

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 605**

21 Número de solicitud: 201331568

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**24.10.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**26.05.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070805**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y  
SALUD (100.0%)**

**Avda. Américo Vespucio, 5  
41092 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**REAL LUNA, Pedro José;  
GARCÍA TOSCANO, Miguel;  
MENÉNDEZ BUJAN, Pablo;  
MARTÍN MOLINA, Francisco;  
NAVARRO MONTERO, Óscar;  
AYLLÓN CASES, Verónica;  
RAMOS MEJÍA, Verónica;  
BUENO UROZ, Clara;  
COBO PULIDO, Marién y  
ROMERO ESCOBAR, Tamara**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Método de obtención de megacariocitos y plaquetas**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso del gen SCL, de secuencia nucleotídica (GenBank NM\_003189.2, NP\_003180.1) SEQ ID NO: 1, para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre, donde dichas células madre no han sido obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima.

**ES 2 536 605 A1**

## DESCRIPCIÓN

**Método de obtención de megacariocitos y plaquetas.****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología y la medicina, y más concretamente en el ámbito de las terapias avanzadas. Específicamente, se refiere al uso de las células madre para la obtención de megacariocitos productores de plaquetas funcionales, para su empleo frente a enfermedades derivadas de anomalías hematopoyéticas. También se refiere a los megacariocitos y plaquetas obtenidos por dicho método, y a los sistemas y/o dispositivos productores de los mismos.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos enucleados que son liberados desde megacariocitos maduros (MKs). Los MKs se originan desde células madre hematopoyéticas (HSCs) por un proceso de diferenciación conocido por megacariopoyesis. Una vez formados, los MKs sufren un proceso de maduración (trombopoyesis) de donde resultan la producción y liberación de las plaquetas (Kaushansky, K. 2008. *Blood* 111(3):981-6). El trasplante de plaquetas es necesario para el tratamiento de trombocitopenias de origen fisiológico, leucemias, enfermedades genéticas o inducidas por quimioterapia agresiva. Debido a que la vida media de las plaquetas es muy baja y al número limitado de plaquetas que se obtienen de los donantes en los bancos de sangre, la generación de sistemas *ex vivo* alternativos para la producción de plaquetas es una opción muy prometedora (Lambert, M.P. *et al.*, 2013. *Blood* 121(17):3319–24.; Slichter, S.J. 2004. *Transfusion Medicine Reviews* 18(3):153–67.). Uno de los retos en medicina es proporcionar a los hospitales una fuente constante de plaquetas, aunque hasta ahora ha sido imposible, ya que es totalmente dependiente de la disponibilidad y el altruismo de los donantes. Por lo tanto, la generación de un sistema donante-independiente capaz de proporcionar plaquetas para transfusión constantemente y eficientemente sería ideal para satisfacer las necesidades de las plaquetas para tratamiento de trombocitopenias en clínica (Lambert *et al.*, M.P. 2013. *Blood* 121(17):3319–24.).

Durante las dos últimas décadas, varios grupos han sido capaces de generar MKs y plaquetas *in vitro* a partir de HSC CD34+ obtenidas desde sangre periférica, cordón umbilical, hígado fetal y médula ósea, pero la capacidad de expansión limitada de las

células HSC CD34+ restringe su uso como una fuente de plaquetas eficiente y constante (Choi, E.S. *et al.* 1995. *Blood* 85(2):402–13; Tao, H.*et al.*, 1999. *Exp. Hematol.* 27(2):293–301; Ma, D.C. *et al.* 2000. *Eur. J. Haematol.* 64(5):304–14; De Bruyn, C. *et al.* 2005. *Stem Cells Dev.* 14(4):415–24). Por el contrario, las células madre embrionarias humanas (hESCs) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) se caracterizan por una capacidad de crecimiento ilimitado y la potencialidad de diferenciarse en cualquier linaje celular, convirtiéndose una alternativa muy prometedora para terapias en hematología (Thomson, J.A. *et al.* 1998. *Science* 282(5391):1145–7; Takahashi, K. *et al.* 2007. *Cell* 131(5):861–72; Krimbel, E.A. y Lu, S.J. 2011. *Stem Cells Int* 2011:273076.). En base a estas propiedades, varios laboratorios en todo el mundo han optimizado diferentes estrategias para la generación de megacariocitos y plaquetas funcionales a partir de células madre pluripotentes humanas (hPSCs) (Takayama, N. *et al.* 2008. *Blood* 111(11):5298–306; Takayama, N. *et al.* 2010. *J. Exp. Med.* 207(13):2817–30; Lu, S.J. *et al.*, 2011. *Cell Res.* 21(3):530–45; Pick, M. *et al.*, 2013. *PLoS One* 8(2):e55530). Hasta la fecha, estos estudios han generado megacariocitos y plaquetas que puedan ser activados *in vitro* por estímulos clásicos (ADP, fibrinógeno o trombina) (Takayama, N. *et al.* 2008. *Blood* 111(11):5298–306; Lu, S.J. *et al.*, 2011. *Cell Res.* 21(3):530–45) y plaquetas funcionales que participan en la formación de coágulos *in vivo* (Takayama, N. *et al.* 2010. *J. Exp. Med.* 207(13):2817–30; Lu, S.J. *et al.*, 2011. *Cell Res.* 21(3):530–45). Sin embargo, estas células poseen la limitación de producir un número reducido de megacariocitos por cada célula madre pluripotente de partida y de plaquetas en comparación con las producciones *in vivo* (Tijssen, M.R. y Ghevaert C.J., 2013. *Thromb Haemost* 11(4):593–604). Por lo tanto, es necesario seguir trabajando en la optimización de protocolos más eficientes de megacariopoyesis y trombopoyesis desde hPSCs.

Estas mejoras podrían basarse en el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación megacariocítica. Un gran número de factores de transcripción se han asociado a la regulación de la megacariopoyesis y trombopoyesis (Goldfarb, A.N. 2007. *Oncogene* 26(47):6795–802). Entre estos mecanismos, SCL/TAL1 ha centrado la atención no sólo en el establecimiento de la hematopoyesis en ratón (Shivdasani, R.A. *et al.*, 1995. *Nature* 373(6513):432–434; Porcher, C. *et al.*, 1996. *Cell* 86(1):47–57), sino también en eritroides y megacariocitos (Mikkola, H.K. *et al.*, 2003. *Science* 421(6922):547–51; Hall, M.A. *et al.*, 2003. *PNAS* 100(3):992–7; Schlaeger *et al.*, 2005. *Blood* 105(10):3871–4).

Se ha demostrado que la sobreexpresión de *SCL* aumenta la diferenciación hematopoyética de hPSCs y potencia las características de los eritroides (Yung, S. *et al.*, 2011. *Hum. Mol. Gen.* 20(24):4932–46; Real, P.J. *et al.*, 2012. *Mol. Therapy* 20(7):1443–53). *SCL* participa en el cometido de los megacariocitos, se propone que la sobreexpresión de este factor de transcripción hematopoyético aumentará la eficiencia de la megacariopoyesis y trombopoyesis de hPSCs. Esta sobreexpresión *a priori* no supondría ningún riesgo cuando las plaquetas son transfundidas, ya que las plaquetas son enucleadas y no llevan más copias de genes sobreexpresados ni de la proteína traducida. Esto representa un paso adelante en el camino de generación de plaquetas a gran escala para su uso en trasplantes humanos.

Por tanto, las hPSCs son una herramienta ideal para optimizar los protocolos de megacariopoyesis y trombopoyesis humana destinada a la ilimitada producción de plaquetas para su uso en clínica. Estos protocolos optimizados representarán una plataforma para el estudio de los procesos moleculares y celulares implicados en la megacariopoyesis y trombopoyesis humana, y podría ser utilizado para modelar enfermedades humanas que afectan a estos procesos de diferenciación, tales como las leucemias megacarioblásticas agudas (AMKL).

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso del gen *SCL/TAL1*, de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, de ahora en adelante secuencia nucleotídica de la invención, para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a. secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, la secuencia nucleotídica de la invención, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o
- b. secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende secuencia nucleotídica de la invención, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar,

para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre. Preferiblemente, la construcción genética es un vector, de ahora en adelante vector de la invención, y aún más preferiblemente es un vector lentiviral. En otra realización preferida, las células madre se seleccionan de la lista que consiste en

5 células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes, células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias, fibroblastos, megacariocitos inducidos (Ono, Y. *et al.*, 2012 *Blood* 120(18):3812-21) o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, son células madre pluripotentes (PSCs), más preferiblemente son células madre de mamífero, y aún mucho más

10 preferiblemente, son células humanas.

Un tercer aspecto de la invención se refiere un megacariocito productor de plaquetas funcionales, de ahora en adelante megacariocito de la invención, obtenido por un método, de ahora en adelante método de producción de plaquetas de la invención, que comprende:

- 15 a) poner en contacto la construcción genética o el vector de la invención, con una célula madre,
- b) seleccionar las células madre del paso (a) que hayan sido transducidas o transformadas con la construcción genética y/o el vector, y
- c) diferenciar las células madre del paso (b) a megacariocitos maduros.

20 En otra realización preferida, las células madre se seleccionan de la lista que consiste en células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes, células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias, fibroblastos, megacariocitos inducidos (Ono, Y. *et al.*, 2012 *Blood* 120(18):3812-21) o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, son células madre pluripotentes (PSCs),

25 más preferiblemente son células madre de mamífero, y aún mucho más preferiblemente, son células humanas. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la diferenciación de las células madre a megacariocitos del paso (c) se lleva a cabo diferenciando las células madre a progenitores megacariocíticos mediante la adición de una composición que comprende un inhibidor de histona deacetilasa. Aún

30 más preferiblemente, el inhibidor de histona deacetilasa es la Tricostatina A. En una realización más preferida de la invención, la diferenciación de las células madre a megacariocitos maduros del paso (c) comprende co-cultivar las células madre con células del estroma.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de plaquetas *in vitro*, de ahora en adelante método de producción de plaquetas de la invención, que comprende cultivar el megacariocito productor de plaquetas funcionales según se ha definido éste en el tercer aspecto de la invención en un medio de cultivo  
5 adecuado.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una plaqueta, de ahora en adelante plaqueta de la invención, obtenida por el método de producción de plaquetas de la invención.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un megacariocito o de una  
10 plaqueta de la invención, en la elaboración de un medicamento.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de un megacariocito o de una plaqueta de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño vascular.

Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso de un megacariocito o de una  
15 plaqueta de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías relacionadas con las plaquetas y/o leucemias megacarioblásticas agudas.

Un noveno aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor de histona deacetilasa para diferenciar una célula madre a megacariocito. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de histona deacetilasa es la  
20 Tricostatina A.

Un décimo aspecto de la invención se refiere a un sistema o dispositivo de producción de plaquetas para la producción *in vitro* y/o *ex vivo* de las plaquetas de la invención que comprende:

a) un biorreactor para la expansión de las células madre en presencia de un  
25 primer medio de crecimiento en comunicación fluida con;

b) una cámara de maduración que comprende células estromales y/o un nicho de médula ósea artificial y un segundo medio de crecimiento, en el que la cámara de maduración está en comunicación fluida con;

c) una cámara de separación de células para la selección de megacariocitos  
30 maduros que está en comunicación fluida con;

- d) un módulo de producción de plaquetas que comprende una pluralidad de cámaras de producción de plaquetas, una matriz tridimensional, un tercer medio de crecimiento, y una pluralidad de bombas para mover el tercio del medio de crecimiento a través de las cámaras de producción de plaquetas, en el que el módulo de producción de plaquetas está en comunicación fluida con ;
- e) una cámara de recogida de plaquetas.

donde las células madre del paso (a) están transfectadas con el gen *SCL*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el sistema o dispositivo de producción de plaquetas incorpora en uno o varios medios de crecimiento empleados en alguno de sus pasos un inhibidor de histona deacetilasa. Aún más preferiblemente, el inhibidor de histona deacetilasa es la Tricostatina A.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

### Figura 1. La sobreexpresión de *SCL* incrementa la producción de megacariocitos

**y plaquetas en PSCs. A)** Esquema de diferenciación de megacariocitos desde hPSCs. Este protocolo de diferenciación se divide en dos etapas: etapa de diferenciación EBs (del día 0 al 15) en presencia de citoquinas hematopoyéticas (bFGF, VEGF, BMP4, Flt3L, SCF y TPO) y con co-cultivo con OP9 en la etapa de diferenciación (del día 15 al 32) donde las hPSCs derivan del crecimiento junto a células del estroma OP9 complementados con heparina, TPO y SCF. **B)** Representa gráficos de citometría de flujo que muestran como las células megacariocíticas (MK) y las plaquetas se identifican y analizan durante la etapa de diferenciación co-cultivo con OP9. Las plaquetas de sangre periférica (PB) se obtuvieron a partir de donantes de bancos de sangre para establecer la configuración del análisis de citometría de flujo. **C)** Cinética de aparición de los megacariocitos y plaquetas de dos líneas diferentes (AND1 y HS181) transducidas con el vector vacío (EV) y con el vector que expresa *SCL* (*SCL*). En los paneles superiores se representa el número de megacariocitos (CD41+ CD42+). El número de plaquetas (CD41+ CD42+) se muestra en los inferiores. **D)** Cinética acumulativa de megacariocitos y plaquetas de HS181 transducidas con el vector vacío (EV) o con el que sobreexpresa *SCL*, en los días 22 y 26 del desarrollo megacariocítico. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 2-3 experimentos independientes desde la línea hPSC HS181.

**Figura 2. Caracterización morfológica, molecular y funcional de los megacariocitos y plaquetas derivadas de HPSCs. A)** Tinción de Papanicolau de las

células purificadas a partir de los sobrenadante de las células HS181 EV y SCL diferenciadas de co-cultivos a 20 y 32 días. **B)** Análisis cuantitativo por RT-PCR de varios factores de transcripción de (*FLI-1*, *NFE2*, *GATA-1* y *SCL*) y marcadores de superficie (*CD41* y *CD61*) expresados en derivados celulares recogidos de los sobrenadantes de cultivos HS181 EV y SCL a 22 días de diferenciación de megacariocitos. La expresión relativa se muestra normalizada a las células EV. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes. **C)** Tinción de Papanicolau de megacariocitos derivados de HS181 EV o SCL activados por trombina (2 U/ml) durante 2 horas. **D)** Análisis por citometría de flujo del control megacariocítico (C) o de células ADP-activadas (+ADP) al día 26 de la diferenciación megacariocítica. El anticuerpo PAC1 se usó para detectar la por la forma activada de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 después del tratamiento con ADP. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes.

**Figura 3. La sobreexpresión de SCL acelera la aparición de progenitores megacariocíticos a partir de PSC.** **A)** Representación esquemática del análisis de progenitores megacariocíticos desde PSCs. Este protocolo de diferenciación se reduce a la etapa de diferenciación de EBs (desde el día 0 a 8) en presencia de citoquinas hematopoyéticas (*bFGF*, *VEGF* *BMP4*, *Flt3L*, *SCF* y *TPO*) y *TPO* y *SCL* (desde el día 8 al 17). El análisis por citometría de flujo se realizó en los días 10, 14 y 17 de la diferenciación megacariocítica. **B)** Gráficos representativos de citometrías de flujo que muestran cómo los progenitores megacariocíticos (*CD34+* y *CD34+ CD41+*) son identificados y analizados. **C)** Cinética de aparición de progenitores megacariocíticos (*CD34+* y *CD34+ CD41+*) desde la línea celular de PSCs AND1 transducida con el vector vacío (EV) o vector *SCL* expresado (*SCL*). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes. **D)** Análisis cuantitativo RT-PCR de varios factores de transcripción asociados al desarrollo megacariocítico (*Fli-1*, *NFE2*, *GATA-1* y *SCL*) y marcadores de superficie (*CD41* y *CD61*) expresados en EBs de cultivos AND1 EV y *SCL* en los días 10, 14 y 17 de la diferenciación megacariocítica. La expresión relativa se muestra normalizada a EBs desde AND1 EV al día 10 de la diferenciación. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes.

**Figura 4. La tricostatina A acelera la aparición de progenitores megacariocíticos a partir de PSCs.** **A)** Esquema del análisis de progenitores megacariocíticos a partir de PSCs en presencia o ausencia de tricostatina A (TSA). El análisis por citometría de flujo se desarrolló el día 14 de la diferenciación megacariocítica. **B)** Análisis de la aparición de progenitores meagariocíticos (*CD34+* y *CD34+ CD41+*) a partir de AND1



PSCs silvestre a dos concentraciones diferentes (10 y 100 nM). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

Los autores de la presente invención han demostrado que la sobreexpresión del gen  
5 *SCL*, de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, aumenta la producción de megacariocitos y plaquetas a partir de células madre. Además, han comprobado que este aumento se produce también a partir de PSCs, que a diferencia de la capacidad de expansión limitada de las células HSC CD34+ se caracterizan por una capacidad de crecimiento ilimitado, y pueden dar lugar a una ilimitada producción de plaquetas  
10 para su uso en clínica.

Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del gen *SCL*, de secuencia nucleotídica (GenBank NM\_003189.2, NP\_003180.1) SEQ ID NO: 1, de ahora en adelante secuencia nucleotídica de la invención, para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, se entiende que el gen *SCL* presenta una secuencia nucleotídica con una identidad de al menos un 50%, más preferiblemente un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% y aún mucho más preferiblemente un 99% con la secuencia SEQ ID NO: 1.

Puede esperarse que el grado de identidad/similaridad de las secuencias homologas a  
20 la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 1, sean, de al menos de un 50% o mayor, y más preferiblemente de al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o un 99%. La correspondencia entre la(s) secuencia(s) nucleotídica(s) de la(s) secuencia(s) putativa(s) y la secuencia recogida en la SEQ ID NO: 1 se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Los métodos de comparación de secuencias son  
25 conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLAST o BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1999)).

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más  
30 concretamente, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas

o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucleic Acids Research 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1999).

El gen *SCL* o *TAL1* " T-cell acute lymphocytic leukemia 1", también denominada como TCL5; tal-1; bHLHa17, se encuentra en el cromosoma 1 (1p32). Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 2 , (de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 con número de acceso en el GenBank (NCBI) NM\_003189.2).

10 En el contexto de la presente invención, *SCL* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

15 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

20 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de *SCL*.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que  
25 comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

a. secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, la secuencia nucleotídica de la invención, de acuerdo a cualquiera de las definiciones anteriormente mencionadas, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o

30 b. secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, de acuerdo a cualquiera de las definiciones anteriormente mencionadas, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de

nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar,

5 para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre. Preferiblemente, la construcción genética es un vector, de ahora en adelante un vector de la invención, y aún más preferiblemente es un vector lentiviral. En otra  
realización preferida, las células madre se seleccionan de la lista que consiste en  
células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes, células madre  
pluripotentes inducidas, células madre embrionarias, fibroblastos, megacariocitos  
inducidos (Ono, Y. *et al.*, 2012 *Blood* 120(18):3812-21) o cualquiera de sus  
10 combinaciones. Aún más preferiblemente, son células madre pluripotentes (PSCs),  
más preferiblemente son células madre de mamífero, y aún mucho más  
preferiblemente, son células humanas.

Un gran número de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden  
ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y  
15 forman parte de la presente invención.

Un "vector" es un replicón, o un vector integrativo, al que se ha unido otro segmento  
polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un "replicón" es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad  
autónoma de replicación polinucleotídica dentro de una célula; esto es, capaz de  
20 replicarse bajo su propio control.

Un vector integrativo es cualquier elemento genético que se integra y se mantiene  
estable en el genoma de una célula.

Un "vector lentiviral" es un vector integrativo derivado a partir de los lentivirus  
(retrovirus no oncogénicos capaces de infectar a todo tipo de células, tanto  
25 quiescentes como en división celular). Los vectores lentivirales pueden insertar  
fragmentos de ADN de tamaño intermedio y que puede alcanzar hasta las 8000 pb. El  
principal inconveniente de los mismos es que su integración es totalmente azarosa en  
el genoma de la célula hospedadora. En la actualidad la mayoría de estos vectores  
son derivados del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

30 "Secuencia de control" se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias  
para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. La naturaleza de  
dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en  
procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio

de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

Como se usa aquí, el término "promotor" hace referencia a una región del ADN aguas arriba del punto de inicio de la transcripción, y en el particular, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal, sea el origen del promotor una planta o no. Hay opromotores que inician la transcripción en un determinado tipo de tejidos, y se denominan como "tejido específicos". Un promotor "inducible" o "reprimible" es un promotor que se encuentra bajo el control del medio ambiente. Los promotores de tejido específico, tejido preferido, específicos de un tipo celular, o promotores inducibles son tipos constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales.

"Unidos de forma operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control "unida de forma operativa" a una secuencia que se transcribe a la secuencia nucleotídica de la invención, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Una "secuencia codificadora" o "secuencia codificante" es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a mRNA y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a mRNA, cDNA, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma

polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

MEGACARIOCITOS DE LA INVENCION

Un tercer aspecto de la invención se refiere un megacariocito productor de plaquetas  
5 funcionales, de ahora en adelante megacariocito de la invención, obtenido por un método que comprende:

- a) poner en contacto la construcción genética o el vector de la invención, con una célula madre,
- b) seleccionar las células madre del paso (a) que han sido transducidas o  
10 transformadas con la construcción genética y/o el vector, y
- c) diferenciar las células madre del paso (b) a megacariocitos maduros.

En otra realización preferida, las células madre se seleccionan de la lista que consiste en células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes, células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias, fibroblastos, megacariocitos  
15 inducidos (Ono, Y. *et al.*, 2012 *Blood* 120(18):3812-21), células progenitoras de megacariocitos o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, son células madre pluripotentes (PSCs), más preferiblemente son células madre de mamífero, y aún mucho más preferiblemente, son células humanas.

Las hESC son las células madre pluripotentes derivadas de la masa celular interna de  
20 un embrión en fase inicial y son capaces de diferenciarse en todos los derivados de las tres capas germinales primarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estas células son capaces de diferenciarse en todos los tipos de células en el cuerpo humano.

Las iPS son un tipo de célula madre pluripotente derivada artificialmente a partir de una célula madura. Típicamente, las células somáticas adultas son inducidas a  
25 convertirse en pluripotentes mediante la activación de genes específicos de inmadurez en estas células.

Las células madre hematopoyéticas son células progenitoras que circulan en la sangre y residen en la médula ósea, y tienen el potencial para dar lugar a todas las células hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas pueden ser adquiridas de la  
30 médula ósea, sangre periférica con máquinas de aféresis, o de cordón umbilical o la placenta después del nacimiento.

El término "células progenitoras de megacariocitos," tal como se utiliza en este documento, se refiere a células madre hematopoyéticas comprometidas con al menos el linaje de megacariocitos e incluye, pero no se limitan a, células de la sangre del cordón umbilical, la médula ósea y sangre periférica, así como células madre hematopoyéticas, las células madre embrionarias, incluyendo células madre embrionarias humanas, y células madre pluripotentes inducidas.

Para los propósitos de la presente descripción, los términos "células madre" y "células progenitoras de megacariocitos" son intercambiables y se refieren a pluripotentes, multipotentes o unipotente células madre o células progenitoras que son capaces de diferenciarse en megacariocitos y tienen el potencial para producir plaquetas.

Para los propósitos de la presente descripción, el término "factores de crecimiento" se refiere a proteínas y y otros factores no proteícos que apoyan el crecimiento, el mantenimiento, la maduración y diferenciación de las células.

Para los propósitos de la presente descripción, el término "medio de crecimiento" se refiere a medio acuoso líquido o semi-sólido que incluye electrolitos, fuentes de energía, factores de crecimiento y otros materiales necesarios para el cultivo ex vivo de las células.

Los megacariocitos tienen la característica notable de duplicar sus contenidos nucleares y celulares sin división celular a través de un proceso llamado endomitosis. A través de la endomitosis, el megacariocito crece a un tamaño enorme y puede alcanzar más de 64 veces el contenido nucleares normales. El aumento de los contenidos nucleares, o poliploidía, juega un papel fundamental en la formación de plaquetas permitiendo a la célula producir las grandes cantidades de proteínas y orgánulos necesarios para la formación y función de las plaquetas. Es importante destacar que los megacariocitos maduros también tienen grandes cantidades de membrana celular extra con la que producen plaquetas. La inducción de poliploidización se puede lograr utilizando solos o en diferentes combinaciones reactivos conocidos en el estado del arte. Los autores de la presente invención han demostrado que el empleo de inhibidores de histona deacetilasa induce la maduración de los progenitores megacariocítico.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la diferenciación de las células madre a megacariocitos del paso (c) se lleva a cabo diferenciando las células madre a progenitores megacariocíticos mediante la adición de una composición que comprende un inhibidor de histona deacetilasa. Aún más

preferiblemente, el inhibidor de histona deacetilasa es la Tricostatina A. En una realización más preferida de la invención, la diferenciación de las células madre a megacariocitos maduros del paso (c) comprende co-cultivar las células madre con células del estroma.

- 5 Las histona deacetilasas (o HDAC) son un tipo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas. Los inhibidores de histona deacetilasas (HDIs) poseen una larga historia como fármacos utilizados en psiquiatría y neurología, como es el ácido valproico, por presentar una acción estabilizadora y anti-epiléptica. Más recientemente, los HDIs han sido  
10 empleados como mitigadores en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. También en los últimos años, se ha llevado a cabo un esfuerzo notable en el desarrollo de HDIs para terapias del cáncer, como vorinostat, que ha sido aprobado recientemente para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T (CTCL).

Los megacariocitos de la invención también se pueden encontrar formando parte de  
15 una población de megacariocitos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una población celular aislada, de ahora en adelante población celular de la invención, que comprende al menos un megacariocito de la invención. En una realización preferida la población celular de la invención comprende al menos un 20%, preferiblemente un 40%, y aún más preferiblemente un 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, o  
20 un 99% de megacariocitos de la invención.

El megacariocito de la invención, preferiblemente, se encuentra aislado. El término "aislado" indica que la célula (megacariocito) o la población de megacariocitos de la invención a la que se refiere, no se encuentran en su ambiente natural. Esto es, la célula o la población celular ha sido separada de su tejido circundante. Particularmente  
25 significa que dicha célula o la población celular está sustancialmente exenta (libre) de otras células normalmente presentes en la sangre, o en un hemoderivado de la misma, de un sujeto del que se haya extraído la sangre para el aislamiento de dicha célula o la población celular. También se refiere a las células o poblaciones celulares que han sido aisladas del organismo en el que se originan. El término también incluye células  
30 que han sido aisladas de un organismo y re-introducidas en el mismo organismo, o en otro.

#### *MÉTODO DE OBTENCIÓN DE PLAQUETAS DE LA INVENCIÓN*

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de plaquetas *in vitro*, de ahora en adelante método de producción de plaquetas de la invención, que comprende cultivar el megacariocito productor de plaquetas funcionales de la invención en un medio de cultivo adecuado.

- 5 Medios de cultivo adecuados son conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, pero sin limitarnos, los descritos en Takayama, N. *et al.* 2008. *Blood* 111(11):5298–306; Takayama, N. *et al.* 2010. *J. Exp. Med.* 207(13):2817–30; Lu, S.J. *et al.*, 2011. *Cell Res.* 21(3):530–45; Ono, Y. *et al.*, 2012 *Blood* 120(18):3812-21; Pick, M. *et al.*, 2013. *PLoS One* 8(2):e55530.
- 10 Un quinto aspecto de la invención se refiere a una plaqueta, de ahora en adelante plaqueta de la invención, obtenida por el método de producción de plaquetas de la invención.

#### *USOS DE LOS MEGACARIOCITOS Y PLAQUETAS DE LA INVENCIÓN*

- 15 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un megacariocito o de una plaqueta de la invención, en la elaboración de un medicamento.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de un megacariocito o de una plaqueta de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño vascular.

- 20 Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso de un megacariocito o de una plaqueta de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías relacionadas con las plaquetas.

- 25 Patologías relacionadas con las plaquetas son conocidas en el estado del arte, por ejemplo entre otras, pero sin limitarnos, trombocitopenias de origen fisiológico, leucemias, enfermedades genéticas o inducidas por quimioterapia agresiva, la Trombastenia de Glanzmann o el Síndrome de Bernard-Soulier, y/o leucemias megacarioblásticas agudas.

- 30 Tanto los megacariocitos como las plaquetas de la invención pueden encontrarse formando parte de una composición, de ahora en adelante primera composición de la invención. En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica (de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención), y más preferiblemente, dicha composición puede incorporar otro u otros principios activos. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además



comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal  
5 o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar los megacariocitos o la población de megacariocitos de la  
10 invención o de dicha composición que comprende células madre de la invención obtenible según el procedimiento de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dichas células. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho vehículo incluyen cualquier vehículo fisiológicamente compatible, por ejemplo, soluciones isotónicas (e.g., solución salina estéril al 0,9% NaCl, solución salina tamponada con  
15 fosfatos (PBS), solución Ringer-lactato, etc.), opcionalmente suplementadas con suero, preferiblemente con suero autólogo; medios de cultivo celular (e.g., DMEM, etc.); o, alternativamente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso, tal como colágeno, colagen-glicosamino-glicano, fibrina, cloruro de polivinilo, poliaminoácidos, tales como polilisina, o poliornitina, hidrogeles, agarosa, sulfato de  
20 dextrano silicona. Asimismo, si se desea, el medio de soporte puede, en realizaciones específicas, contener factores de crecimiento u otros agentes. Si el soporte es sólido, semisólido, o gelatinoso, los megacariocitos pueden ser introducidos en una fase líquida del vehículo que es tratada posteriormente de forma tal que se convierte en una fase más sólida.

25 La composición farmacéutica de la invención, si se desea, puede contener también, cuando sea necesario, aditivos para aumentar, controlar o dirigir de otro modo el efecto terapéutico deseado de los megacariocitos, los cuales comprenden dicha composición farmacéutica, y/o sustancias auxiliares o sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, codisolventes,  
30 conservantes, etc. También, para estabilizar la suspensión celular, es posible añadir quelantes de metales. La estabilidad de las células en el medio líquido de la composición farmacéutica de la invención puede mejorarse mediante la adición de sustancias adicionales, tales como, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, etcétera. Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la  
35 composición farmacéutica de la invención son conocidas, en general, por los técnicos

en la materia y se usan normalmente en la elaboración de composiciones celulares. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin. Puede encontrarse información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de tecnología farmacéutica (Farmacia Galénica).

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

La composición farmacéutica de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. La composición farmacéutica de la invención puede prepararse en un modo de dosificación líquido o gel, por ejemplo, en forma de suspensión, para ser inyectada o perfundida al individuo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, incluyen la formulación de la composición farmacéutica de la invención en una suspensión estéril con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución isotónica, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfatos (PBS), o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado, para la administración a un sujeto vía parenteral, e.g., un ser humano, preferentemente vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, etc., aunque también son posibles otras rutas alternativas de administración.

La administración de la composición farmacéutica de la invención al individuo se llevará a cabo por los medios convencionales. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica se puede administrar a dicho individuo por vía intravenosa utilizando los dispositivos adecuados, tales como jeringas, catéteres (un catéter intravenoso periférico estándar, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar, etc.), trocares, cánulas, etc. El flujo de las células se puede controlar por inflado y desinflado en serie de globos distales y proximales ubicados dentro de la vasculatura del paciente, creando así zonas temporales sin flujo que promueven la acción terapéutica

celular. En todos los casos, la composición farmacéutica de la invención se administrará utilizando los equipos, aparatos y dispositivos adecuados a la administración de composiciones celulares y conocidos por el experto en la técnica.

5 Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (e.g., por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula apropiada, por  
10 perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, se puede almacenar hasta el momento de su aplicación mediante los procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Esta composición farmacéutica también se puede  
15 almacenar junto a medicamentos adicionales, útiles en el tratamiento en enfermedades, en una forma activa que comprende una terapia combinada.

#### *COMPOSICIONES Y MEDIO DE CULTIVO DE LA INVENCIÓN*

Los autores de la presente invención también han demostrado que el uso de un  
20 inhibidor de histona deacetilasa sirve para potenciar la diferenciación de una célula madre a megacariocito. Así, dichos inhibidores se pueden utilizar para mejorar las condiciones de cultivo *in vitro* de los progenitores de megacariocitos y megacariocitos inmaduros. Las composiciones y el medio de cultivo de la invención, aumentan las tasas de maduración de estos, lo que puede ser usado para incrementar la producción  
25 de plaquetas.

Por tanto, un noveno aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor de histona deacetilasa para diferenciar una célula madre a megacariocito. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de histona deacetilasa es la Tricostatina A. Dichos inhibidores pueden encontrarse también  
30 formando parte de una composición, de ahora en adelante segunda composición de la invención. Además, los inhibidores y/o la segunda composición de la invención puede formar parte, también, de un medio de cultivo, o de una composición farmacéutica para su uso como medicamento.

*SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS*

Un décimo aspecto de la invención se refiere a un sistema o dispositivo de producción de plaquetas para la producción *in vitro* y/o *ex vivo* de las plaquetas de la invención que comprende:

5

- a) un biorreactor para la expansión de las células madre en presencia de un primer medio de crecimiento en comunicación fluída con;
- b) una cámara de maduración que comprende células estromales y/o un nicho de médula ósea artificial y un segundo medio de crecimiento, en el que la cámara de maduración está en comunicación fluída con;
- c) una cámara de separación de células para la selección de megacariocitos maduros que está en comunicación fluída con;
- d) un módulo de producción de plaquetas que comprende una pluralidad de cámaras de producción de plaquetas, una matriz tridimensional, un tercer medio de crecimiento, y una pluralidad de bombas para mover el tercio del medio de crecimiento a través de las cámaras de producción de plaquetas, en el que el módulo de producción de plaquetas está en comunicación fluída con ;
- e) una cámara de recogida de plaquetas.

10

15

donde las células madre del paso (a) están transfectadas con el gen *SCL*.

20

En una realización preferida, el sistema o dispositivo de producción de plaquetas se utiliza para aumentar la expansión celular de las células madre y / o progenitores de megacariocitos, por tanto, incorpora en uno o varios medios de crecimiento empleados en alguno de sus pasos un inhibidor de histona deacetilasa. Aún más preferiblemente, el inhibidor de histona deacetilasa es la Tricostatina A. En otra realización preferida de la invención, las células estromales, son células estromales OP9.

25

Los dispositivos de producción de plaquetas o sistemas de cultivo de células son conocidos en el estado del arte y el sistema no se limita al dispositivo descrito en este documento. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, los biorreactores, vasos, cámaras y bolsas son bolsas de recogida de células, tales como bolsas de recogida de sangre estériles conocidas por las personas con conocimiento normal en las técnicas de bancos de sangre. En otras formas de realización, los vasos, las cámaras y las bolsas son recipientes biocompatibles estériles de cualquier diseño.

30

## EJEMPLOS DE LA INVENCION

### Material y métodos

#### Cultivo de hPSC

Las líneas hPSCs AND1 y HS181 (vector vacío (EV) o SCL (SCL)) ya se han  
 5 caracterizado (Real, P.J. *et al.*, 2012. *Mol. Therapy* 20(7):1443–53). Estas líneas se  
 mantuvieron indiferenciadas en cultivo libre de nutrientes siguiendo el protocolo  
 descrito por Ramos-Mejía, V. *et al.*, 2010. *Mol. Therapy* 18(12):2173–81). En resumen,  
 las hPSCs se cultivaron sobre Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA) en frascos T25  
 10 en un medio nutritivo suplementado con 8ng/mL de factor de crecimiento fibroblástico  
 básico (bFGF) (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). El medio se renovó  
 diariamente y los cultivos confluentes se separaron semanalmente mediante  
 colagenasa IV durante 2-5 minutos (Invitrogen, Edimburgo, Escocia). Se obtuvo la  
 aprobación del comité nacional de ética para estudios con embriones para el trabajo  
 con hPSCs.

#### 15 Diferenciación de megacariocitos desde PSCs.

El protocolo de diferenciación de megacariocitos se adaptó del grupo del Dr. Lanza  
 (Lu, S.J. *et al.*, 2011. *Cell Res.* 21(3):530–45). En resumen, hPSCs indiferenciadas en  
 confluencia en dispositivos T-25 se trataron con colagenasa IV durante 2-5 minutos y  
 se desechó el Matrigel sobrante. Con la finalidad de formar cuerpo embriodes (EB), las  
 20 hPSCs se transfirieron a placas de fijación “*ultra-low*” (Corning, Lowell, MA) en medio  
 EB (Dulbecco KO modificado con medio Eagle suplementado con 20% de suero fetal  
 bovino no inactivado por calor, 1% de aminoácidos no esenciales 1 mmol/L de L-  
 glutamina y 0,1 mmol/L de β-mercaptoetanol) y sin citoquinas. Al día siguiente se  
 cambió el medio para eliminar los restos celulares y se refrescó el medio EB  
 25 suplementado con proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) (50 ng/mL), factor de  
 crecimiento endotelial vascular (VEGF) (50 ng/mL) y factor de crecimiento fibroblástico  
 (bFGF) (20ng/mL). Desde el día 3 al 8 se continuó con medio EB que contenía BMP4  
 (50 ng/mL), VEGF (50 ng/mL) y bFGF (20 ng/mL), factor célula madre (SCF) (20  
 ng/mL), trombopoietina (TPO) (20 ng/mL), Fms- Tirosina kinasa ligando 3 (FLT3L) (20  
 30 ng/mL), Desde el día 8 hasta el final de la fase de diferenciación (15 días) el cóctel de  
 citoquinas suplementado con medio EB se simplificó con TPO (50 ng/mL) y SCF (20  
 ng/mL). Todas las citoquinas se adquirieron de PeproTech (Londres, Reino Unido).

En el día 10 de la diferenciación EB,  $3 \times 10^4$  células por pocillo se sembraron en placas  
 de 6 pocillos para formar el estroma celular. El día 15 de la etapa de diferenciación EB,

las EBs se disociaron en colagenasa B (Roche, Suiza) durante 2 horas a 37 °C seguido de 10 minutos de incubación con buffer de disociación celular (Invitrogen) a 37°C. Las células se lavaron con PBS, se centrifugaron a 1200rpm durante 4 minutos. La suspensión de una sola célula se obtuvo mediante pipeteo suave con 2 ml de medio de diferenciación OP9 (DM: medio basal alpha-MEM, 10% de FBS no inactivado por calor, 100µM monotioglicerol y 50 mg/mL de ácido ascórbico que contiene TPO (100 ng/mL), SCF (50 ng/mL) y heparina (25 U/mL). Las células se cultivaron en DM durante el resto de la etapa de diferenciación de OP9 (desde el día 15-32) con refresco continuo cada 2-3 días. A partir del día 20 en adelante se añadió al cultivo celular el inhibidor de metaloproteinasas GM6001 (Merck Milipore, Bellerica, MA) (50 µM) para evitar la escisión de CD42b en plaquetas.

Para evaluar la diferenciación megacariocítica se llevó a cabo un análisis de antígenos de superficie CD41a y CD42b en el co-cultivo de de OP9 desde el día 18 hasta el final del protocolo de diferenciación cada 2 días. La mitad de los medios se recolectó, recogiendo las células en suspensión, y la misma cantidad de medio nuevo de completó para continuar el cultivo de diferenciación. Las células se centrifugaron a 800 g durante 5 minutos, se tiñeron en PBS con FCS al 2% y 2mM de EDTA usando anticuerpos de ratón antihumanos CD41a-PE (eBiosciences , San Diego, CA) (dilución 1/100) y CD42b-APC (Biolegend, San Diego, CA) (dilución 1/50) y analizados con un citómetro de flujo FACSCantoll equipado con el software Diva FACS (Becton Dickinson , Franklin Lakes, NJ). La cuantificación del número de células y plaquetas doblemente positivas CD41a<sup>+</sup> y CD42b<sup>+</sup> se desarrollaron añadiendo una cantidad conocida de Microesferas Perfect-Count (Cytognos, Salamanca, España) a la suspensión celular antes del análisis FACS.

#### 25 Integrina $\alpha$ IIb $\beta$ 3 con capacidad de activación vinculante a PAC-1

Los megacariocitos y las plaquetas se recogieron por centrifugación a 800 g durante 5 minutos, se lavaron con buffer Tyrode (NaCl (150 mM), KCl (2,9 mM), NaHCO<sub>3</sub> (12 mM), glucosa (0,1%), BSA (0,1%), HEPES (5 mM)) con calcio y magnesio (CaCl<sub>2</sub> (1 mM) y MgCl<sub>2</sub> (1 mM)) y se resuspendió en 100 µL del mismo tampón. Después, las plaquetas y las células se tiñeron con el anticuerpo anti-CD42b-APC durante 20 minutos a temperatura ambiente, activado mediante la adición de 70M de 5' adenina di-fosfato (ADP) durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se tiñeron usando el anticuerpo PAC-1-FITC (BD biosciences) que reconoce la forma activada de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Las células y las plaquetas se incubaron durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente. Las células control se tiñeron con ambos

anticuerpos pero no activados por ADP. Por último, la tinción PAC-1 se analizó usando un citómetro de flujo FACSCanto II.

#### Activación por fibrinógeno

El día anterior del experimento de activación, 8 pocillos de cámaras (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) se recubrieron con 100 g/mL de fibrinógeno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) preparado en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las plaquetas y las células se recogieron, se centrifugaron a 800 g durante 5 minutos, se resuspendieron en tampón Tyrode. Al ser activados con ADP (50 µM) o trombina (2 U/mL) los megacariocitos y plaquetas se incubaron durante 2 horas a 37 °C, después se fijaron con 2% de paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos y se lavaron con PSB.

#### Citoquímica

Para realizar la evaluación citológica en la suspensión celular del co-cultivo de OP9, las células se recogieron, se fijaron con paraformaldehído al 2% y se lavaron dos veces con PBS. A continuación, las células se fijaron a portaobjetos tratados con polilisina por citospina a 800 g durante 15 minutos, se desecaron y tiñeron utilizando la tinción de Papanicolau. Alternativamente, las células y plaquetas con fibrinógeno activado se tiñeron usando el mismo protocolo. Los portaobjetos teñidos se analizaron bajo microscopía óptica y las imágenes se tomaron con un escáner 2,0 NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japón)

#### Análisis de precursores de megacariocitos

Se evaluó la aparición de células precursoras de megacariocíticas (CD34<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup> CD41a<sup>+</sup>) durante las etapas de diferenciación EB en los días 10, 14 y 17 de diferenciación. Un tercio de las EB en crecimiento de una placa de 6 pocillos se recogieron y lavaron una vez con PBS. De la misma manera, para evaluar el efecto de la tricostatina A (TSA) en la diferenciación, las EBs se trataron con DMSO o TSA a 10 nM o 100nM durante 14 días. En ambos casos las EBs se disociaron con colagenasa B y tampón de disociación como se ha descrito anteriormente. Se obtuvo una suspensión celular homogénea después del lavado de EBs con PBS y resuspendiéndose en 300 L de PBS con 2% de FCS y 2 mM de EDTA con precaución hasta que no se observan grumos. Las células disociadas se tiñeron con los anticuerpos anti-CD34-PECy7 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y anti-CD41a-PE y 7AAD. Las células vivas identificadas por exclusión de 7AAD se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II.

Aislamiento de ARN, PCR-RT y análisis qPCR

El ARN total procedente de hPSCs indiferenciadas, hEBs y suspensión celular de co-cultivo OP9 se aislaron usando Trizol (Invitrogen) como se ha descrito previamente (Real, P.J. *et al.*, 2009. *Nat. Med.* 15(1):50-8). El ADNc se generó con el “*Super Script First Strand Sythesis System*” para RT-PCR (Invitrogen) y analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) usando Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, La Jolla, CA) y el sistema QPCR Mx3005P (Agilent Technologies). El gen GAPDH se utilizó para normalizar los datos y la expresión relativa se calculó utilizando el método de  $\Delta\Delta CT$ . Las secuencias de *primers* se enumeran en la **tabla 1**:

Nombre del primer	Secuencias	SEQ ID
GAPDH Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	SEQ ID NO: 3
GAPDH Rv	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	SEQ ID NO: 4
CD41 Fw	TGAGCCGCATTTACGTGGAAA	SEQ ID NO: 5
CD41 Rv	CTTCACAGTAACGCTTGTCCC	SEQ ID NO: 6
CD61 Fw	GTGACCTGAAGGAGAATCTGC	SEQ ID NO: 7
CD61 Rv	TCACTCACTGGGAACCTCGATG	SEQ ID NO: 8
FLI-1 Fw	CCAACGAGAGGAGAGTCATCG	SEQ ID NO: 9
FLI-1 Rv	TTCCGTGTTGTAGAGGGTGGT	SEQ ID NO: 10
GATA1 Fw	TCACTCCCTGTCCCCAATAG	SEQ ID NO: 11
GATA1 Rv	GGAGAGTTCCACGAAGCTTG	SEQ ID NO: 12
NEF2 Fw	GCAGGAACAGGGTGATACAGC	SEQ ID NO: 13
NEF2 Rv	GAGCAGGGGCAGTAAGTTGT	SEQ ID NO: 14
SCL Fw	GGATGCCTTCCCTATGTTCA	SEQ ID NO: 15
SCL Rv	GGTGTGGGGACCATCAGTAA	SEQ ID NO: 16

Perfil de expresión génica y análisis de datos

A los 14 días, las EBs procedente de AND1 EV y AND1 SCL se rompieron y el ARN total se aisló utilizando Trizol. La calidad del ARN se verificó en la plataforma Bioanalyzer Agilent 2100. Las muestras de ARN se etiquetaron (Agilent Low Input Quick Etiquetado kit Amp, Agilent Technologies) con Cy3 siguiendo el protocolo del fabricante. El procedimiento de hibridación se realizó utilizando el kit Agilent Gene Expression Hybridation (Agilent Technologies). Los fragmentos de ARNc etiquetados Cy3 se hibridaron con Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray 8x60K (Agilent Technologies) utilizando las recomendaciones de Agilent. Dos muestras independientes por condición se etiquetaron e hibridado. La agrupación jerárquica de los genes las muestras se realizó con una correlación menos métrica. Los genes candidatos putativos con un doble cambio >2 y un valor de  $p < 0,01$  se consideraron diferencialmente expresados (EV vs SCL). Los 100 genes sobrerregulados y poco



regulados se seleccionaron y analizaron utilizando la herramienta online Connectivity Map (Lamb, J. *et al.*, 2006. *Science* 313(5795):1929–35.) ([www.broadinstitute.org/cmap](http://www.broadinstitute.org/cmap)).

## Resultados

### 5 La sobreexpresión de SCL aumenta la producción de megacariocitos y plaquetas en hPSC.

En los últimos años se ha dilucidado el papel del factor de transcripción SCL en la especificación hematopoyética de hPSCs. Los modelos celulares humanos se generaron por expresión forzada de SCL en hPSCs (Yung, S. *et al.*, 2011. *Hum. Mol. Gen.* 20(24):4932–46; Real, P.J. *et al.*, 2012. *Mol. Therapy* 20(7):1443–53). Estas células conservan propiedades de pluripotencia y el aumento del potencial hematopoyético produciendo niveles altos de células progenitoras hematopoyéticas (CD34+ CD45+) y de células hematopoyéticas maduras (CD45+). También se ha visto que la sobreexpresión acelera la diferenciación eritroide. Recientemente, diferentes grupos han demostrado la participación de SCL en la diferenciación de megacariocitos a partir de ESCs (Changraoui, H. *et al.*, 2011. *Blood* 118(3):723–35) y de células madre humanas hematopoyéticas CD34+ (Choi, E.S. *et al.*, 1995. *Blood* 85(2):402–13.; Tao, H. *et al.*, 1999. *Exp. Hematol.* 27(2):293–301; Ma, D.C. *et al.*, 2000. *Eur. J. Haematol.* 64(5):304–14; De Bruyn, C. *et al.*, 2005. *Stem Cells Dev.* 14(4):415–24). No obstante, la función de SCL durante la hematopoyesis humana en embriones o la generación *in vitro* de megacariocitos y plaquetas desde hPSCs es desconocida.

Para determinar el impacto de la expresión de SCL en ambos procesos, hPSCs se diferenciaron en presencia de un conjunto de citoquinas humanas como ya ha descrito el grupo del Dr. Lanza (Figura 1A). Consiste en un protocolo de 2 fases. En primer lugar, las hPSCs forman cuerpo embrionario (EBs) inmediatamente en 14 días. El día 15 se desagregan y las células hPSCs derivadas se cultivan con células OP9 durante 17 días en medio de diferenciación suplementado con heparina, TPO y SCF. La cinética de aparición de megacariocitos y plaquetas se cuantificó durante la etapa de diferenciación en co-cultivo por citometría de flujo (Figura 1B y C). La sobreexpresión de SCL aumentó la producción de megacariocitos y plaquetas en dos líneas celulares independientes. Como se muestra en la figura 1C, a los 18 días las hPSCs AND1 que sobreexpresaban SCL (SCL) generaron 15 veces más megacariocitos y 10 veces más plaquetas que las células control (EV). En el día 20, EV y SCL presentaron el pico de producción de megacariocitos y plaquetas, con un aumento de producción de 6 y 10 veces, respectivamente, a favor de las células que sobreexpresan SCL. A partir del día

24 en adelante, la megacariopoyesis y la trombopoyesis se redujeron drásticamente en las células AND1 acabando el proceso de diferenciación megacariocítica el día 28. En las células HS181 la cinética de aparición de megacariocitos y plaquetas es más progresiva. La producción de megacariocitos y plaquetas más elevada se observó a los 24 días con aumento de 10 y 3 veces, respectivamente en células que sobreexpresan SCL (SCL). Este pico es seguido de un descenso pronunciado hasta el día 32, donde las células control HS181 (EV) cesan por completo la producción de plaquetas y megacariocitos, por su parte las células que sobreexpresan SCL eran todavía levemente productivas. Estos datos sugieren que SCL regula positivamente la diferenciación megacariocítica de hPSCs, aumentan el número de megacariocitos y plaquetas y mantienen su producción durante un periodo de tiempo más largo, sin tener en cuenta la línea hPSC empleada.

Por otro lado, se ha estudiado que estrategia de recolección es más eficiente en términos de producción de megacariocitos y plaquetas. En otro experimento, se recogió cada 2-4 días una fracción de sobrenadante de cultivo celular para su análisis y el volumen equivalente se repuso con medio de diferenciación. El uso de células HS181 tuvo una diferenciación de megacariocitos más progresiva, por tanto se probó en paralelo tres planes alternativos: i) una recolección el día 22; ii) una sola recolección el día 26; una primera recolección el día 22 seguida de un reemplazo del medio y una segunda recolección el día 26. La figura 1D muestra que la doble recolección es el procedimiento más eficaz para obtener una mejor producción de megacariocitos y plaquetas, en comparación con las recolecciones únicas de los días 22 y 26. Estos resultados indican que la estrategia acumulativa no es beneficiosa para incrementar la producción de megacariocitos y plaquetas, por otra parte la renovación del medio favorece la diferenciación las hPSCs a megacariocitos.

#### La sobreexpresión de SCL no afecta a las propiedades morfológicas, moleculares y funcionales de los megacariocitos y plaquetas derivadas de hPSCs

Se desarrolló una caracterización detallada a diferentes niveles con la finalidad de evaluar el impacto de la sobreexpresión de SCL en los megacariocitos y plaquetas derivados a partir de hPSCs. En primer lugar, en HS181 se purificaron megacariocitos del sobrenadante de EV y SCL durante el co-cultivo diferentes etapas de diferenciación, temprana (20 días) y tardía (32 días). Estas células se fijaron con formaldehído, concentradas con citospina y caracterizada utilizando una tinción con solución de Papanicolau (figura 2A). Como se muestra en la figura 2A, el sobrenadante HS181 SCL contenía una mayor concentración de megacariocitos en

comparación con el conteo de EV, sin embargo no se detectaron diferencias morfológicas entre ellos. Como era de esperar, se observó un estado de diferenciación más maduro en el día 32 determinado porque se encontraron un número mayor de megacariocitos grandes y multinucleados. En segundo lugar, se realizó un análisis de la expresión génica al principio del punto de diferenciación (22 días) a partir del sobrenadante de HS181 control (EV) con sobreexpresión de SCL (SCL). Se encontraron cuatro factores de transcripción asociados a la diferenciación megacariocítica (*FLI-1*, *NFE2*, *GATA-1* y *SCL*) y dos marcadores de superficie se analizaron por RT-PCR (figura 2B). La expresión de *FLI-1* y *NFE2* estuvo sobrerregulada en células HS181 SCL (SCL); mientras que no hubo diferencias de expresión en *GATA-1*, *CD41* y *CD61* entre las células del control (EV) y SCL.

A continuación, se evaluó la funcionalidad de los megacariocitos derivados hPSCs. Los megacariocitos derivados de cultivos control HS181 (EV) y de sobreexpresión de SCL (SCL) al día 26 se purificaron y cultivaron sobre portaobjetos recubiertos de fibronectina en presencia de trombina humana (2 U/mL) durante 2 horas (figura 2C). Después de esto, las célula no unidas se eliminaron y las células activadas se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con formaldehido y se tiñeron utilizando el protocolo de tinción de Papanicolau. Curiosamente tanto las células megacariocíticas EV y SCL se activaron de manera similar y presentó un número similar de células unidas multinucleadas (Figura 2C). Además, a partir de una fracción de sobrenadante de HS181 control (EV) y con sobreexpresión de SCL se recogieron el día 26, se lavaron dos veces con PBS y se activa mediante la adición de 5' adenina di-fosfato (ADP) durante 10 minutos. Después de que las células y plaquetas se tiñeron utilizando el anticuerpo PAC-1, que reconoce la forma activada de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , se analizaron por citometría de flujo (figura 2D). Es importante destacar que los megacariocitos y plaquetas obtenidos a partir de células control (EV) y con sobreexpresión de SCL, son igualmente funcionales y los niveles de activación por ADP son muy cercanos. Estos resultados apoyan que la sobreexpresión de SCL no modifica la funcionalidad de los megacariocitos y las plaquetas derivadas de hPSCs.

La sobreexpresión de SCL acelera la emergencia de progenitores megacariocíticos a partir de hPSCs.

En estudios anteriores, se ha propuesto que la sobreexpresión de SCL promovió la aparición de progenitores hematopoyéticos y de ertiro-megacariocitos, así como acelerar la diferenciación de eritroides. Sin embargo, el linaje de diferenciación de megacariocitos no ha sido estudiado y este es el tema principal del estudio. Para

demostrar que la sobreexpresión de SCL potencia los el surgimiento de progenitores megacariocíticos a partir de hPSCs, se extendió la etapa inicial de diferenciación hasta el día 17 y se analizó la aparición de células madre CD34 y progenitores megacariocíticos (CD34+CD41+) a diferentes tiempos (10,14 y 17 días) por citometría de flujo (figura 3A y 3B). Como se muestra en la figura 3C, la sobreexpresión de SCL aceleró significativamente la emergencia de ambas poblaciones. Este efecto es particularmente drástico en el caso de las poblaciones CD34+CD41+ que alcanzó del 5 al 7-8% del total de células dentro del EB durante la diferenciación de hPSCs que sobreexpresan SCL, en contraste con la baja tasa de detección (por debajo del 0,5%) en células control (EV). Además, los megacariocitos más maduros CD41+ CD42+ derivados podrían ser detectados sólo el día 17 en EBs que sobreexpresan SCL (datos no mostrados).

Con el fin de demostrar aún más el efecto de la sobreexpresión de SCL en la aceleración del surgimiento de progenitores de megacariocitos se desarrolló un análisis de la expresión génica en los mismos puntos de tiempo (10, 14 y 17 días). Los niveles de expresión de los factores de transcripción y los marcadores de superficie asociados a megacariocitos con diferenciación temprana se evaluaron con RT-PCR cuantitativa usando los EBs control (EV) al día 10 (Figure 3D). Es importante destacar que tres factores de transcripción y dos marcadores de superficie fueron significativamente sobreexpresados en EBs que sobreexpresaban SCL en los tres puntos de tiempo. La dinámica de expresión de *NFE2*, *GATA-1*, *CD41* y *CD61* fue muy similar con el aumento continuo de la diferenciación. Mientras que la expresión de *FLI-1* fue muy elevada y constante en toda la diferenciación de EBs SCL, se registró una ligera inducción en el control EBS (EV). Estos datos confirmaron que la sobreexpresión de SCL promueve y mejora la aparición de progenitores megacariocíticos a partir de hPSCs.

La sobreexpresión de SCL imita parcialmente el efecto de los inhibidores de histona desacetilasa durante la diferenciación megacariocítica.

Una vez que se confirmó que la sobreexpresión de SCL en hPSCs aceleró la aparición de progenitores megacariocíticos, se profundizó en los mecanismos moleculares y de regulación de la transcripción mediados por SCL durante el desarrollo megacariocítico a partir de hPSCs. Se desarrollaron perfiles de expresión génica con micromatrices de oligonucleótidos en células control (EV) y con sobreexpresión de SCL (SCL) a los 14 días de la etapa de diferenciación EBs, ya que fue el momento donde el EBs se desagrega y se siembran con células del estroma según el protocolo estándar (Figura

1A). Este análisis mostró un desarrollo megacariocítico mas eficiente al día 14 en EBs SCL con muchos genes asociados a la diferenciación hematopoyética y la hemostasia. Entre ellos encontramos los cinco genes previamente analizados en la figura 3D. Usando el software Ingenuity ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) también se construyó una red transcripcional controlada por SCL que regula muchos de los reguladores transcripcionales megacariocíticos (FLI-1, GATA1, GATA2, NEF2, RUNX1, etc) y sus genes diana (datos no mostrados).

Además, se utilizó una herramienta bioinformática pública denominada Connectivity Map, desarrollada por el Broad Institute. Este software complejo recoge una gran cantidad de perfiles de expresión génica a partir de varias líneas celulares estándares tratadas con una lista de moléculas bioactivas y compara estos perfiles con un conjunto de datos de expresión particular. Se han seleccionado los 100 genes más inducidos y reprimidos en una agrupación jerárquica de EBs EV vs EBs SCL y se presentó la lista de este análisis. Se ha encontrado una correlación muy alta entre los principales genes y los perfiles de expresión de varias líneas celulares tratadas con Tricostatina A (TSA) en diferentes concentraciones (Tabla 2). El segundo compuesto que también se enriqueció fue vorinostat o suberoilánilida ácido hidroxámico. Ambas drogas están clasificadas como inhibidores de la histona desacetilasa. Para validar experimentalmente estos datos *in silico* se realizó un ensayo de diferenciación megacariocítica en presencia o ausencia de TSA en dos concentraciones alternativas (Figura 4A) y se analizaron los progenitores de megacariocitos a partir de hPSCs silvestres. Como se muestra en la figura 4B, la adición de TSA desde el principio del proceso de diferenciación se asocia con un aumento en CD34+ CD41+ en los progenitores megacariocíticos a los 14 días de la etapa de diferenciación. Se van a realizar experimentos adicionales para optimizar el tiempo, las concentraciones y los inhibidores alternativos de la histona desacetilasa, tales como el ácido valproico o SAHA que deben ser confirmados. En conclusión, estos resultados muestran que la sobreexpresión de SCL puede controlar la actividad histona desacetilasa durante la diferenciación megacariocítica y que la caracterización de las vías moleculares inducidas por SCL puede ayudar a mejorar el proceso de desarrollo de megacariocitos a partir de hPSCs.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Uso de una secuencia polinucleotídica que consiste en la SEQ ID No 1 o en una secuencia nucleotídica con una identidad de al menos un 80% con la secuencia SEQ ID NO: 1, para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre pluripotentes, donde dichas células madre no han sido obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima.
- 5
- 2.- Uso de un vector que comprende la secuencia nucleotídica definida de acuerdo con la reivindicación anterior, para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre pluripotentes, donde dichas células madre no han sido obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima
- 10
- 3.- El uso del vector de acuerdo con la reivindicación anterior, donde el vector es un vector lentiviral.
- 4.- Uso de una construcción genética que comprende el vector tal y como éste se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, para obtener megacariocitos productores de plaquetas funcionales a partir de células madre pluripotentes, donde dichas células madre no han sido obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima
- 15
- 5.- El uso del vector según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, o de la construcción genética según la reivindicación 4, donde las células madre pluripotentes se seleccionan de la lista que consiste en células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias, fibroblastos, megacariocitos inducidos o cualquiera de sus combinaciones con la premisa de que dichas células madre no hayan sido obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima
- 20
- 6.- El uso del vector o de la construcción genética según la reivindicación 5, donde las células madre son células madre pluripotentes inducidas.
- 25
- 7.- El uso del vector o de la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, donde las células madre son células de un mamífero.
- 8.- El uso del vector o de la construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde las células madre son células madre humanas no embrionarias.
- 30
- 9.- Un megacariocito productor de plaquetas funcionales obtenido por un método que comprende:

a) poner en contacto un vector tal y como se ha definido éste en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, o una construcción genética según se define en la reivindicación 4, con una célula madre, donde dicha célula madre no ha sido obtenida por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima;

5            b) seleccionar las células madre del paso (a) que han sido transducidas o transformadas con el vector y/o la construcción genética; y

            c) diferenciar las células madre del paso (b) a megacariocitos maduros.

10.- El megacariocito según la reivindicación anterior, donde las células madre son células madre pluripotentes inducidas.

10    11.- El megacariocito según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde las células madre son células de un mamífero.

12.- El megacariocito según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, donde las células madre son células madre humanas no embrionarias.

15    13.- El megacariocito según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, donde la diferenciación de las células madre a megacariocitos del paso (c) se lleva a cabo diferenciando las células madre a progenitores megacariocíticos mediante la adición de una composición que comprende un inhibidor de histona deacetilasa.

14.- El megacariocito según la reivindicación 13, donde el inhibidor de histona deacetilasa es la Tricostatina A.

20    15.- El megacariocito según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, donde la diferenciación de las células madre a megacariocitos maduros del paso (c) comprende co-cultivar las células madre con células del estroma.

25    16. Un método para la producción de plaquetas *in vitro* que comprende cultivar el megacariocito productor de plaquetas funcionales, tal y como se ha definido éste en cualquiera de las reivindicaciones 9-15, en un medio de cultivo adecuado.

17.- El uso de un megacariocito obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 9-15, o de una plaqueta obtenida según el método de la reivindicación 16, en la elaboración de un medicamento o como vector dirigido a los sitios de daño vascular.

30    18.- El uso de un megacariocito obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 9-15, o de una plaqueta obtenida según el método de la reivindicación 16, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías relacionadas con las plaquetas y/o leucemias megacarioblásticas agudas.

19.- Uso de un inhibidor de histona deacetilasa para diferenciar una célula madre a megacariocito, donde dicha célula madre no ha sido obtenida por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima.

5 20.- Uso de una composición que comprende un inhibidor de histona deacetilasa para diferenciar una célula madre a megacariocito, donde dicha célula madre no ha sido obtenida por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima.

21.- Un sistema o dispositivo de producción de plaquetas para la producción *in vitro* y/o *ex vivo* de las plaquetas de la invención que comprende:

10 a) un biorreactor para la expansión de las células madre pluripotentes, donde dichas células madre no han sido obtenidas por métodos que destruyan o utilicen embriones humanos como materia prima, en presencia de un primer medio de crecimiento en comunicación fluída con

15 b) una cámara de maduración que comprende células estromales y/o un nicho de médula ósea artificial y un segundo medio de crecimiento, en el que la cámara de maduración está en comunicación fluída con

c) una cámara de separación de células para la selección de megacariocitos maduros que está en comunicación fluída con

20 d) un módulo de producción de plaquetas que comprende una pluralidad de cámaras de producción de plaquetas, una matriz tridimensional, un tercer medio de crecimiento, y una pluralidad de bombas para mover el tercio del medio de crecimiento a través de las cámaras de producción de plaquetas, en el que el módulo de producción de plaquetas está en comunicación fluída con

e) una cámara de recogida de plaquetas;

25 donde las células madre del paso (a) están transfectadas con la secuencia polinucleotídica tal y como se ha definido ésta en la reivindicación 1.



Fig.1

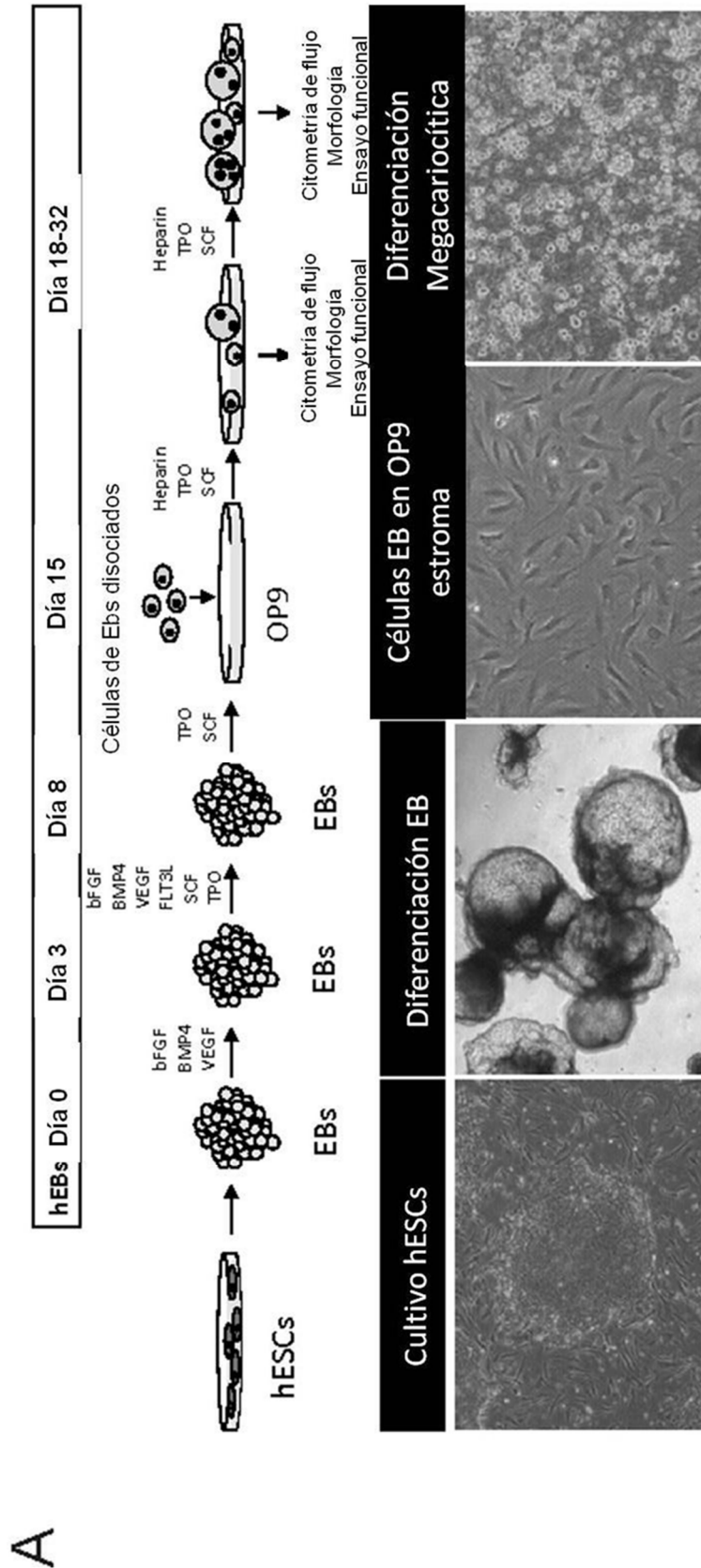


Fig.1

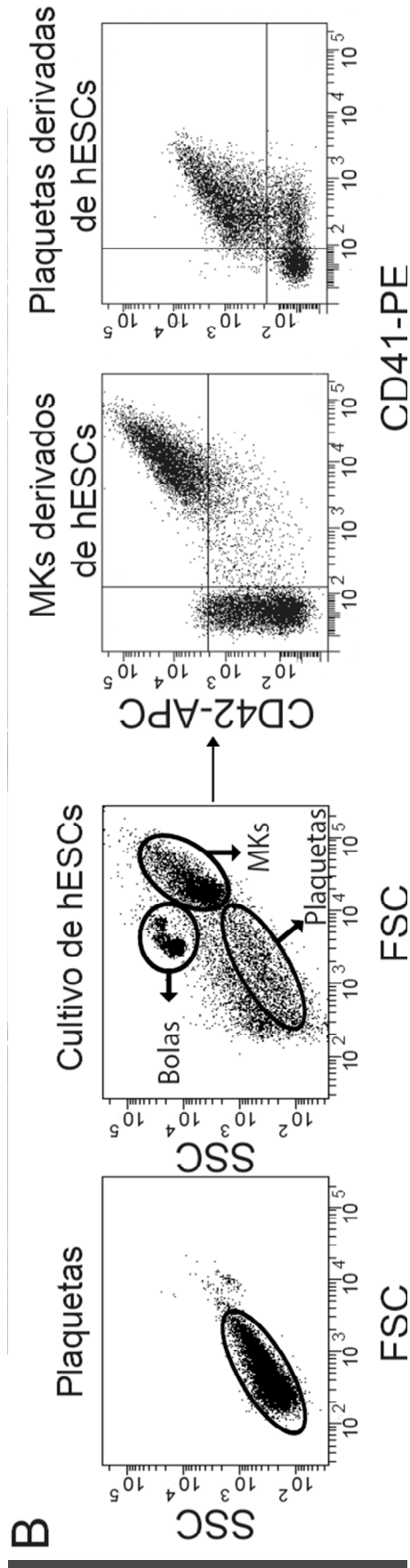


Fig.1

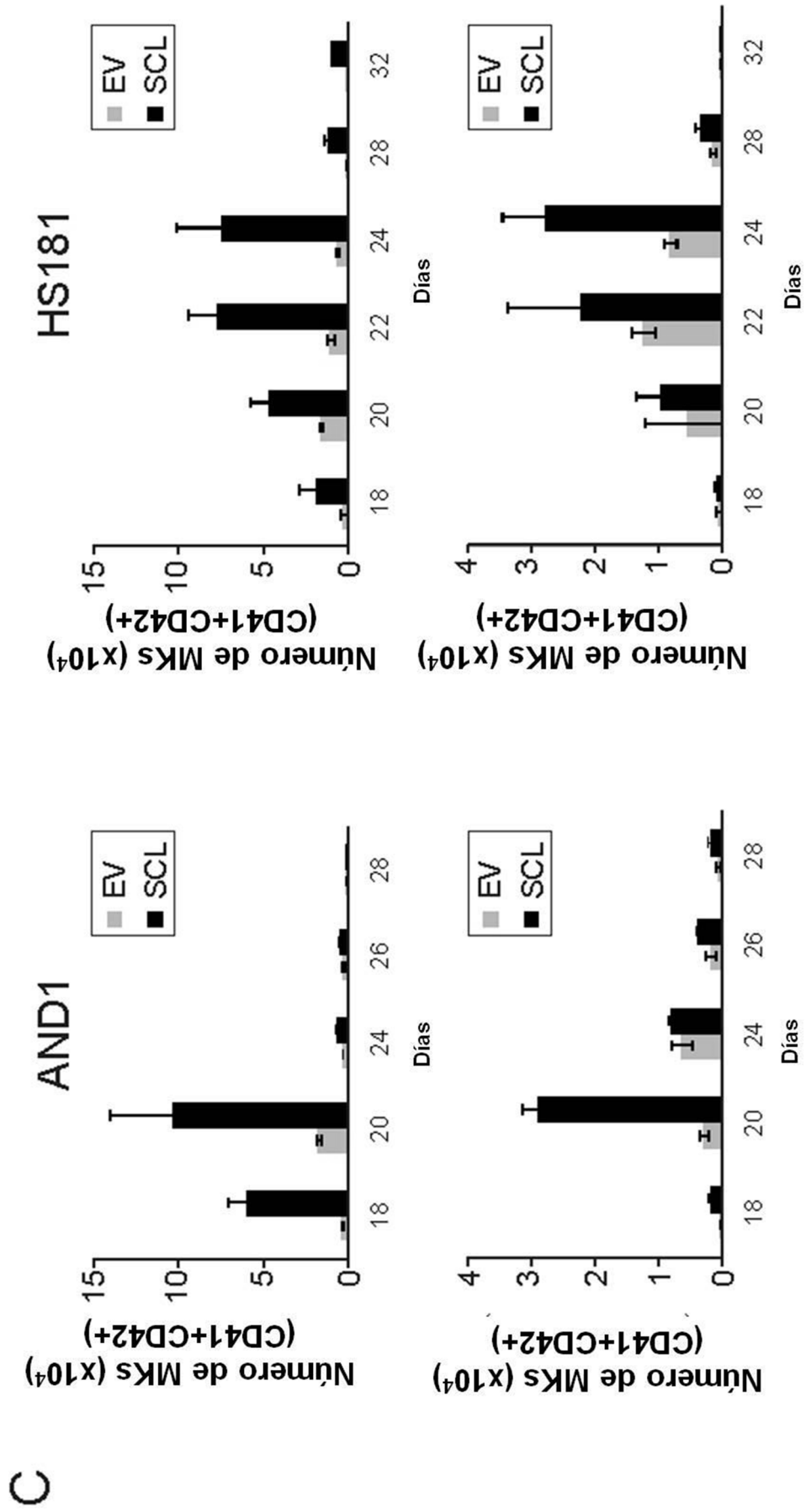


Fig.1



Fig.2

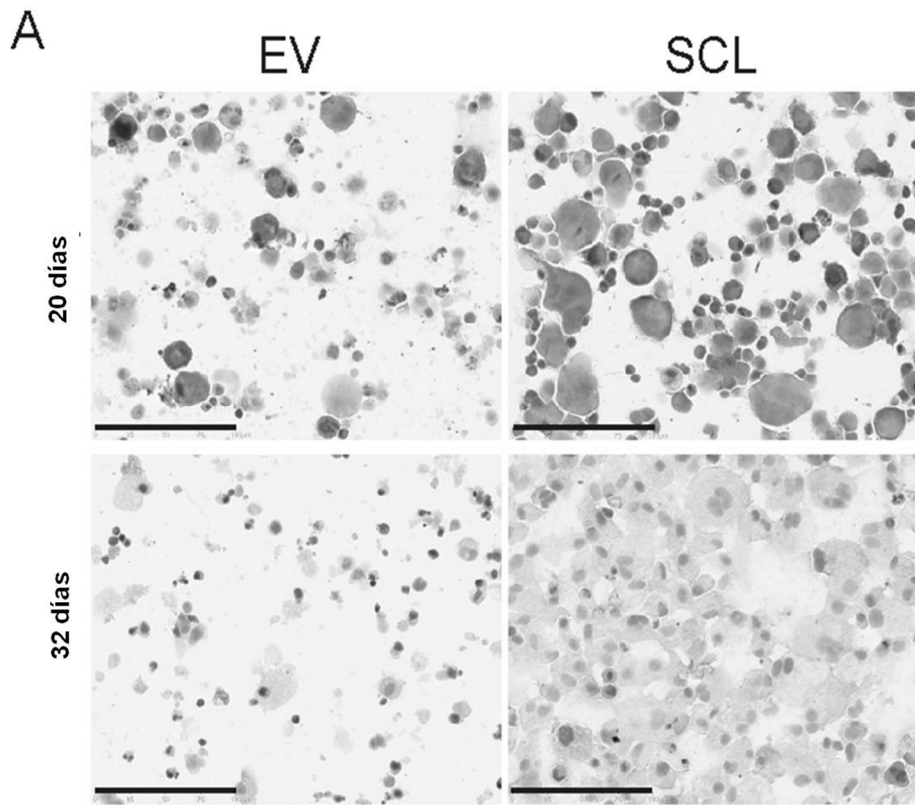


Fig. 2

**B**

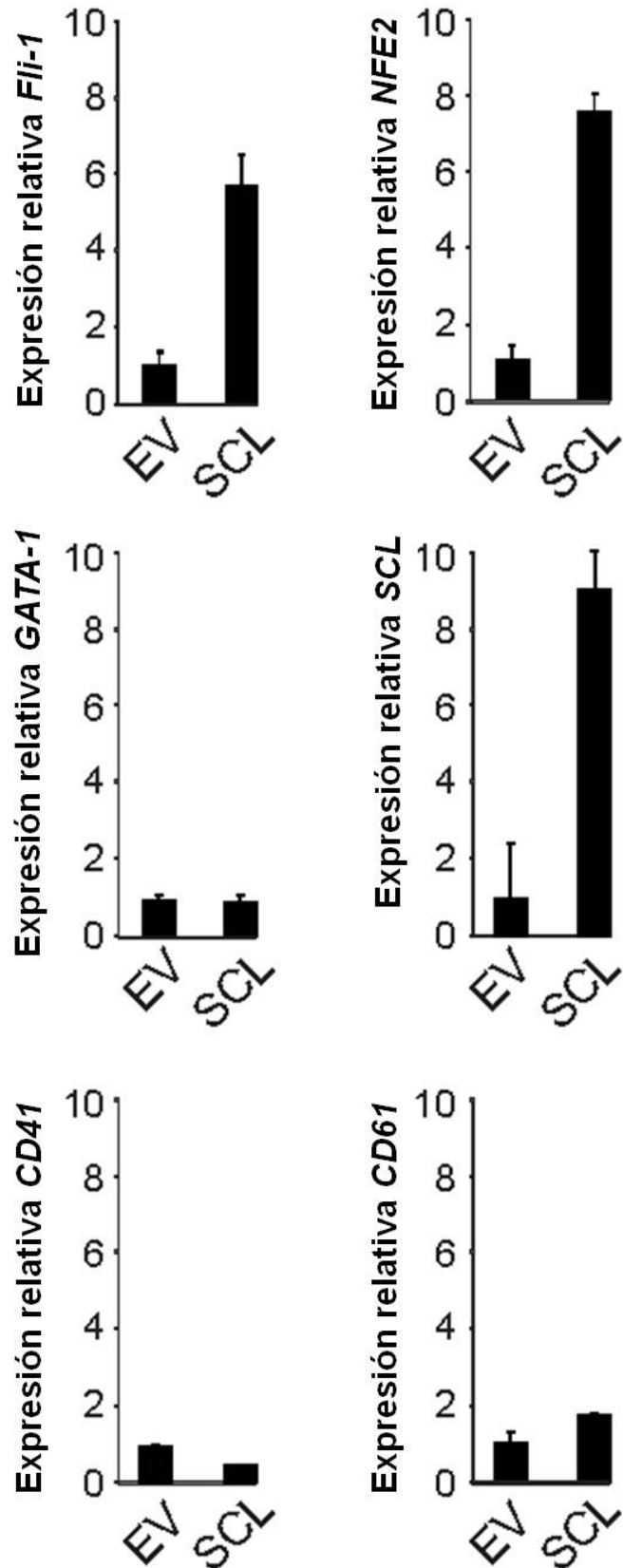


Fig. 2

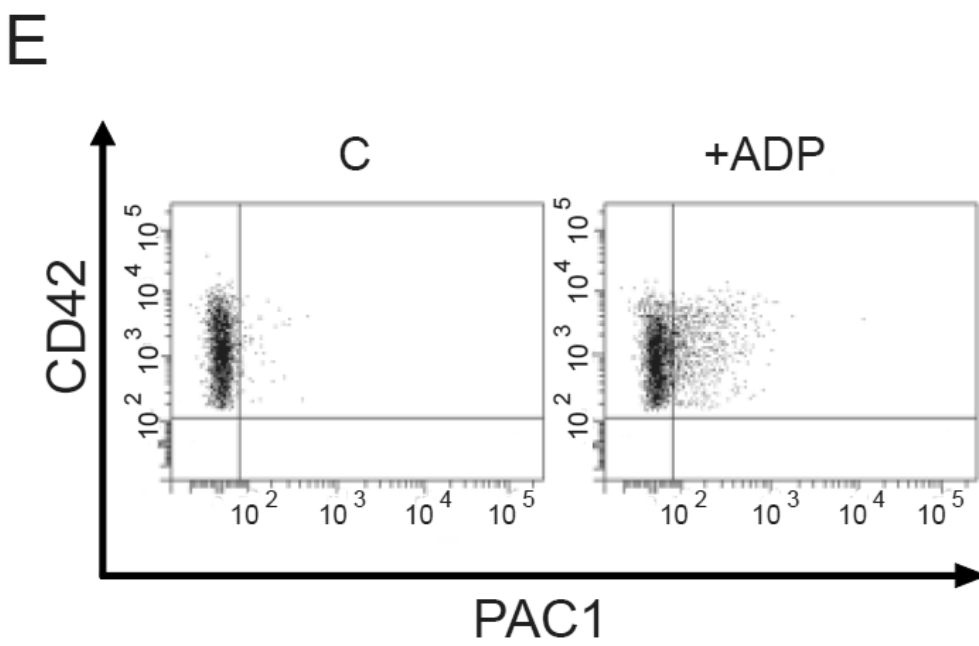
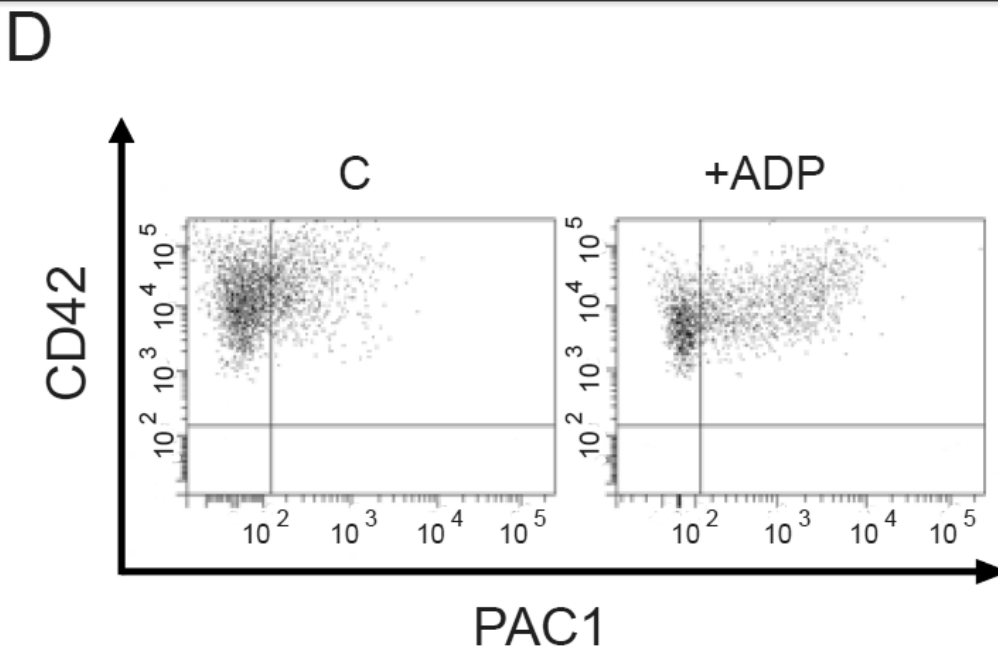
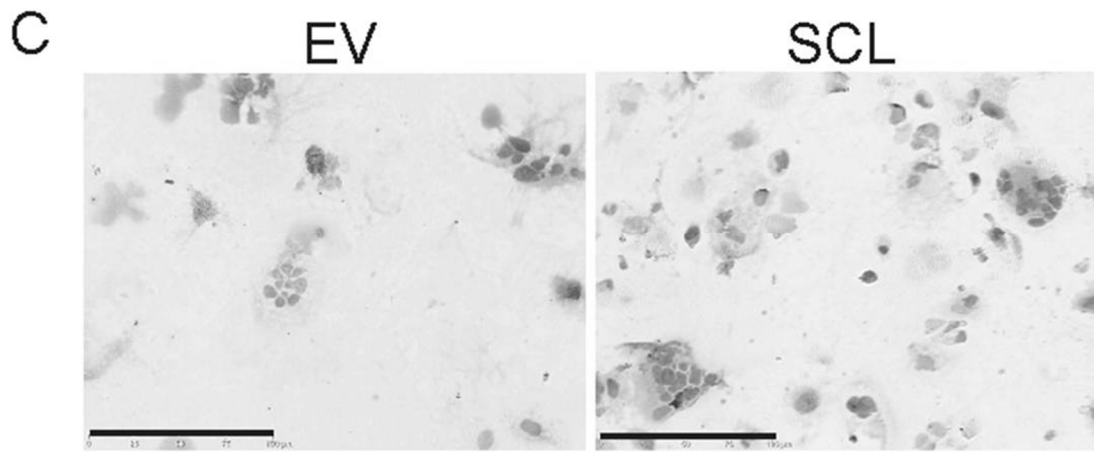


Fig. 3

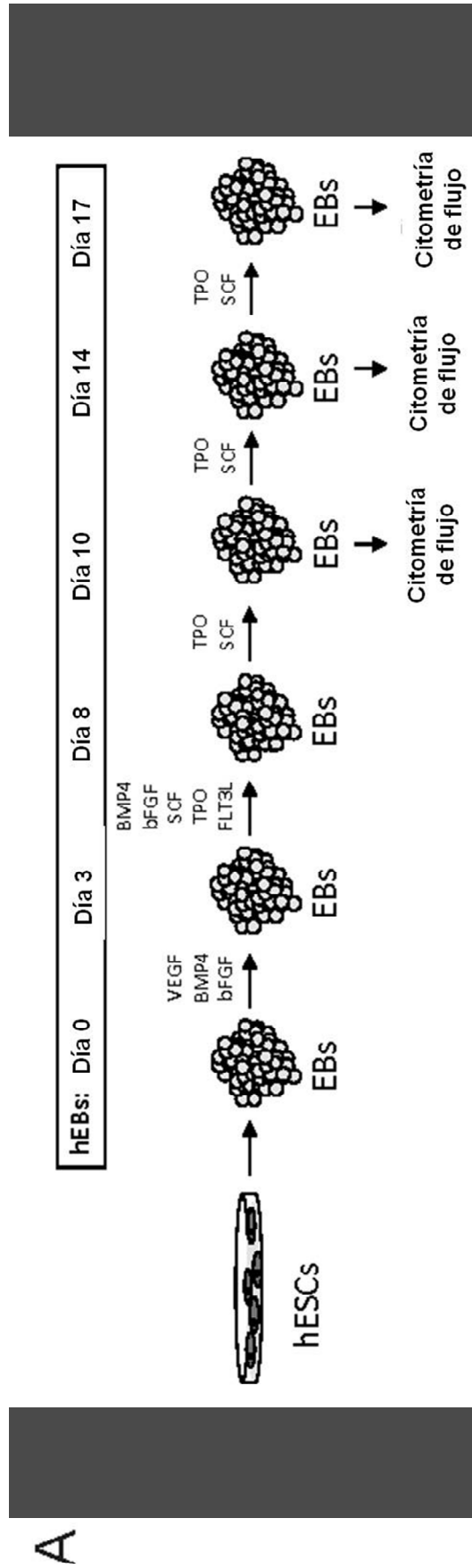




Fig. 3

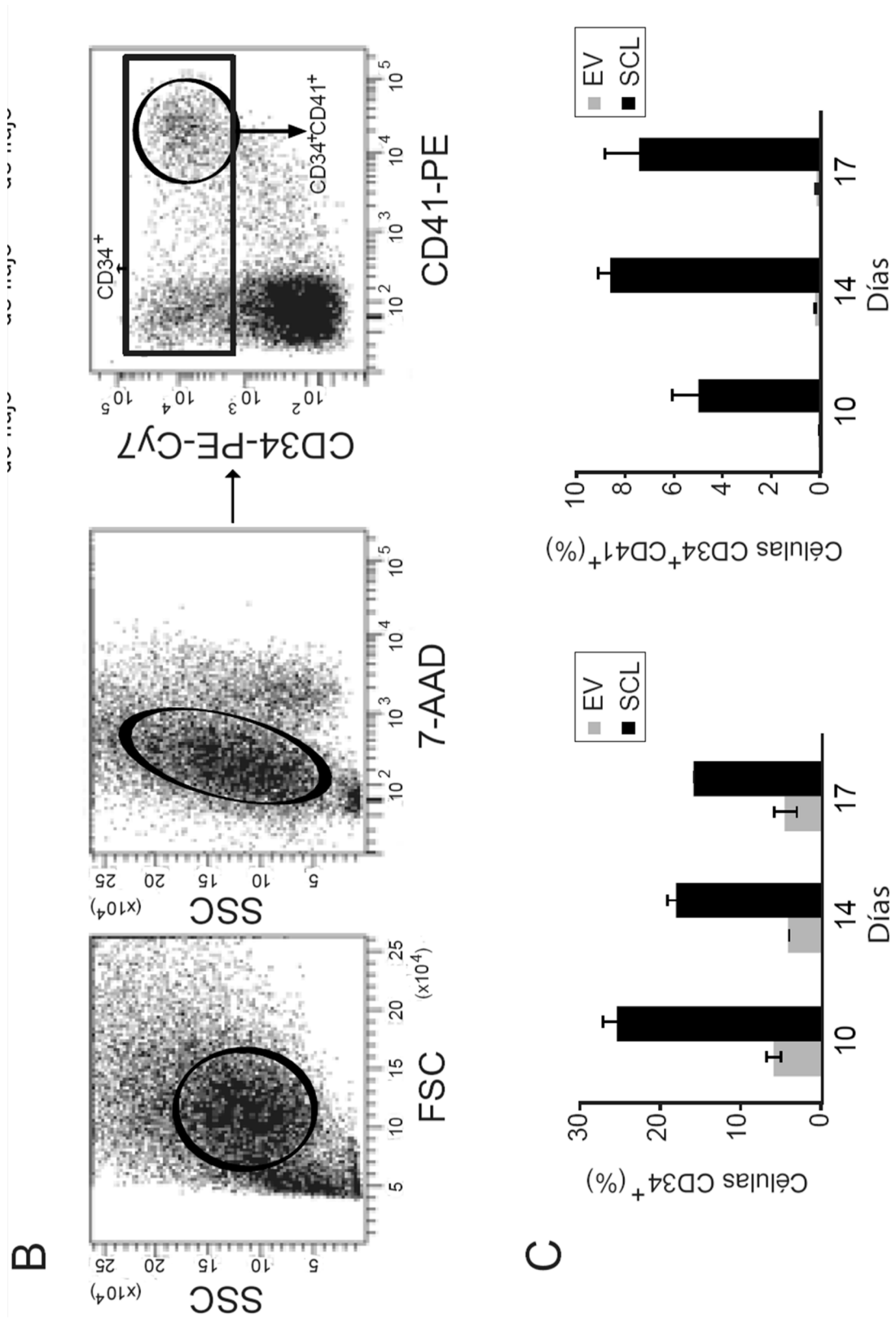


Fig. 3

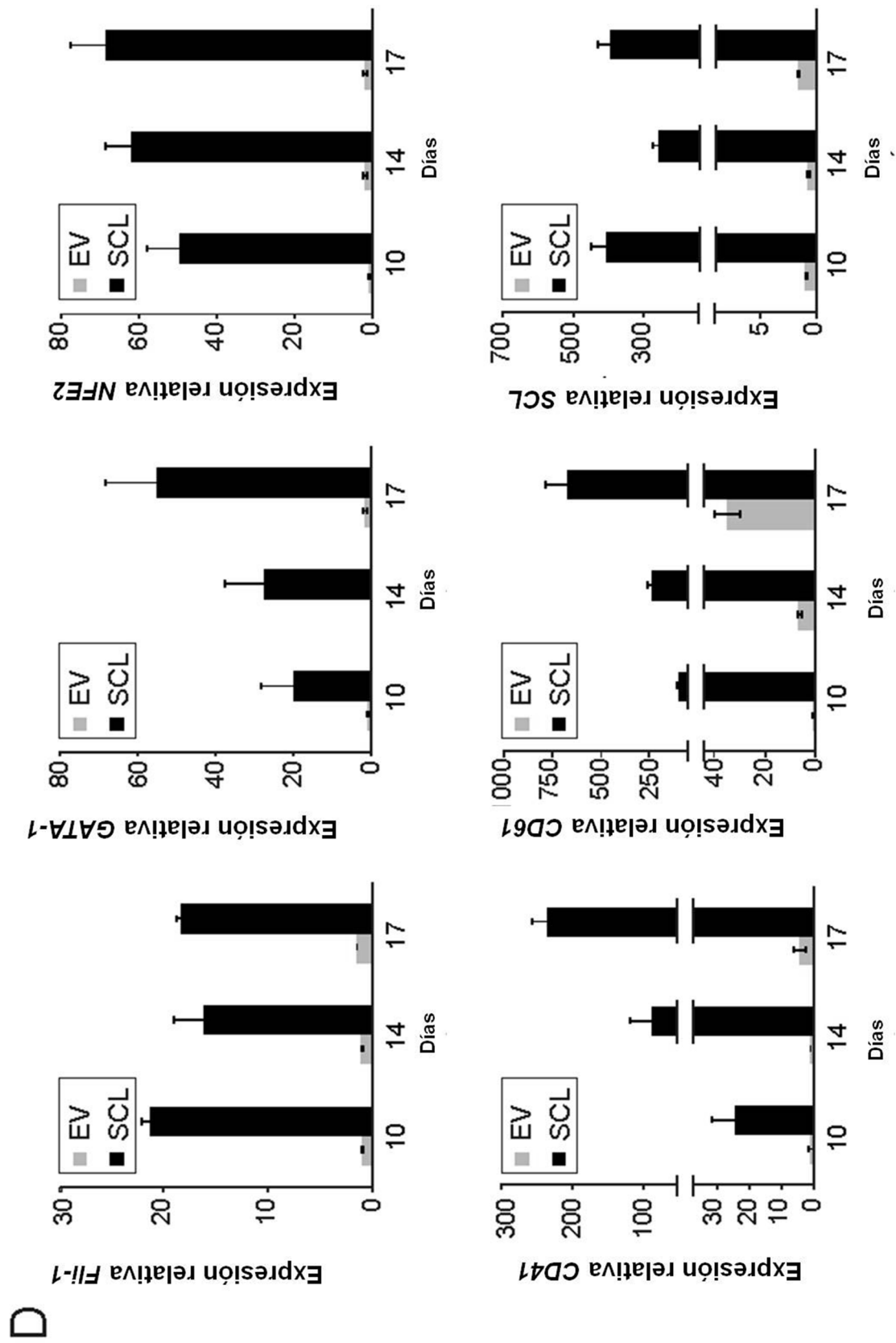


Fig. 4

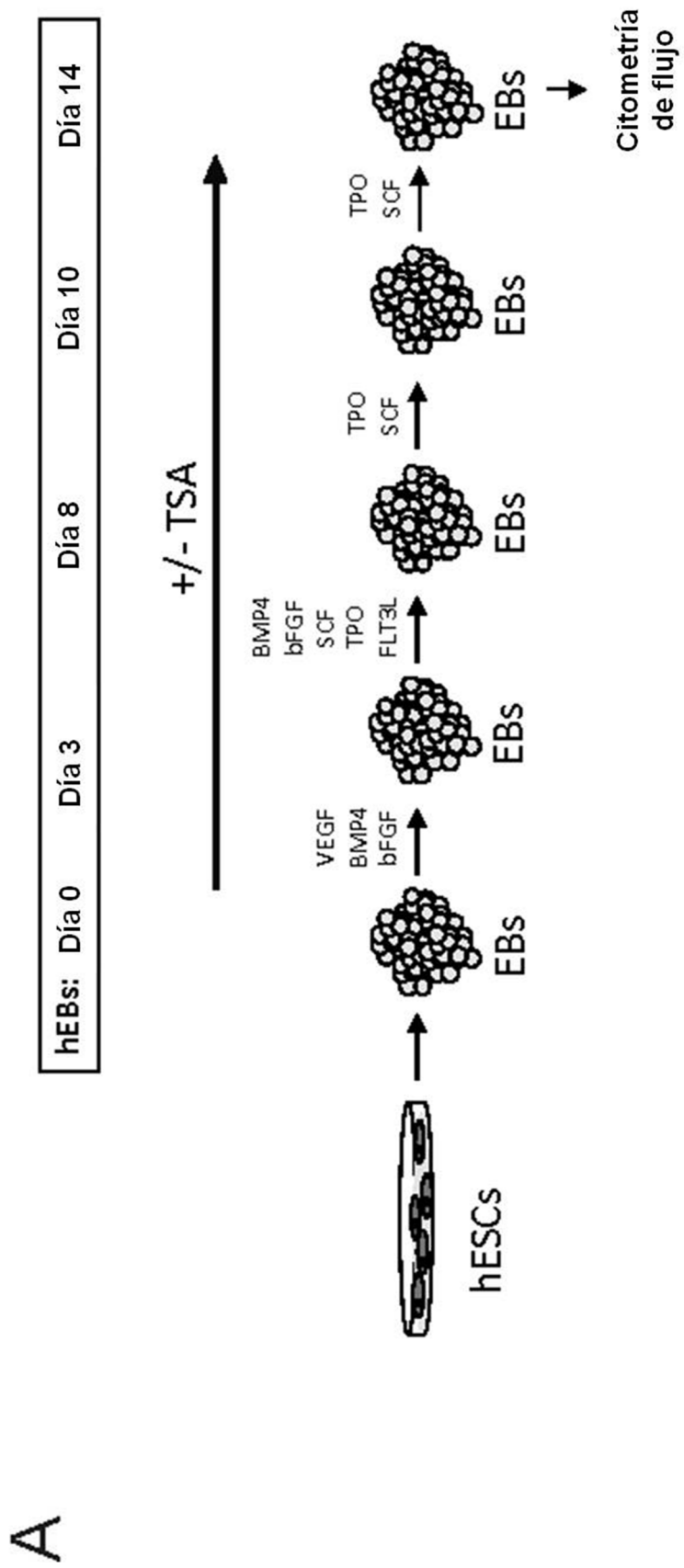
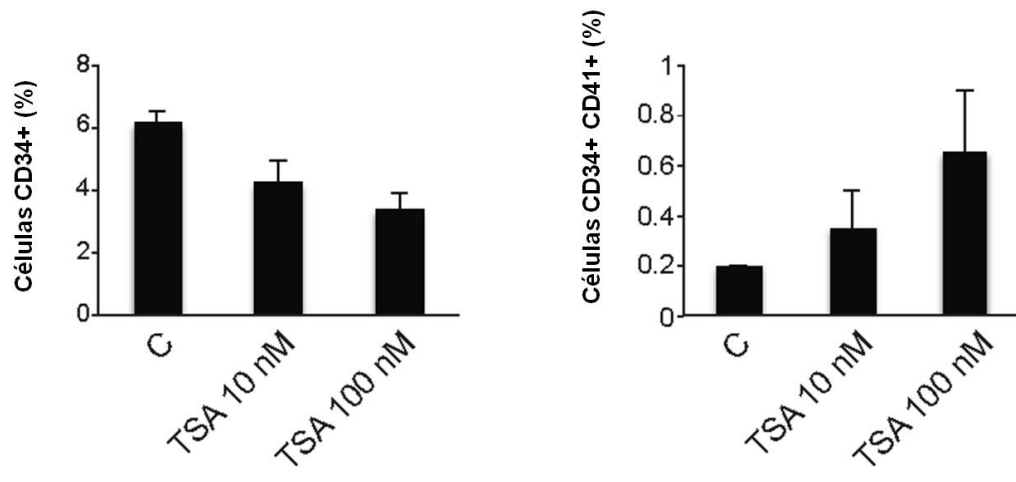


Fig. 4

B



# ES 2 536 605 A1

## Listado secuencias

<110> Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud  
<120> Método de obtención de megacariocitos y plaquetas  
<130> GENYO-13008  
<160> 16  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 5018  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
gcccgggact atcccttcgc ggtgtagcgg cagccggaga cctggctgag gaggcaaccg 60  
cgtagacacc tccctgctta gaaaacaaac actgaaccag accgatcca gttggagggt 120  
tcgaaaatgt tccagacagc ctgtcgggag gggttgttgt tgctgttgga ctaaatagct 180  
attcctgatt ggtcatgtat agggtttttt aaggcgggtg gggggaggag ggggtagagg 240  
aaaggctcca aacacctgca ggttgggggc ggaaagctgt ttgcgattcc ctggactggt 300  
tggtcgggga caggaggtaa ttcccagcca ttgacccca tttctctctc tccctccctc 360  
ttgccctgcc ttttctctc caccctatc tttctggaa actcgctttg ggcgcggcag 420  
atgcccagg accacaccgc agcgtactg caggcctctc agcgaaaaag ggggaaagca 480  
aagaccggg tgtgcatcct cttcctcggc ttccgccct tccggcgga gtggagatcc 540  
tattcagagg ggccggtctc tctaaatatg ccccaggatg accgagcggc cgccgagcga 600  
ggcggctcgc agtgaccccc agctagaggg acgggacgcg gccgaggcca gcatggcccc 660  
cccgcacctg gtctgctga acggcgtcgc caaggagacg agccgcgcgg ccgcagcggga 720  
gccccagtc atcgaactgg gcgcgcgcg aggccgggg ggcggccctg ccggtggggg 780  
cggcgccgcg agagacttaa agggccgcga cgcggcgacg gccgaagcgc gccatcgggt 840  
gcccaccacc gagctgtgca gacctcccgg gcccgccccg gccccgcgc ccgcctcggt 900  
tacagcggag ctgcccggcg acggccgat ggtgcagctg agtcctcccg cgctggctgc 960  
ccccgccgcc cccggccgcg cgctgctcta cagcctcagc cagccgctgg cctctctcgg 1020  
cagcgggttc tttggggagc cggatgcctt ccctatgttc accaccaaca atcgagtgaa 1080  
gaggagacct tccccctatg agatggagat tactgatggt ccccacacca aagttgtgcg 1140  
gcgtatcttc accaacagcc gggagcgatg gcggcagcag aatgtgaacg gggcctttgc 1200  
cgagctccgc aagctgatcc ccacacatcc cccggacaag aagctcagca agaatgagat 1260  
cctccgcctg gccatgaagt atatcaactt cttggccaag ctgctcaatg accaggagga 1320  
ggagggcacc cagcgggcca agactggcaa ggaccctgtg gtgggggctg gtgggggtgg 1380  
agtgggggga gggggcgcg cggccccaaga tgacctctg caagacgtgc tttccccaa 1440  
ctccagctgc ggcagctccc tggatggggc agccagcccc gacagctaca cggaggagcc 1500  
cgcgccc aaa cacacggccc gcagcctcca tctgcatg ctgcctgccg ccgatggagc 1560

ES 2 536 605 A1

cggccctcgg tgatgggtct gggccaccag gatcagccag gagggcgttc ttaggctgct 1620  
 gggatgggtg gcttcagggc aggtgggggtg agaattgggc ggctctgaag caagggcggtg 1680  
 gacttgaact ttcttgatg tctgaacttt gggaagcctt tactgaccct ggggctggct 1740  
 tttctgtttc ctgtaccagt aggagatcag aaaaatggag caaagtggta ggtacttttt 1800  
 gtgaagacgg cacggctctc cctcttcctc cagtcccaa tccttcccaa gtaagaggct 1860  
 ggagttgtca ctgcttttgg cctggagttt gggatccctg tctttcctaa gacctggggg 1920  
 tgtcagctct catctgaggc atccagcagt ctctgccttg ccttttagccc ctcccaagct 1980  
 ggctgggggtg gcctgtgtgg ccacttctgt ccatatztat aggtacccaa tagctgccca 2040  
 tttcgtgagc cccatcttca cccaggccta tgttgatcca tccagcttgc cagatgctgc 2100  
 agagtcaaaa gcctcgaggc gccttcttca gggcctgggt gaagaagatg atcagtggac 2160  
 agtctgctct agatgagctg ggccggaggg tcaggaacc cagtcgccct tacttcttgc 2220  
 cctggggatc aaagtctgc tttctccca atgagacttg ccttcctaag cctgtggctg 2280  
 tggagacaat gtctgcagcc ctgagaaagc cctgtcgggc tttgtgtgaa ggcagagaaa 2340  
 gggacaatga tagtagagt atagggagca agagatattt tgggcatgtg ggcttcaact 2400  
 cctcgacatc actgttcatg ctggcgagtg aatgccagtg tgctgatggg cgtacgctgg 2460  
 tgctgagtag atgcgcagcc ccactgtgac attctcctgg atgcttagag ggatttcttt 2520  
 gctgtaagat gtctgtttgc tgatggctg gtctatgttc cgaattgagc aaaaaacctg 2580  
 tcctatgaat gctttgcatt tggaaatfff gcttgacttc agttattggt ggaatcttta 2640  
 gcgctcaata ggaccaggat ccagcctcac ttctagggtg tgggaaatcc aatcagagac 2700  
 caggccctgg ctaagacca aacatatgca cttcactta gcagaacctt aaacaccctt 2760  
 cagttgtgca gcttttggct atcaaggggt cgtctgggag gttggtttaa tgcaatagaa 2820  
 gtgctcccct ctgaaagttg tacatgaaat ttttgtaaat cacatcctta tccttcatct 2880  
 tttaaagaaa taaccactgc aagtcctfff gtaaagtga gaatcctfff gtagaatgaa 2940  
 ccactgcccc ttcatgatt tcctgtgtca atccagatgg tgggatgtgg ttttcttaag 3000  
 gtgaggcctg tctgtgacct gcatctaagc ccatgggaca aattgcacag aagtcctgta 3060  
 tgtctgtcat tgtaccctta agtcacccta gccctctccc tctaggctct gccttcgagg 3120  
 tcagaggaga gatagcctgt ggccctgtcc tgccatgcaa gaactcatca ctgtggctgt 3180  
 ctggaaagcc ccccttata gtttgggctt cagcctagtg gcttgcctc accatgatgg 3240  
 ggccctaatt cagccatgta cagacagaga atatgtctgc tcctttcccc ttccttttaa 3300  
 gtaaggtcca attctcgagc ttggggcaac attgttcacc tttgtagcac tcaggctctc 3360  
 cattcaattt caggctcccc agatcatggt ttggtgaaaa ttagggttgg ttcctttcca 3420  
 acgtttggaa gatcctgtga ggagcccat ctgtctaaag atagagtcac tgctgtagga 3480  
 tctaaggctg tttgctcac cgtggattcg cttgagttag gaatgagaag tagccacagt 3540  
 atggatgggt ggatgggttt tatgagatgg atcacatatt ttattaagaa ctcaaacttc 3600

ES 2 536 605 A1

tggctccctc ttctttcaga cttgccatgt gactctggct tggcctatct cctagggcta 3660  
 tgggtgtggac tgaatgggat catgaaagta gacagttttg agaacgtaaa gaactttttc 3720  
 ttttccctca atctcaatcc tgcagtgggg tttcgcagcc tgagtccacg acctagggcag 3780  
 taggccggtg tgcctgactg cccagcattt gggtaattta gattgtaaac cgctttggcc 3840  
 tgagttattg agattgtcct cttttctcca gattatctat ttgtgtgtgt gtgtgtgtgt 3900  
 gtgtgagaga cgggtgtctg ttctgtcact caggctggag tacagtgggtg ccatcattgc 3960  
 tgtctgcagc cttgaactct gggctcaagc aatcctctca cctcagcctc ccgagttaggg 4020  
 aggaccacag gtgtgagcca ccacacctgg ctaattttta cttttttttt tttttggtag 4080  
 agatggagtc ttgctatatt gcccaggctg gtcttgaagt cctggcttca ggcaattctc 4140  
 ctgcctttgc ctccagaagc actgggatca cagggtgtcag ccattgcacc cagcccagat 4200  
 tgtcttaatt tctatcttgt tccaaggcca gggacagtaa taagaatgga aaagagatat 4260  
 gggaaactg gcagactgtg taaaatgtaa tgcaactacc caaaacaagc ctggtaggaa 4320  
 agggcaagtc tttaggtctt tgtaagaact aaagaagatc tgtaattttt attttcaccc 4380  
 tctgtacccc atgacctat ccttcctctc cttccttgtt acctatgaaa aactggcaac 4440  
 attccaagaa tagcatctgt acaaagggga aagaacataa aggtaaaaca aaacaaaaca 4500  
 acattttgag aacaaagatg accataacca ctgaagggaa tcacatcttt taagacaaat 4560  
 tcatattctt ttatttgta tggcagatga caagatggta caacctttat tcttttccaa 4620  
 aataaaaca agggcacagc atctgtagtc agccgacaac tatttcggcc ttttgggggt 4680  
 gggctctggcc gtacttgtga tttcgatggg acgtgacctt ctgctgaaga cttgccccct 4740  
 gcccggtgtac atagtgcatt gtttctgtgg gcgggcccag cactttccgt caacgttgta 4800  
 ctgtatgtga tgaattgcgt tggctctctg atttttctgc agaagaggag taaccgctcc 4860  
 aggtaccttg acctttgtac agcccagagg ccaacactgt ggggtgtgtga ctcttttagca 4920  
 aaaaaaacc atgtgggtgat gatgtgtata tatatgtgag gatgtatcgg gaagatttct 4980  
 aaataaaagt tttacaaagg ggaaaaaaaa aaaaaaaa 5018

<210> 2  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Glu Arg Pro Pro Ser Glu Ala Ala Arg Ser Asp Pro Gln Leu  
 1 5 10 15

Glu Gly Arg Asp Ala Ala Glu Ala Ser Met Ala Pro Pro His Leu Val  
 20 25 30

Leu Leu Asn Gly Val Ala Lys Glu Thr Ser Arg Ala Ala Ala Ala Glu  
 35 40 45

Pro Pro Val Ile Glu Leu Gly Ala Arg Gly Gly Pro Gly Gly Gly Pro





<210> 3  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer GAPDH Fw  
  
 <400> 3  
 gaaggatgaag gtcggagt 18

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer GAPDH RV  
  
 <400> 4  
 gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer CD41 Fw  
  
 <400> 5  
 tgagccgcat ttacgtggaa a 21

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer CD41 RV  
  
 <400> 6  
 cttcacagta acgcttgccc c 21

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer CD61 Fw  
  
 <400> 7  
 gtgacctgaa ggagaatctg c 21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> primer CD61 RV

ES 2 536 605 A1

<400> 8  
tcactcactg ggaactcgat g 21

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer FLI-1 Fw

<400> 9  
ccaacgagag gagagtcac g 21

<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer FLI-1 RV

<400> 10  
ttccgtgtg tagagggtg t 21

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer GATA1 Fw

<400> 11  
tcactccctg tcccgaatag 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer GATA1 RV

<400> 12  
ggagagttcc acgaagcttg 20

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer NEF2 Fw

<400> 13  
gcaggaacag ggtgatacag c 21

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

ES 2 536 605 A1

<220>  
<223> primer NEF2 Rv  
<400> 14  
gagcaggggc agtaagttgt 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer SCL Fw  
<400> 15  
ggatgccttc cctatgttca 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer SCL Rv  
<400> 16  
ggtgtggga ccatcagtaa 20