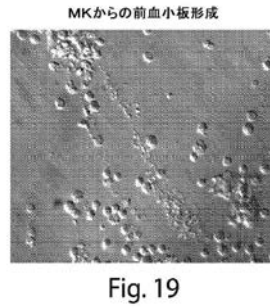


Fig. 16

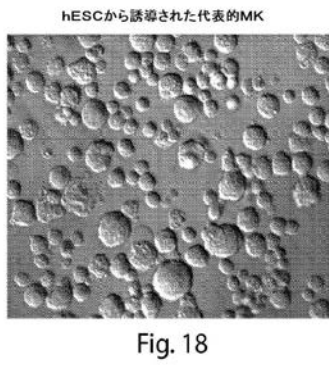
【 図 1 7 】



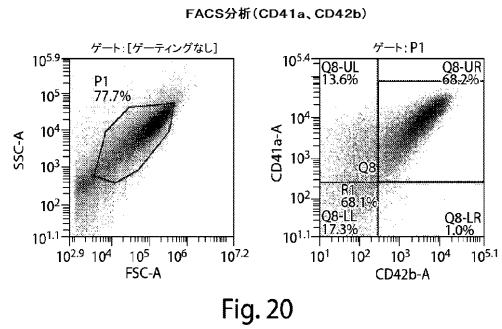
【 図 1 9 】



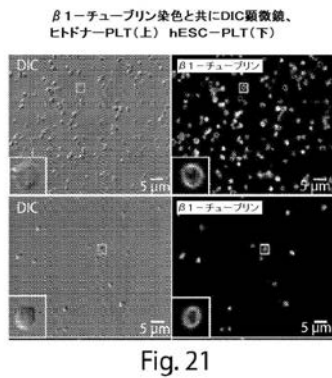
【 図 1 8 】



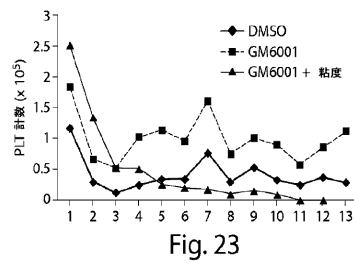
【 図 2 0 】



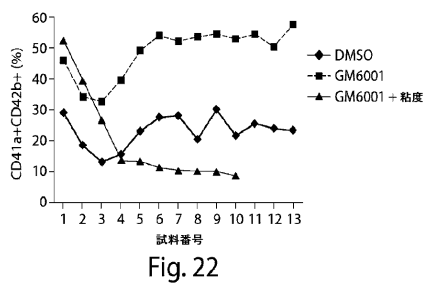
【 図 2 1 】



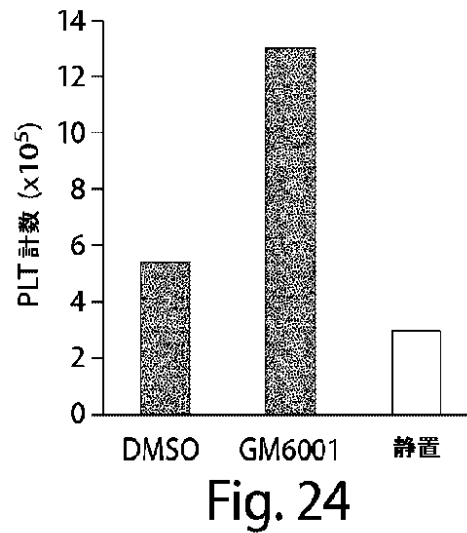
【 図 2 3 】



【 図 2 2 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

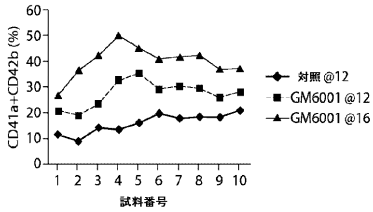


Fig. 25

【 図 2 7 】

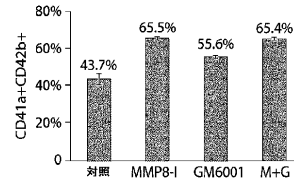


Fig. 27

【 図 2 6 】

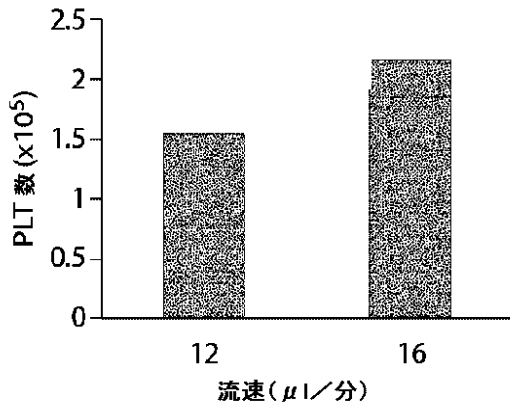


Fig. 26

【 図 2 8 】

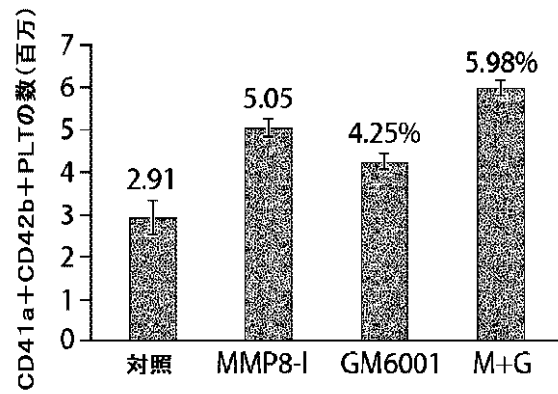


Fig. 28

【 図 2 9 】

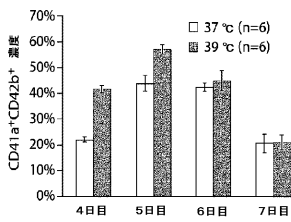


Fig. 29

【 図 3 1 】

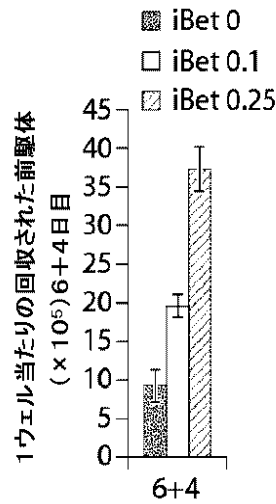


Fig. 31

【 図 3 0 】

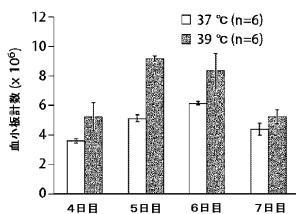


Fig. 30

【 図 3 2 】

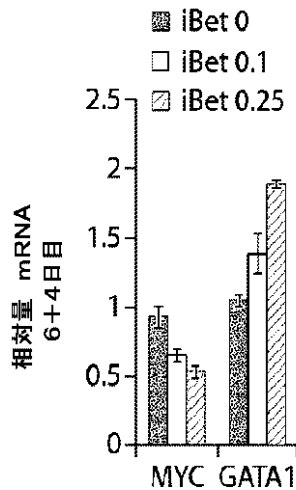


Fig. 32

【 図 3 3 】

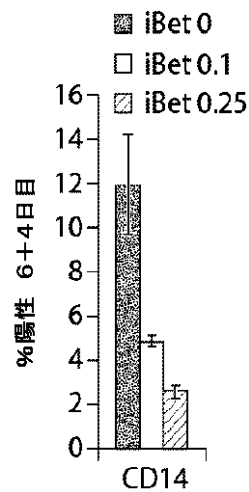


Fig. 33

【 配列表 】

2019205448000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和1年8月9日 (2019.8.9)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

2 ミクログロブリン欠損血小板を生成するための方法であって、

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物を、造血拡大増殖培地およびトロンボポエチン (TPO) または TPO アゴニストと接触させて、培養中において、2 ミクログロブリン欠損血小板を放出する前血小板の形成を引き起こすこと、ここで、該 2 ミクログロブリン欠損血小板の少なくとも 60% が CD41a および CD42b の発現について陽性である、

を含む、前記方法。

【 請求項 2 】

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物を、幹細胞因子 (SCF)、インターロイキン (IL) - 6、および IL - 9 と接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【 請求項 3 】

TPO の濃度が 10 ~ 100 ng / ml であり、SCF の濃度が 0.5 ~ 100 ng / ml であり、IL - 6 の濃度が 5 ~ 25 ng / ml であり、および IL - 9 の濃度が 5 ~

25 ng/ml である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物を SCF および IL-11 と接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

TPO の濃度が 10 ~ 100 ng/ml であり、SCF の濃度が 0.5 ~ 100 ng/ml であり、および IL-11 の濃度が 10 ~ 100 ng/ml である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物を ROCK インヒビターと接触させることをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ROCK インヒビターの濃度が 0.05 ~ 50 μM である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ROCK インヒビターが Y27632 である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物をヘパリンと接触させることをさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ヘパリンの濃度が 2.5 ~ 25 単位/ml である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物を BET インヒビターと接触させることをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

巨核球の非接着性培養物がフィーダーフリーの培養物である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

巨核球を剪断力に供することをさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物を、外因的に添加されたプロテアーゼインヒビターまたは外因的に添加されたマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) インヒビターと接触させることをさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

2 ミクログロブリン欠損巨核球の非接着性培養物を、37 と 40 との間の温度で培養することをさらに含む、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

血小板を単離することをさらに含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

2 ミクログロブリン欠損巨核球が、2 ミクログロブリン欠損多能性幹細胞に由来する、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

2 ミクログロブリン欠損多能性幹細胞が、2 ミクログロブリンノックアウト多能性幹細胞である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

血小板を生成するための方法であって、巨核球の非接着性培養物を、造血拡大増殖培地および TPO または TPO アゴニストと接触させて、培養中において、前血小板の形成を引き起こすこと、ここで、該前血小板が血小板を放出し、該血小板の少なくとも 60% が CD41a および CD42b の発現について陽性である、

を含む、前記方法。

【請求項 20】

血小板を生成するための方法であって、
プロテアーゼインヒビターの存在下、剪断力条件下で巨核球または巨核球系列特異的前駆細胞（MLP）の非接着性集団を培養して、培養中において、前血小板の形成を引き起こすこと、ここで、該前血小板が血小板を放出し、該血小板の少なくとも60%がCD41aおよびCD42bの発現について陽性である、
を含む、前記方法。

【請求項 21】

巨核球系列特異的前駆細胞（MLP）を生成するための方法であって、
人工多能性幹細胞に由来する巨核球系列特異的前駆細胞（MLP）を、BETインヒビターの存在下またはc-mycサブプレッサーの存在下で接触させて、MLPの形成を引き起こすこと
を含む、前記方法。

【請求項 22】

巨核球を生成するための方法であって、
(a) 多能性幹細胞を培養して、造血性内皮細胞を形成すること；
(b) 該造血性内皮細胞を培養して、巨核球系列特異的前駆細胞（MLP）を形成すること；および
(c) 該MLPを培養して、巨核球を形成すること
を含む、前記方法。

フロントページの続き

(72)発明者 リュ, シ - ジャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 4 5 , シュルーズベリー, ベガ ドライブ 2 2

(72)発明者 ランツァ, ロバート ピー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 1 0 , クリントン, サウス メドー ロード 3
5

Fターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BB19 BD39 CA44

【外国語明細書】

2019205448000001.pdf