



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0044427
 (43) 공개일자 2018년05월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) *A61K 35/19* (2014.01)
C12M 1/06 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0644 (2013.01)
A61K 35/19 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7010196
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월08일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년04월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2016/076406
- (87) 국제공개번호 WO 2017/047492
 국제공개일자 2017년03월23일
- (30) 우선권주장
 JP-P-2015-182221 2015년09월15일 일본(JP)

- (71) 출원인
가부시키가이샤 메가카리온
 일본 교토후 교토시 시모교쿠 추도지 아와타초 9
 3반지 교토 리서치 파크
- (72) 발명자
시게모리, 도모히로
 일본 6008815 교토후 교토시 시모교쿠 추도지 아
 와타초 93반지 교토 리서치 파크 가부시키가이샤
 메가카리온 내
오카모토, 하루키
 일본 6008815 교토후 교토시 시모교쿠 추도지 아
 와타초 93반지 교토 리서치 파크 가부시키가이샤
 메가카리온 내
- (74) 대리인
장수길, 오현식

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **회전식 교반 배양법에 의한 혈소판의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은, 혈소판의 제조 방법으로서, 배양 용기 내의 배양액 중에서 거핵구 세포를 배양하는 공정을 포함하며, 당해 배양 공정에서, 배양액을 교반자로 교반하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12M 27/02 (2013.01)

C12M 41/42 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

혈소판의 제조 방법으로서,
배양 용기 내의 배양액 중에서 거핵구 세포를 배양하는 공정을 포함하며,
상기 배양 공정에서, 상기 배양액을 교반자로 교반하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 교반자가 블레이드상인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 배양 용기가 밀폐형 바이오리액터인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 교반자를 회전수 50rpm 이상으로 회전시키는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 거핵구 세포가,
거핵구 세포로부터 미분화된 세포에서, 암 유전자, 폴리콤 유전자, 및 아폽토시스 억제 유전자로 이루어지는 군
으로부터 선택되는 유전자 중 적어도 하나를 강제 발현한 후, 당해 강제 발현을 해제한 세포인, 방법.

청구항 6

혈소판 제제의 제조 방법으로서,
제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 방법으로 거핵구 세포에 혈소판을 산생시키고, 배양물로부터 혈소판
을 회수하는 공정과,
상기 혈소판으로부터 혈소판 이외의 혈구계 세포 성분을 제거하는 공정을 포함하는 방법.

청구항 7

혈액 제제의 제조 방법으로서,
제6항에 기재된 방법으로 혈소판 제제를 제조하는 공정과,
상기 혈소판 제제를 다른 성분과 혼합하여 혈액 제제를 얻는 공정을 포함하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 방법으로 제조된 혈소판.

청구항 9

제6항에 기재된 방법으로 제조된 혈소판 제제, 또는 제8항에 기재된 혈소판을 포함하는, 혈소판 제제.

청구항 10

제7항에 기재된 방법으로 제조된 혈액 제제, 또는 제8항에 기재된 혈소판을 포함하는, 혈액 제제.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 회전식 교반 배양에 의한 혈소판의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈소판 제제는, 수술 시나 상해 시의 대량 출혈, 또는 항암제 치료 후의 혈소판 감소에 따른 출혈 경향을 나타내는 환자에 대하여 그 증상의 치료 및 예방을 목적으로 하여 투여된다. 현재, 혈소판 제제의 제조는, 건강 지원자에 의한 헌혈에 의존하고 있다. 그러나, 일본에서는 인구 구성에 기인하여 헌혈자수가 감소하고 있어, 2027년에는 약 100만인분의 헌혈이 부족할 것으로 추측되고 있다. 그래서, 본 발명의 기술분야의 목적의 하나로서, 혈소판의 안정 공급을 들 수 있다.

[0003] 또한, 종래의 혈소판 제제는, 세균 오염에 의한 리스크가 높기 때문에, 혈소판 제제의 이식 후에 위독한 감염증을 야기할 가능성이 있다. 그 때문에, 임상 현장에서는, 항상, 보다 안전한 혈소판 제제가 요구되고 있다. 그 요구에 응하기 위해, 오늘날에는, in vitro로 배양한 거핵구 세포로부터 혈소판을 생산하는 방법이 개발되어 있다.

[0004] 종래, 배양 세포로부터의 혈소판 생산은, 디쉬를 사용한 정지 배양계에서 행하여지고 있었다(WO2014/100779A1, Qiang Feng, et al., Stem Cell Reports). 그러나, 정지 배양계는 매우 손이 많이 가는 것이며, 대량 배양에는 적합하지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2014/1007791호 팸플릿

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Qiang Feng, et al., Stem Cell Reports 3 1-15 (2014)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은, 셰이커 플라스크를 사용한 진탕 배양계, 즉 배양 용기 자체를 진탕하는 배양 방법을 사용함으로써, 높은 생리 활성을 갖는 혈소판을 생산하는 것에 성공하였다. 그러나, 셰이커 플라스크 배양계에서는, 배지량의 스케일업에 따라, 혈소판(CD41a+CD42b+) 생산량과 혈소판의 생리 활성(PAC1 결합성, P-selectin 양성)의 저하가 일어나는 것이 관명되었다.

[0008] 또한, 셰이커 플라스크 배양계에서는, 웨딩 반응 등에 기인하는 것으로 생각되는 혈소판의 열화 반응(CD42b 양성률의 저하)이 일어나는 것이 발견되었다. 게다가, 생체로의 이식에 적합하지 않은 비정상적인 혈소판(아넥신 V 양성 혈소판)이 보다 많이 포함되는 것도 알았다.

[0009] 따라서, 본 발명은, 생체에 이식 가능한 고품질의 혈소판을 대규모의 양으로 생산하는 방법을 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위하여 검토를 거듭한 결과, 배양 용기를 진탕하는 것이 아니라, 배양 용기 내에 배치한 교반자로 배양액을 회전 방향으로 교반하면서 거핵구 세포를 배양함으로써, 혈소판의 생산 효율 및 생리 활성을 높게 할 수 있음과 함께, 혈소판의 열화를 낮게 억제함, 비정상 혈소판을 감소시킬 수 있음을 알아냈다. 또한, 교반 배양에 의한 배양 시의 세포 밀도, 교반 회전수, 기타의 조건을 검토하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0011] 즉, 본 발명은, 혈소판의 제조 방법으로서, 배양 용기 내의 배양액 중에서 거핵구 세포를 배양하는 공정을 포함하며, 상기 배양 공정에서, 상기 배양액을 교반자로 교반하는, 방법이다.

- [0012] 또한 본 발명에 따른 혈소판의 제조 방법에서는, 상기 교반자가 블레이드상인 것도 바람직하다.
- [0013] 또한 본 발명에 따른 혈소판의 제조 방법에서는, 상기 배양 용기가 밀폐형 바이옱리액터인 것도 바람직하다.
- [0014] 또한 본 발명에 따른 혈소판의 제조 방법에서는, 교반자를 회전수 50rpm 이상으로 회전시키는 것도 바람직하다.
- [0015] 또한 본 발명에 따른 혈소판의 제조 방법에서는, 상기 거핵구 세포가, 거핵구 세포로부터 미분화한 세포에서, 암 유전자, 폴리콤 유전자, 및 아폽토시스 억제 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 유전자 중 적어도 하나를 강제 발현한 후, 당해 강제 발현을 해제한 세포인 것도 바람직하다.
- [0016] 또한 본 발명은, 혈소판 제제의 제조 방법으로서, 이상에 기재된 방법으로 거핵구 세포에 혈소판을 산생시키고, 배양물로부터 혈소판을 회수하는 공정과, 상기 혈소판으로부터 혈소판 이외의 혈구계 세포 성분을 제거하는 공정을 포함하는 방법이다.
- [0017] 또한 본 발명은, 혈액 제제의 제조 방법으로서, 이상에 기재된 방법으로 혈소판 제제를 제조하는 공정과, 상기 혈소판 제제를 다른 성분과 혼합하여 혈액 제제를 얻는 공정을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 상기 어느 하나의 방법으로 제조된 혈소판을 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은 상기 어느 하나의 방법으로 제조된 혈소판 제제, 또는 상기 혈소판을 포함하는, 혈소판 제제를 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명은 상기 방법으로 제조된 혈액 제제, 또는 상기 혈소판을 포함하는, 혈액 제제를 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 방법에 의하면, 종래의 진탕 배양보다도 혈소판의 생산 효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 생산된 혈소판은, 종래의 진탕 배양으로 생산되는 혈소판보다도 높은 생리 활성을 갖는다.
- [0022] 또한, 본 발명의 방법에 의하면, 혈소판의 열화 반응(CD42b 양성률의 감소)을 억제할 수 있음과 함께, 비정상 혈소판(아넥신 V 양성 혈소판)의 산생을 억제할 수도 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은, 거핵구 세포의 교반 배양 또는 진탕 배양을 행하여 얻어진 혈소판에 대해서, PMA 또는 ADP의 자극의 전후에, 항CD42b 항체 및 항PAC-1 항체를 사용하여 유세포 분석(flow cytometry)을 행한 결과를 나타낸다.
 도 2는, 거핵구 세포의 교반 배양 또는 진탕 배양을 행하여 얻어진 혈소판에 대해서, PMA 또는 ADP의 자극의 전후에, 항CD42b 항체 및 항CD62p 항체를 사용하여 유세포 분석을 행한 결과를 나타낸다.
 도 3은, 거핵구 세포의 교반 배양 또는 진탕 배양을 행하여 얻어진 혈소판에 대해서, 항CD41a 항체 및 항CD42b 항체를 사용하여 유세포 분석을 행한 결과를 나타낸다.
 도 4는, 거핵구 세포의 교반 배양 또는 진탕 배양을 행하여 얻어진 혈소판에 대해서, 아넥신 V가 결합하는 비율을 유세포 분석으로 측정된 결과를 나타낸다.
 도 5는, 거핵구 세포를, 회전수를 바꾸어서 교반 배양하여 얻어진 각각의 혈소판에 대해서, 항CD41a 항체 및 항CD42b 항체를 사용하여 유세포 분석을 행한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명에 따른 혈소판의 제조 방법은, 배양 용기 내의 배양액 중에서 거핵구 세포를 배양하는 공정을 포함하며, 당해 배양 공정에서, 배양액을 교반자로 회전 방향으로 교반하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 명세서에 있어서, 「배양 용기」는, 배양액을 교반자로 교반하면서 거핵구 세포를 배양할 수 있는 용기라면 특별히 한정되지 않으며, 개방계의 배양 디쉬, 폐쇄계의 스크루 캡 구비 플라스크, 바이옱리액터 등을 들 수 있다.
- [0026] 본 명세서에 있어서, 「교반자」는, 배양액 중에 배치하여 배양액을 직접 교반할 수 있는 것이면 되고, 예를 들어 마그네틱 스테러로 사용되는 각종 교반자나, 바이옱리액터에 비치된 교반 블레이드로 할 수 있다. 마그네틱 스테러의 교반자를 사용하는 경우, 배양액 내에 교반자를 배치하고, 배양 용기의 외부에서 모터에 의해 자석을 회전시킴으로써, 배양액을 교반할 수 있다. 교반 블레이드를 구비한 바이옱리액터의 경우에는, 바이옱리액터

내의 블레이드가 배양액의 액면보다 아래로 되도록 하고, 바이오리액터가 구비하는 모터에 의해 교반 블레이드를 회전시킴으로써, 배양액을 교반할 수 있다.

- [0027] 이하, 본 발명의 일 형태로서, 교반 블레이드를 구비한 바이오리액터를 사용하는 예를 설명한다.
- [0028] 본 명세서에 있어서의 바이오리액터는, 거핵구 세포를 배양 가능한 배양조와, 배양조 내의 배양액을 교반할 수 있는 교반기를 갖는 한, 어떤 것이어도 되고, 시판하는 것을 사용해도 된다.
- [0029] 바이오리액터는, 최적의 세포 증식, 세포 대사, 거핵구 세포의 분화 성숙, 거핵구 세포의 다핵화, 전혈소판(proplatelet)의 형성, 혈소판 생산, 혈소판의 생리 활성의 유지 등에 적합한 물리화학적 환경을 제공한다. 그것을 위해, 통기 장치, 배기 장치, 온도 조절 장치, pH 제어 장치, 용존 산소압(DOT) 조절 장치, 배플, 스파저(sparger), 포트 등을 구비하고 있어도 된다.
- [0030] 바이오리액터의 교반기는, 배양액을 교반할 수 있는 한 어떤 구성이더라도 되지만, 예를 들어 배양조 내에 설치되고, 모터에 의해 구동되는 임펠러와, 임펠러에 고정된 교반 블레이드를 포함하는 구성으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서의 바이오리액터의 교반은, 특별히 한정하지 않지만, 예를 들어 교반 회전수는, 10rpm 내지 300rpm으로 할 수 있고, 50rpm 이상이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 100rpm 이상, 더욱 바람직하게는, 140rpm 이상이다.
- [0032] 바이오리액터의 배양조의 형상도 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 세로로 긴 관상의 형태로 할 수 있고, 탱크의 정상부와 저부에 평탄한 면을 갖는 것이어도 된다.
- [0033] 배양조의 용적은, 적어도 0.3리터, 바람직하게는 적어도 1리터, 50리터, 보다 바람직하게는 적어도 200리터, 보다 바람직하게는 적어도 500리터, 더욱 보다 바람직하게는 적어도 1000리터, 더욱 보다 바람직하게는 적어도 2000리터이다.
- [0034] 본 발명 있어서의 바이오리액터의 블레이드는, 특별히 그 형상을 한정하지 않는다. 예를 들어, 평블레이드 터빈형 날개, 프로펠러형 날개, 화살촉 블레이드형, 굽은 블레이드형 날개, 원반 구비 편평 블레이드 터빈형 날개도 이용 가능하다.
- [0035] 본 명세서에 있어서 「거핵구 세포」란, 생체 내에서는 골수 중에 존재하는 최대의 세포이며, 혈소판을 방출하는 것을 특징으로 한다. 또한, 세포 표면 마커 CD41a, CD42a, 및 CD42b 양성으로 특징지어지고, 이외에, CD9, CD61, CD62p, CD42c, CD42d, CD49f, CD51, CD110, CD123, CD131, 및 CD203c 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 마커를 더 발현하고 있는 경우도 있다. 「거핵구 세포」는, 다핵화(다배체화)하면, 통상의 세포 16 내지 32 배의 계층을 갖지만, 본 명세서에 있어서, 간단히 「거핵구 세포」라고 하는 경우, 상기 특징을 갖추고 있는 한, 다핵화한 거핵구 세포와 다핵화 전의 거핵구 세포의 양쪽을 포함한다. 「다핵화 전의 거핵구 세포」는, 「미숙한 거핵구 세포」 또는 「증식기의 거핵구 세포」와도 동일 의미이다.
- [0036] 거핵구 세포는, 공지된 여러 가지 방법으로 얻을 수 있다. 거핵구 세포의 제조 방법의 비한정적인 예로서, 국제 공개 제2011/034073호에 기재된 방법을 들 수 있다. 동 방법에서는, 「거핵구 세포로부터 미분화한 세포」에서, 암 유전자와 폴리콤 유전자를 강제 발현시킴으로써, 무한히 증식하는 불사화 거핵구 세포주를 얻을 수 있다. 또한, 국제 공개 제2012/157586호에 기재된 방법에 따라서, 「거핵구 세포로부터 미분화한 세포」에서, 아포토시스 억제 유전자를 강제 발현시킴으로써, 불사화 거핵구 세포를 얻을 수 있다. 이들 불사화 거핵구 세포는, 유전자의 강제 발현을 해제함으로써, 다핵화가 진행하여, 혈소판을 방출하게 된다.
- [0037] 거핵구 세포를 얻기 위해서, 상기 문헌에 기재된 방법을 조합해도 된다. 그 경우, 암 유전자, 폴리콤 유전자, 및 아포토시스 억제 유전자의 강제 발현은, 동시에 행해도 되고, 순차 행해도 된다. 예를 들어, 암 유전자와 폴리콤 유전자를 강제 발현시키고, 당해 강제 발현을 억제하고, 다음으로 아포토시스 억제 유전자를 강제 발현시키고, 당해 강제 발현을 억제하여, 다핵화 거핵구 세포를 얻어도 된다. 또한, 암 유전자와 폴리콤 유전자와 아포토시스 억제 유전자를 동시에 강제 발현시키고, 당해 강제 발현을 동시에 억제하여, 다핵화 거핵구 세포를 얻을 수도 있다. 먼저, 암 유전자와 폴리콤 유전자를 강제 발현시키고, 계속하여 아포토시스 억제 유전자를 강제 발현시키고, 당해 강제 발현을 동시에 억제하여, 다핵화 거핵구 세포를 얻을 수도 있다.
- [0038] 본 명세서에 있어서 「거핵구 세포로부터 미분화한 세포」란, 거핵구로의 분화능을 갖는 세포이며, 조혈간세포 계로부터 거핵구 세포에 이르는 여러 가지 분화 단계의 세포를 의미한다. 거핵구로부터 미분화한 세포의 비한정적인 예로서는, 조혈간세포, 조혈전구세포, CD34양성 세포, 거핵구·적아구계 전구세포(MEP)를 들 수 있다. 이들 세포는, 예를 들어 골수, 제대혈, 말초혈로부터 단리하여 얻을 수도 있고, 또한 보다 미분화한 세포인 ES

세포, iPS 세포 등의 다능성 줄기 세포로부터 분화 유도하여 얻을 수도 있다.

- [0039] 본 명세서에 있어서 「암 유전자」란, 생체 내에서 세포의 암화를 유도하는 유전자를 말하며, 예를 들어 MYC 패밀리에 속하는 유전자(예를 들어, c-MYC, N-MYC, L-MYC), SRC 패밀리에 속하는 유전자, RAS 패밀리에 속하는 유전자, RAF 패밀리에 속하는 유전자, c-Kit, PDGFR, Abl 등의 프로테인 키나아제 패밀리에 속하는 유전자를 들 수 있다.
- [0040] 본 명세서에 있어서 「폴리콤 유전자」란, CDKN2a(INK4a/ARF) 유전자를 음성으로 제어하며, 세포 노화를 회피하기 위해 기능하는 유전자로서 알려져 있다(오구라 등, 재생 의료 vol.6, No.4, pp26-32; Jseus et al., Jseus et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology vol.7, pp667-677, 2006; Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.100, pp211-216, 2003). 폴리콤 유전자의 비항정적인 예로서, BMI1, Mel18, Ring1a/b, Phc1/2/3, Cbx2/4/6/7/8, Ezh2, Eed, Suz12, HADC, Dnmt1/3a/3b를 들 수 있다.
- [0041] 본 명세서에 있어서 「아포토시스 억제 유전자」란, 세포의 아포토시스를 억제하는 기능을 갖는 유전자를 말하며, 예를 들어 BCL2 유전자, BCL-xL 유전자, Survivin 유전자, MCL1 유전자 등을 들 수 있다.
- [0042] 유전자의 강제 발현 및 강제 발현의 해제는, 국제 공개 제2011/034073호, 국제 공개 제2012/157586호, 국제 공개 제2014/123242 또는 Nakamura S et al, Cell Stem Cell. 14, 535-548, 2014에 기재된 방법, 기타의 공지된 방법 또는 거기에 준하는 방법으로 행할 수 있다.
- [0043] 본 명세서에 있어서 「혈소판」은, 혈액 내의 세포 성분의 하나이며, CD41a 양성 및 CD42b 양성으로 특징지어진다. 혈소판은, 혈전 형성과 지혈에서 중요한 역할을 함과 함께, 손상 후의 조직 재생이나 염증의 병태 생리에도 관여한다. 출혈 등에 의해 혈소판이 활성화되면, 그의 막 상에 Integrin α IIB β 3(glycoprotein IIb/IIIa; CD41a와 CD61의 복합체) 등의 세포 접착 인자의 수용체가 발현한다. 그 결과, 혈소판끼리가 응집하여, 혈소판으로부터 방출되는 각종 혈액 응고 인자에 의해 피브린이 응고함으로써, 혈전이 형성되어, 지혈이 진행된다.
- [0044] 혈소판의 기능은, 공지된 방법에 의해 측정해 평가할 수 있다. 예를 들어, 활성화한 혈소판막 상의 Integrin α IIB β 3에 특이적으로 결합하는 PAC-1에 대한 항체를 사용하여, 활성화한 혈소판량을 측정할 수 있다. 또한, 동일하게 혈소판의 활성화 마커인 CD62P(P-selectin)를 항체로 검출하여, 활성화한 혈소판량을 측정해도 된다. 예를 들어, 유세포 분석을 사용하여, 활성화 비의존성의 혈소판 마커 CD61 또는 CD41에 대한 항체로 게이팅을 행하고, 그 후, 항PAC-1 항체나 항CD62P 항체의 결합을 검출함으로써 행할 수 있다. 이들 공정은, 아데노신 이인산(ADP) 존재 하에서 행해도 된다.
- [0045] 또한, 혈소판의 기능의 평가는, ADP 존재 하에서 피브리노겐과 결합할지 여부를 보아서 행할 수도 있다. 혈소판이 피브리노겐과 결합함으로써, 혈전 형성의 초기에 필요한 인테그린의 활성화가 발생한다.
- [0046] 또한, 혈소판의 기능 평가는, 국제 공개 제2011/034073호의 도 6에 나타낸 바와 같이, in vivo에서의 혈전 형성을 가시화하여 관찰하는 방법으로 행할 수도 있다.
- [0047] 한편, 혈소판의 CD42b의 발현율이 낮은 경우나, 아넥신 V 양성률이 낮은 경우에는, 혈소판이 열화 또는 비정상이라고 평가된다. 이들 혈소판은, 혈전 형성이나 지혈 기능을 충분히 갖지 않아, 임상적으로 유용하지 않다.
- [0048] 본 명세서에 있어서 「혈소판의 열화」란, 혈소판 표면의 CD42b(GPIIb α)가 감소하는 것을 말한다. 따라서, 열화된 혈소판에는, CD42b의 발현이 저하된 혈소판이나, 쉐딩 반응에 의해 CD42b의 세포외 영역이 절단된 혈소판이 포함된다. 혈소판 표면의 CD42b가 없어지면, 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor: VWF)와의 회합을 할 수 없게 되어, 결과적으로 혈소판의 혈액 응고 기능이 상실된다. 혈소판의 열화는, 혈소판 분획 중의 CD42b 양성률(또는 CD42b 양성 입자수)에 대하다 CD42b 음성률(또는 CD42b 음성 입자수)을 지표로 하여 평가할 수 있다. CD42b 양성률에 대한 CD42b 음성률이 높을수록, 또는 CD42b 양성 입자수에 대한 CD42b 음성 입자수가 많을수록, 혈소판은 열화되어 있다. CD42b 양성률이란, 혈소판 분획에 포함되는 혈소판 중, 항CD42b 항체를 결합할 수 있는 혈소판의 비율을 의미하고, CD42b 음성률이란, 혈소판 분획에 포함되는 혈소판 중, 항CD42b 항체가 결합하지 않는 혈소판의 비율을 의미한다.
- [0049] 본 명세서에 있어서 「비정상적인 혈소판」란, 음성 전하 인지질인 포스파티딜세린이 지질 이중층의 내측으로부터 외측에 노출된 혈소판을 말한다. 생체 내에서는, 포스파티딜세린은 혈소판의 활성화에 따라 표면에 노출되고, 거기에 많은 혈액 응고 인자가 결합함으로써, 혈액 응고 캐스케이드 반응이 증폭되는 것이 알려져 있다. 한편, 비정상적인 혈소판에서는, 항상 많은 포스파티딜세린이 표면에 노출되어 있고, 이러한 혈소판이 환자에게 투여되면, 과잉의 혈액 응고 반응을 야기하여, 과중성 혈관내 응고 증후군 등의 위독한 병태로 이어질 가능성이 있다. 포스파티딜세린에는 아넥신 V가 결합하므로, 혈소판 표면 상의 포스파티딜세린은, 형광 표지한 아넥신 V

의 결합량을 지표로 하여 유세포 분석기(flow cytometer)를 사용하여 검출할 수 있다. 따라서, 비정상적인 혈소판의 양은, 혈소판 분획 중의 아넥신 V 양성률, 즉 아넥신이 결합하는 혈소판의 비율 또는 수로 평가할 수 있다. 아넥신 V 양성률이 높을수록, 또는 아넥신 V 입자수가 많을수록, 비정상적인 혈소판은 많다.

[0050] 본 발명에 있어서의 거핵구 세포의 배양 조건은, 통상의 조건으로 할 수 있다. 예를 들어, 온도는 약 35°C 내지 약 42°C, 약 36°C 내지 약 40°C, 또는 약 37°C 내지 약 39°C로 할 수 있고, 5 내지 15% CO₂ 및/또는 20% O₂로 해도 된다.

[0051] 거핵구 세포를 배양할 때의 배지는 특별히 한정되지 않고 거핵구 세포로부터 혈소판이 생성되는 데 적합한 공지된 배지나 그것에 준하는 배지를 적절히 사용할 수 있다. 예를 들어, 동물 세포의 배양에 사용되는 배지를 기초 배지로서 제조할 수 있다. 기초 배지로서는, 예를 들어 IMDM 배지, Medium 199 배지, Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM) 배지, αMEM 배지, Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM) 배지, Ham's F12 배지, RPMI 1640 배지, Fischer's 배지, Neurobasal Medium(라이프 테크놀로지스) 및 이들의 혼합 배지를 들 수 있다.

[0052] 배지에는, 혈청 또는 혈장이 함유되어 있어도 되거나, 또는 무혈청이어도 된다. 필요에 따라, 배지는, 예를 들어 알부민, 인슐린, 트란스페린, 셀레늄, 지방산, 미량 원소, 2-머캅토에탄올, 티올글리세롤, 모노티오글리세롤(MTG), 지질, 아미노산(예를 들어 L-글루타민), 아스코르브산, 헤파린, 비필수 아미노산, 비타민, 증식 인자, 저분자 화합물, 항생 물질, 항산화제, 피루브산, 완충제, 무기염류, 사이토카인 등의 1가지 이상의 물질도 함유할 수 있다. 사이토카인이란, 혈구계 분화를 촉진하는 단백질이며, 예를 들어 혈관내피세포증식인자(VEGF), 트롬보포이에틴(TPO), 각종 TPO 유사 작용 물질, Stem Cell Factor(SCF), ITS(인슐린-트란스페린-셀레나이트) 서플리먼트, ADAM 저해제 등이 예시된다. 본 발명에 있어서 바람직한 배지는, 혈청, 인슐린, 트란스페린, 세린, 티올글리세롤, 아스코르브산, TPO를 포함하는 IMDM 배지이다. 또한 SCF를 포함하고 있어도 되고, 또한 헤파린을 포함하고 있어도 된다. 각각의 농도도 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 TPO는 약 10ng/mL 내지 약 200ng/mL, 또는 약 50ng/mL 내지 약 100ng/mL로 할 수 있고, SCF는 약 10ng/mL 내지 약 200ng/mL, 또는 약 50ng/mL로 할 수 있고, 헤파린은 약 10U/mL 내지 약 100U/mL, 또는 약 25U/mL로 할 수 있다. 포르볼에스테르(예를 들어, 포르볼-12-밀리 스타트-13-아세테이트; PMA)를 첨가해도 된다.

[0053] 혈청을 사용하는 경우에는 인간 혈청이 바람직하다. 또한, 혈청 대신에, 인간 혈장 등을 사용해도 된다. 본 발명에 따른 방법에 의하면, 이들 성분을 사용함으로써, 혈청을 사용했을 때와 동등한 혈소판이 얻어질 수 있다.

[0054] 유전자의 강제 발현 및 그의 해제를 위하여 Tet-on(등록 상표) 또는 Tet-off(등록 상표) 시스템과 같은 약제 응답성의 유전자 발현 유도 시스템을 사용하는 경우, 강제 발현하는 공정에서는, 대응하는 약제, 예를 들어 테트라사이클린 또는 독시사이클린을 배지에 함유시키고, 이들을 배지로부터 제거함으로써 강제 발현을 억제해도 된다.

[0055] 본 발명에 있어서의 거핵구 세포의 배양 공정은 부유 배양에 의해 행하여지므로, 피더 세포 없이 실시할 수 있다.

[0056] 본 발명은 본 발명에 따른 방법으로 제조한 혈소판도 포함한다.

[0057] 본 발명에 따른 혈소판 제제의 제조 방법은, 본 발명에 따른 방법에 의해 거핵구 세포를 배양하여 혈소판을 산생시키고, 배양물로부터 혈소판이 풍부하게 존재하는 분획을 회수하는 공정과, 당해 혈소판 분획으로부터 혈소판 이외의 혈구계 세포 성분을 제거하는 공정을 포함한다. 혈구계 세포 성분을 제거하는 공정은, 백혈구 제거 필터(예를 들어, 데루모사제, 아사히 가세이 메디컬사제) 등을 사용하여, 거핵구 세포를 포함하는 혈소판 이외의 혈구계 세포 성분을 제거함으로써 행할 수 있다. 혈소판 제제의 보다 구체적인 제조 방법은, 예를 들어 국제 공개 제2011/034073호에 기재되어 있다.

[0058] 본 발명에 따른 혈액 제제의 제조 방법은, 본 발명에 따른 방법으로 혈소판 제제를 제조하는 공정과, 당해 혈소판 제제를 다른 성분과 혼합하는 공정을 포함한다. 다른 성분으로서, 예를 들어 적혈구 세포를 들 수 있다.

[0059] 혈소판 제제 및 혈액 제제에는, 기타, 세포의 안정화에 이바지하는 다른 성분을 첨가해도 된다.

[0060] 본 명세서에서 인용되는 모든 특허문헌 및 비특허문헌의 개시는, 전체로서 본 명세서에 참조에 의해 도입된다.

[0061] 실시예 1

- [0062] 이하, 본 발명을 실시예에 기초하여 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 전혀 이것에 한정되는 것은 아니다. 당업자는, 본 발명의 의의를 일탈하지 않고 여러 가지 양태로 본 발명을 변경할 수 있으며, 이러한 변경도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0063] 1. 불사화 거핵구 세포의 제작
- [0064] 1-1. iPS 세포로부터의 조혈전구세포의 제조
- [0065] 인간 iPS 세포(TKDN SeV2: 센다이 바이러스를 사용하여 수립된 인간 태아 피부 섬유아세포 유래 iPS 세포)로부터, Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010)에 기재된 방법에 따라서, 혈구 세포로의 분화 배양을 실시하였다. 즉, 인간 ES/iPS 세포 콜로니를 20ng/mL VEGF(R&D SYSTEMS) 존재 하에서 C3H10T1/2 피더 세포와 14일간 공배양하여 조혈전구세포(Hematopoietic Progenitor Cells; HPC)를 제작하였다. 배양 조건은 20% O₂, 5% CO₂로 실시했다(특별히 기체가 없는 한, 이하 동일 조건).
- [0066] 1-2. 유전자 도입 시스템
- [0067] 유전자 도입 시스템은, 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용하였다. 렌티바이러스 벡터는, Tetracycline 제어성의 Tet-on(등록 상표) 유전자 발현 유도 시스템 벡터이다. LV-TRE-mOKS-Ubc-tTA-I2G(Kobayashi, T., et al. Cell 142, 787-799 (2010))의 mOKS 카세트를 c-MYC, BMI1, BCL-xL로 재조합함으로써 제작하였다. 각각, LV-TRE-c-Myc-Ubc-tTA-I2G, LV-TRE-BMI1-Ubc-tTA-I2G, 및 LV-TRE-BCL-xL-Ubc-tTA-I2G로 하였다.
- [0068] 바이러스 입자는, 293T 세포에 상기 렌티바이러스 벡터를 유전자 도입함으로써 제작하였다.
- [0069] 이러한 바이러스 입자를 목적 세포에 감염시킴으로써, BMI1, MYC, 및 BCL-xL의 유전자가 목적 세포의 게놈 서열에 도입된다. 안정적으로 게놈 서열에 도입된 이들의 유전자는, 배지에 독시사이클린(clontech #631311)을 첨가함으로써 강제 발현시킬 수 있다.
- [0070] 1-3. 조혈전구세포에의 c-MYC 및 BMI1 바이러스 감염
- [0071] 미리 C3H10T1/2 피더 세포를 파종한 6 well plate 상에 상기 방법으로 얻어진 HPC를 5x10⁴ cells/well씩 파종하고, 렌티바이러스법으로 c-MYC 및 BMI1을 강제 발현시켰다. 이때, 세포주 1종류에 대하여 6 well씩 사용하였다. 즉, 각각 MOI 20이 되도록 배지 중에 바이러스 입자를 첨가하고, 스핀 인펙션(32℃ 900rpm, 60분 간 원심)으로 감염시켰다. 본 조작은, 12시간 간격으로 2회 실시하였다.
- [0072] 배지는, 기본 배지(15% Fetal Bovine Serum(GIBCO), 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine(GIBCO), 1% Insulin, Transferrin, Selenium Solution(ITS-G)(GIBCO), 0.45mM 1-Thioglycerol(Sigma-Aldrich), 50 μg/mL L-Ascorbic Acid(Sigma-Aldrich)를 함유하는 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(Sigma-Aldrich))에 50ng/mL Human thrombopoietin(TPO)(R&D SYSTEMS), 50ng/mL Human Stem Cell Factor(SCF)(R&D SYSTEMS) 및 2 μg/mL Doxycycline(Dox)을 첨가한 배지(이하, 분화 배지)에, 추가로 Protamine를 최종 농도 10 μg/mL 첨가한 것을 사용하였다.
- [0073] 1-4. 거핵구 자기 증식주의 제작 및 유지 배양
- [0074] 상기 방법으로 cMYC 및 BMI1 바이러스 감염을 실시한 날을 감염 0일째로 하고, 이하와 같이, cMYC 및 BMI1 유전자 도입형 거핵구 세포를 배양함으로써, 거핵구 자기 증식주를 각각 제작하였다. BMI1 유전자, c-MYC 유전자의 강제 발현은, 배지에 독시사이클린(clontech #631311) 1 μg/mL를 첨가함으로써 행하였다.
- [0075] · 감염 2일째 내지 감염 11일째
- [0076] 피펫팅으로 상기 방법으로 얻어진 바이러스 감염 완료 혈구 세포를 회수하고, 1200rpm, 5분간 원심 조작을 행하여 상청을 제거한 후, 새로운 분화 배지에서 현탁하여 새로운 C3H10T1/2 피더 세포 상에 파종했다(6well plate). 감염 9일째에 동일한 조작을 함으로써 계대를 실시하였다. 세포수를 계측 후 1×10⁵ cells/2mL/well로 C3H10T1/2 피더 세포 상에 파종했다(6well plate).
- [0077] · 감염 12일째 내지 감염 13일째
- [0078] 감염 2일째와 동일한 조작을 실시하였다. 세포수를 계측 후 3×10⁵ cells/10mL/100mm dish로 C3H10T1/2 피더 세포 상에 파종했다(100mm dish).

- [0079] · 감염 14일째
- [0080] 바이러스 감염 완료 혈구 세포를 회수하고, 세포 1.0×10^5 개당, 항인간 CD41a-APC 항체(BioLegend), 항인간 CD42b-PE 항체(eBioscience), 항인간 CD235ab-pacific blue(BioLegend) 항체를 각각 2 μ L, 1 μ L, 1 μ L씩을 사용하여 항체 반응시켰다. 반응 후에, FACS Verse(BD)를 사용하여 해석하였다. 감염 14일째에 있어서, CD41a 양성률이 50% 이상이었던 세포를 거핵구 자기 증식주로 하였다.
- [0081] 1-4. 거핵구 자기 증식주에의 BCL-xL 바이러스 감염
- [0082] 상기 감염 14일째의 거핵구 자기 증식주에, 렌티바이러스법으로 BCL-xL을 유전자 도입하였다. MOI 10이 되도록 배지 중에 바이러스 입자를 첨가하고, 스핀 인핵선(32°C 900rpm, 60분간 원심)으로 감염시켰다. BCL-xL 유전자의 강제 발현은, 배지에 독시사이클린(clontech #631311) 1 μ g/mL를 첨가함으로써 행하였다.
- [0083] 1-5. 거핵구 불사화주의 제작 및 유지 배양
- [0084] · 감염 14일째 내지 감염 18일째
- [0085] 전술한 방법으로 얻어진 BCL-xL을 유전자 도입한 거핵구 자기 증식주를 회수하여, 1200rpm, 5분간 원심 조작을 행하였다. 원심 후, 침전한 세포를 새로운 분화 배지에서 현탁한 후, 새로운 C3H10T1/2 피더 세포 상에 2×10^5 cells/2mL/well로 파종했다(6well plate).
- [0086] · 감염 18일째: 계대
- [0087] 세포수를 계측 후, 3×10^5 cells/10mL/100mm dish로 파종하였다.
- [0088] · 감염 24일째: 계대
- [0089] 세포수를 계측 후, 1×10^5 cells/10mL/100mm dish로 파종하였다. 이후, 4-7일마다 계대를 행하고, 유지 배양을 행하였다.
- [0090] 감염 24일째에 BCL-xL을 유전자 도입한 거핵구 자기 증식주를 회수하고, 세포 1.0×10^5 개당, 항인간 CD41a-APC 항체(BioLegend), 항인간 CD42b-PE 항체(eBioscience), 항인간 CD235ab-Pacific Blue(Anti-CD235ab-PB; BioLegend) 항체를 각각 2 μ L, 1 μ L, 1 μ L씩을 사용하여 면역 염색한 후에 FACS Verse(BD)를 사용하여 해석하여, 감염 24일째에서도, CD41a 양성률이 50% 이상인 주를 불사화 거핵구 세포주로 하였다. 감염 후 24일 이상 증식할 수 있었던 이들 세포를 불사화 거핵구 세포주 SeV2-MKCL로 하였다.
- [0091] 얻어진 SeV2-MKCL을 10cm 디쉬(10mL/디쉬)에서 정지 배양하였다. 배지는, IMDM을 기본 배지로 하여, 이하의 성분을 첨가했다(농도는 최종 농도).
- [0092] FBS(시그마#172012 lot.12E261) 15%
- [0093] L-Glutamin(Gibco #25030-081) 2mM
- [0094] ITS(Gibco #41400-045) 100배 희석
- [0095] MTG(monothioglycerol, sigma #M6145-25ML) 450 μ M
- [0096] 아스코르브산(sigma #A4544) 50 μ g/mL
- [0097] Puromycin(sigma #P8833-100MG) 2 μ g/mL
- [0098] SCF(와코준야쿠 #193-15513) 50ng/mL
- [0099] TPO 유사 작용 물질 200ng/mL
- [0100] 배양 조건은, 37°C, 5% CO₂로 하였다.
- [0101] 2. 혈소판의 생산
- [0102] 이어서, 독시사이클린을 포함하지 않는 배지에서 배양함으로써 강제 발현을 해제하였다. 구체적으로는, 1.의 방법으로 얻은 불사화 거핵구 세포주(SeV2-MKCL)를 PBS(-)로 2번 세정하고, 1.0×10^5 cells/mL의 파종 밀도로 다

음 배지에 현탁하였다.

- [0103] 배지는, IMDM을 기본 배지로서, 이하의 성분을 첨가했다(농도는 최종 농도).
- [0104] FBS 15%
- [0105] L-Glutamin(Gibco #25030-081) 2mM
- [0106] ITS(Gibco #41400-045) 100배 희석
- [0107] MTG(monothioglycerol, sigma #M6145-25ML) 450 μ M
- [0108] 아스코르브산(sigma #A4544) 50 μ g/mL
- [0109] SCF(와코준야쿠 #193-15513) 50ng/mL
- [0110] TPO 유사 작용 물질 200ng/mL
- [0111] ADAM 저해제 15 μ M
- [0112] SR1 750nM
- [0113] ROCK 저해제 5 μ M
- [0114] 얻어진 불사화 거핵구 세포주 현탁액을 125mL 진탕(셰이커) 플라스크(배지 25mL) 및 바이오리액터의 교반 배양조(배지 700mL)에 첨가하였다. 이러한 배양 조건에서, 3일 내지 9일간 배양함으로써 혈소판을 생산시켰다. 바이오리액터는, 바이오트사의 BCP 교반 배양조(이하, BCP라 기재함)를 사용하였다.
- [0115] BCP에서는, 2리터 용적의 배양조 중에 0.7리터의 또는 1리터 용적의 배양조 중에 0.5리터의 불사화 거핵구 세포주 현탁액을 배양하였다. 교반 속도는 75rpm. 교반은, 회전식 교반 날개를 사용하였다. BCP의 사양은, 다음과 같다. 외형 치수: 300(W) \times 905(H) \times 500(D)mm. 배양조: 액량 0.5 내지 10L. 스피너 플라스크 또는 베셀. 교반 방식: 하부 마그네트 교반. 회전수: 10 내지 140rpm. 온도 조정: 실온+10 $^{\circ}$ C 내지 45 $^{\circ}$ C. 계측 제어: 교반, 온도, pH, DO, 레벨, 피드.
- [0116] 125mL 진탕 플라스크는, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂ 환경 하에서, 진탕 배양기(N-BIOTEK, AniCell)를 사용하여 100rpm의 속도로 진탕 배양하였다.
- [0117] 3. 혈소판의 측정
- [0118] 2.의 방법으로 생산된 혈소판을 측정하기 위해서, 강제 발현 해제 후, 배양 6일 후의 배양 상청 샘플을 회수하고, 각종 항체에 의한 염색과 함께, 유세포 분석기를 사용한 분석을 하였다. CD41a 양성 CD42b 양성의 입자수를 정상 혈소판수로 하고, CD41a 양성 CD42b 음성인 입자수를 열화 혈소판수로 하였다. 아넥신 V 양성의 입자수를 비정상 혈소판수로 하였다. 또한, 샘플을 PMA 또는 ADP/Thrombin으로 자극하고, 자극 전후의 PAC-1 및 CD62p의 양성률을 산출하여 생리 활성을 측정하였다.
- [0119] 자세한 측정 방법과 결과는 이하와 같다.
- [0120] 3-1. 혈소판의 측정
- [0121] 정상 혈소판, 열화 혈소판, 혈소판의 생리 활성의 측정을 위해서, 1.5mL 마이크로 튜브에 희석액 900 μ L를 첨가하고, 거기에 배양 상청 100 μ L를 첨가하여, 혼합하였다. 희석 혼합한 배양 상청 200 μ L를 FACS 튜브에 분주하고, 이하의 표지 항체 또는 단백질을 첨가하여 염색을 행하였다. 비정상 혈소판의 측정을 위해서, 배양 상청 100 μ L를 FACS 튜브에 분주하고, 이하의 표지 항체 또는 단백질을 첨가하여 염색을 행하고, 유세포 분석기 분석 직전에 Annexin V binding buffer(BD)로 5배 희석하여, 분석하였다.
- [0122] 사용한 항체는 이하와 같다.
- [0123] 정상 혈소판 및 열화 혈소판의 측정
- [0124] 0.5 μ L 항CD41 항체 APC 표지(Bio Legend 303710)
- [0125] 0.5 μ L 항CD42a 항체 PB 표지(eBioscience 48-0428-42)
- [0126] 0.5 μ L 항CD42b 항체 PE 표지(eBioscience 12-0428-42)

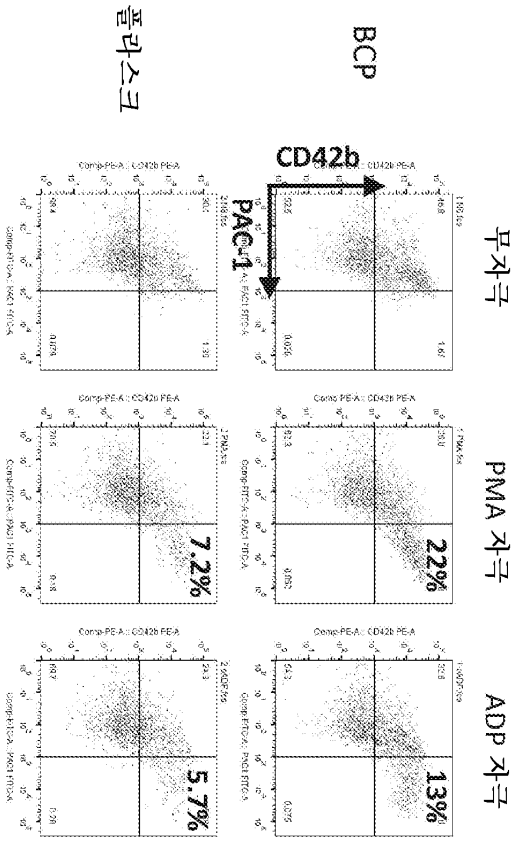
- [0127] 혈소판의 생리 활성의 측정
- [0128] 0.5 μL 항CD42a 항체 PB 표지(eBioscience 48-0428-42)
- [0129] 0.5 μL 항CD42b 항체 PE 표지(eBioscience 12-0428-42)
- [0130] 0.5 μL 항CD62p 항체 APC 표지(Bio Legend 304910)
- [0131] 10 μL 항PAC-1 항체 FITC 표지(BD 303704)
- [0132] 비정상 혈소판수의 측정
- [0133] 0.5 μL 항CD41 항체 APC 표지(Bio Legend 303710)
- [0134] 0.5 μL 항CD42a 항체 PB 표지(eBioscience 48-0428-42)
- [0135] 5 μL Annexin V FITC 표지(BD, 556419)
- [0136] 3-2. 혈소판 생리 활성의 측정
- [0137] 혈소판의 자극은, PMA 0.2 μM(Phorbol 12-myristate 13-acetate, sigma #P1585-1MG), 또는 ADP 100 μM(sigma #A2754) 및 Thrombin 0.5U/mL(sigma)로 실온에서 행하였다. 자극 30분 후에 BD사 FACSverce로 측정을 실시하였다.
- [0138] CD42a 양성의 혈소판 분획에 있어서의, 자극 전후의 PAC-1 양성률 및 CD62p 양성률을 측정하여, 비교 평가하였다.
- [0139] 결과를 도 1에 나타낸다. PMA 또는 ADP/Thrombin 자극 시의 PAC-1 양성률의 MFI는, BCP에 의한 교반 배양의 경우, 125mL 셰이커 플라스크에서의 진탕 배양 조건의 경우보다도, 약 2 내지 3배 향상되었다.
- [0140] 또한, 도 2에 나타낸 바와 같이, BCP에 의한 교반 배양에서는, 셰이커 플라스크에서의 진탕 배양에 비해, CD62p 양성률도 2배 이상 높아, 생리 활성이 높은 혈소판이 얻어진 것으로 나타났다.
- [0141] 3-3. 혈소판의 열화 측정
- [0142] 상기 3-1.의 방법에 의해, 각 처리 샘플을 유세포 분석기를 사용하여 분석하고, CD41a 양성 CD42b 양성의 입자수를 정상 혈소판수, CD41a 양성 CD42b 음성인 입자수를 열화 혈소판수로서 산출하였다.
- [0143] 결과를 도 3에 나타낸다. 정상 혈소판의 산생 효율은, 진탕 배양의 경우에 비해, BCP에 의한 교반 배양인 경우, 약 1.7배로 증가하였다. 한편, 열화된 혈소판은, 진탕 배양의 경우에 비해, BCP에 의한 교반 배양의 경우, 약 0.75배로 감소하였다.
- [0144] 3-4. 비정상 혈소판의 측정
- [0145] 상기 3-1.의 방법에 의해, 각 처리 샘플을 유세포 분석기를 사용하여 분석하고, 아넥신 V 양성의 입자수를 비정상 혈소판수로 하였다. 결과를 도 4에 나타낸다. 진탕 배양의 경우에 비해, BCP에 의한 교반 배양의 경우, 비정상 혈소판수는, 약 0.7배로 감소하였다.
- [0146] 4. 배양 조건의 최적화
- [0147] BCP 교반 배양 장치의 교반 회전수를 바꾸었을 때의 혈소판 생산 효율의 차이를 측정하였다. 교반 회전수를 100rpm, 120rpm, 140rpm으로 하여, CD41a 양성 CD42b 양성 입자를 측정된 결과를 도 5에 나타낸다.
- [0148] 가장 회전수가 높은 140rpm인 때에, 혈소판(CD41a 양성 CD42b 양성)의 생산량이 가장 높아졌다.

산업상 이용가능성

- [0149] 본 발명에 의해, 셰이커 플라스크에 의한 진탕 배양에서는 달성할 수 없는 고품질의 혈소판을 얻을 수 있음은 명백하다. 그러므로, 본 발명은 혈소판의 공업 레벨의 대량 생산 실현에 공헌할 수 있는 것이다.

혈소판의 생리 활성

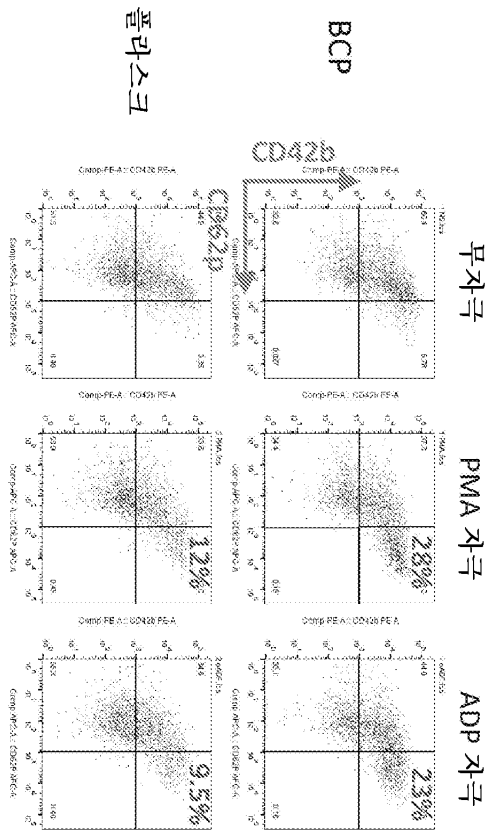
안제 자극 시의 혈소판 생리 활성 평가(PAC-1 아세이)



도면
도면1

혈소판의 생리 활성

약제 자극 시의 혈소판 생리 활성 평가(CD62P 억제)

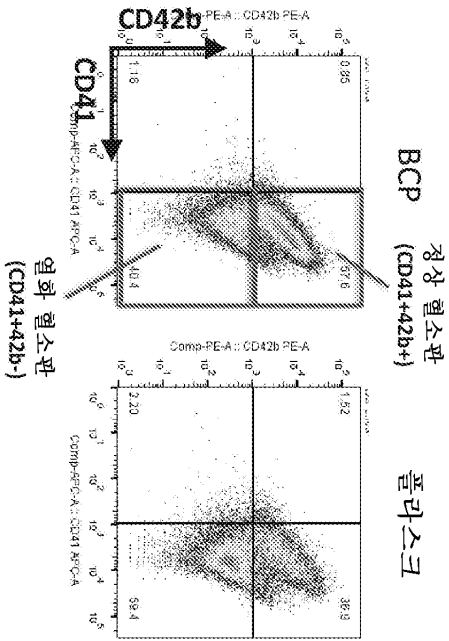


도면2

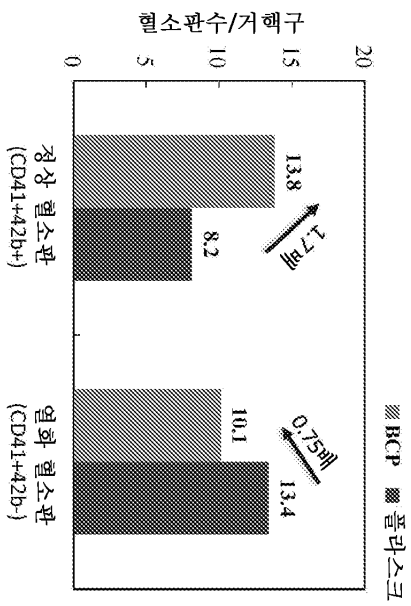
도면3

혈소판 생성 효율

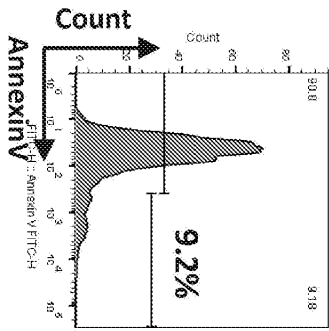
혈소판 표면 항원에 대한 FACS 플롯



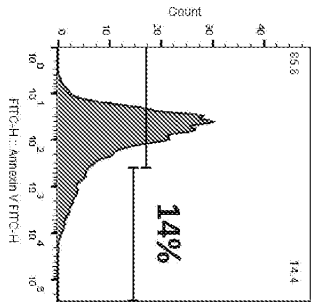
정상 및 열화 혈소판의 산생 효율



도면4



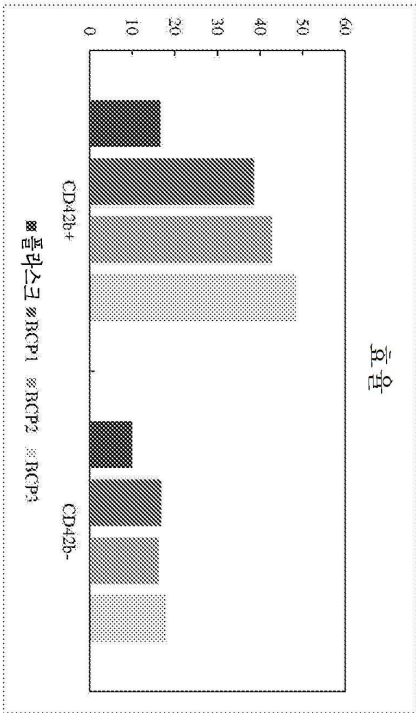
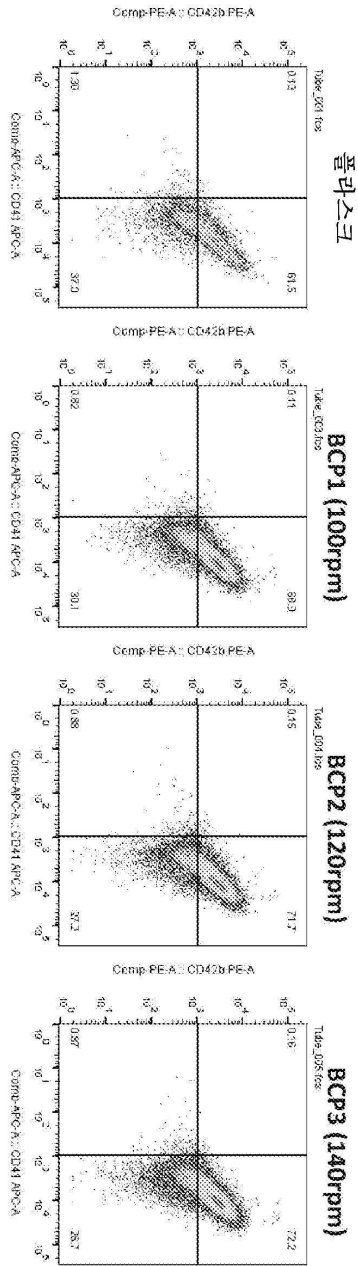
BCP



플리스크

비정상 혈소판

혈소판 산생 효율



도면5