

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 262**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2012 PCT/JP2012/062217**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12157586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 12785650 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2708597**

54 Título: **Célula megacariocítica polinucleada y método para la elaboración de plaquetas**

30 Prioridad:

**13.05.2011 JP 2011108253**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)  
3-1, Hongo 7-chome  
Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8654, JP**

72 Inventor/es:

**ETO, KOJI;  
NAKAUCHI, HIROMITSU;  
TAKAYAMA, NAOYA y  
NAKAMURA, SOU**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 659 262 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Célula megacariocítica polinucleada y método para la elaboración de plaquetas

Campo técnico

5 **[0001]** La presente invención hace referencia a un método para poliploidizar megacariocitos de forma eficiente antes de la poliploidización, un método para la producción de plaquetas a partir de dichos megacariocitos y similares.

Estado de la técnica

10 **[0002]** Para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la sangre o tratamientos quirúrgicos, se necesitan grandes cantidades de glóbulos. Entre los glóbulos, una plaqueta, que es una célula indispensable para la coagulación sanguínea y la hemostasia, constituye uno de los glóbulos especialmente importantes. La plaqueta tiene una gran demanda para la leucemia, el trasplante de médula ósea, el tratamiento contra el cáncer y similares, por lo que existe una gran necesidad de tener un suministro estable. Hasta ahora, la plaqueta se ha suministrado de manera estable, así como un método que consiste en recogerla de la sangre que donan los donantes, un método que consiste en administrar un fármaco que tiene una estructura similar a TPO (mimética),  
15 un método que consiste en diferenciar megacariocitos de la sangre de cordón umbilical o las células de la médula ósea, o métodos similares. Recientemente, se ha desarrollado una tecnología consistente en inducir una diferenciación *in vitro* de células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés) o células iPS para preparar glóbulos, tales como plaquetas.

20 **[0003]** Los presentes inventores han establecido una tecnología consistente en inducir una diferenciación de megacariocitos y plaquetas de células madre embrionarias y han demostrado la eficacia de las células madre embrionarias como fuente de plaquetas (Documento de patente 1 y Documento no patente 1). Asimismo, los presentes inventores han establecido un método para la preparación de megacariocitos y plaquetas de células iPS y han permitido resolver el problema de la compatibilidad de un antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) que se producía, de manera inevitable, en la transfusión de plaquetas obtenidas de células madre embrionarias (Documento de patente 2).  
25

**[0004]** Además, con el fin de superar el problema relativo a la cantidad de plaquetas, entre otros, preparadas a partir de células madre, los presentes inventores han descubierto un método consistente en establecer y, de esta manera, preparar una línea celular progenitora de megacariocitos inmortalizados a partir de las células madre y, por lo tanto, han desarrollado una tecnología importante para la preparación *in vitro* de una gran cantidad de plaquetas y similares (Documento de patente 3).  
30

**[0005]** *In vivo*, los megacariocitos forman una formación pseudopodial denominada proplaquetas (progenitores de plaquetas), fraccionan su citoplasma y liberan plaquetas. Se cree que la poliploidización de megacariocitos se produce mediante endomitosis hasta que liberan plaquetas. La endomitosis de los megacariocitos es mitosis multipolar no acompañada de formación de surcos de escisión y extensión de husos y se produce por la cariocinesis anormal y la mitosis del citoplasma. Como resultado de la endomitosis, se forman células que contienen diversos núcleos segmentados. La poliploidización de megacariocitos se induce mediante la repetición de dicha endomitosis.  
35

**[0006]** Hasta ahora, se han dado a conocer muchos resultados de estudios sobre la poliploidización de megacariocitos. Lodier, *et al.* han elucidado (Documento no patente 1) que, en la endomitosis de megacariocitos, no se ha reconocido la localización de la célula no muscular miosina II en un anillo contráctil a pesar de la formación de surco de escisión y se producen defectos en la formación del anillo contráctil y la extensión de husos. Se ha demostrado que dichas anomalías en el anillo contráctil o en la extensión de husos son más notables mediante la inhibición de actividades de RhoA y Rock (Documento no patente 2). RhoA se acumula en el surco de escisión y estimula la activación de algunos factores efectores, incluida la Rho quinasa (Rock), la citrón quinasa, la LIM quinasa y mDia/forminas. Estos resultados indican que mediante la inhibición de las actividades de factores tales como RhoA y Rock, implicados en la formación de un anillo contráctil, se estimula la endomitosis de megacariocitos. También se ha dado a conocer que cuando se refuerza una señal Rho ubicada en dirección 3' de alfa2/beta1 integrina, se inhibe la formación de proplaquetas de los megacariocitos inmaduros antes de la poliploidización.  
40  
45

50 **[0007]** Se ha dado a conocer que el ácido transretinoico (ATRA), factor de transcripción, y el ácido valproico, que se conoce como inhibidor de la histona deacetilasa, están implicados en la diferenciación de megacariocitos. Schweinfurth, *et al.* han descubierto que el tratamiento de megacariocitos inmaduros con ácido transretinoico o ácido valproico estimula la poliploidización (Documento no patente 3). Asimismo, se da a conocer que la poliploidización de megacariocitos se estimula cuando p53, producto génico que suprime el cáncer, se reduce (Documento no patente 4). Zhang *et al.* (Haematologica 2004; 89(10)) expone que bcl-XL se regula  
55

negativamente de manera temprana durante la diferenciación *in vitro* de megacariocitos de pacientes con trombocitemia esencial.

5 **[0008]** Sanz *et al.* (Exp. Haematol., 29(6), junio 2001, 728-735) expone que BCL-XL se expresó claramente durante los primeros 15 días de cultivo de CD41+ células megacariocíticas y que la expresión reducida de BCL-XL el día 20 de cultivo vino acompañada de un incremento de la cantidad de células apoptóticas.

**[0009]** Terui *et al.* (Exp. Haematol., 26(3), marzo 1998, 236-244) expone que BCL-XL se expresó claramente en líneas celulares con propiedades megacariocíticas, así como que la cantidad de BCL-XL aumentó 10 veces cuando las líneas celulares K562 se diferenciaron específicamente en linaje megacariocítico.

10 **[0010]** Zhao *et al.* (Thrombosis Research, 127, febrero 2011, 122-130) expone que los megacariocitos carentes de función *Per2* presentaban una ploidía creciente y mostraban una expresión considerablemente aumentada de BCL-XL, así como que el índice de formación de proplaquetas disminuyó.

**[0011]** Takayama *et al.* (J. Exp. Med., 207(13), noviembre 2010, 2817-2830) expone que la expresión sostenida y excesiva de c-MYC en megacariocitos vino acompañada de la producción deficiente de plaquetas funcionales.

15 **[0012]** También se ha demostrado que como factor que puede influir en un procedimiento de diferenciación de megacariocitos, el cultivo de megacariocitos inmaduros a 39 °C, una temperatura superior a la temperatura de cultivo convencional, estimula la inducción a megacariocitos maduros poliploidizados y la formación de proplaquetas (Documento no patente 5).

Lista de citas

Documentos de patente

20 **[0013]**

Documento de patente 1: WO2008/041370  
Documento de patente 2: WO2009/122747  
Documento de patente 3: WO2011/034073

Documentos no patente

25 **[0014]**

Documento no patente 1: Takayama, *et al.*, Blood, 111: 5298-5306 2008  
Documento no patente 2: Lordier, *et al.*, Blood, 112: 3164-3174 2009  
Documento no patente 3: Schweinfurth, *et al.*, Platelets, 21: 648-657 2010  
Documento no patente 4: Fuhrken, *et al.*, J. Biol. Chem., 283: 15589-15600 2008  
30 Documento no patente 5: Proulx *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 88: 675-680 2004

Sumario de la invención

Problema que ha de solucionar la invención

35 **[0015]** Teniendo en cuenta que la cantidad de plaquetas funcionales (plaquetas que presentan actividades *in vivo*, por ejemplo, acción hemostática y caracterizadas como CD42b+) disponibles de megacariocitos cuya "poliploidización" no se ha desarrollado suficientemente, es demasiado pequeña como para desarrollar una aplicación clínica, los presentes inventores pensaron que debería estimularse la poliploidización de megacariocitos con el fin de producir de forma eficiente plaquetas funcionales *in vitro*.

40 **[0016]** Por consiguiente, un objeto de la presente invención consiste en dar a conocer un método de estimulación de la poliploidización de megacariocitos y, de esta manera, la preparación de más megacariocitos poliploidizados, un método de producción eficiente de plaquetas a partir de megacariocitos poliploidizados y similares.

Medios para solucionar el problema

45 **[0017]** Con el problema anterior en mente, los presentes inventores trataron de estimular la poliploidización de megacariocitos que se han preparado a partir de células madre pluripotentes (células madre embrionarias, células iPS y similares) y cuya poliploidización no se ha desarrollado suficientemente. En primer lugar, los presentes inventores realizaron esta prueba con la línea celular progenitora de megacariocitos inmortalizados (véase el Documento de patente 3) preparados a partir de células madre pluripotentes desarrolladas por ellos mismos. Esta línea celular progenitora de megacariocitos inmortalizados es la que se distribuye con potencial proliferativo mejorado y se establece (inmortaliza) mediante la inducción de la expresión de un oncogén, tal como  
50 MYC o un gen tal como BMI1 en las células progenitoras de megacariocitos obtenidas de células madre pluripotentes.

**[0018]** Con el fin de estimular la poliploidización con esta línea celular progenitora de megacariocitos inmortalizados, los presentes inventores han tenido éxito en la estimulación eficiente de la poliploidización forzando la expresión de un gen supresor de apoptosis cuando se lleva a cabo la supresión de la expresión de un oncogén y un gen polycomb.

5 **[0019]** Los presentes inventores también han confirmado que, al igual que la expresión forzada de un gen supresor de apoptosis, la inhibición de la expresión o función de un producto génico p53 también hace que aumente la eficacia de la poliploidización. Asimismo, han confirmado que la sumisión de la línea celular progenitora de megacariocitos a tratamiento con un inhibidor ROCK (doble espiral asociada a Rho que forma quinasa/quinasa asociada a Rho) o un inhibidor HADC, a un cultivo a 39 °C y similares, también es eficaz para  
10 inducir la poliploidización. Además, se ha descubierto que el tratamiento con un inhibidor de función de complejo de actomiosina (complejo de actina y miosina) estimula la poliploidización enormemente.

**[0020]** Se ha descubierto que los megacariocitos altamente poliploidizados producidos por la presente invención contienen megacariocitos de 4N u 8N o mayores en una proporción mayor que la de los conocidos y, al mismo tiempo, contienen dichas células en una proporción mucho mayor que la de los megacariocitos maduros  
15 producidos *in vivo*.

**[0021]** Asimismo, los presentes inventores han descubierto que en los megacariocitos maduros suficientemente poliploidizados, la cantidad de plaquetas producidas a partir de un megacariocito muestra un incremento radical mediante la supresión de la expresión forzada de un gen supresor de apoptosis. Además, se ha confirmado que la eficacia de producción de plaquetas también puede aumentarse mediante el cultivo en un medio al que se le  
20 añade un inhibidor ROCK. Después de estudiar las condiciones óptimas para el periodo de cultivo, la temperatura de cultivo y similares, han llevado a cabo la presente invención.

La presente invención hace referencia a:

**[0022]**

25 [1] un método de producción de megacariocitos poliploidizados, que incluye una etapa de obtención de los megacariocitos forzando la expresión de oncogén seleccionado de la familia de genes MYC y BMI1, en células en cualquier fase de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en megacariocitos antes , forzando la expresión de BCL-XL en megacariocitos antes de la poliploidización y cultivar y proliferar las células resultantes, preferiblemente donde un gen c-MYC se utiliza como oncogén;

30 [2] el método descrito anteriormente en [1], donde en la etapa de cultivo, se inhibe la expresión o función de un producto génico p53;

[3] el método descrito anteriormente en [1] o [2], donde en la etapa de cultivo, se somete a los megacariocitos antes de la poliploidización a al menos uno de los siguientes (a) a (c):

(a) tratamiento con un inhibidor de función de complejo de actomiosina;

(b) tratamiento con un inhibidor ROCK; y

35 (c) tratamiento con un inhibidor HDAC;

preferiblemente donde el inhibidor ROCK es Y27632; el inhibidor HDAC es ácido valproico; y el inhibidor de función de complejo de actomiosina es blebbistatin;

40 [4] el método descrito anteriormente en cualquiera de [1] a [3], donde la etapa de cultivo se lleva a cabo a una temperatura superior a 37° C;

[5] el método descrito anteriormente en cualquiera de [1] a [4], donde las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen a partir de células seleccionadas del grupo que consiste en células iPS, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas derivadas de la sangre de cordón umbilical, sangre de médula ósea o sangre periférica y células madre hematopoyéticas;

45 [6] el método descrito anteriormente en cualquiera de [1] a [4], que también comprende la etapa de supresión de la expresión forzada de BCL-XL.

[7] un método de producción de una plaqueta, que incluye:

una etapa de obtención de megacariocitos poliploidizados mediante la utilización del método descrito anteriormente en cualquiera de [1] a [6] y de cultivo de las células; y

50 una etapa de recolección de una plaqueta del cultivo de los megacariocitos poliploidizados;

donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo al tiempo que se suprime la expresión de BCL-XL que se ha expresado de forma forzada o después de que se elimine BCL-XL de las células;

[8] el método descrito anteriormente en [7], donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo en ausencia de un suero y/o en ausencia de una célula alimentadora;

55 [9] el método descrito anteriormente en [7] u [8], donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo entre un día y 15 días;

[10] el método anteriormente en cualquiera de [7] a [9], donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo a 37 °C;

[11] el método descrito anteriormente en cualquiera de [7] a [9], donde en la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados, se añade un inhibidor ROCK y/o un inhibidor de función de complejo de actomiosina a un medio;

preferiblemente donde el inhibidor ROCK es Y27632 y el inhibidor de función de complejo de actomiosina es blebbistatin.

En la presente memoria, también se da a conocer una plaqueta producida mediante el método descrito en cualquiera de [7] a [11]; y

un producto sanguíneo que contiene la plaqueta descrita anteriormente.

#### Efecto de la invención

**[0023]** La presente invención posibilita la estimulación artificial de la poliploidización de megacariocitos. En particular, la presente invención también es eficaz para la estimulación de la poliploidización de megacariocitos preparados *in vitro* como se indica anteriormente, y la invención posibilita el suministro de megacariocitos (por ejemplo, una población de megacariocitos que presenta megacariocitos de 4N o mayores en una proporción elevada) cuyo nivel de poliploidización se ha desarrollado más que los megacariocitos disponibles *in vivo*.

**[0024]** Asimismo, la presente invención posibilita el incremento notable del número de plaquetas producidas por megacariocito poliploidizado.

**[0025]** Por lo tanto, se hace posible disminuir radicalmente el tiempo necesario para producir plaquetas de células madre y, entonces, llevar a cabo la producción masiva de las plaquetas mediante inducción de megacariocitos antes de la poliploidización de las células madre, proliferación de los megacariocitos antes de la poliploidización mediante la utilización, por ejemplo, del método descrito en el Documento de patente 3, y poliploidización de los megacariocitos antes de la poliploidización para producir plaquetas de acuerdo con el método de la presente invención. Las plaquetas obtenidas según se describe anteriormente son CD42b positivas y contribuyen ampliamente a la aplicación clínica.

#### Breve descripción de los dibujos

##### **[0026]**

[FIG. 1A] Se muestra el esquema de un ensayo llevado a cabo para analizar la dependencia de citoquina de la proliferación de iMKPC-tipo I.

[FIG. 1B] Se muestra un cambio en la cantidad de células cuando se cultivó iMKPC-tipo I en medios a los que se había añadido SCF y TPO (S+T), SCF y EPO (S+E), SCF (S), TPO (T) y EPO (E), respectivamente, de acuerdo con el plan que se muestra en la figura 1A.

[FIG. 1C] Se muestran histogramas de citometría de flujo de la expresión de un marcador de superficie de iMKPC-tipo I el día 8 del plan que se muestra en la figura 1A.

[FIG. 1D] Se muestran los resultados de forzar la expresión de c-MYC y BMI1 con células CD34 positivas derivadas de la sangre de cordón umbilical y de estimular la proliferación de megacariocitos antes de la poliploidización.

[FIG. 2A] Se muestran los resultados del análisis de la influencia de citoquina en la proliferación de iMKPC-tipo II.

[FIG. 2B] Se muestran los resultados del análisis de la expresión de CD41a y CD42b en iMKPC-tipo II.

[FIG. 3] Se muestran las observaciones microscópicas de la poliploidización de iMKPC-tipo II cuando se llevó a cabo la expresión forzada de BCL-XL y la supresión de la expresión de un gen p53, y de la poliploidización cuando se añadió blebbistatin al medio.

[FIG. 4] Se muestran las observaciones microscópicas del análisis de la influencia de BCL-XL en la proliferación de iMKPC-tipo II.

[FIG. 5] Influencia de un inhibidor ROCK en la poliploidización de megacariocitos. Después de que se suprimiera la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos (mediante cultivo en presencia de doxiciclina y en ausencia de estradiol), se añadió un inhibidor ROCK (Y27632) (10 µM). Tras cultivo durante 7 días, se analizó el grado de poliploidización. A muestra histogramas de citometría de flujo de células (vehículo) a las que no se había añadido inhibidor ROCK y de células (Rock i) a las que se había añadido el inhibidor, donde estas células se tiñeron con Hoechst, colorante nuclear, a continuación CD41a, marcador de megacariocitos, se tiñó con un anticuerpo antiCD41a. B es un gráfico en el que se muestran los resultados de A.

[FIG. 6] Resultados del análisis del nivel de expresión de un gen implicado en la maduración de megacariocitos en cultivo a 39 °C. Después de suprimirse la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos, se cultivaron las células resultantes a 39 °C durante 5 días. Se analizó el nivel de expresión de un grupo de genes (GATA1 (A), PF4 (B), NFE2 (C) y β-tubulina (D)) indispensable para la maduración de megacariocitos mediante PCR cuantitativa (q-PCR, por sus siglas en inglés). El nivel de expresión que se muestra en estos gráficos es una proporción con respecto al nivel de expresión de GAPDH.

[FIG. 7] Resultados del análisis de la influencia de BCL-XL, uno de los genes supresores de apoptosis, en la poliploidización de megacariocitos. El grado de poliploidización se analizó después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos, la inducción de la expresión de BCL-XL en presencia de un inhibidor ROCK (10  $\mu$ M) y el cultivo de las células resultantes durante 7 días. A muestra los histogramas de citometría de flujo de cada una de las células expresadas MYC/BMI1 (gráfico izquierdo), de las células tratadas con un inhibidor ROCK después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1 (gráfico central), y de las células sometidas a expresión de BCL-XL además de la supresión de la expresión de MYC/BMI1 y el tratamiento con un inhibidor ROCK (gráfico derecho), donde estas células se tiñeron con un colorante nuclear, Hoechst y, a continuación, CD41a, marcador de megacariocitos, se tiñó con un anticuerpo antiCD41a. B es un gráfico en el que se muestran los resultados de A. C incluye micrografías de células que tienen un núcleo de 2N, 4N, 8N y 8N o superior.

[FIG. 8] Curva de crecimiento de células BCL-XL expresadas. Se muestran los resultados de un cambio en la cantidad de células BCL-XL expresadas (CD41a+) (■) y la cantidad de células no expresadas (CD41a+) (▲) como una función de los días de cultivo al tiempo que se suprime la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos en presencia de un inhibidor ROCK (10  $\mu$ M).

[FIG. 9] Influencia de la reducción de p53 en la poliploidización. Se analizó el grado de poliploidización de CD41a+ mediante la supresión de la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos, la inducción de BCL-XL en presencia de un inhibidor ROCK (10  $\mu$ M), la reducción de un gen p53 y, a continuación, el cultivo de las células resultantes a 39 °C durante 7 días. A muestra los histogramas de citometría de flujo de cada una de las células control (control) en las que p53 no se había reducido y de las células (SiP53) en las que p53 se había reducido, donde estas células se tiñeron con un colorante nuclear Hoechst y, a continuación, CD41a, marcador de megacariocitos, se tiñó con un anticuerpo antiCD41a. B es un gráfico en el que se muestran los resultados de A.

[FIG. 10] Influencia de tratamiento con ácido valproico en la poliploidización. Se analizó el grado de poliploidización de las células CD41a+ después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos, la inducción de la expresión de BCL-XL en presencia de un inhibidor ROCK (10  $\mu$ M), la reducción de un gen p53, el tratamiento de las células resultantes con ácido valproico (0,5 mM) y el cultivo a 39 °C durante 7 días. A muestra los histogramas de citometría de flujo de cada una de las células (Si P53) no tratadas con ácido valproico y de las células (SiP53 VLP) tratadas con ácido valproico, donde estas células se tiñeron con un colorante nuclear Hoechst y, a continuación, CD41a, marcador de megacariocitos, se tiñó con un anticuerpo antiCD41a. B es un gráfico en el que se muestran los resultados de A.

[FIG. 11] Influencia de un inhibidor de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina (inhibidor de función de complejo de actomiosina) en la poliploidización de megacariocitos. Se analizó el grado de polimerización después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos (mediante cultivo en presencia de doxiciclina y en ausencia de estradiol), la adición de blebbistatin (10  $\mu$ g/ml), inhibidor de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina y el cultivo durante 7 días. A muestra histogramas de citometría de flujo de células (-) a las que no se había añadido blebbistatin y de células (+) a las que se había añadido blebbistatin (10  $\mu$ g/ml), donde estas células se tiñeron con un colorante nuclear Hoechst y, a continuación, CD41a, marcador de megacariocitos, se tiñó con un anticuerpo antiCD41a. B es un gráfico en el que se muestran los resultados de A.

[FIG. 12] Influencia, en la poliploidización de megacariocitos, del tratamiento con blebbistatin utilizado en combinación con los otros tratamientos. Se analizó el grado de poliploidización de las células CD41a+ después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos, la inducción de la expresión de BCL-XL en presencia de Y27632 (10  $\mu$ M) y ácido valproico (0,5 mM), la reducción de un gen p53, la adición de blebbistatin (10  $\mu$ g/ml) y el cultivo a 39 °C durante 7 días. A muestra los histogramas de citometría de flujo de cada una de las células (-) no tratadas con blebbistatin y de las células (+) tratadas con blebbistatin, donde estas células se tiñeron con un colorante nuclear, Hoechst y, a continuación, CD41a, marcador de megacariocitos, se tiñó con un anticuerpo antiCD41a. B es un gráfico en el que se muestran los resultados de A.

[FIG. 13] Curva de crecimiento de células sometidas a tratamiento con blebbistatin en combinación con los otros tratamientos. Se hizo un gráfico (A) de un cambio en la cantidad de las células siguientes como una función de los días de cultivo: células (CD41a+) tratadas con blebbistatin (CD41a+) (▲) y células (CD41a+) no tratadas con blebbistatin (■); cada una después de que se suprimiera la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos, se expresó BCL-XL en presencia de Y27632 (10  $\mu$ M) y ácido valproico (0,5 mM) y se redujo un gen p53. En B, se muestran las micrografías de estas células.

[FIG. 14] Se muestran los resultados del análisis de la expresión de CD41a y CD42b en megacariocitos y plaquetas en ambos casos, donde se suprimió la expresión de BCL-XL y donde no se suprimió durante una fase de liberación de plaquetas.

[FIG. 15] Se muestran recuentos de células medidos al mismo tiempo de ON/OFF de la expresión de BCL-XL a partir de los resultados de la figura 14. A muestra la cantidad de plaquetas CD42b positivas, B muestra la cantidad de megacariocitos CD41a positivos/CD42b positivos y C muestra la cantidad de megacariocitos CD41a positivos.

[FIG. 16] Se muestran los resultados del análisis de la influencia de temperaturas de cultivo establecidas a 35 °C, 37 °C y 39 °C en la cantidad de plaquetas en ambos casos, donde se suprimió la expresión de BCL-XL y donde no se suprimió durante una fase de liberación de plaquetas.

[FIG. 17] Se muestran los resultados del análisis de la influencia de la presencia o ausencia de un suero, células alimentadoras y blebbistatin en la cantidad de plaquetas.

[FIG. 18] Se muestran los resultados del análisis de la influencia de un suero, células alimentadoras y blebbistatin en la proporción de plaquetas CD42b.

5 [FIG. 19] Se muestra un ejemplo de condiciones de cultivo preferibles en la etapa de poliploidización (expansión MCB) de megacariocitos y durante una fase de liberación de plaquetas (producción de plaquetas).

[FIG. 20] Se muestra un aumento de una proporción de plaquetas CD42b mediante la supresión de la expresión de BCL-XL y un aumento adicional de una proporción de plaquetas CD42b mediante la eliminación del suero y las células alimentadoras del medio y la adición de blebbistatin.

10 [FIG. 21] Se muestran los resultados del análisis de la influencia de un anticuerpo inhibitorio funcional HIP1 contra CD42b en el efecto de aglutinación de ristocetina de plaquetas periféricas.

[FIG. 22] Se muestran los resultados del análisis de la influencia de un anticuerpo inhibitorio funcional HIP1 contra CD42b en la formación de trombos *in vivo*.

15 [FIG. 23] Se muestran los resultados de trasplantar respectivamente, a ratones NOG, de plaquetas derivadas de células iPS producidas con la adición simultánea de KP-457 (S-45457), un inhibidor de ADAM17 y, de esta manera, aumentar el nivel de expresión de GPIba (CD42b) y las plaquetas derivadas de células iPS producidas sin la adición de un inhibidor de ADAM17 y medir la cantidad de plaquetas que contribuyeron a la formación de trombos.

20 [FIG. 24] Se muestran los resultados de trasplantar plaquetas periféricas humanas deterioradas de forma falsa mediante la adición de 100  $\mu$ m de CCCP, un agente dañino para las plaquetas, en presencia de KP-457, plaquetas a las que se añadió CCCP en ausencia de KP-457 y plaquetas frescas, respectivamente, y medir la cantidad de plaquetas que contribuyeron a la formación de trombos.

Modo de llevar a cabo la invención

(Método de producción de megacariocitos poliploidizados)

25 **[0027]** La presente invención da a conocer un método de estimulación de la poliploidización de megacariocitos y, de esta manera, preparación de poliploidización de megacariocitos.

30 **[0028]** Un modo del método de producción de megacariocitos poliploidizados según la presente invención incluye una etapa de obtención de megacariocitos forzando la expresión de un oncogén seleccionado de la familia de genes MYC, y BMI1, en células en cualquier fase de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en megacariocitos antes de la poliploidización, forzando la expresión de BCL-XL en megacariocitos antes de la poliploidización y cultivar y proliferar las células resultantes, preferiblemente donde un gen c-MYC se utiliza como oncogén.

35 **[0029]** El término "megacariocitos antes de la poliploidización" según como se utiliza en la presente memoria no está particularmente limitado y puede hacer referencia a megacariocitos disponibles a partir de células de sangre del cordón umbilical o de la médula ósea y cuya poliploidización no se ha desarrollado suficientemente, o megacariocitos que se han diferenciado por inducción de células madre embrionarias, células iPS, células madre hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical, sangre de médula ósea o sangre periférica, células progenitoras o similares y cuya poliploidización no se ha desarrollado suficientemente.

40 **[0030]** Además, el término "megacariocitos antes de la poliploidización", según como se utiliza en la presente memoria, abarca células que se caracterizan, por ejemplo, como CD41a positivas/CD42a positivas/CD42b positivas.

45 **[0031]** El término "megacariocitos poliploidizados" o "megacariocitos que se han sometido a poliploidización" se refiere a células o a una población celular en la que ha aumentado la cantidad de núcleos en términos relativos en comparación con "megacariocitos antes de la poliploidización". Por ejemplo, cuando los megacariocitos a los que se ha de aplicar el método de la presente invención tienen un núcleo 2N, las células que tienen un núcleo 4N o superior corresponden a "megacariocitos poliploidizados" o "megacariocitos que se han sometido a poliploidización". Incluso en megacariocitos antes de la poliploidización, la cantidad de núcleos no se limita a uno. En una población celular, la cantidad de núcleos en la población celular entera muestra un aumento significativo después de un término predeterminado, la población celular antes del término predeterminado puede denominarse "megacariocitos antes de la poliploidización" y la población celular después de un término predeterminado puede denominarse "megacariocitos que se han sometido a poliploidización".

55 **[0032]** La presente invención puede aplicarse también a megacariocitos antes de la poliploidización que se han diferenciado por inducción de células madre pluripotentes (tal como células madre embrionarias y células iPS), células madre hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical, sangre de médula ósea o sangre periférica, y células progenitoras. Por ejemplo, se prefieren los megacariocitos disponibles a partir de una estructura similar a una red (que también pueden denominarse saco madre embrionario o saco iPS) preparados a partir de células madre embrionarias o células iPS. En la presente memoria, la "estructura similar a una red" preparada a partir de células madre embrionarias o células iPS significa una estructura similar a un saco estérico (que tiene un espacio interno) derivada de células madre embrionarias o células iPS. Se hace con una población

celular endotelial y similares, y contiene en la misma células progenitoras hematopoyéticas (véase el Documento de patente 1, el Documento de patente 2 y el Documento no patente 2).

5 **[0033]** En la presente memoria, se da a conocer que es posible utilizar las que se establecen finalmente como una línea celular ES mediante cultivo de huevos fecundados en la fase de blastocito junto con células alimentadoras, con el aislamiento de células proliferantes derivadas del grupo de células interior en células individuales y la repetición del subcultivo.

10 **[0034]** Cuando se utilizan células iPS, pueden utilizarse células de cualquier origen en la medida en que hayan adquirido diferenciación pluripotente similar a células madre embrionarias mediante la introducción de diversos tipos de genes de factor de transcripción (que, de ahora en adelante, se denominará "factor de diferenciación pluripotente") capaces de proporcionar células somáticas (por ejemplo, fibroblastos o glóbulos) con diferenciación pluripotente. Como factores de diferenciación pluripotente, ya se han dado a conocer muchos factores. Entre los ejemplos se encuentran, pero sin carácter limitativo, la familia Oct (ex. Oct3/4), la familia SOX (ex. SOX2, SOX1, SOX3, SOX15 y SOX17), la familia Klf (ex. Klf4 y Klf2), la familia MYC (ex. c-MYC, N-MYC y L-MYC), NANOG y LIN28.

15 **[0035]** Los presentes inventores han dado a conocer que al forzar la expresión de un oncogén, tal como MYC, y un gen, tal como BMI1, en megacariocitos antes de la poliploidización (incluidos los denominados "células progenitoras de megacariocitos" en el Documento de patente 3) derivados de células madre pluripotentes, los megacariocitos resultantes presentan capacidad proliferativa mejorada (Documento de patente 3, JEM, 207: 2817-2830 2010).

20 **[0036]** Los megacariocitos antes de la poliploidización obtenidos mediante la utilización del método mencionado anteriormente son adecuados para su utilización en el método de la presente invención.

25 **[0037]** Según se da a conocer en el presente documento, los megacariocitos antes de la poliploidización son aquellos que se obtienen mediante una etapa de, en cualquier fase de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en megacariocitos antes de la proliferación, forzar la expresión de un oncogén y cualquiera de los siguientes genes (i) a (iii):

- (i) un gen supresor de la expresión de un gen p16 o un gen p19;
- (ii) un gen supresor de la expresión de un gen Ink4a/Arf; y
- (iii) un gen polycomb;

y cultivar y proliferar las células resultantes.

30 **[0038]** Entre los ejemplos del oncogén, se incluye el gen de la familia MYC, el gen de la familia Src, el gen de la familia Ras, el gen de la familia Raf y los genes de la familia de proteína quinasa, tal como c-Kit, PDGFR y Abl. Entre los ejemplos de los genes (i) a (iii), se incluyen BMI1, Mel18, Ring1a/b, Phc1/2/3, Cbx2/4/6/7/8, Ezh2, Eed, Suz12, HADC y Dnmt1/3a/3b, prefiriéndose particularmente un gen BMI1. Los expertos en la materia pueden llevar a cabo el control de la expresión del oncogén y el gen polycomb de manera convencional. Por ejemplo, puede utilizarse el método descrito en detalle en el Documento de patente 3 y similares. El oncogén y cualquiera de los genes (i) a (iii) pueden introducirse en las células en cualquier fase de las células progenitoras hematopoyéticas en megacariocitos antes de la poliploidización. Sin embargo, esto no se limita, puesto que la expresión de estos genes se induce en los megacariocitos antes de la poliploidización que se han de utilizar en la presente invención.

40 **[0039]** El oncogén y los genes (i) a (iii) (por ejemplo, un gen BMI1) incluyen tanto genes que tienen una secuencia de ADNc ya conocida como homólogos identificados mediante la utilización de la técnica anterior a partir de la homología con la secuencia de ADNc conocida.

45 **[0040]** Por ejemplo, entre los genes de la familia MYC, el gen c-MYC es un gen que tiene una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. Los homólogos del gen c-MYC son genes que tienen una secuencia de ADNc sustancialmente igual que la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. El ADNc que tiene una secuencia sustancialmente igual que la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 es un ADN que tiene aproximadamente un 60 % o más de identidad de secuencia, preferiblemente aproximadamente un 70 % o más de identidad de secuencia, más preferiblemente aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad de secuencia, más preferiblemente aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en relación con un ADN que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un ADN capaz de hibridarse con un ADN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 en condiciones estrictas, donde una proteína codificada por un ADN de este tipo contribuye a la amplificación de las células en una fase de diferenciación, tal como megacariocitos antes de la poliploidización.

55 **[0041]** El gen BMI1 es un gen que tiene una secuencia de ácido nucleico de, por ejemplo, SEQ ID NO: 2. Un homólogo del gen BMI1 es un gen que tiene una secuencia de ADNc sustancialmente igual que la secuencia de

ácido nucleico de, por ejemplo, SEQ ID NO: 2. El ADNc que tiene una secuencia sustancialmente igual que la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 es un ADN que tiene aproximadamente un 60 % o más de identidad de secuencia, preferiblemente aproximadamente un 70 % o más de identidad de secuencia, más preferiblemente aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad de secuencia, más preferiblemente aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en relación con un ADN que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 2 o un ADN capaz de hibridarse con un ADN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 en condiciones estrictas, donde una proteína codificada por un ADN de este tipo suprime la senescencia inducida por oncogenes en las células en las que el oncogén, tal como el gen de la familia MYC, se ha expresado, de manera que se estimula la amplificación de las células.

**[0042]** El oncogén mencionado anteriormente y los genes (i) a (iii) son necesarios para la proliferación celular, pero pueden inhibir la estimulación de la poliploidización o la liberación de plaquetas, de manera que la expresión de estos genes puede suprimirse antes de una etapa de poliploidización. La supresión de la expresión de estos genes en las células facilita la liberación de plaquetas funcionales (Documento de patente 3).

**[0043]** El término "gen supresor de apoptosis", según se utiliza en el presente documento, no se limita particularmente en la medida en que es un gen que suprime la apoptosis. Ejemplos del mismo incluyen un gen BCL2, un gen BCL-XL, survivina y MCL1.

**[0044]** Los presentes inventores han descubierto que, cuando se suprime la expresión forzada del oncogén y de cualquiera de los genes (i) a (iii), puede inducirse la muerte de los megacariocitos proliferados antes de la poliploidización. Tal y como se muestra más adelante en los Ejemplos, la supresión de la expresión del oncogén y de cualquiera de los genes (i) a (iii) en los megacariocitos antes de la poliploidización y la expresión forzada de un gen supresor de apoptosis en las células estimulan la poliploidización de los megacariocitos, lo que da lugar a la producción eficiente de plaquetas a partir de los megacariocitos antes de la poliploidización.

**[0045]** Tal y como se muestra más adelante en los Ejemplos, los megacariocitos siguen con una proliferación de larga duración forzando la expresión de un gen supresor de apoptosis.

**[0046]** Los genes supresores de apoptosis, tal como el gen BCL-XL y el gen BCL2, incluyen tanto los genes cuya secuencia de ADNc ya se ha publicado como los homólogos identificados mediante la técnica anterior a partir de la homología con la secuencia de ADNc conocida. Por ejemplo, un gen BCL-XL, uno de los genes supresores de apoptosis, es un gen que tiene una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. Un homólogo del gen BCL-XL es un gen que tiene una secuencia de ADNc sustancialmente igual que la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. El ADNc que tiene una secuencia sustancialmente igual que la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 es un ADN que tiene aproximadamente un 60 % o más de identidad de secuencia, preferiblemente aproximadamente un 70 % o más de identidad de secuencia, más preferiblemente aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un 99 % de identidad de secuencia en relación con un ADN que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 3 o un ADN capaz de hibridarse con un ADN que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 en condiciones estrictas, donde una proteína codificada por un ADN de este tipo es eficaz para la supresión de la apoptosis.

**[0047]** El término "condiciones estrictas", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a las condiciones de hibridación que los expertos en la materia pueden determinar fácilmente y son condiciones experimentales y empíricas que, normalmente, dependen de una longitud de sonda, una temperatura de lavado y una concentración de sal. Normalmente, una temperatura para el recocado adecuado aumenta cuando se utiliza una sonda más larga y disminuye cuando se utiliza una sonda más corta. La formación híbrida depende, normalmente, de la capacidad de renaturalización de una cadena complementaria situada en un entorno en el que una temperatura es ligeramente inferior que su punto de fusión.

**[0048]** En condiciones estrictas bajas, por ejemplo, en una fase de lavado de filtro después de la hibridación, se lava un filtro en una solución 0,1×SSC, 0,1 % SDS en condiciones de temperatura de entre 37 °C y 42 °C. En condiciones estrictas altas, por ejemplo, en la fase de lavado, se lava un filtro en una solución 5×SSC, 0,1 % SDS a 65 °C. Puede obtenerse un polinucleótido con homología superior mediante el aumento de las condiciones estrictas.

**[0049]** Con el fin de forzar la expresión de genes tales como el oncogén, los genes (i) a (iii) y el gen supresor de apoptosis en células, puede emplearse cualquier método que conozcan los expertos en la materia. Por ejemplo, el gen puede introducirse en las células mediante la utilización de un sistema de introducción de genes con un lentivirus o un retrovirus y, a continuación, expresarse. Cuando se lleva a cabo la expresión de genes mediante la utilización de un vector de introducción de genes viral, puede expresarse un gen diana mediante la unión operativa del gen en dirección 3' de un promotor adecuado, la inserción del gen resultante en el vector de introducción de genes y, a continuación, su introducción en las células. En el presente documento, el término "unión operativa" significa que un gen diana se une a un promotor para alcanzar la expresión deseada del gen diana. En modos de realización de la presente invención, por ejemplo, el gen diana puede expresarse de forma

constante con la utilización de un promotor CMV, un promotor EF1 o similares. De forma alternativa, un promotor adecuado (promotor inducible) puede situarse bajo el control de un elemento que tiene actividad controlada por un factor trans, por ejemplo, un elemento de respuesta a fármacos, tal como un elemento de respuesta a tetraciclina y puede expresarse, por inducción, un gen diana si se lleva a cabo un control de este tipo como la

5 adición de fármacos. Puesto que un sistema de expresión de genes con la utilización de un fármaco puede llevar a cabo un control de expresión deseado del oncogén o de los genes (i) a (iii), los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente un sistema adecuado. Con el fin de llevar a cabo dicha expresión, puede utilizarse un kit disponible en el mercado. El oncogén y los genes (i) a (iii), que son los genes diana en el control de expresión, pueden insertarse en vectores respectivos o en un vector.

10 **[0050]** La supresión de la expresión del oncogén o de cualquiera de los genes (i) a (iii) en megacariocitos puede alcanzarse, por ejemplo, mediante la eliminación del fármaco o similares y, de esta manera, liberar la inducción de la expresión con la utilización del sistema de expresión inductivo anteriormente mencionado. De forma alternativa, el oncogén o cualquiera de los genes (i) a (iii) que se haya introducido puede eliminarse con la utilización de un sistema Cre/lox o similar para controlar, de manera supresora, la expresión de estos genes.

15 Según sea necesario, puede utilizarse un kit disponible en el mercado con el fin de regular, de manera supresora, la expresión del oncogén o del gen (i) a (iii).

**[0051]** Un modo del método de producción de megacariocitos poliploidizados según la presente invención incluye una etapa consistente en forzar la expresión de un gen supresor de apoptosis en células y, en paralelo, inhibir la expresión o función de un producto génico p53 en las células. El término "expresión" se utiliza como un concepto

20 que abarca la transcripción y la traducción. Por ejemplo, el término "expresión inhibitoria" puede incluir el significado "inhibidor en un nivel de transcripción" o "inhibidor en un nivel de traducción".

**[0052]** El producto génico p53 es ampliamente conocido como un gen supresor de tumores y se conoce su secuencia y similares en diversas especies animales.

**[0053]** Puede alcanzarse un método de inhibición de la función del producto génico p53 en megacariocitos mediante una tecnología convencional en este campo técnico. Ejemplos del método incluyen un método de introducción de mutación (sustitución, inserción o delección, o alteración, o modificación) en un gen p53 y, de esta manera, inhibir la producción del producto génico y un método de inhibición directa de la función del producto génico. Ejemplos del método de introducción directa de mutación (sustitución, inserción o delección, o alteración, o modificación) en un gen incluyen un método de destrucción del gen p53 entero mediante recombinación

25 homóloga con la utilización de un vector de reconocimiento génico adecuado y un método de introducción de mutación en una región importantes para la actividad del producto génico con la utilización de un sistema Cre/lox o similar.

**[0054]** Como método de inhibición de la función del producto génico p53, puede utilizarse un método dominante negativo. El método dominante negativo es un método de inducción en células de una expresión abundante de una proteína p53 con mutación introducida en la misma para reducir su actividad o quitársela, haciendo que una proporción de la proteína p53 inerte a la proteína p53 normal en células sea abrumadoramente elevada y, de esta manera, obtener células que muestran un comportamiento celular que han perdido la función de la proteína p53.

35

**[0055]** Como método de supresión de la expresión del producto génico p53, puede utilizarse un método antisentido, un método de ribozima, un método de ARNi o similares.

40

**[0056]** El método antisentido es un método de supresión de la expresión de un gen mediante la utilización de un ácido nucleico monocatenario que presenta una secuencia base complementaria a un gen diana (básicamente, un ARNm como producto de transcripción) y que presenta normalmente una longitud de entre 10 bases y 100 bases, preferiblemente entre 15 bases y 30 bases. La expresión de genes se inhibe mediante la introducción de un ácido nucleico antisentido en células y mediante su hibridación con el gen diana. El ácido nucleico antisentido no es completamente complementario al gen diana en la medida en que puede producirse un efecto de inhibición de la expresión del gen diana. Según sea necesario, los expertos en la materia pueden diseñar el ácido nucleico antisentido con la utilización de *software* conocido o similares. El ácido nucleico antisentido puede ser cualquiera entre ADN, ARN y quimera de ADN/ARN o puede modificarse.

45

**[0057]** Una ribozima es una molécula de ácido nucleico que hidroliza de forma catalítica un ARN diana y está compuesta por una región antisentido que presenta una secuencia complementaria al ARN diana y una región central catalizadora implicada en la reacción de ruptura. Según sea necesario, los expertos en la materia pueden diseñar una ribozima de manera conocida. Una ribozima es, normalmente, una molécula de ARN, pero puede utilizarse una molécula quimera de ADN-ARN en su lugar.

50

**[0058]** El método de ARNi es un mecanismo de supresión de la expresión de genes de secuencia específica inducido por un ácido nucleico bicatenario. El método presenta una especificidad elevada y, además, es muy seguro porque emplea un mecanismo de supresión de la expresión de genes originalmente presentes *in vivo*.

55

**[0059]** Ejemplos del ácido nucleico bicatenario que presentan un efecto de ARNi incluyen ARNip. Cuando se utiliza ARNip para células de mamíferos, se trata de un ARN bicatenario que presenta, normalmente, entre 19 y 30 bases, preferiblemente entre aproximadamente 21 y 25 bases. El ácido nucleico bicatenario que presenta un efecto de ARNi tiene, normalmente, como una de las cadenas, una secuencia complementaria a una parte de un ácido nucleico diana y, como la otra cadena, una secuencia complementaria a la misma

**[0060]** El ácido nucleico bicatenario que presenta un efecto de ARNi puede diseñarse de manera conocida a partir de la secuencia base de un gen diana. El ácido nucleico bicatenario que presenta un efecto de ARNi puede ser cualquiera entre un ARN bicatenario, un ácido nucleico bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN, un ácido nucleico artificial y un ácido nucleico sometido a diversas modificaciones.

**[0061]** El ARNip, el ácido nucleico antisentido y la ribozima pueden expresarse en células mediante la introducción, en células, de vectores (por ejemplo, vectores lentivirus) que contienen los ácidos nucleicos que los codifican, respectivamente. Como ARNip, pueden utilizarse ADN que codifica dos cadenas, respectivamente, o puede utilizarse un ADN que codifica un ácido nucleico monocatenario obtenido mediante unión de las dos cadenas de un ácido nucleico bicatenario a través de un bucle. En este último caso, el ARN monocatenario obtenido mediante transcripción intracelular presenta una estructura en horquilla porque su parte complementaria se hibrida en las moléculas. Este ARN se denomina ARNhc (ARN horquillado corto). Cuando el ARNhc se exporta al citoplasma, la parte de bucle es escindida por una enzima (Dícer) para ser un ARN bicatenario y produce un efecto de ARNi.

**[0062]** Como otro método de inhibición de la función del producto génico p53 en megacariocitos, puede emplearse un método de inhibición directa o indirecta de la función del producto génico p53, un método de inhibición de la fosforilación de p53 y, de esta manera, inhibición indirecta de la activación de p53 o métodos similares.

**[0063]** Como se describe más adelante en los Ejemplos, los megacariocitos antes de la expresión forzada de un gen supresor de apoptosis y la inhibición de la expresión o la función del producto génico p53, continúan con la proliferación, donde se incluyen los megacariocitos cuya dependencia de citoquina es SCF y las plaquetas liberadas de los mismos no son CD42b positivas. Cuando se lleva a cabo la expresión forzada de un gen supresor de apoptosis y la inhibición de la expresión o función del producto génico p53, los megacariocitos se poliploidizan parcialmente al tiempo que continúan la proliferación y liberan muchas plaquetas CD42 positivas. En esta fase, la dependencia de citoquina de los megacariocitos cambia de SCF a TOP y la proliferación y la maduración se llevan a cabo en paralelo.

**[0064]** Un modo del método de producción de megacariocitos poliploidizados de acuerdo con la presente invención incluye, adicionalmente, al menos una entre una etapa de tratamiento de los megacariocitos antes de la poliploidización al tiempo que se cultivan, con (a) un inhibidor de función de complejo de actomiosina, (b) un inhibidor ROCK y (c) un inhibidor HDAC. Por medio del tratamiento mencionado anteriormente, prosigue una proliferación y una poliploidización más estables.

**[0065]** El término "complejo de actomiosina", según se utiliza en la presente memoria, significa un complejo entre actina y miosina II y constituye, por ejemplo, un anillo contráctil que aparecerá en el momento de la citocinesis. En el complejo de actomiosina, la miosina II actúa como una proteína motora al tiempo que se relaciona con actina y está implicada en la contracción del anillo contráctil, entre otros. El "inhibidor de función de complejo de actomiosina" en la presente invención puede inhibir la función mediante cualquier mecanismo. Incluye, por ejemplo, los que inhiben la formación de un complejo de actomiosina y, de esta manera, inhiben la función del complejo de actomiosina; los que inhiben la IIA/IIB ATPasa de cadena pesada de miosina (MHC, por sus siglas en inglés) y, de esta manera, inhiben la función del complejo de actomiosina; y los que inhiben la quinasa de cadena ligera de miosina (MICK) y, de esta manera, inhiben la función del complejo de actomiosina. La IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina es una molécula que tiene una función importante en la contracción de un anillo contráctil, mientras la quinasa de cadena ligera de miosina fosforila L2, entre cadenas ligeras de miosina, e induce un movimiento deslizante entre la actina y la miosina.

**[0066]** Se ha dado a conocer, hasta la fecha, que un inhibidor ROCK suprime la endomitosis de megacariocitos y estimula la poliploidización. La IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina o la quinasa de cadena ligera de miosina que controla la formación o la función de un complejo de actomiosina actúa en dirección 3' de una señal ROCK y, más directamente, controla la contracción de un anillo contráctil a través de la regulación de la formación o la función de un complejo de actomiosina. Por lo tanto, el inhibidor de función de complejo de actomiosina se supone que suprime la endomitosis de megacariocitos de forma más eficiente y estimula más la poliploidización en comparación con el inhibidor ROCK.

**[0067]** Ejemplos del inhibidor de función de complejo de actomiosina utilizables en la presente invención incluyen blebbistatin (Science, 299: 1743-1747 2003), inhibidor de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina y ML7, inhibidor de quinasa de cadena ligera de miosina. También pueden utilizarse ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNhc) o anticuerpos que inhiben la actividad de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina o de quinasa de

cadena ligera de miosina como inhibidor de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina o como inhibidor de quinasa de cadena ligera de miosina.

5 **[0068]** Cabe recalcar que el término "tratamiento", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una operación llevada a cabo para producir el efecto de un inhibidor o similares en células diana, por ejemplo, la adición de una cantidad adecuada de un inhibidor o similares a un medio de cultivo de células para incorporarlo en las células. En algunos casos, puede utilizarse conjuntamente una operación que estimula su incorporación en células.

10 **[0069]** Un modo del método de producción de megacariocitos de acuerdo con la presente invención, incluye, de forma adicional, una etapa de tratamiento de los megacariocitos antes de la poliploidización con un inhibidor ROCK al tiempo que se cultivan.

**[0070]** Entre los ejemplos del inhibidor ROCK (doble espiral asociada a Rho que forma quinasa/quinasa asociada a Rho), se incluye [(R)-(+)-trans-N-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-ciclohexano carboxamida·2HCl·H<sub>2</sub>O] (Y27632). En algunos casos, también pueden utilizarse anticuerpos o ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNhc) que inhiben la actividad de la Rho quinasa como inhibidor ROCK.

15 **[0071]** Un modo del método de producción de megacariocitos de acuerdo con la presente invención, incluye, de forma adicional, una etapa de tratamiento de los megacariocitos antes de la poliploidización con un inhibidor HDAC al tiempo que se cultivan las células.

20 **[0072]** El inhibidor HDAC presenta una acción de inhibición de la actividad de la histona deacetilasa (HDAC). Hasta la fecha, se han conocido muchos inhibidores HDAC. Entre los ejemplos de los mismos, se incluye el ácido valproico, la tricostatina A, el SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida) y el APHA (aroil-pirrolil-hidroxiamida). En particular, se utiliza, preferiblemente, el ácido valproico y la tricostatina A. Cuando un fármaco que se ha de utilizar se suministra en forma de sal, puede utilizarse el inhibidor en forma de sal.

25 **[0073]** Los expertos en la materia pueden determinar de antemano la concentración óptima cuando las células se tratan con un inhibidor de función de complejo de actomiosina, un inhibidor ROCK, un inhibidor HDAC o similares a partir de los resultados de un ensayo preliminar. Los expertos en la materia también pueden seleccionar el tiempo de tratamiento, el método o similares según sea necesario. Por ejemplo, cuando las células se tratan con blebbistatin, inhibidor de II ATPasa de cadena pesada de miosina, puede añadirse en una cantidad de entre aproximadamente 2 y 15 µg/ml o entre aproximadamente 5 y 10 µg/ml a un medio de cultivo y cultivarse, por ejemplo, preferiblemente durante aproximadamente 5 y 10 días, en particular, preferiblemente, 30 durante aproximadamente 6 y 7 días. Y27632, inhibidor ROCK, puede añadirse en una cantidad de entre 5 y 15 µM o entre 8 y 12 µM, preferiblemente entre aproximadamente 10 µM, mientras que el ácido valproico, inhibidor HDAC, puede añadirse en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 y 1 mM o entre aproximadamente 0,2 y 0,7 mM, preferiblemente aproximadamente 0,5 mM. El tiempo de tratamiento con Y27632 o ácido valproico puede ser de entre 10 y 21 días, preferiblemente de aproximadamente 14 días.

35 **[0074]** Un modo del método de producción de megacariocitos poliploidizados de acuerdo con la presente invención incluye, de forma adicional, la colocación de células megacariocíticas a una temperatura de 37 °C o superior, donde BCL-XL se ha expresado de forma forzada al tiempo que se cultivan las células.

40 **[0075]** Se ha confirmado que mediante el cultivo de megacariocitos a una temperatura habitual de 37 °C o superior, se estimula la diferenciación de megacariocitos que se han sometido a poliploidización. Las "temperaturas de 37 °C o superiores" se encuentran, por ejemplo, entre aproximadamente 37 °C y aproximadamente 42 °C, preferiblemente entre aproximadamente 37 °C y aproximadamente 39 °C, puesto que las temperaturas que no dañan las células son adecuadas. Si bien puede determinarse un plazo de cultivo a temperaturas de 37 °C o superiores, según sea necesario, mientras se monitoriza la cantidad de megacariocitos que se han sometido a poliploidización, el plazo es, por ejemplo, entre 10 días y 28 días, preferiblemente entre 45 14 días y aproximadamente 21 días.

**[0076]** No se impone ninguna limitación particular en las demás condiciones de cultivo en la etapa de llevar a cabo la expresión forzada de un gen supresor de apoptosis en megacariocitos que no se han sometido a poliploidización y, a continuación, cultivar las células resultantes en la medida en que el efecto de la presente invención puede producirse, de manera preferible, en las condiciones. Pueden utilizarse condiciones de cultivo 50 conocidas o condiciones equivalentes a las mismas. Por ejemplo, TPO, IL-1, IL-3, IL-4, IL5, IL-6, IL-9, IL-11, EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, ligando Flt3 y heparina pueden utilizarse, bien por separado, bien en combinación de dos o más y añadirse a un medio.

**[0077]** De forma alternativa, puede utilizarse una célula alimentadora, según sea necesario, para el cultivo.

55 **[0078]** Los megacariocitos que se han sometido a poliploidización obtenida mediante la utilización del método mencionado anteriormente producen, de forma eficiente, plaquetas funcionales CD42b positivas. Según se muestra más adelante en los Ejemplos, las plaquetas CD42b positivas presentan una capacidad de formación de

trombos elevada tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, los megacariocitos que se han sometido a la poliploidización pueden producir plaquetas funcionales incluso cuando se descongelan después de la criopreservación.

5 **[0079]** En la presente memoria, también se da a conocer una composición globular que presenta un contenido elevado de megacariocitos poliploidizados. El término "composición globular" puede comprender, al igual que "megacariocitos poliploidizados" cuya poliploidización se ha estimulado mediante el método de la presente invención, megacariocitos preparados mediante la utilización de otro método, y los demás glóbulos.

10 **[0080]** El tratamiento de los megacariocitos antes de la poliploidización mediante el método de la presente invención puede estimular su diferenciación en megacariocitos poliploidizados de 4N o superior. Por consiguiente, la aplicación del método de la invención a una población de megacariocitos diferenciados, por ejemplo, de células madre pluripotentes o similares, posibilita la obtención de una composición globular que presenta un contenido elevado de megacariocitos poliploidizados de 4N o superior. Cuando la población de megacariocitos se trata mediante la utilización del método de la presente invención, es posible aumentar el contenido de megacariocitos poliploidizados con 4N o superior a al menos un 20 % o más, 30 % o más, preferiblemente 40 % o más, 50 % o más, más preferiblemente 80 % o más (véase, por ejemplo, la figura 11B). En consecuencia, la presente invención posibilita la preparación de una población de megacariocitos o una población de glóbulos con una proporción de existencia elevada de megacariocitos poliploidizados.

15 **[0081]** Dicha composición globular también puede criopreservarse. Por lo tanto, dicha composición globular se distribuye en un estado congelado y el método de producción de plaquetas que se describe a continuación puede llevarse a cabo del lado del usuario.

20 **[0082]** Los megacariocitos y similares que se hayan tratado para estimular la poliploidización mediante el método de la presente invención son eficaces también para su trasplante *in vivo* y para producir plaquetas funcionales *in vivo* mediante un método adecuado.

25 **[0083]** Actualmente, las células madre hematopoyéticas se han trasplantado a través del trasplante de médula ósea, trasplante de sangre de cordón umbilical o similares. En particular, el trasplante de sangre de cordón umbilical permite la reducción de los problemas del trasplante de médula ósea, tal como la escasez de la cantidad de donantes y una gran carga para los donantes, de modo que, recientemente, ha habido más oportunidades de trasplante de sangre de cordón umbilical. Los megacariocitos producidos *in vivo* mediante trasplante de sangre de cordón umbilical, sin embargo, no se han sometido a poliploidización de forma suficiente y la producción de una cantidad suficiente de plaquetas *in vivo* lleva tiempo. Cuando una capacidad de producción de plaquetas debería aumentar rápidamente, el trasplante de sangre de cordón umbilical no puede satisfacer esta demanda suficientemente en la actualidad.

30 **[0084]** Con el trasplante de megacariocitos poliploidizados obtenidos mediante la utilización del método de la presente invención se pueden superar los problemas asociados al trasplante de médula ósea, tal como la escasez de la cantidad de donantes y una gran carga de donantes, así como los problemas asociados al trasplante de sangre de cordón umbilical, tal como la capacidad de producción de plaquetas *in vivo*. Por consiguiente, el método de la presente invención es muy superior a los métodos de trasplante convencionales.

(Método de producción de plaquetas)

35 **[0085]** Asimismo, el método de producción de plaquetas de acuerdo con la presente invención permite producir plaquetas *in vitro* a partir de los megacariocitos poliploidizados y similares obtenidos mediante la utilización de la presente invención.

**[0086]** El método de producción de plaquetas de acuerdo con la presente invención incluye una etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados obtenidos por medio del método mencionado anteriormente y de recogida de plaquetas del producto cultivado.

40 **[0087]** Si bien no se impone ninguna limitación en las condiciones de cultivo, los megacariocitos poliploidizados pueden cultivarse durante entre aproximadamente 7 a 15 días, por ejemplo, en presencia de TPO (entre aproximadamente 10 y 200 ng/mL, preferiblemente entre aproximadamente 50 y 100 ng/mL) o en presencia de TPO (entre aproximadamente 10 y 200 ng/mL, preferiblemente entre aproximadamente 50 y 100 ng/mL), SCF (entre 10 y 200 ng/mL, preferiblemente aproximadamente 50 ng/mL) y heparina (entre aproximadamente 10 y 50 100 U/mL, preferiblemente aproximadamente 25 U/ml).

**[0088]** El método de producción de plaquetas de acuerdo con la presente invención comprende, en la etapa de cultivo de megacariocitos poliploidizados, la supresión de la expresión forzada anteriormente mencionada de BCL-XL o la eliminación del BCL-XL anteriormente mencionado de los megacariocitos poliploidizados.

45 **[0089]** La supresión de la expresión de un gen supresor de apoptosis también puede alcanzarse, por ejemplo, mediante la eliminación del producto químico o similar para liberar la inducción de la expresión mediante el sistema de expresión inductivo anteriormente mencionado. De forma alternativa, el gen supresor de apoptosis

introducido puede eliminarse mediante la utilización de un sistema Cre/lox y, de esta manera, puede controlarse, de manera supresora, la expresión de este gen. Según sea necesario, puede utilizarse un kit disponible en el mercado o similar con el fin de regular, de manera supresora, la expresión de un gen supresor de apoptosis.

5 **[0090]** Como se muestra más adelante en los Ejemplos, cuando la expresión de un gen supresor de apoptosis que se ha expresado de forma forzada para estimular la poliploidización conlleva un aumento de la eficacia de producción de plaquetas funcionales CD41a positivas/CD42b positivas.

**[0091]** La supresión de la expresión o la eliminación de un gen supresor de apoptosis comienza 15 días, preferiblemente 10 días, más preferiblemente entre 3 y 7 días, todavía más preferiblemente aproximadamente 3 días antes de la recogida de plaquetas.

10 **[0092]** En esta etapa, puede suprimirse la expresión tanto de un gen supresor de apoptosis exógeno como de un gen supresor de apoptosis endógeno. La inhibición de la expresión o la función de un producto génico p53 puede llevarse a cabo de forma exitosa después de la presente etapa.

15 **[0093]** La temperatura de cultivo no se limita particularmente en la medida en que puede producirse el efecto de la presente invención. El cultivo puede llevarse a cabo a entre 35 °C y 40 °C, siendo adecuado entre 37 °C y 39 °C, como se muestra más adelante en los Ejemplos.

20 **[0094]** En el método de producción de acuerdo con la presente invención, la etapa de cultivo de megacariocitos poliploidizados puede realizarse en condiciones exentas de suero y/o exentas de célula alimentadora. Como se muestra más adelante en los Ejemplos, no se encontraron grandes diferencias en la cantidad de producción de plaquetas entre el cultivo en un medio que contiene un suero bovino fetal y el cultivo en un medio exento de suero. Sin embargo, una proporción de plaquetas CD42b positivas era superior cuando las células se cultivaron en un medio exento de suero o en un medio exento de célula alimentadora. Si la etapa de producción de plaquetas puede llevarse a cabo en un medio exento de suero y en un medio exento de célula alimentadora, las plaquetas así obtenidas pueden utilizarse clínicamente sin causar el problema de la inmunogenicidad.

25 **[0095]** La producción de plaquetas sin la utilización de una célula alimentadora permite suprimir un coste de producción y es adecuada para la producción en masa porque no se necesita la adhesión de la célula alimentadora y, por consiguiente, puede llevarse a cabo el cultivo en suspensión en un matraz o similar. Cuando no se utiliza la célula alimentadora, puede utilizarse un medio condicionado. El medio condicionado no se limita particularmente y los expertos en la materia pueden prepararlo de manera conocida. Por ejemplo, puede obtenerse mediante cultivo de una célula alimentadora, según sea necesario y, a continuación, eliminación de la célula alimentadora del producto cultivado mediante la utilización de un filtro o similar.

30 **[0096]** En un modo del método de producción de plaquetas de acuerdo con la presente invención, se añade un inhibidor ROCK y/o inhibidor de función de complejo de actomiosina a un medio. Puede utilizarse el inhibidor ROCK y el inhibidor de función de complejo de actomiosina similar a los utilizados en el método anteriormente mencionado de producción de megacariocitos poliploidizados. Ejemplos del inhibidor ROCK incluyen Y27632. Ejemplos del inhibidor de función de complejo de actomiosina incluyen blebbistatin, inhibidor de II ATPasa de cadena pesada de miosina. El inhibidor ROCK puede añadirse por separado; el inhibidor ROCK y el inhibidor de función de complejo de actomiosina pueden añadirse individualmente; o pueden añadirse conjuntamente.

35 **[0097]** El inhibidor ROCK y/o el inhibidor de función de complejo de actomiosina se añade, preferiblemente, en una cantidad de entre 0,1 µM y 30 µM, por ejemplo, entre 0,5 µM y 25 µM, entre 5 µM y 20 µM o similar.

40 **[0098]** El plazo de cultivo después de la adición del inhibidor ROCK y/o el inhibidor de función de complejo de actomiosina puede encontrarse entre un día y 15 días. Puede ser de 3 días, 5 días, 7 días o similar. Mediante la adición del inhibidor ROCK y/o el inhibidor de función de complejo de actomiosina, puede aumentarse, de forma adicional, una proporción de plaquetas CD42b positivas.

45 **[0099]** En la presente memoria, se da a conocer un kit para la estimulación de la poliploidización de megacariocitos y la producción de megacariocitos maduros y/o plaquetas. El kit incluye, además de un vector de expresión, entre otros, necesario para la inducción de la expresión intracelular del oncogén, cualquiera de los genes (i) a (iii) mencionados anteriormente, un gen BCL-XL o similares y un reactivo, un medio para el cultivo de células, un suero, un suplemento tal como un factor de crecimiento (por ejemplo, TPO, EPO, SCF, heparina, IL-6, IL-11 o similares), un antibiótico, entre otros. Además, el kit incluye, por ejemplo, cuando se utilizan células derivadas de células madre embrionarias o células iPS, un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo contra Flk1, CD31, CD34, lectina UEA-I o similares) para confirmar un marcador para la identificación de una estructura similar a una red preparada a partir de estas células. El reactivo, anticuerpo, entre otros, incluidos en el kit se suministran en cualquier tipo de recipiente que permita que un ingrediente constitutivo mantenga su actividad de forma eficiente y que no provoque ni su adsorción al material del recipiente ni su deterioración.

55 **[0100]** El kit puede incluir, además, megacariocitos antes de la poliploidización en los que el oncogén y cualquiera de los genes (i) a (iii) anteriormente mencionados se han expresado de forma forzada.

**[0101]** Las "células" descritas en la presente memoria se obtienen de humanos y animales no humanos (por ejemplo, ratones, ratas, ganado, caballos, cerdos, ovejas, monos, perros, gatos y pájaros). Si bien no se impone ninguna limitación particular, se prefieren particularmente las células obtenidas de humanos.

5 **[0102]** La presente invención y las demás exposiciones del presente documento se describirán, posteriormente, con más detalle por medio de ejemplos. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que la presente invención no se limita a los Ejemplos ni estos la limitan.

#### EJEMPLOS

##### 1. Preparación de megacariocitos antes de la poliploidización

10 1-1. (Ejemplo de referencia) Preparación de megacariocitos antes de la poliploidización a partir de células madre embrionarias

**[0103]** Con el fin de analizar la poliploidización de megacariocitos, se prepararon megacariocitos antes de la poliploidización a partir de células madre embrionarias (véase el Documento de patente 3 para obtener más información).

15 **[0104]** Se cultivó una línea celular ES [KhES-3] durante 14 días en presencia de 20 ng/ml de VEGF para preparar una estructura similar a una red. Se recuperaron células progenitoras hematopoyéticas eliminadas de la estructura similar a una red y se sembraron en células 10T1/2 para obtener un recuento celular de  $1 \times 10^5$ /pocillo.

20 **[0105]** Las células progenitoras hematopoyéticas preparadas de esta manera se infectaron con un vector de retrovirus pMx tet off c-MYC 2A BMI1 que contenía c-MYC-2A-BMI1 tres veces cada 12 horas a un MOI = 10 (confirmado mediante la utilización de células Jurkat) para inducir la expresión de c-MYC y BMI1 (Documento de patente 3). El vector pMx tet off c-MYC 2A BMI1 permite la expresión de un gen c-MYC y un gen BMI1 en presencia de estradiol, al tiempo que suprime la expresión del gen c-MYC y el gen BMI1 en presencia de doxiciclina (Dox) y en ausencia de estradiol.

25 **[0106]** De forma simultánea a la primera infección, se añadieron 2 nM de estradiol y, 12 horas después de la infección final, se eliminó el virus. En esa fase, la cantidad liberada de plaquetas CD42b positivas era pequeña aunque la expresión del gen c-MYC o el gen BMI1 se inactivara, lo que indica que las células eran megacariocitos inmaduros. Estas células inmaduras pueden, posteriormente, denominarse "iMKPC-tipo I".

30 **[0107]** Se analizó la dependencia de citoquina de iMKPC-tipo I mediante la siembra de  $2 \times 10^5$  células iMKPC-tipo I en células alimentadoras 10T1/2 y mediante su cultivo durante 14 días a 37 °C en las condiciones que se muestran en la figura 1A en presencia de 2 uM de  $\beta$ -estradiol con la utilización de las siguientes citoquinas: SCF (50 ng/ml), TPO (50 ng/ml) y EPO (6 U/ml). Se llevó a cabo un recuento de la cantidad celular de una población en la que se confirmó la proliferación el día 4 y el día 11 y se volvieron a sembrar  $2 \times 10^5$  células, mientras que se cambió el medio de las otras poblaciones. La cantidad de células se contó el día 8 y el día 14 y se volvieron a sembrar  $2 \times 10^5$  células. Al mismo tiempo, el día 8, se analizaron algunas de las células con un citómetro de flujo después de tinción con un anticuerpo CD41, un anticuerpo CD42b y un anticuerpo GPA.

35 **[0108]** Los resultados se muestran en las figuras 1B y C. Como se muestra en la figura 1B, la proliferación de células iMKPC-tipo I dependió en gran medida de SCF. Como se muestra en la figura 1C, las células de cualquier población eran casi CD41 positivas, pero en las poblaciones sin SCF, la población CD41+/CD42b mostraba una reducción marcada en la proliferación. La población CD41+/CD42b es una población que muestra una proliferación adecuada entre las células iMKPC-tipo I.

40 **[0109]** Estos descubrimientos, incluida la proliferación dependiente de SCF, indican que las células iMKPC-tipo I son megacariocitos inmaduros.

##### 1-2. Preparación de megacariocitos antes de la poliploidización a partir de células CD34 positivas obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical

45 **[0110]** Se confirmó que los megacariocitos antes de la poliploidización pueden prepararse a partir de células CD34 positivas obtenidas a partir de la sangre de cordón umbilical de manera similar a cuando se utilizan células madre embrionarias o células iPS.

50 **[0111]** Más específicamente, se infectaron células CD34 positivas obtenidas a partir de la sangre de cordón umbilical tres veces con virus pMx-c-MYC y DNsam BMI1 (cada uno, vector de retrovirus) a un MOI = 10 y se contó la cantidad de células CD41a (marcador megacariocítico) positivas el día 14 y el día 21 con la utilización de FACS. Se utilizó Mock (vector vacío) como control.

**[0112]** Los resultados se muestran en la figura 1D. En comparación con Mock, se observó la proliferación de megacariocitos CD41 positivos de una población en la que se habían expresado de forma forzada c-MYC y

BMI1. Por lo tanto, se confirmó que los megacariocitos antes de la poliploidización pueden obtenerse a partir de células obtenidas a partir de la sangre de cordón umbilical de manera similar a como se describe en 1-1.

## 2. Preparación de megacariocito poliploidizado a partir de megacariocitos antes de la poliploidización

### 2-1. (Ejemplo de referencia) Influencia de la expresión de BCL-XL en la poliploidización

- 5 **[0113]** El día 23, después de la infección con un vector de retrovirus pMx tet off c-MYC 2A BMI1 que contenía c-MYC-2A-BMI1 en la Sección 1-1, se infectaron las células una vez con Lv-BCL-XL-GFP inducible por doxiciclina (vector lentivirus) a un MOI = 10. El vector se preparó mediante la introducción de ADNc de BCL-XL amplificado por PCR en un vector Ai-Lv tet on (clontech) tratado con EcoRI y BamHI mediante la utilización de un kit de clonación PCR In-Fusion advance (clontech). Veinticuatro horas después de la infección, se eliminó el virus.
- 10 Mediante la eliminación de estradiol y la adición de doxiciclina, se suprimió la expresión de c-MYC y BMI1 y, al mismo tiempo, se inició la expresión de BCL-XL.

### 2-2. Influencia de la reducción del gen p53 en la poliploidización

- 15 **[0114]** Se redujo un gen p53 mediante su infección con un vector de lentivirus FG12-sh p53 además del vector de lentivirus Lv-BCL-XL-GFP inducible por doxiciclina. Las células así obtenidas pueden, posteriormente, denominarse células "iMKPC-tipo II".

### 2-3. Dependencia de citoquina de iMKPC-tipo II

- 20 **[0115]** En células alimentadoras 10T1/2, se sembraron  $2 \times 10^5$  células iMKPC-tipo II y, a continuación, se cultivaron en presencia de 0,5 µg/ml de Dox a 39 °C durante 21 días en las condiciones de las citoquinas, es decir, SCF (50 ng/ml), TPO (50 ng/ml) y EPO (6 U/ml). Los resultados se muestran en la figura 2A. Se confirmó que la línea celular iMKPC-tipo II muestra proliferación en ausencia de citoquina, pero la proliferación se estimula todavía más mediante la adición de TPO. Si bien las células iMKPC-tipo I eran dependientes de SCF y el TPO no influyó en su proliferación, las células de tipo II mostraron proliferación mejorada en presencia de TPO y SCF no influyó en la proliferación.

### 2-4. Análisis del marcador de superficie de iMKPC-tipo II

- 25 **[0116]** El día 21, después de la adición de citoquina, se analizaron las células con un citómetro de flujo después de la tinción con un anticuerpo CD41, un anticuerpo CD42b y un anticuerpo GPA. Los resultados se muestran en la figura 2B. La población con TPO añadido mostró una expresión mayor de CD41a y CD42b en comparación con las otras poblaciones, lo que indica que es una población más comprometida con los megacariocitos.

### 2-5. Cambio morfológico e influencia de blebbistatin

- 30 **[0117]** Los resultados de la observación microscópica de iMKPC-tipo I y tipo II se muestran en la figura 3. Se observó que, si se apaga la expresión de c-MYC y BMI1, se fuerza la expresión de BCL-XL y se reduce el gen p53, las células se poliploidizan en gran medida. También se confirmó que las células se poliploidizaban en mayor medida mediante la adición de blebbistatin (5 µg/ml).

- 35 **[0118]** Tal y como se muestra en las Secciones 2-3 a 2-5, en la fase de iMKPC-tipo II, los megacariocitos proliferan, una proporción de plaquetas CD42b positivas en todas las plaquetas liberadas aumentó, algunas de las células se poliploidizaron y la dependencia de citoquina cambió a TPO, lo que indica que la proliferación y la maduración se produjeron simultáneamente.

### 2-6. Influencia de la supresión de la expresión de BCL-XL

- 40 **[0119]** En células alimentadoras 10T1/2, se sembraron  $2 \times 10^5$  células iMKPC-tipo II y se llevó a cabo un cultivo de larga duración a 39 °C en presencia de 0,5 µg/ml de Dox (BCL-XL ON) o en su ausencia (BCL-XL OFF). Cada dos o cinco días, se contó la cantidad de células y se volvieron a sembrar  $2 \times 10^5$  células.

- 45 **[0120]** Los resultados se muestran en la figura 4. La supresión de BCL-LX mediante Dox OFF hizo que disminuyera un índice de proliferación de células iMKPC-tipo II después de un largo periodo (después de 100 días), las células perdieron su capacidad de proliferación, lo que indica que BCL-XL es indispensable para la proliferación de larga duración de las células iMKPC-tipo II.

### 2-7. Análisis de la influencia de los demás tratamientos en la poliploidización

#### 2-7-1. Influencia del inhibidor ROCK

- 50 **[0121]** Después de la introducción de los genes MYC y BMI1, los megacariocitos resultantes (aproximadamente  $10^5$ ) se cultivaron durante aproximadamente 30 días en ausencia de doxiciclina y presencia de estradiol en las condiciones de cultivo de 37 °C y en presencia de un 5 % de CO<sub>2</sub> para su proliferación a aproximadamente  $10^{11}$ . Se prosiguió el cultivo todavía, al tiempo que se cambió la condición a la presencia de doxiciclina y ausencia de

estradiol con el fin de suprimir la expresión del gen MYC y el gen BMI1 en la línea celular de megacariocitos proliferados de esta manera y se añadió un inhibidor ROCK (Y27632; producto de Wako Pure Chemicals) al medio de cultivo para obtener una concentración de 10  $\mu$ M con el fin de determinar la influencia de Y27632 en la poliploidización. El día 7, después de que se iniciara el cultivo con la adición de Y27632 al medio de cultivo, se analizó el grado de poliploidización mediante la utilización de FACS (FIG. 5). Las células añadidas con el inhibidor ROCK mostraron un aumento del número de células con 4N (gráfico superior de la figura 5 (Rock i), cuadro en blanco en el gráfico inferior) en comparación con el de las células añadidas sin el inhibidor (gráfico superior de la figura 5 (vehículo), cuadro relleno). Esto reveló que el inhibidor ROCK estimula la poliploidización de megacariocitos antes de la poliploidización, que se obtuvieron a partir de células madre embrionarias y adquirieron capacidad de proliferación como resultado de la expresión de un gen c-MYC y un gen BMI1.

#### 2-7-2. Influencia del inhibidor ROCK + cultivo en condiciones de temperatura elevada

**[0122]** Hasta la fecha, se ha dado a conocer que como resultado del cultivo de megacariocitos inmaduros a una temperatura de, por ejemplo, 39 °C, superior a la temperatura de cultivo habitual, se estimula la maduración de megacariocitos, incluida la poliploidización y la formación de proplaquetas (Documento no patente 5). Con el fin de confirmarlo en megacariocitos antes de la poliploidización que se han obtenido de células madre embrionarias, se analizó un nivel de expresión de genes (GATA1, PF4, NFE2 y  $\beta$ -tubulina) conocidos por mostrar expresión mejorada con la maduración de megacariocitos mediante la utilización de PCR cuantitativa.

**[0123]** Se estimuló la proliferación de megacariocitos antes de la poliploidización. Con el fin de suprimir la expresión del gen MYC y el gen BMI1 en los megacariocitos resultantes antes de la poliploidización, se llevó a cabo el cultivo durante 5 días en condiciones cambiadas, es decir, en presencia de doxiciclina y ausencia de estradiol a una temperatura de cultivo de 39 °C. A continuación, se llevó a cabo PCR cuantitativa para medir el nivel de expresión de los respectivos genes (FIG. 6). Como resultado, se descubrió que el nivel de expresión de los genes que actúan como indicador de la maduración de megacariocitos es mayor con cultivo a 39 °C que con cultivo a 37 °C.

#### 2-7-3. Influencia del inhibidor ROCK + expresión forzada de gen BCL-XL

**[0124]** Se suprimió la expresión de MYC/BMI1 en megacariocitos antes de la poliploidización y, al mismo tiempo, se introdujo un vector lentivirus similar al utilizado en 2-1 para la inducción de la expresión de BCL-XL en las células en presencia de doxiciclina.

**[0125]** Se analizó si la poliploidización de células progenitoras megacariocíticas se obtuvo a partir de un inhibidor ROCK mediante la presencia o ausencia de la expresión de un gen BCL-XL (FIG. 7).

**[0126]** Se analizó el grado de poliploidización (ensayo ploidía) mediante la supresión de la expresión de MYC/BMI1 en presencia de 10  $\mu$ M de Y27632 al tiempo que se indujo la supresión de BCL-XL y se cultivaron las células resultantes durante 7 días. Se confirmó que la cantidad de células poliploidizadas con 8N o más aumentó en gran medida en la línea celular expresada de BCL-XL (una barra sombreada en la figura 7B) en comparación con una línea celular (una barra en blanco en la figura 7B) en la que no se expresó BCL-XL. Además, se observó que la cantidad de células en las que se expresó BCL-XL mostraban un aumento gradual (■ en la figura 8) mientras que la cantidad de células en las que se expresó BCL-XL disminuye (▲ en la figura 8).

**[0127]** Esto indica que, con el fin de evitar la dependencia de oncogén en megacariocitos antes de la poliploidización que adquirieron una capacidad de proliferación elevada como resultado de la expresión forzada del oncogén, los genes que suprimen la apoptosis, tal como el gen BCL-XL, eran eficaces.

#### 2-7-4. Influencia del inhibidor ROCK + expresión forzada del gen BCL-XL + supresión del gen p53

**[0128]** Se estudió si la supresión de la expresión de p53 estimulaba la poliploidización de megacariocitos antes de la poliploidización o no.

**[0129]** Se suprimió la expresión del gen p53 como en 2-2 mediante infección con lentivirus a un MOI = 10 mediante la utilización de un vector lentivirus FG12 en el que se había introducido un promotor, shp53.

**[0130]** Después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1, la expresión forzada de BCL-XL y la supresión de la expresión de p53 en presencia de Y27632, se llevó a cabo el cultivo durante 7 días a 39 °C. Después del cultivo, se analizó el grado de poliploidización. Como resultado, se descubrió que, en comparación con las células control (barra en negro en la figura 9B) en las que no se redujo p53, las células (barra en blanco en la figura 9B) en las que se redujo p53 mostraron un aumento de la cantidad de células con 8N y se estimuló la poliploidización.

#### 2-7-5. Influencia del inhibidor ROCK + expresión forzada del gen BCL-XL + supresión del gen p53 + ácido valproico

**[0131]** Se analizó la influencia en la poliploidización mediante tratamiento adicional de las células, que se sometieron al tratamiento de 2-7-4, con ácido valproico. Después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1, la expresión forzada de BCL-XL, el tratamiento con el inhibidor ROCK (10  $\mu$ M) y la supresión de la expresión de p53, se añadió ácido valproico (concentración final: 0,5 mM) al medio y el cultivo se llevó a cabo a 39 °C durante 7 días. Como resultado, se descubrió que las células (barra en blanco en la figura 10B) tratadas con ácido valproico mostraron poliploidización estimulada en comparación con las células control (barra en negro en la figura 10B) que no se sometieron a tratamiento con ácido valproico.

2-7-6. Influencia de la expresión forzada del gen BCL-XL + inhibidor de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina e influencia del inhibidor ROCK + expresión forzada del gen BCL-XL + supresión del gen p53 + ácido valproico + inhibidor de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina

**[0132]** Se analizó si el tratamiento de megacariocitos cuya poliploidización no se ha desarrollado suficientemente con blebbistatin, es decir, un inhibidor de IIA/B ATPasa de cadena pesada de miosina, presentó una influencia en el grado de poliploidización. Después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1, la expresión forzada de BCL-XL y el tratamiento con blebbistatin (10  $\mu$ g/ml), se cultivaron las células resultantes a 39 °C durante 7 días. Se descubrió que la cantidad de células con 8N o más era superior en las células sometidas a tratamiento con blebbistatin (barra en blanco en la figura 11) que en las células no sometidas a tratamiento con blebbistatin (barra en negro en la figura 11B) y mostraron una poliploidización estimulada.

**[0133]** A continuación, se analizó el grado de poliploidización cuando se utilizó el tratamiento con blebbistatin en combinación con los otros tratamientos. Las células se sometieron a tratamiento con blebbistatin además de los tratamientos mencionados anteriormente en la Sección 2-7-5 y se analizó su influencia en la poliploidización. Después de la supresión de la expresión de MYC/BMI1, la expresión forzada de BCL-XL, el tratamiento con un inhibidor ROCK (10  $\mu$ M), la supresión de la expresión de p53 y el tratamiento con ácido valproico (0,5 mM), se llevó a cabo el tratamiento con blebbistatin (10  $\mu$ g/ml) y, a continuación, se cultivaron las células resultantes a 39 °C durante 7 días. Se descubrió que la cantidad de células con 8N o más era superior en las células sometidas a tratamiento con blebbistatin (barra en blanco en la figura 12) que en las células control no sometidas a tratamiento con blebbistatin (barra en negro en la figura 12b), lo que mostraba que los tratamientos estimularon la poliploidización. Asimismo, después del cultivo durante 7 días, las células tratadas con blebbistatin mostraron una ligera deterioración en la capacidad de proliferación (gráfico superior en la figura 13) pero se observó hipertrofia del citoplasma. Por lo tanto, se confirmó la inducción a megacariocitos maduros (gráfico inferior en la figura 13).

### 3. Producción de plaquetas a partir de megacariocitos poliploidizados

#### 3-1. Influencia de la supresión de la expresión de BCL-XL en la producción de plaquetas (1)

**[0134]** En células alimentadoras 10T1/2, se sembraron  $2 \times 10^5$  células iMKPC-tipo II obtenidas en la Sección 2-2 y, a continuación, se cultivaron a 39 °C en presencia de 0,5  $\mu$ g/ml de Dox (BCL-XL ON) o después de la eliminación de Dox del medio de cultivo (BCL-XL OFF). El día 3-4, se analizaron los megacariocitos y las plaquetas en el medio de cultivo con un citómetro de flujo después de una tinción con un anticuerpo CD41 y un anticuerpo CD42.

**[0135]** Los resultados se muestran en la figura 14. Se descubrió que la población (B) en la que se suprimió la expresión de BclxL mediante DOX OFF está compuesta, principalmente, por megacariocitos maduros en los que se expresó CD42b (B) en comparación con los megacariocitos (A) en los que se expresó BCL-XL mediante Dox ON. También se descubrió que, con respecto a las plaquetas liberadas de los mismos, una proporción de las plaquetas en las que se expresó CD42b necesario para la expresión de la función aumentó (D) en comparación con la de las plaquetas (C) liberadas de los megacariocitos de BCL-XL ON.

#### 3-2. Influencia de la supresión de la expresión de BCL-XL en la producción de plaquetas (2)

**[0136]** En la figura 15 se muestran los resultados de medición de la cantidad de células cuando la expresión de BCL-XL era ON u OFF, a partir de los resultados similares a los que se muestran en la Sección 3-1. La cantidad de plaquetas aumentó notablemente en la población en la que se había suprimido la expresión de BCL-XL.

**[0137]** A muestra la cantidad de plaquetas CD42b positivas; B muestra la cantidad de megacariocitos CD41a positivos/CD42b positivos y C muestra la cantidad de megacariocitos CD41a positivos.

**[0138]** No se observó influencia alguna de la expresión de BclxL en la cantidad de megacariocitos en los que se expresó CD41 (C), pero se supuso que una proporción de expresión de CD42b en CD41 + aumentó debido a la supresión de la expresión de BclxL y la cantidad de megacariocitos maduros aumentó.

#### 3-3. Influencia de la temperatura de cultivo en la producción de plaquetas

**[0139]** En células alimentadoras 10T1/2, se sembraron entre 2 y  $3 \times 10^5$  células iMKPC-tipo II y se cultivaron durante 3 días a temperaturas de cultivo de 35, 37 y 39 °C con o sin adición de 0,5  $\mu$ g/mL de Dox. Se analizaron

las plaquetas contenidas en el sobrenadante con un citómetro de flujo después de una tinción con un anticuerpo CD41 y un anticuerpo CD42b. En la figura 16, se muestra la desviación típica y media de la cantidad de plaquetas CD41a + CD42b de cada población, donde 37 °C Dox+ equivale a 1.

5 **[0140]** A partir de los resultados, se descubrió que las temperaturas de cultivo de 37 °C o de 39 °C son adecuadas. En los ensayos que se llevaron a cabo posteriormente, se fijó la temperatura de cultivo en 37 °C.

**[0141]** 3-4. Influencia de las células alimentadoras, la utilización de suero para el cultivo y la presencia o ausencia de blebbistatin en la producción de plaquetas

10 **[0142]** Se midió una eficacia de producción de plaquetas con las condiciones siguientes combinadas, como se muestra en la figura 17: utilización/no utilización de células alimentadoras, utilización/no utilización de medio condicionado, utilización de medio con suero/utilización de medio exento de suero y administración/no administración de blebbistatin.

15 **[0143]** El medio condicionado se preparó con la siembra de  $8 \times 10^5$  células 10T1/2 tratadas con MMC en una placa de 10 cm sometida a recubrimiento con gelatina, con el cambio del medio con 10 ml de un medio de diferenciación (EBM) que contenía SCF (50 ng/ml) y TPO (50 ng/ml) y que contenía, además, un 15 % de suero o que no contenía un suero el día siguiente (después de la adhesión de las células), con la recuperación del medio y la adición de 10 ml de un nuevo medio (que contenía SCF y TPO) 24 horas más tarde, con la mezcla del medio condicionado tres días y con la filtración del medio a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar las células 10T1/2. Cuando se utilizó el medio resultante para realizar ensayos, se volvió a añadir SCF y TPO.

20 **[0144]** En una célula alimentadora, mediante la utilización de población, se sembraron entre 2 y  $3 \times 10^5$  células iMKPC-tipo II en células alimentadoras 10T1/2, mientras que en la población sin utilización, las células se sembraron en una placa recubierta de gelatina de manera similar. En el medio con suero, mediante la utilización de población, se utilizó un medio de diferenciación con un 15 % de suero o medio condicionado, mientras que en la población de administración de blebbistatin, se añadieron 5  $\mu\text{M}$  de blebbistatin al medio. El cultivo se realizó a 37 °C durante 3 días.

25 **[0145]** Se analizaron las plaquetas contenidas en el sobrenadante del medio con un citómetro de flujo después de una tinción con un anticuerpo CD41 y un anticuerpo CD42b. Con las células obtenidas mediante cultivo en células alimentadoras con la adición de un 15 % de suero, sin la adición de blebbistatin, como células de condición normal, en el gráfico de barras de la figura 17 se muestra la desviación típica y media de una proporción de la cantidad de plaquetas CD41+ CD42b en cada población con respecto a las de la condición normal. No se observó ninguna diferencia considerable en la producción de plaquetas entre las poblaciones.

30

**[0146]** En la figura 18, se muestra una comparación del nivel de expresión de CD42b en plaquetas CD41 positivas en cada población (una proporción de la intensidad de la fluorescencia media de cada población con respecto a la intensidad de la fluorescencia media de la condición normal). En condiciones exentas de suero y exentas de célula alimentadora, se produjeron las plaquetas con la expresión de CD42b más elevada. No se observó influencia de blebbistatin.

35

**[0147]** En la figura 19, se muestra un ejemplo de las condiciones optimizadas. En la figura 20, se muestra una proporción de plaquetas CD41 positivas y CD42b positivas (que pueden denominarse "GPIba") en un cultivo con las condiciones optimizadas.

40 **[0148]** Como se muestra en la figura 20, en las plaquetas producidas a partir de los megacariocitos poliploidizados obtenidos mediante la presente invención, aproximadamente un 20 % eran CD41 positivas y CD42b positivas. Cuando se suprimió la expresión de BCL-XL, la proporción aumentó hasta un 55 % y cuando el cultivo se realizó con la eliminación de las células alimentadoras y el suero añadido, la proporción aumentó incluso hasta un 81 %.

4. Importancia de la expresión de CD42b para la función de plaquetas (referencia)

45 **[0149]** Se midió un efecto inhibitorio de un anticuerpo HIP1 en una reacción de aglutinación por ristocetina (reacción de aglutinación a través de vWF y un receptor [aquí, pentámero compuesto por GPIba, GPIX y similares] en plaquetas) mediante la utilización de plaquetas de sangre periférica humana. El anticuerpo HIP1 era un anticuerpo inhibidor de función de GPIba.

50 **[0150]** Después de que se inhibiera el efecto de GPIba mediante la suspensión de  $1 \times 10^8$  plaquetas en un 50 % de plasma sanguíneo, la adición de un anticuerpo HIP1 al mismo y el precultivo a 37 °C durante 3 segundos, se añadió ristocetina (concentración final: 2 mg/ml) para inducir una reacción de aglutinación y se monitorizó la transmisión de la luz durante 7 minutos. En el gráfico de barras de la figura 21, se muestra la transmisión de la luz máxima (que muestra la intensidad de la aglutinación) de cada población. El anticuerpo HIP1 inhibió completamente la aglutinación debido a la asociación del factor de von Willebrand (vWF) GPIb/alfa a una

55 concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  o mayor.

**[0151]** A continuación, se administraron 100 ug de un anticuerpo HIP1 o IgC control en ratones NOG y se trasplantaron las plaquetas teñidas con TAMRA (tinte rojo). Se expuso el endotelio vascular a láser con el fin de dañarlo e inducir la formación de trombos. Se contó la cantidad de plaquetas humanas (rojas) que habían contribuido a la formación de trombos.

- 5 **[0152]** En el gráfico de barras de la figura 22, se muestra la desviación típica y media de la cantidad de plaquetas humanas en los trombos corregida con una longitud de vaso sanguíneo unitaria. En el grupo al que se administró anticuerpo HIP1, se inhibió la contribución de plaquetas humanas a los trombos.

**[0153]** Por lo tanto, se observó que GPIba (CD42b) es una molécula que cumple una función importante en la formación de trombos tanto *in vivo* como *in vitro*.

- 10 Aplicabilidad industrial

**[0154]** La presente invención da a conocer un método de estimulación de la poliploidización de células progenitoras megacariocíticas y, además, de inducción de forma eficiente de la liberación de plaquetas. En particular, el método de la presente invención es muy eficaz para la preparación de megacariocitos o plaquetas *in vitro* a partir de diversas células madre y contribuye, en gran medida, al desarrollo de curas en campos médicos o en productos sanguíneos.

- 15

#### LISTA DE SECUENCIAS

##### **[0155]**

<110> The University of Tokyo

<120> Método de producción de megacariocito poliploidizado y plaqueta

- 20

<130> T0529ADP0012

<150> JP 2011-108253

< 151> 2011-05-13

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

- 25

<210> 1

< 211> 1319

< 212> DNA

< 213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 659 262 T3

atgccctca acgtagctt caccaacag aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag 60  
 ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg 120  
 cagcccccg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc cccccgccc 180  
 ctgtccccta gccgcccctc cgggctctgc tcgccctcct acgttgccgt cacacccttc 240  
 tccttcggg gagacaacga cggcgggtggc gggagcttct ccacggccga ccagctggag 300  
 atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg cgaccggac 360  
 gaggagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgta tgtggagcgg cttctcggcc 420  
 gccgccaagc tcgtctcaga gaagctggcc tcctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc 480  
 agcccgaacc ccgcccgcg ccacagcgtc tgctccacct ccagcttgta cctgcaggat 540  
 ctgagcggcg ccgctcagag tgcatcgacc cctcggtggt cttcccctac cctctcaacg 600  
 acagcagctc gcccaagtcc tgcgcctcgc aagactccag cgccttctct ccgtcctcgg 660  
 attctctgct ctctcagacg gagtctctcc cgcagggcag ccccagagccc ctggtgctcc 720  
 atgaggagac accgcccacc accagcagcg actctgagga ggaacaagaa gatgaggaag 780  
 aaatcgatgt tgtttctgtg gaaaagaggc aggctcctgg caaaaggcca gagtctggat 840  
 caccttctgc tggaggccac agcaaacctc ctcacagccc actggtcctc aagaggtgcc 900  
 acgtctccac acatcagcac aactacgcag cgcctccctc cactcgggaag gactatcctg 960  
 ctgccaagag ggtcaagttg gacagtgtca gagtctgag acagatcagc aacaaccgaa 1020  
 aatgcaccag cccaggtcc tcggacaccg aggagaatgt caagaggcga acacacaacg 1080  
 tcttgagcgc ccagaggagg aacgagctaa aacggagctt tttgcccctg cgtgaccaga 1140  
 tcccggagt ggaaaacaat gaaaaggccc ccaagtagt taccctaaa aaagccacag 1200  
 catacatcct gtccgtccaa gcagaggagc aaaagctcat ttctgaagag gacttgttgc 1260  
 ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac ttgaacagct acggaactct tgtgcgtaa 1319

<210> 2

< 211> 981

5 < 212> DNA

< 213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 659 262 T3

atgcatcgaa caacgagaat caagatcact gagctaaatc cccacctgat gtgtgtgctt	60
tgtggagggt acttcattga tgccacaacc ataatagaat gtctacattc cttctgtaaa	120
acgtgtattg ttcgttacct ggagaccagc aagtattgtc ctatttgtga tgtccaagtt	180
cacaagacca gaccactact gaatataagg tcagataaaa ctctccaaga tattgtatac	240
aaattagttc cagggctttt caaaaatgaa atgaagagaa gaagggattt ttatgcagct	300
catccttctg ctgatgctgc caatggctct aatgaagata gaggagaggt tgcagatgaa	360
gataagagaa ttataactga tgatgagata ataagcttat ccattgaatt ctttgaccag	420
aacagattgg atcggaaagt aaacaaagac aaagagaaat ctaaggagga ggtgaatgat	480
aaaagatact tacgatgcc agcagcaatg actgtgatgc acttaagaaa gtttctcaga	540
agtaaaatgg acatacctaa tactttccag attgatgtca tgtatgagga ggaacctta	600
aaggattatt atacactaat ggatattgcc tacatttata cctggagaag gaatggtcca	660
cttcattga aatacagagt tcgacctact tghtaaagaa tgaagatcag tcaccagaga	720
gatggactga caaatgctgg agaactggaa agtgactctg ggagtgacaa ggccaacagc	780
ccagcaggag gtattccctc cacctcttct tgtttgccta gccccagtac tccagtgcag	840
tctcctcatc cacagtttcc tcacatttcc agtactatga atggaaccag caacagcccc	900
agcggtaacc accaatcttc ttttgccaat agacctcgaa aatcatcagt aatgggtca	960
tcagcaactt cttctggttg a	981
<210> 3	
< 211> 702	
< 212> DNA	
5 < 213> Homo sapiens	
<400> 3	
atgtctcaga gcaaccggga gctggtggtt gactttctct cctacaagct ttcccagaaa	60
ggatacagct ggagtcagtt tagtgatgtg gaagagaaca ggactgaggc cccagaaggg	120
actgaatcgg agatggagac ccccagtgcc atcaatggca acccatcctg gcacctggca	180
gacagccccg cggatgaatgg agccactggc cacagcagca gtttggatgc cggggaggtg	240
atccccatgg cagcagtaaa gcaagcgtg agggaggcag gcgacgagtt tgaactgcgg	300
taccggcggg cattcagtga cctgacatcc cagctccaca tcaccccagg gacagcatat	360
cagagctttg aacaggtagt gaatgaactc ttccgggatg gggtaaactg gggtcgcatt	420
gtggcctttt tctccttogg cggggcactg tgcgtggaaa gcgtagacaa ggagatgcag	480
gtattggtga gtcggatcgc agcttggtg gccacttacc tgaatgacca cctagagcct	540
tggatccagg agaacggcgg ctgggatact tttgtggaac tctatgggaa caatgcagca	600
gccgagagcc gaaagggcca ggaacgcttc aaccgctggt tcctgacggg catgactgtg	660
gccggcgtgg ttctgctggg ctcaactctc agtcggaat ga	702

**REIVINDICACIONES**

1. Método de producción de megacariocitos poliploidizados, donde el método comprende la etapa de obtención de los megacariocitos forzando la expresión de un oncogén seleccionado de la familia de genes MYC, y BMI1, en células en cualquier fase de diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en megacariocitos antes de la poliploidización, forzando la expresión de BCL-XL en megacariocitos antes de la poliploidización, y cultivo y proliferación de las células resultantes, preferiblemente donde un gen c-MYC se utiliza como oncogén.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde en la etapa de cultivo, se inhibe la expresión o función de un producto génico p53.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde en la etapa de cultivo, se somete a los megacariocitos antes de la poliploidización a al menos uno de los siguientes (a) a (c):
  - (a) tratamiento con un inhibidor de función de complejo de actomiosina;
  - (b) tratamiento con un inhibidor ROCK; y
  - (c) tratamiento con un inhibidor HDAC, preferiblemente donde,
 

el inhibidor ROCK es Y27632; el inhibidor HDAC es ácido valproico; y el inhibidor de función de complejo de actomiosina es blebbistatin.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la etapa de cultivo se lleva a cabo a una temperatura superior a 37° C.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las células progenitoras hematopoyéticas se obtienen de células seleccionadas del grupo que consiste en células iPS, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, preferiblemente donde dichas células madre hematopoyéticas se obtienen de sangre de cordón umbilical, sangre de médula ósea o sangre periférica.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que también comprende la etapa de supresión de la expresión forzada de BCL-XL.
7. Método de producción de una plaqueta, que comprende:
 

la obtención de megacariocitos poliploidizados mediante la utilización del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y el cultivo de las células; y la recolección de una plaqueta del cultivo de los megacariocitos poliploidizados, donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo al tiempo que se suprime la expresión de BCL-XL que se ha expresado de forma forzada o después de que se elimine BCL-XL de las células.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo en ausencia de un suero y/o en ausencia de una célula alimentadora.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo entre 1 día y 15 días.
10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados se lleva a cabo a 37 °C.
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde en la etapa de cultivo de los megacariocitos poliploidizados, se añade un inhibidor ROCK y/o un inhibidor de función de complejo de actomiosina a un medio, preferiblemente donde el inhibidor ROCK es Y27632 y el inhibidor de función de complejo de actomiosina es blebbistatin.

FIG. 1A

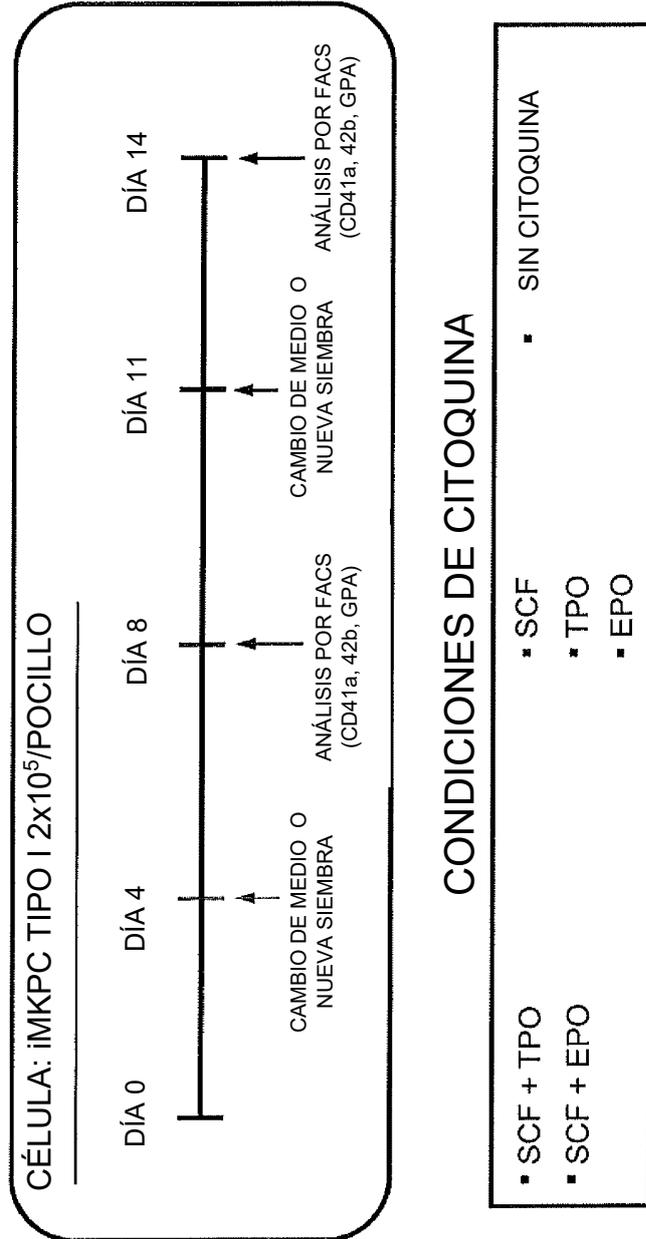


FIG. 1B

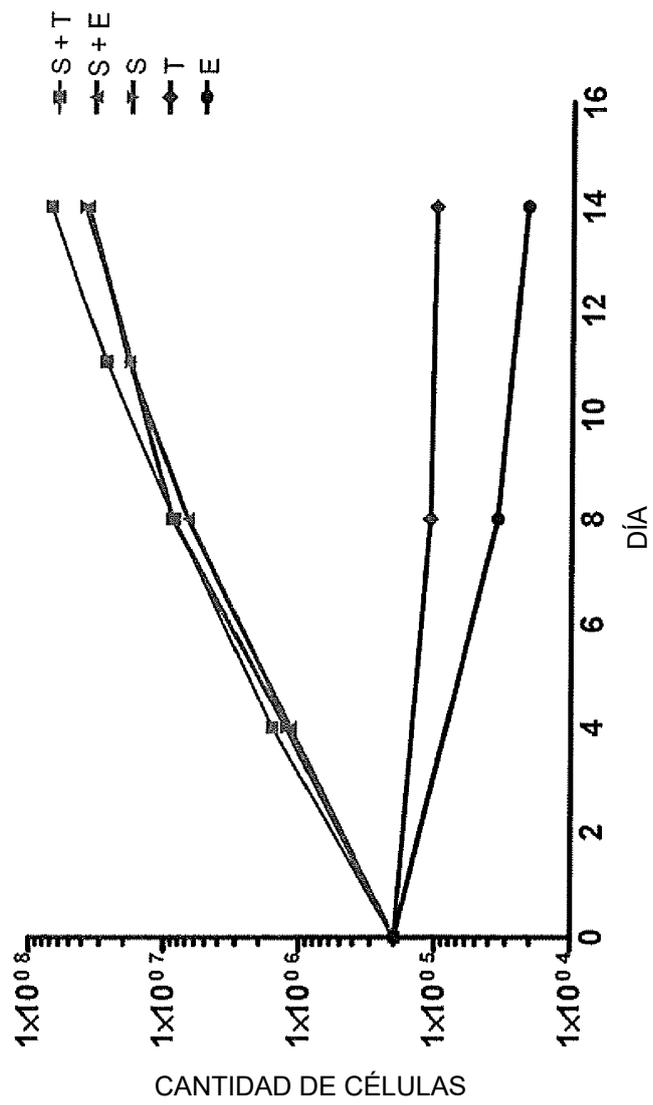


FIG. 1C

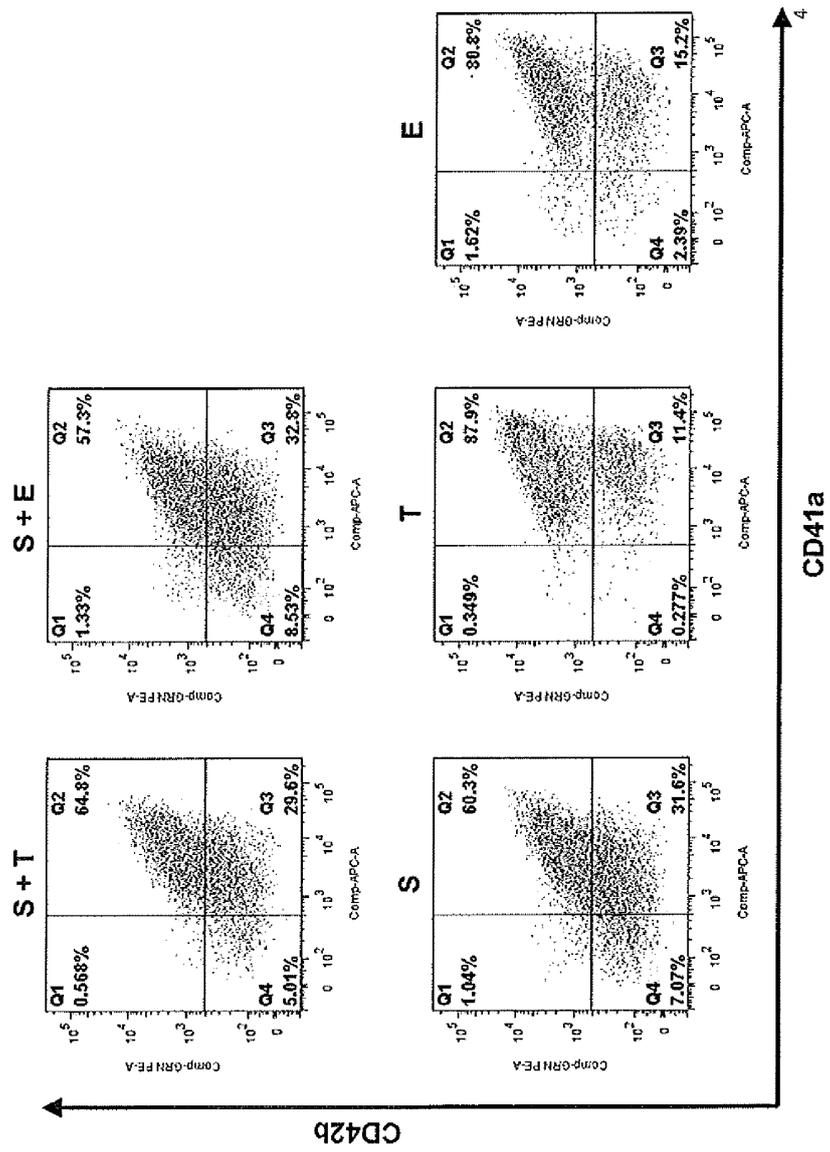


FIG. 1D

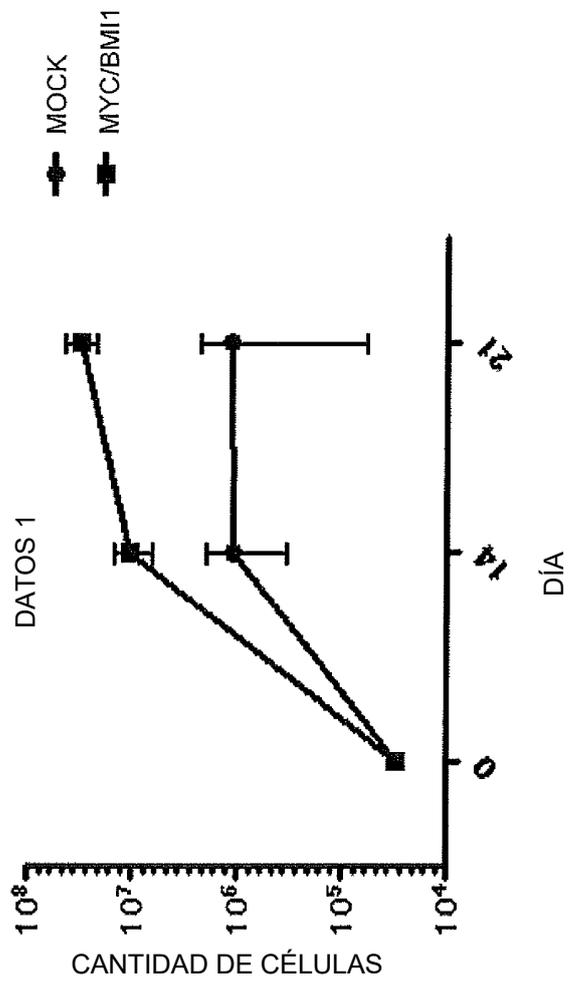


FIG. 2A

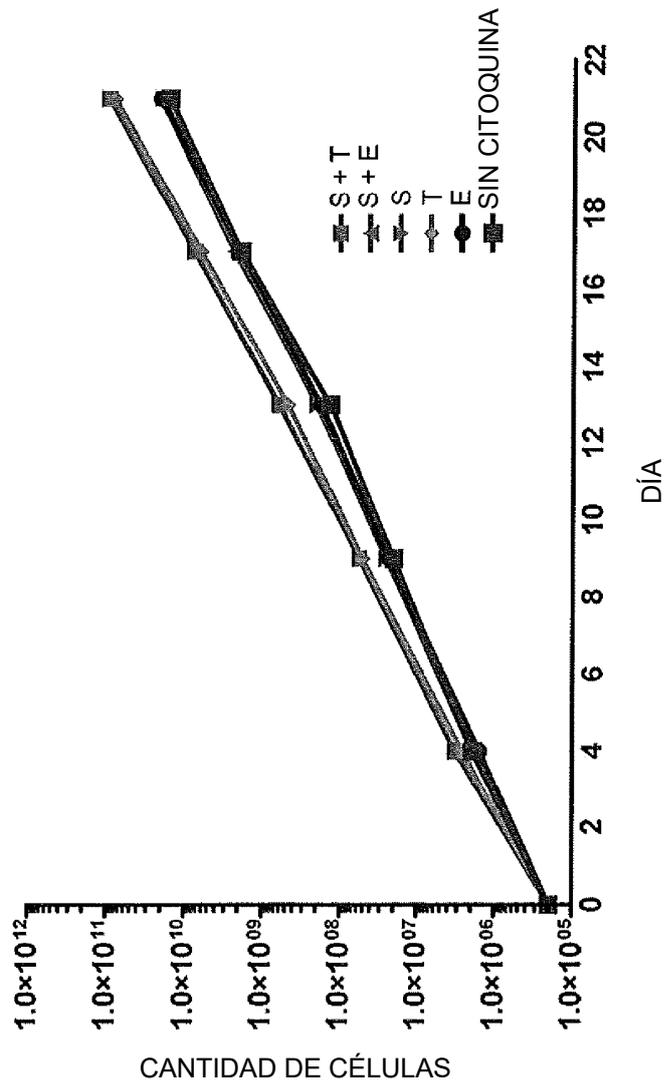


FIG. 2B

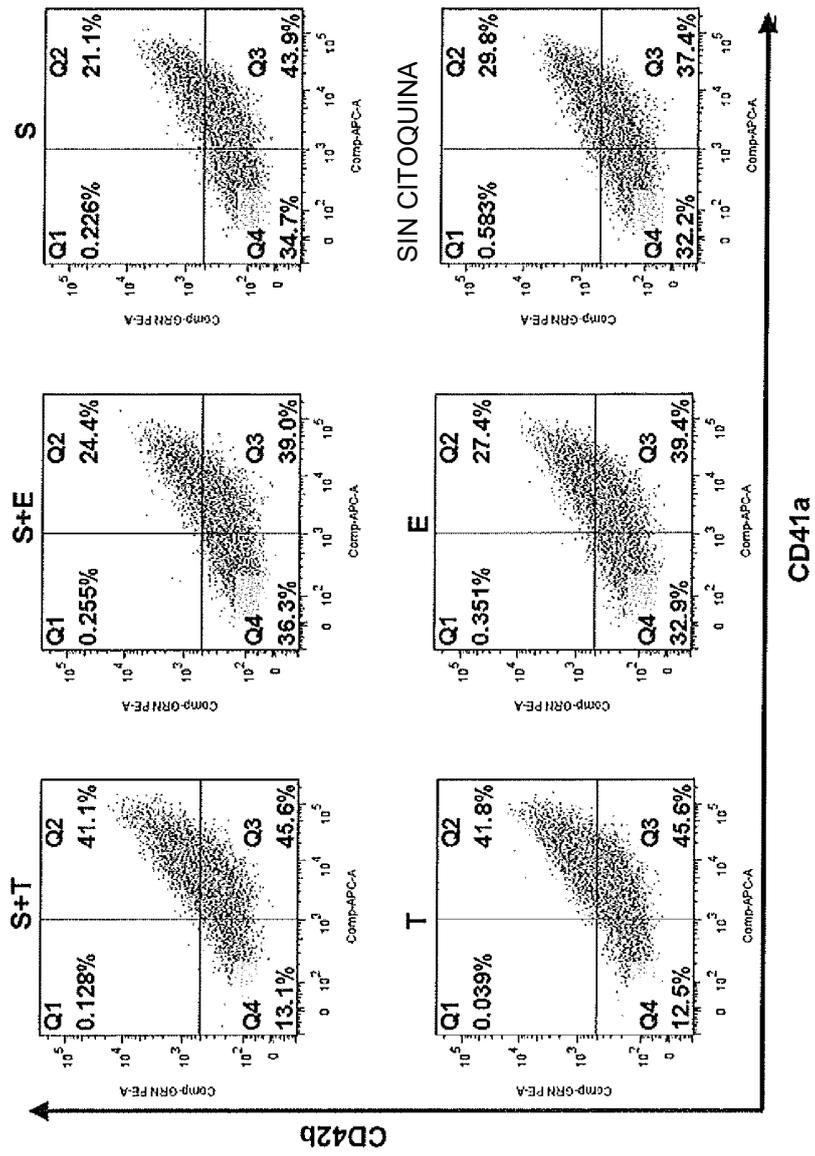


FIG. 3

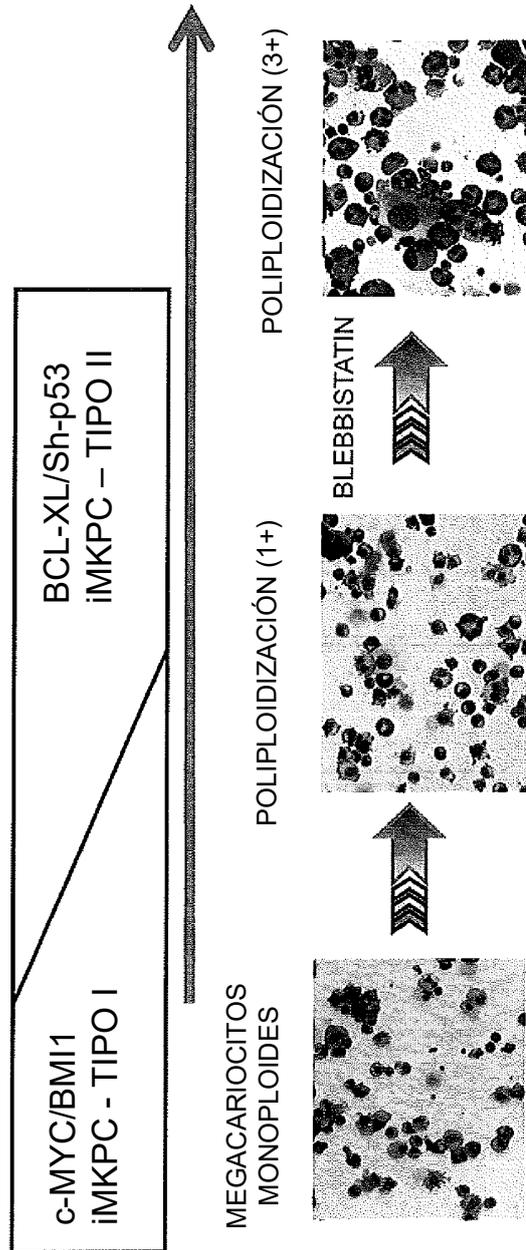


FIG. 4

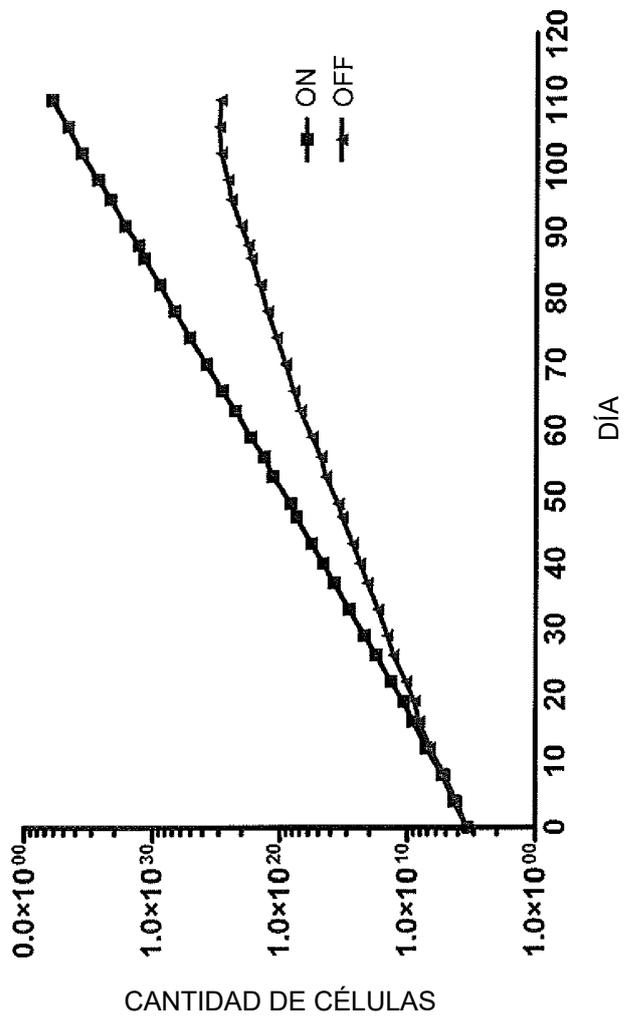
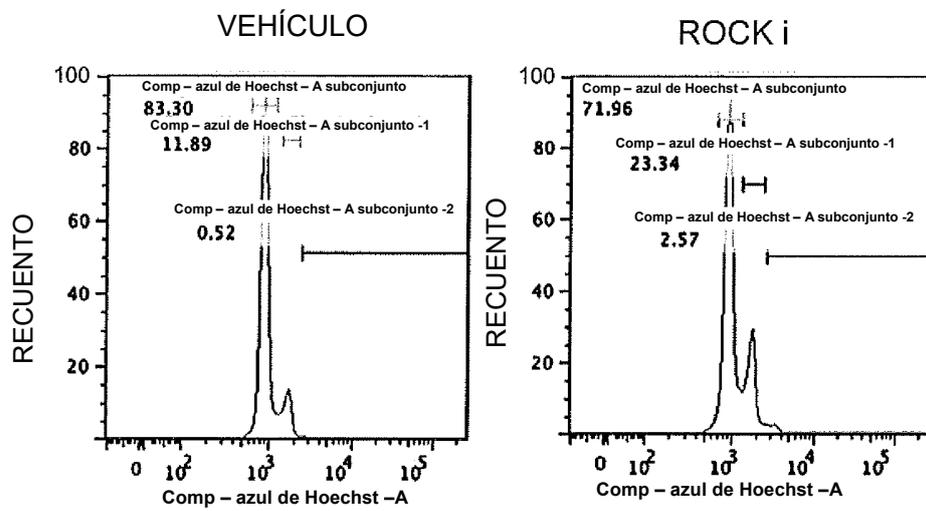


FIG. 5

**A**



**B**

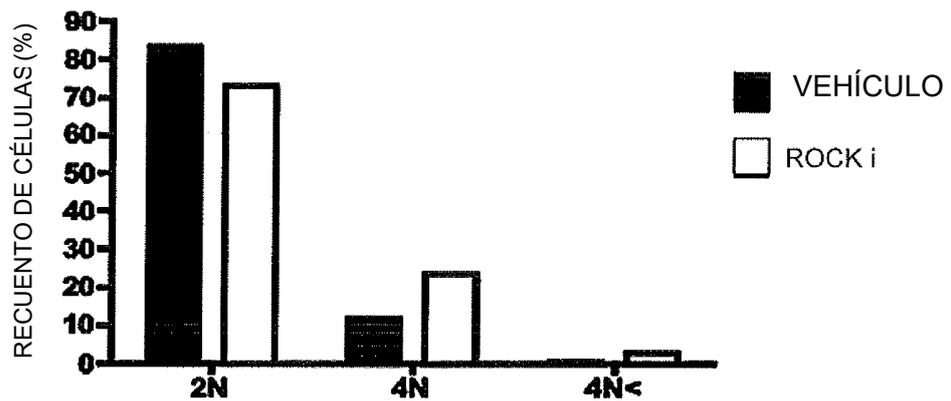


FIG. 6

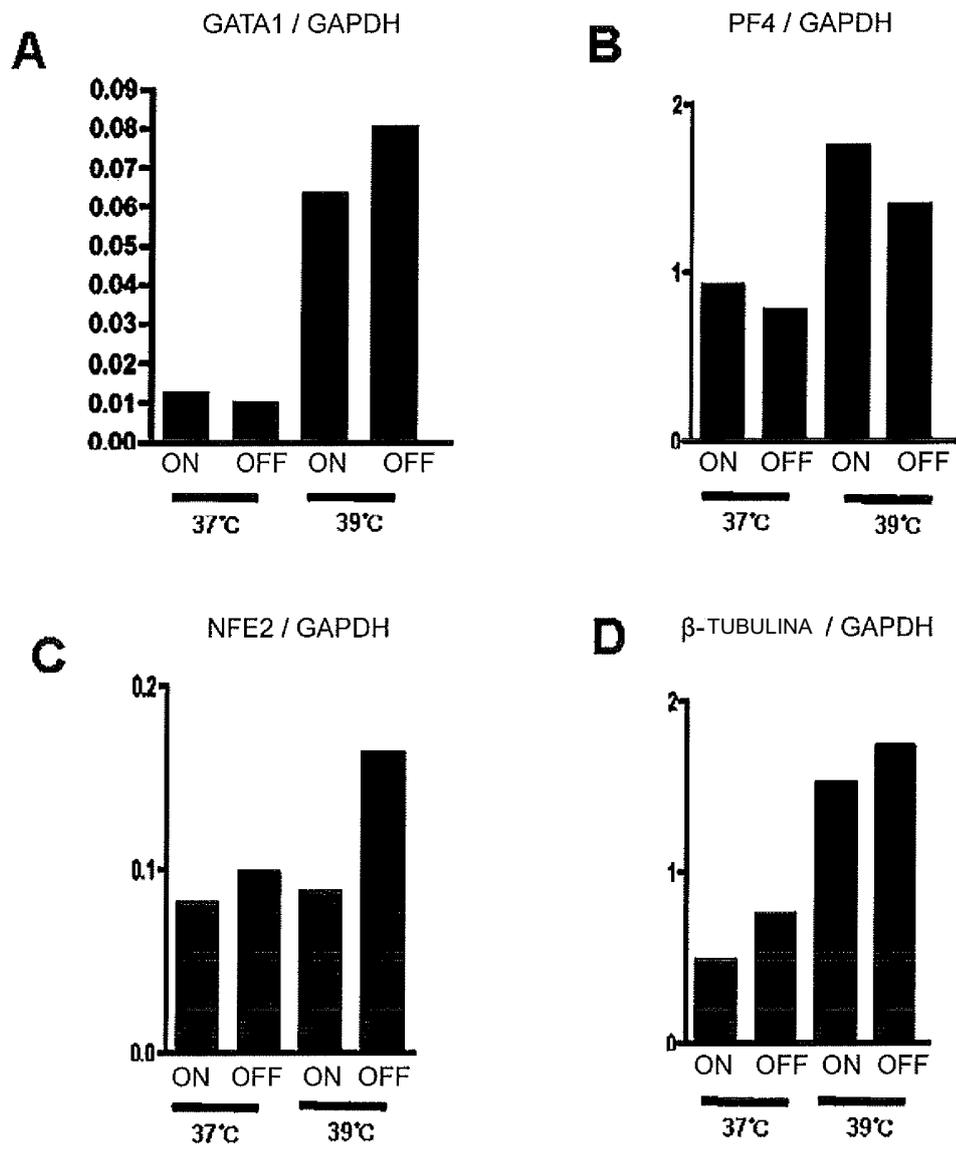


FIG. 7

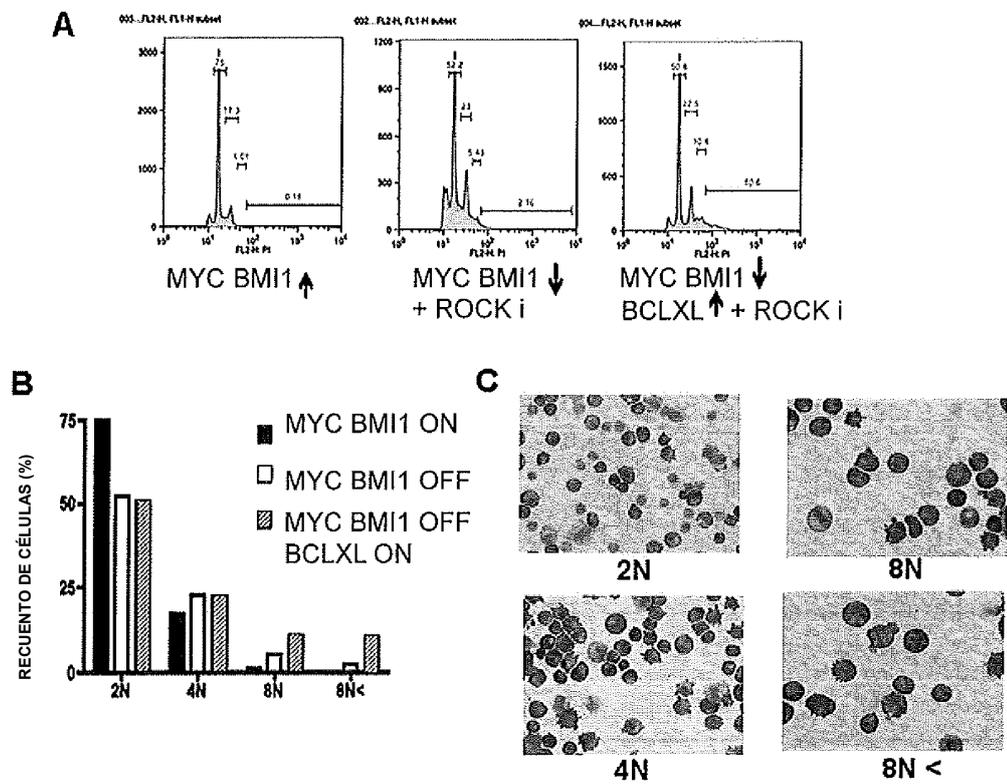


FIG. 8

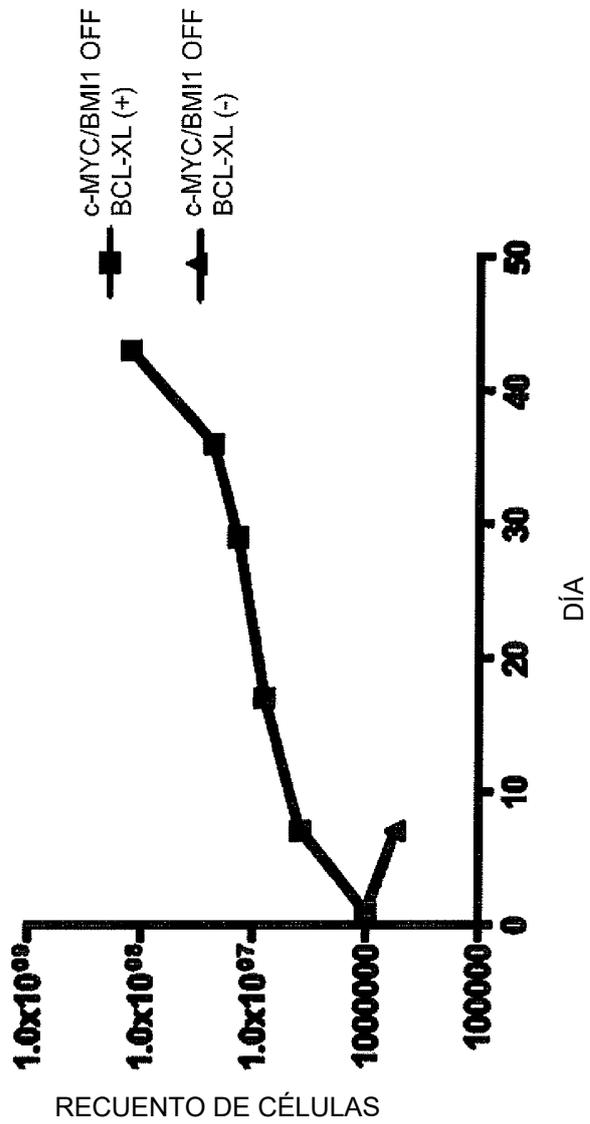


FIG. 9

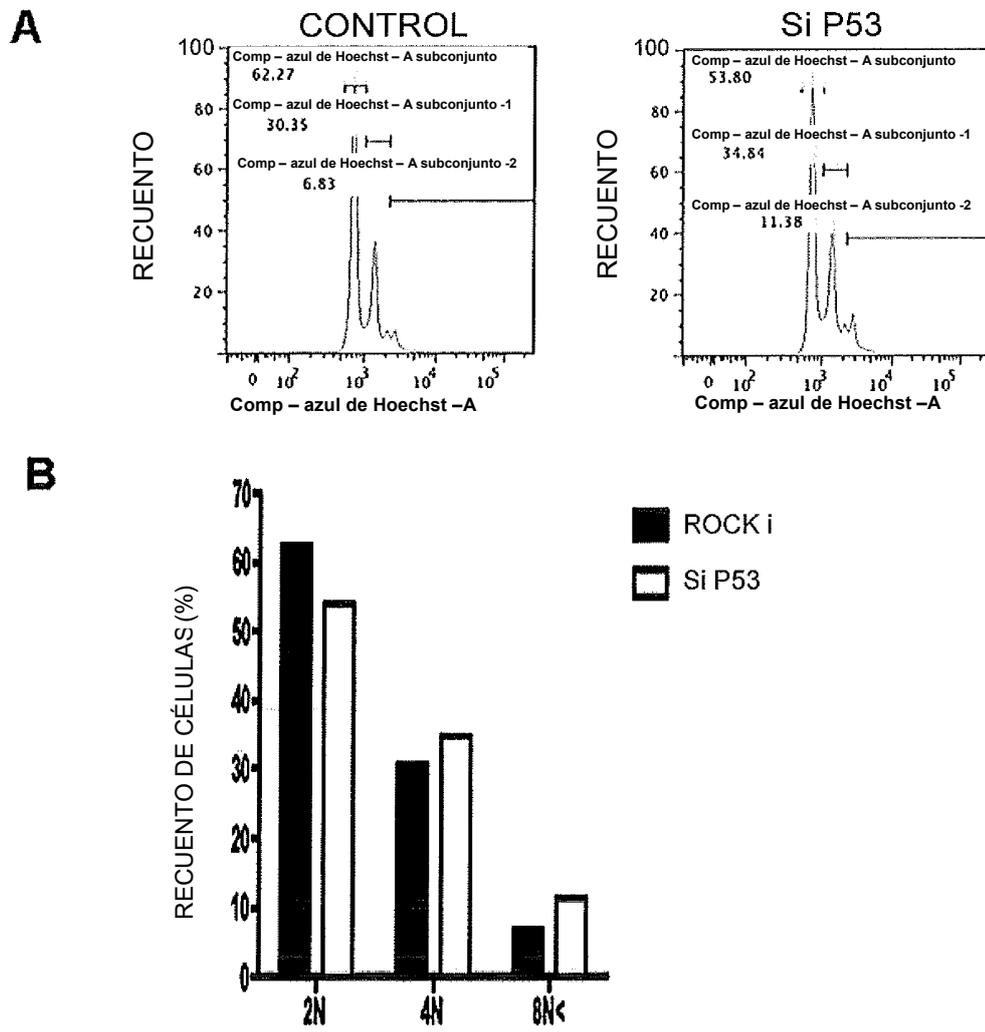


FIG. 10

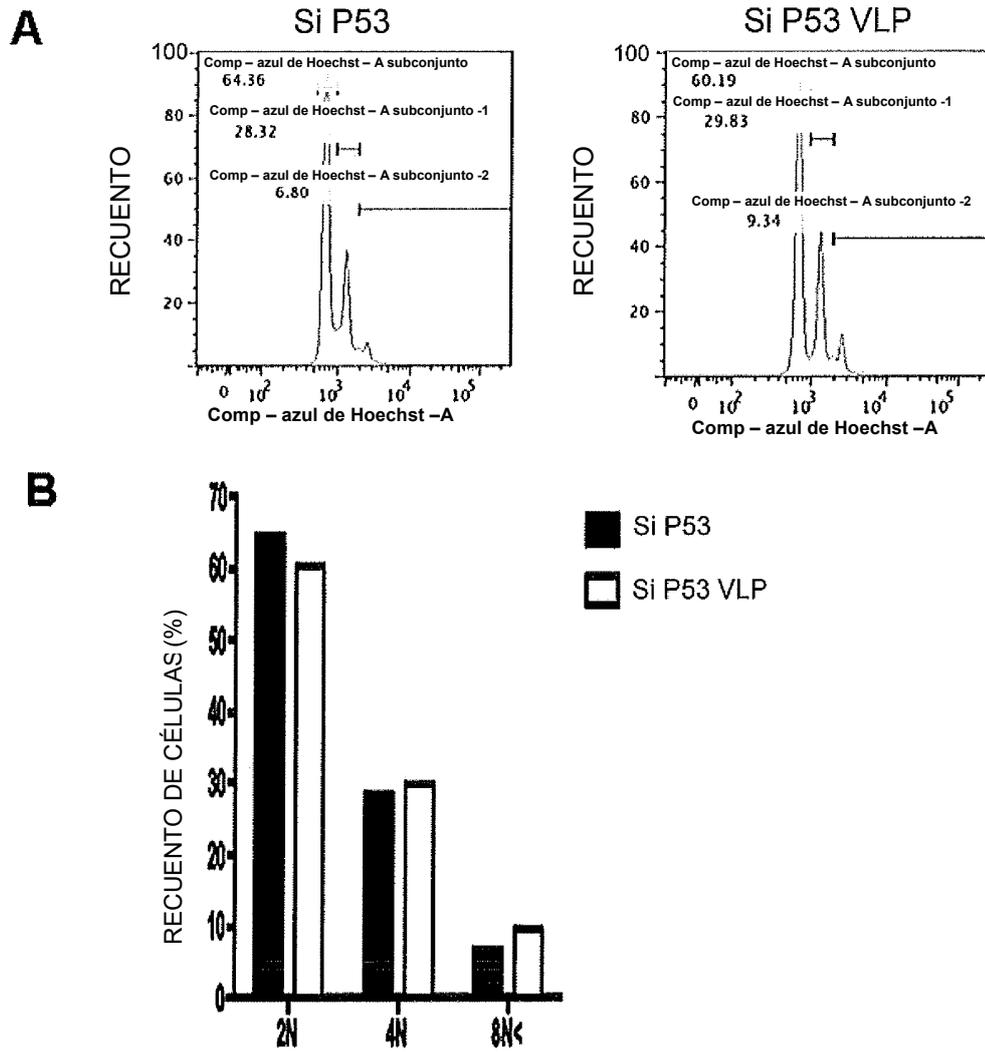
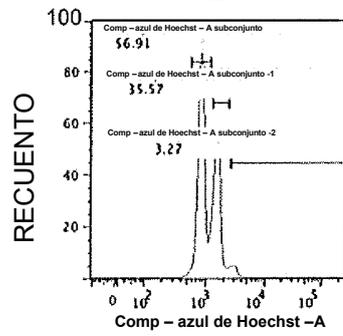


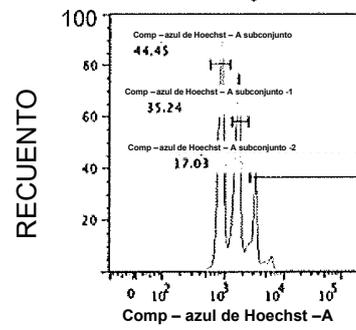
FIG. 11

A

BLEBBISTATIN -



+



B

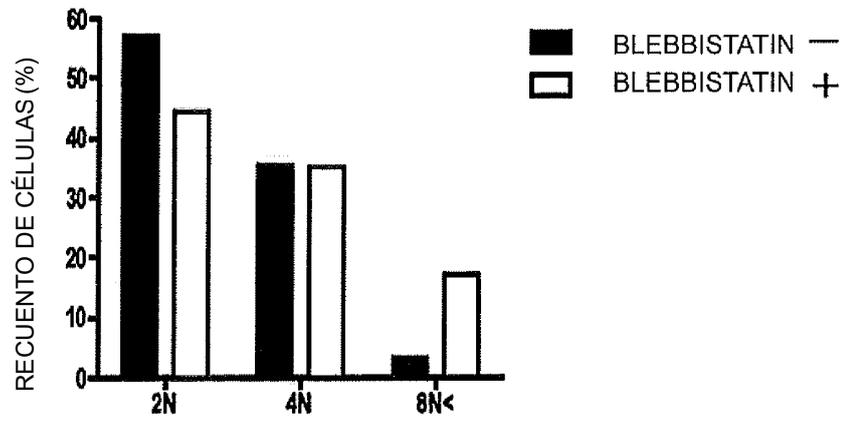


FIG. 12

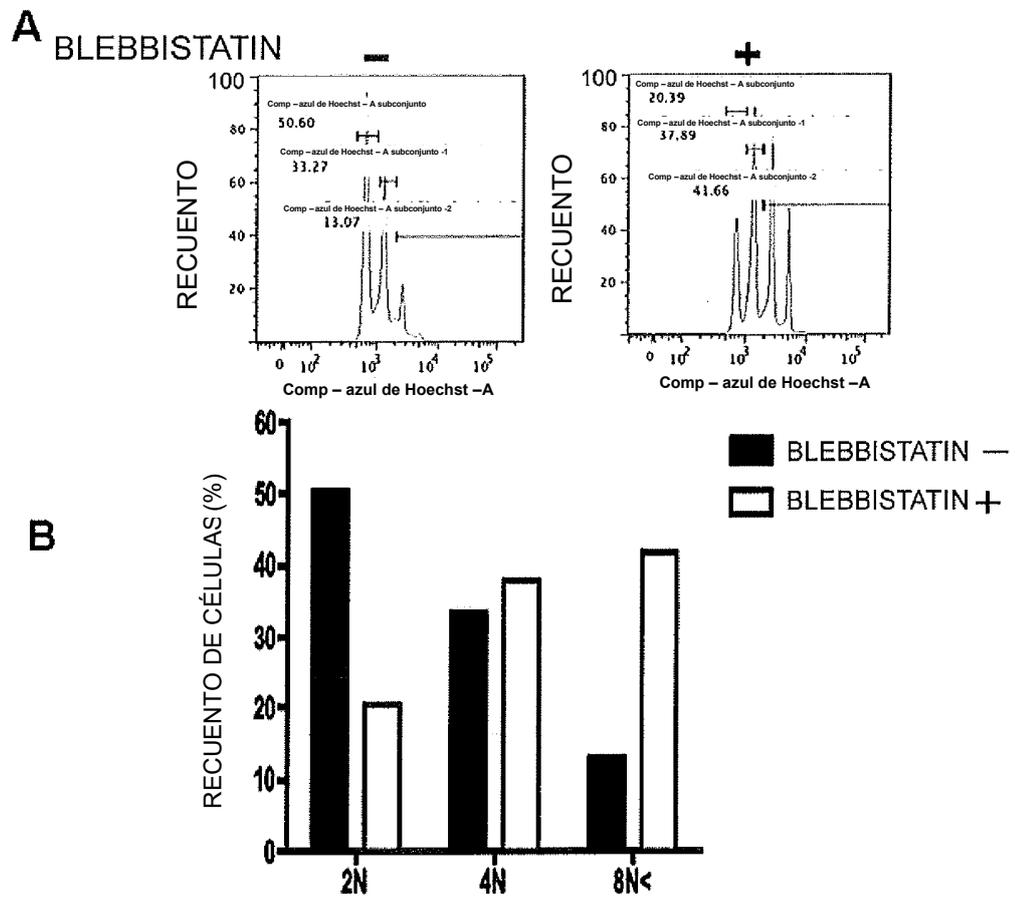


FIG. 13

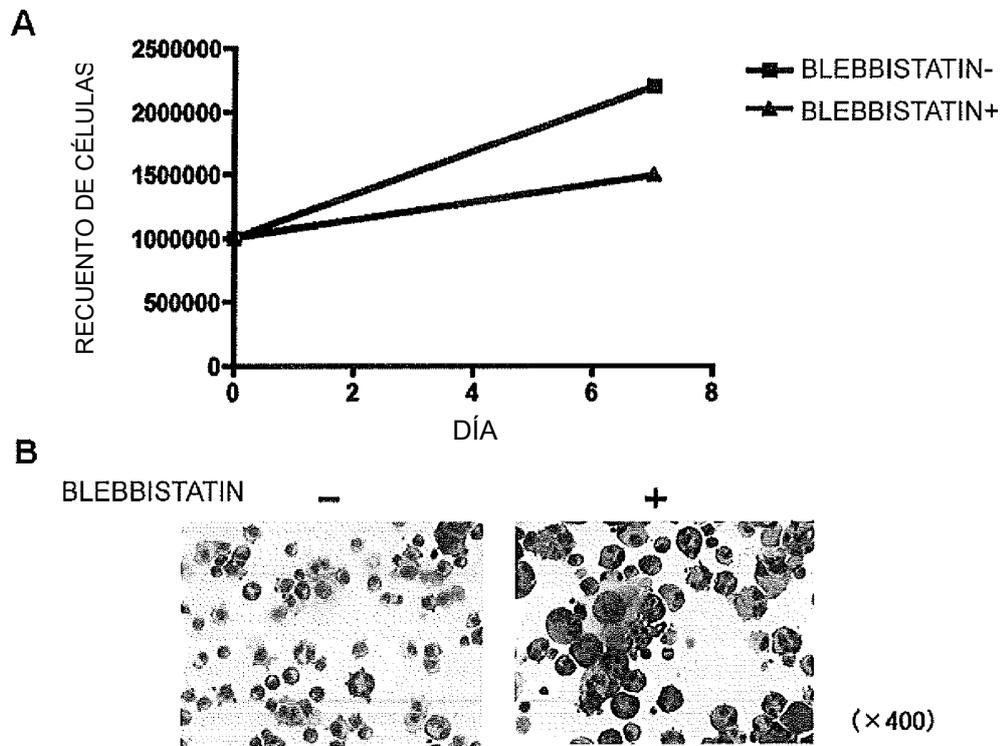


FIG. 14

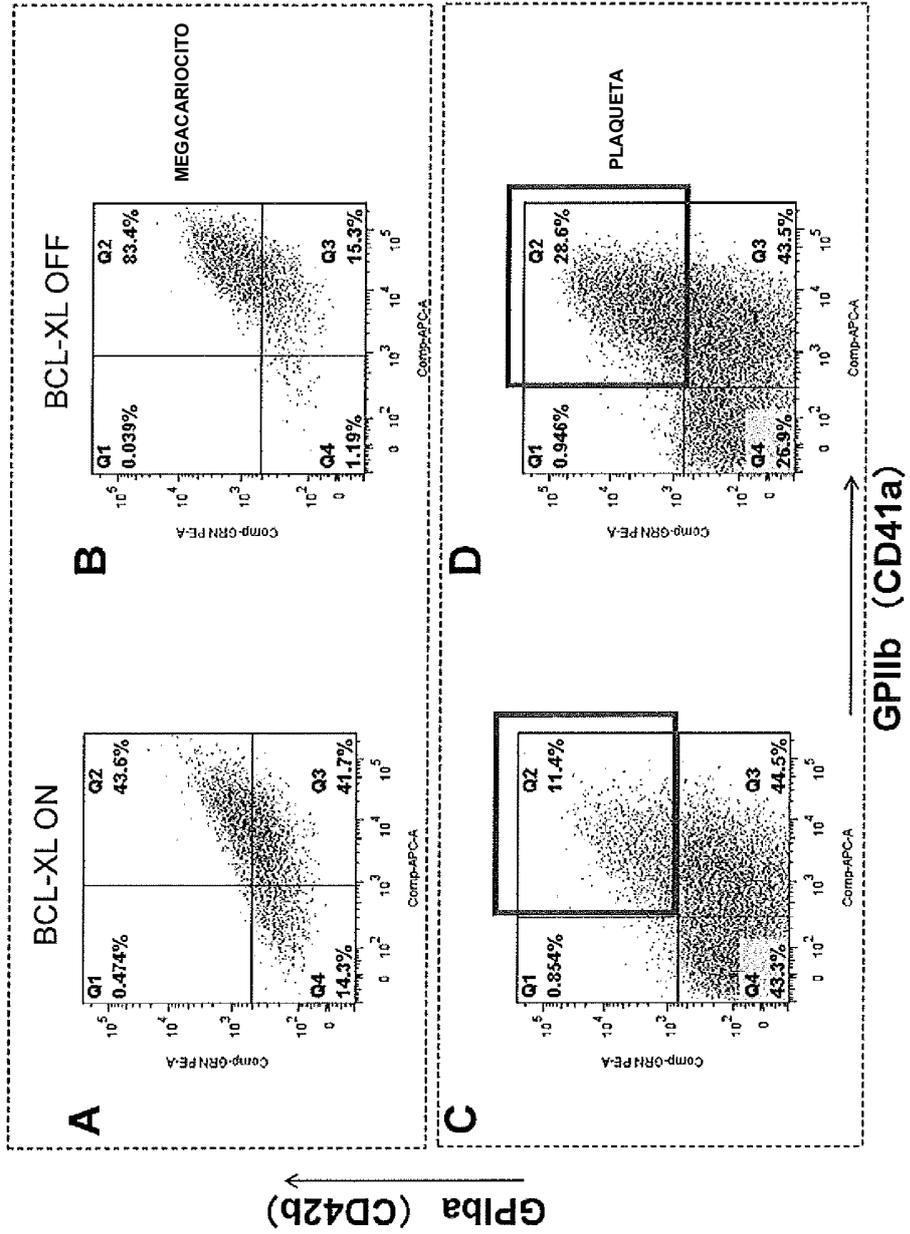


FIG. 15

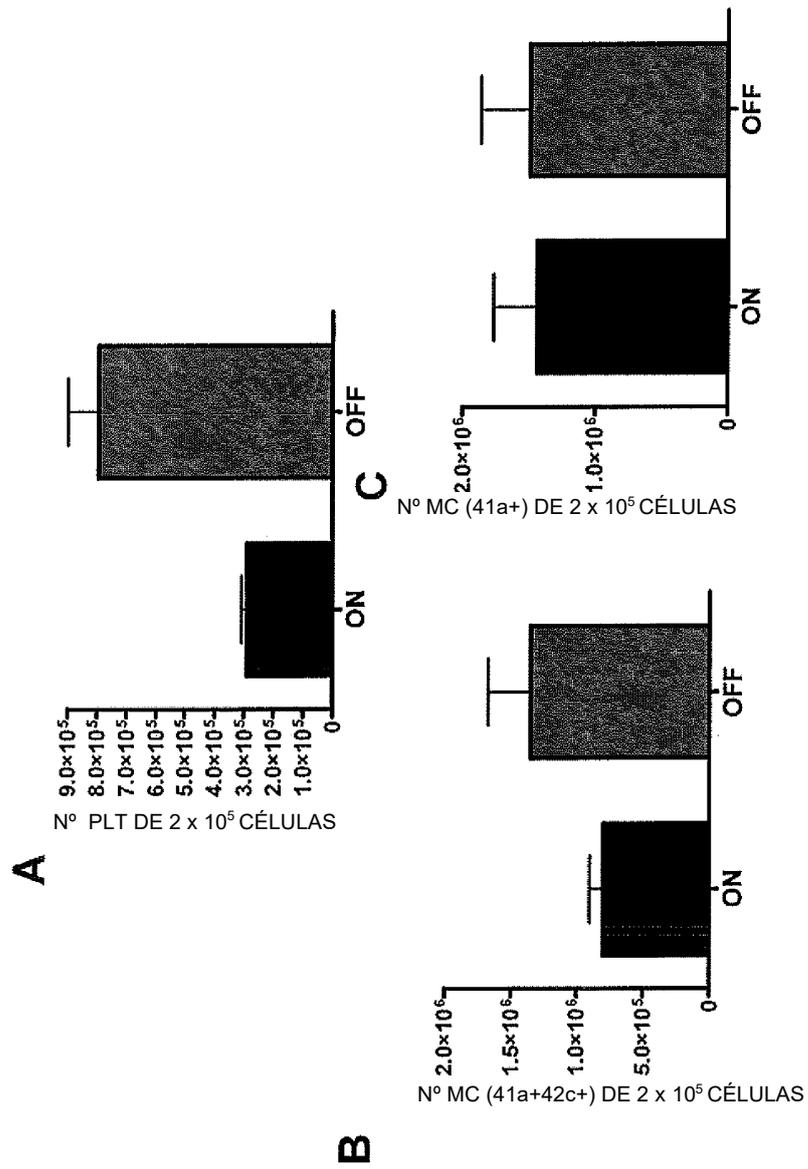


FIG. 16

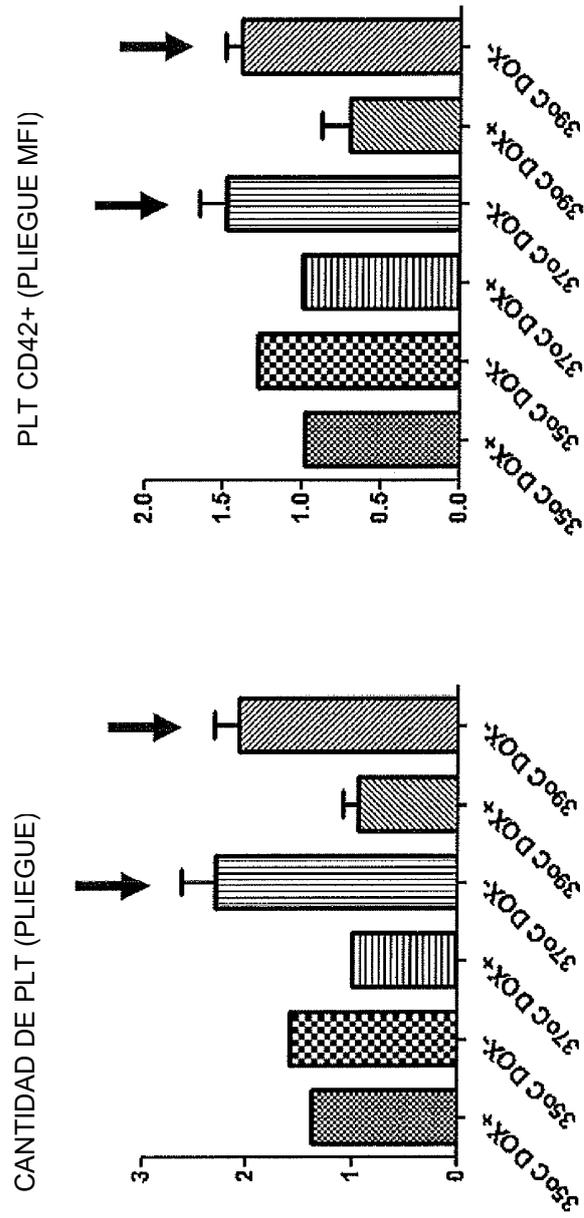


FIG. 17

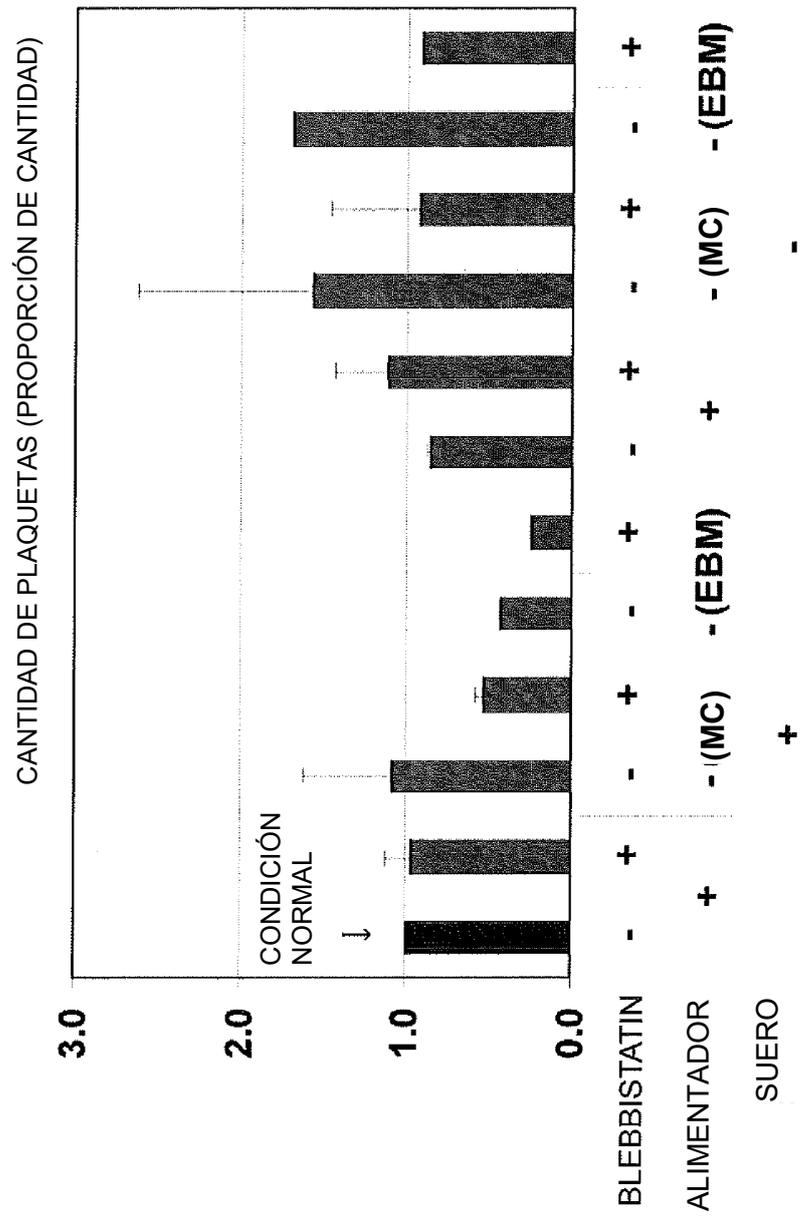


FIG. 18

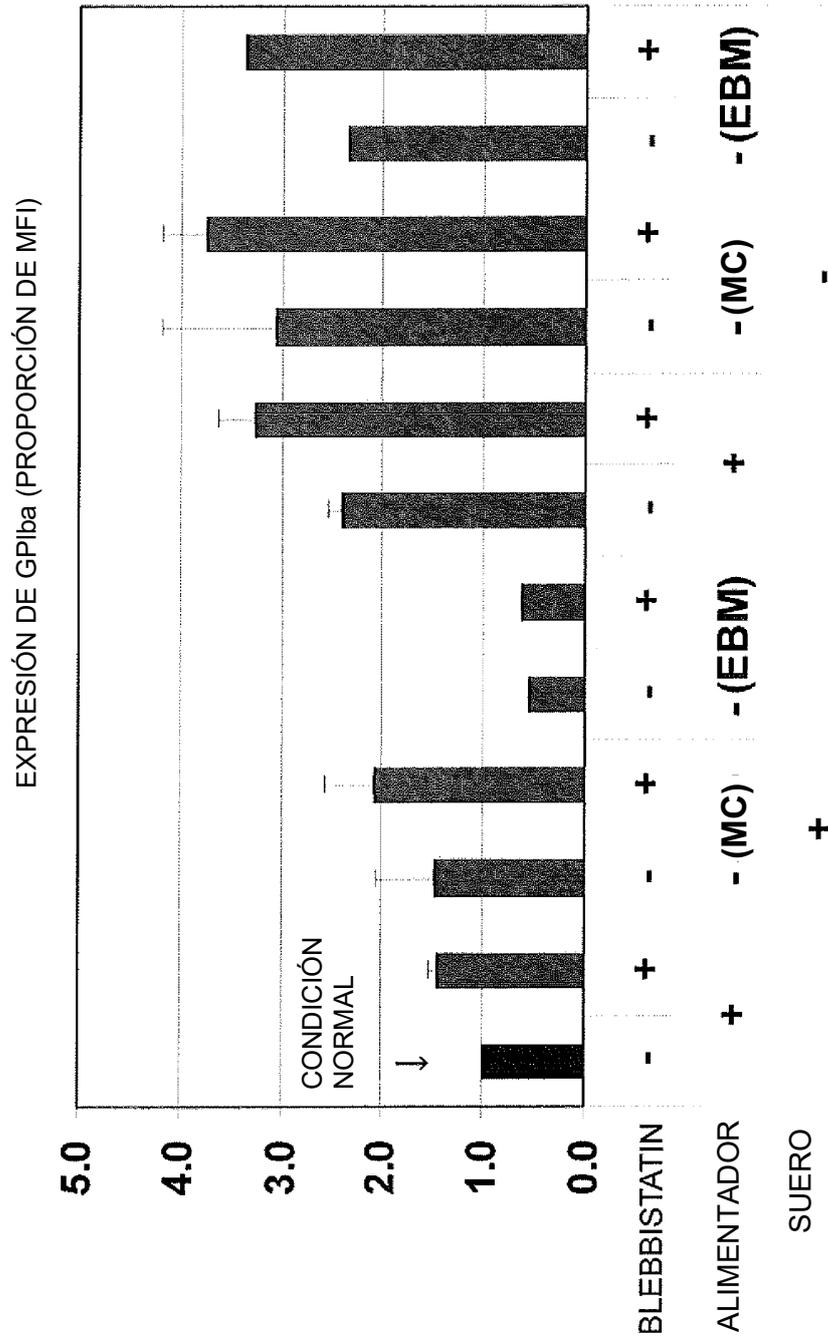


FIG. 19

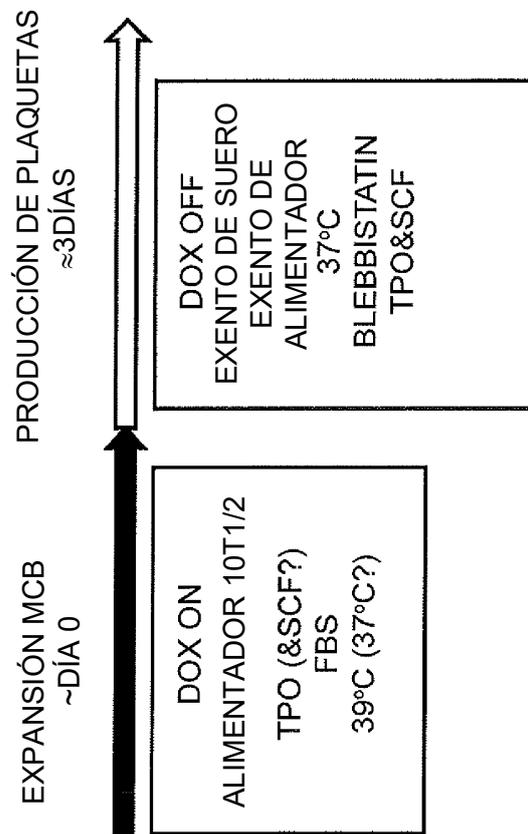


FIG. 20

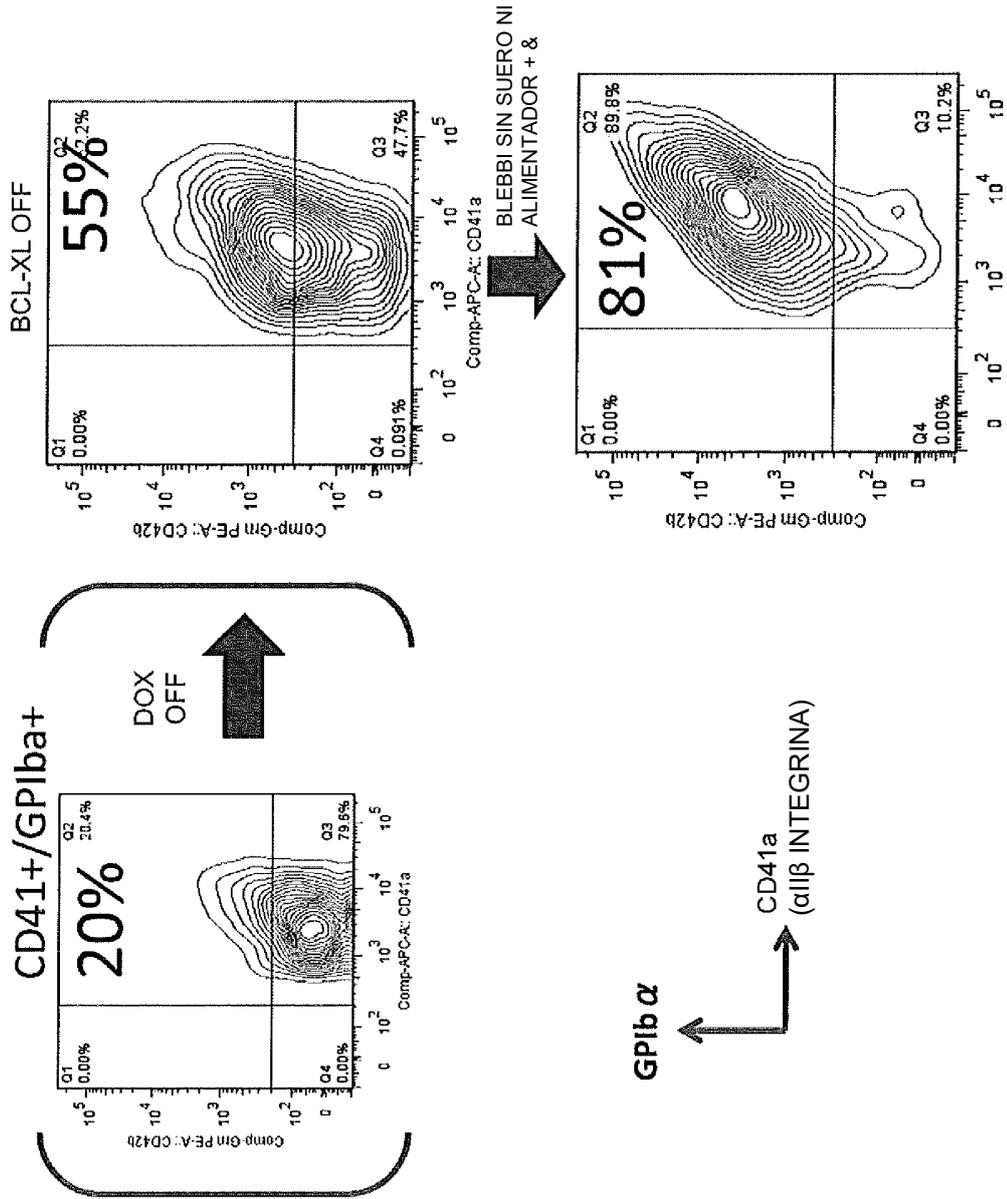


FIG. 21

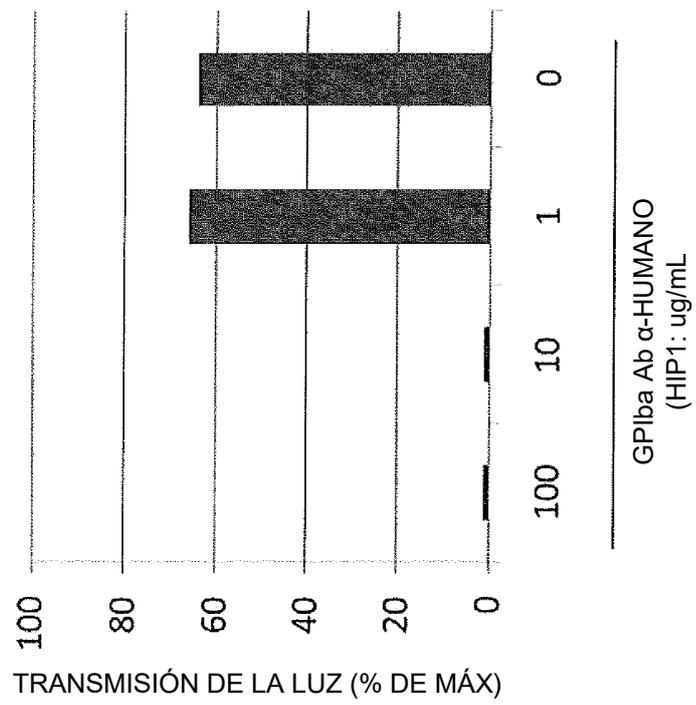


FIG. 22

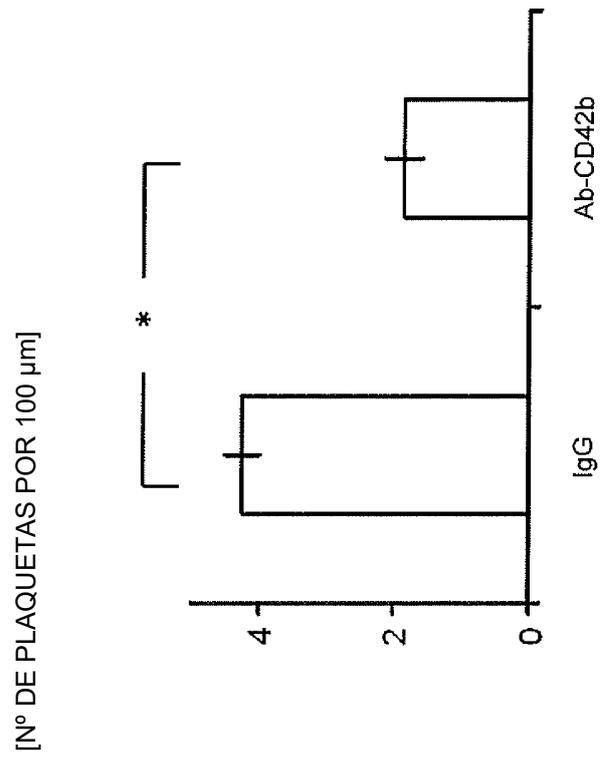


FIG. 23

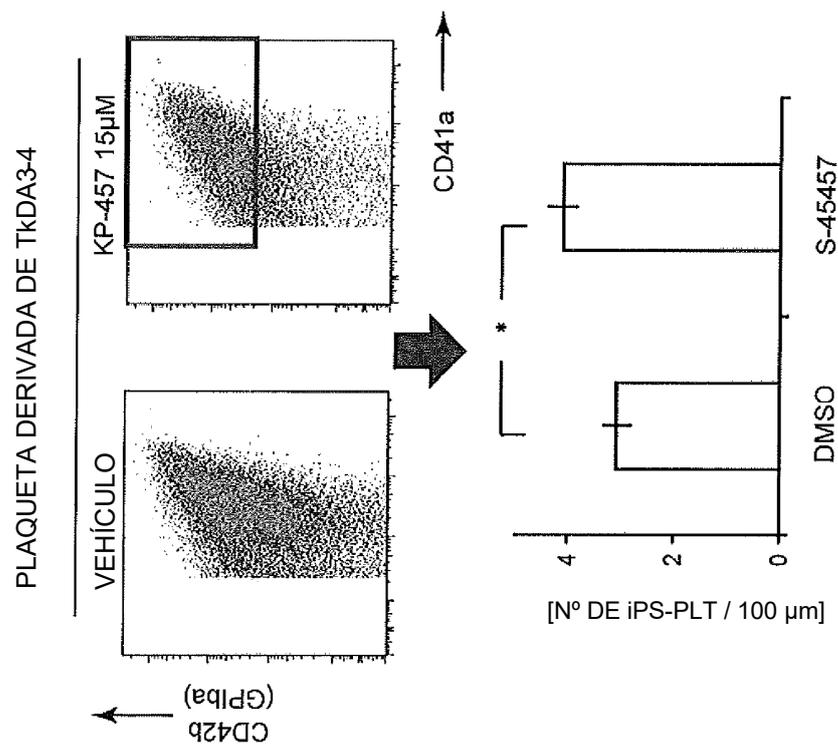


FIG. 24

