

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 688**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/00** (2006.01)  
**A61K 35/14** (2015.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)  
**C12N 5/078** (2010.01)  
**C12N 5/0789** (2010.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 16202612 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3159001**

54 Título: **Método novedoso para la producción de células diferenciadas**

30 Prioridad:

**15.09.2009 JP 2009213645**

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

**26.09.2019**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)  
3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-Ku  
Tokyo 113-0033, JP**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 725 688 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

Método novedoso para la producción de células diferenciadas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para la producción de células diferenciadas específicas, así como a una célula producida por el método. La presente invención se refiere, en particular, a un método para la producción de glóbulos diferenciados, así como a un glóbulo producido por el método.

10

**Estado de la técnica**

Cuando se necesitan células específicas para el tratamiento de una enfermedad, debe obtenerse una cantidad de células suficiente para alcanzar los objetivos del tratamiento. Sin embargo, es complicado obtener una cantidad suficiente de células utilizadas para el tratamiento de organismos vivos. Por lo tanto, se están estudiando métodos tal como un método de preparación de células diana mediante la inducción de la diferenciación de sus células progenitoras o similares *ex vivo*.

15

20

En el caso de tratar enfermedades sanguíneas o de realizar tratamiento quirúrgico, se necesitan glóbulos utilizados para el tratamiento. Entre los glóbulos, se necesitan especialmente plaquetas, esenciales para la coagulación sanguínea (hemostasia) y células megacariocíticas, responsables de la producción de proplaquetas y que también producen plaquetas. En particular, existe una gran demanda de plaquetas en el tratamiento de la leucemia, el trasplante de médula ósea y la terapia contra el cáncer, entre otros, y existe una gran necesidad de tener un suministro estable de plaquetas. Los métodos utilizados para la obtención de plaquetas incluyen, además de un método de recolección de sangre de donantes, un método de administración de productos TPO-miméticos, un método de diferenciación de células megacariocíticas de sangre de cordón umbilical o de células mieloide, entre otros. Asimismo, se están estudiando métodos tal como un método de preparación de glóbulos a partir de células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas después de la amplificación de estas células progenitoras *ex vivo*. Entre los ejemplos de métodos dados a conocer, se incluye un método de determinación de una línea de células madre hematopoyéticas a partir de células madre embrionarias de ratones (Documento de patente 1), un método de diferenciación de células madre embrionarias de primates en células hematopoyéticas (Documento de patente 2), así como un método de amplificación fácil y estable de células CD34 positivas/CD38 negativas que mantienen la no diferenciación de células madre hematopoyéticas *ex vivo* (Documento de patente 3).

25

30

35

En la inducción de la diferenciación de células, las células madre pluripotentes son extremadamente útiles. Pueden utilizarse células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias y células iPS, como fuente de producción artificial de glóbulos, por ejemplo, plaquetas. En los últimos años, la determinación de células iPS ha contribuido a aumentar la atención sobre la utilidad de células madre pluripotentes como fuente importante para la terapia celular en medicina regenerativa. Por ejemplo, Takayama *et al.* han conseguido inducir la diferenciación de células madre embrionarias humanas en células megacariocíticas y plaquetas, por lo que han ofrecido la posibilidad de utilizar plaquetas diferenciadas de células madre embrionarias como fuente de transfusión de plaquetas (Documento de patente 4 y Documento no patente 1). En el documento de patente EP 2,096,169 se da a conocer un proceso para generar, de forma eficaz, células madre pluripotentes inducidas de forma segura a partir de células somáticas, mientras que en el documento de patente EP1970446 se da a conocer un factor de reprogramación nuclear para una célula somática, como medio para producir una célula madre pluripotente inducida. Asimismo, en Moon *et al.* (Cell research, 2011, 21(9), pp. 1305-1315) se da a conocer la transdiferenciación de fibroblastos de ratón en células similares a NSC, así como la reprogramación de fibroblastos en células madre pluripotentes inducidas. Los inventores, además, han establecido un método de preparación de células megacariocíticas y plaquetas a partir de células iPS, lo que posibilita la resolución de un problema de emparejamiento de antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés), inevitable en la transfusión de plaquetas derivadas de células madre embrionarias. Si bien tradicionalmente ha sido complicado contar con un suministro estable de una cantidad suficiente de plaquetas por medio de la donación de sangre debido a factores tales como una escasez crónica de donantes, este problema parece poder solucionarse mediante la inducción de la diferenciación de plaquetas a partir de células madre embrionarias o células iPS. Sin embargo, de acuerdo con los métodos propuestos hasta la fecha, sólo puede prepararse una pequeña cantidad de plaquetas a partir de células iPS o células madre embrionarias y, asimismo, ha de llevarse a cabo cada vez una serie de operaciones para la producción. Por consiguiente, se necesita proporcionar un método mejorado y eficaz para garantizar una estabilidad cuantitativa de plaquetas.

40

45

50

55

60

Dicho problema, que ha de resolverse con el fin de suministrar de manera estable una cantidad suficiente de glóbulos, por ejemplo, células megacariocíticas, y plaquetas, también puede encontrarse en el suministro de otros tipos de células.

Por lo tanto, incluso en el caso de preparar células deseadas mediante la inducción de la diferenciación de células, aún no es fácil preparar células progenitoras de células deseadas en una gran cantidad, por lo que, en la actualidad, es difícil garantizar una cantidad suficiente de células deseadas terminalmente diferenciadas.

65

**Documentos del estado de la técnica**

Documentos de patente

- 5 Documento de patente 1: Solicitud de patente japonesa abierta nº. 2006-141356
- Documento de patente 2: Solicitud de patente japonesa abierta nº. 2004-350601
- Documento de patente 3: Solicitud de patente japonesa abierta nº. 2006-61106
- Documento de patente 4: WO2008/041370

10 Documentos no patente

Documento no patente 1: Takayama *et al.*, Blood, 111: 5298-5306, 2008

**Sumario de la invención**

15 **Problemas que se han de solucionar por medio de la invención**

20 Por lo que se refiere a los glóbulos, los presentes inventores han establecido el método de obtención de megacariocitos y plaquetas a partir de células iPS. En la aplicación clínica de este método, sin embargo, ha de mejorarse el método de manera que los megacariocitos y las plaquetas puedan producirse en una gran cantidad. También es importante permitir que las plaquetas se suministren de forma rápida y estable en función de las necesidades, para la realización de aplicaciones clínicas en el futuro.

25 En vista de las circunstancias mencionadas anteriormente, en el presente documento se desvela un método para la producción de células diana por medio de la inducción de la diferenciación de células, mediante el aumento de la capacidad de crecimiento de las células en una fase de diferenciación deseada y la amplificación de las células para producir las células diana a partir de las células.

30 También se da a conocer en el presente documento un glóbulo diferenciado deseado mediante la utilización de este método. En particular, en el presente documento se da a conocer una célula progenitora megacariocítica con una gran capacidad de crecimiento que es un glóbulo que sirve como fuente de células megacariocíticas maduras y plaquetas, y un método para la producción de dichas células progenitoras megacariocíticas.

35 Asimismo, el método que se da a conocer en el presente documento produce células megacariocíticas maduras y plaquetas a partir de las células progenitoras megacariocíticas de forma estable en una gran cantidad, y en el presente documento se da a conocer una célula megacariocítica madura producida mediante este método y una plaqueta inducida por diferenciación a partir de la célula megacariocítica madura.

40 La presente invención tiene el objeto de proporcionar un método para la producción de células eritroides y una población celular tal como se define en las reivindicaciones, puesto que también se requiere el suministro estable de células eritroides, al igual que ocurre con las plaquetas.

45 En la presente memoria, también se da a conocer un método de conservación de larga duración de células progenitoras megacariocíticas, es decir, células en un estado inmaduro de células megacariocíticas maduras, que son células progenitoras de plaquetas.

**Medios para solucionar los problemas**

50 Como resultado de la comparación de la productividad de los megacariocitos y las plaquetas de células iPS establecidas mediante la utilización de cuatro genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) y de células iPS establecidas mediante la utilización de los tres genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4) distintos de c-MYC, los presentes inventores han descubierto que las células iPS que utilizan los cuatro genes producen megacariocitos y plaquetas de forma considerablemente más eficaz. Los presentes inventores también han descubierto que, si bien se suprime la expresión de los cuatro genes introducidos tras el establecimiento en células iPS, se induce la reactivación del gen c-MYC con diferenciación megacariocítica, lo que está relacionado con un aumento de la cantidad de producción de megacariocitos. Los presentes inventores también han descubierto que las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple en las que se ha expresado el gen c-MYC de forma forzada obtienen una capacidad de crecimiento elevada.

60 Normalmente, en el caso en que un oncogén, tal como c-MYC, se sobreexpresa en las células, tiene lugar la progresión del ciclo celular y se activa el crecimiento. Se sabe que las células perciben este crecimiento como estrés e inducen una respuesta defensiva (senescencia inducida por oncogenes: OIS, por sus siglas en inglés) para suprimir el estrés, de manera que se suprime el crecimiento celular excesivo. Los presentes inventores han percibido este fenómeno y han descubierto, además, un método para la producción de células diferenciadas específicas en una gran cantidad mediante la regulación de la OIS de las células en una fase de diferenciación.

La presente invención se ha llevado a cabo a partir de los descubrimientos mencionados anteriormente.

La presente invención se ajusta a lo que se define en las reivindicaciones. En los siguientes apartados (1) a (30) se establecen aspectos relacionados de la exposición.

- 5
- (1) Un método para la producción de células específicas mediante la inducción de la diferenciación de células, donde se expresa un oncogén de forma forzada en células en una fase de diferenciación deseada para amplificar las células en la fase de diferenciación deseada.
- 10
- (2) El método para la producción de células específicas de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (1), donde se suprime la senescencia inducida por oncogenes, que se induce mediante la expresión forzada del oncogén en las células en la fase de diferenciación deseada.
- (3) El método para la producción de células específicas de acuerdo con los apartados mencionados anteriormente (1) o (2), donde se consigue la supresión de la senescencia inducida por oncogenes mediante la expresión de un gen polycomb.
- 15
- (4) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (1) a (3), donde las células en la fase de diferenciación deseada son células inducidas por diferenciación a partir de células madre embrionarias o células iPS.
- (5) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (1) a (4), donde se introduce un oncogén exógeno o se introduce un oncogén y un gen polycomb en las células en la fase de diferenciación deseada y el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducidos se expresan de forma forzada.
- 20
- (6) El método para la producción de células específicas de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (5), donde se introduce el oncogén exógeno o el gen polycomb en células progenitoras de las células en la fase de diferenciación deseada y el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducidos se expresan de forma forzada.
- 25
- (7) El método para la producción de células específicas de acuerdo con los apartados mencionados anteriormente (5) o (6), donde el oncogén y/o el gen polycomb están, cada uno, unidos de forma operativa a un lado en dirección 3' de un promotor inducible y el oncogén unido o el oncogén y el gen polycomb unidos se expresan de forma inducida y forzada.
- 30
- (8) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (5) a (7), donde se suprime la expresión del oncogén o la expresión del oncogén y del gen polycomb en las células en la fase de diferenciación deseada para estimular la diferenciación de las células en la fase de diferenciación deseada.
- 35
- (9) El método para la producción de células específicas de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (8), donde la supresión de la expresión del oncogén o de la expresión del oncogén y del gen polycomb se alcanza mediante la unión operativa del oncogén o del oncogén y el gen polycomb, cada uno, a un lado en dirección 3' de un promotor supresor para, de esta manera, suprimir la expresión del oncogén o la expresión del oncogén y del gen polycomb.
- 40
- (10) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (1) a (9), donde el oncogén es un gen de la familia MYC.
- (11) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (3) a (10), donde el gen polycomb es BMI1.
- 45
- (12) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (6) a (11), donde las células progenitoras de las células en la fase de diferenciación deseada son células progenitoras hematopoyéticas, las células en la fase de diferenciación deseada son células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple y las células específicas son células megacariocíticas maduras.
- 50
- (13) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (6) a (11), donde las células progenitoras de las células en la fase de diferenciación deseada son células progenitoras hematopoyéticas, las células en la fase de diferenciación deseada son células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple y las células específicas son plaquetas.
- (14) El método para la producción de células específicas de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (12) a (13), donde las células progenitoras hematopoyéticas se encuentran en una estructura similar a una red preparada a partir de células madre embrionarias o células iPS.
- 55
- (15) Una célula megacariocítica madura, que es una célula específica producida mediante el método de acuerdo con los apartados mencionados anteriormente (12) o (14).
- (16) Una plaqueta, que es una célula específica producida mediante el método de acuerdo con los apartados mencionados anteriormente (13) o (14).
- 60
- (17) Un producto sanguíneo que comprende, como principio activo, la plaqueta de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (16).
- (18) Un kit para la producción de la célula megacariocítica madura de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (15) o la plaqueta de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (16).
- (19) Un glóbulo en una fase de diferenciación deseada, donde se expresa un oncogén de forma forzada.
- 65
- (20) El glóbulo de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (19), donde también se expresa un gen polycomb de forma forzada.
- (21) El glóbulo de acuerdo con los apartados mencionados anteriormente (19) o (20), donde el glóbulo en la fase

de diferenciación deseada es una célula inducida por diferenciación a partir de una célula madre embrionaria o una célula iPS.

(22) El glóbulo de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (19) a (21), donde se introduce un oncogén exógeno o se introduce un oncogén y un gen polycomb en el glóbulo en la fase de diferenciación deseada y el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducidos se expresan de forma forzada.

(23) El glóbulo de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (22), donde se introduce el oncogén exógeno o el gen polycomb en una célula progenitora del glóbulo en la fase de diferenciación deseada y el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducidos se expresan de forma forzada.

(24) El glóbulo de acuerdo con los apartados mencionados anteriormente (22) o (23), donde el oncogén y/o el gen polycomb están, cada uno, unidos de forma operativa a un lado en dirección 3' de un promotor inducible y el oncogén unido o el oncogén y el gen polycomb unidos se expresan de forma inducida y forzada.

(25) El glóbulo de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (19) a (24), donde el oncogén es un gen de la familia MYC.

(26) El glóbulo de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (20) a (25), donde el gen polycomb es BMI1.

(27) El glóbulo de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (23) a (26), donde la célula progenitora del glóbulo en la fase de diferenciación deseada es una célula progenitora hematopoyética y el glóbulo en la fase de diferenciación deseada es una célula progenitora megacariocítica previa a la multinucleación.

(28) El glóbulo de acuerdo con el apartado mencionado anteriormente (27), donde la célula progenitora hematopoyética se encuentra en una estructura similar a una red preparada a partir de una célula madre embrionaria o una célula iPS.

(29) Una composición celular congelada que comprende el glóbulo de acuerdo con cualquiera de los apartados mencionados anteriormente (19) a (28).

(30) Un kit para la producción de la célula progenitora megacariocítica previa a la multinucleación, que es el glóbulo de acuerdo con los apartados mencionados anteriormente (27) o (28).

### Efecto ventajoso de la invención

Tal y como se expone en la presente memoria, es posible amplificar células en una fase de diferenciación deseada, así como producir células específicas diferenciadas de las células amplificadas en una gran cantidad.

Asimismo, en el caso de la producción de glóbulos diferenciados, es posible producir glóbulos tales como células megacariocíticas y plaquetas a partir de células madre pluripotentes de forma estable en una gran cantidad.

Además, los glóbulos producidos de acuerdo con la presente invención y tal como se da a conocer en el presente documento pueden crioconservarse. Por ejemplo, cuando se producen células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple como glóbulos, las células pueden crioconservarse. Por lo tanto, es posible suministrar células megacariocíticas maduras y plaquetas derivadas de la misma fuente de células progenitoras megacariocíticas.

En particular, en el método desvelado en el presente documento, las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple (células progenitoras de células megacariocíticas maduras) que pueden crioconservarse, pueden prepararse a partir de células iPS en una gran cantidad. Mediante la utilización de estas células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple como fuente, es posible producir y suministrar una cantidad suficiente de plaquetas para repetidas transfusiones de sangre al tiempo que se evita el problema de emparejamiento de HLA.

Asimismo, de acuerdo con la presente invención, se da a conocer un método para el suministro estable de células eritroides *in vitro*.

### Breve descripción de los dibujos

En la figura 1, se muestra un gráfico para la comparación de la cantidad de células megacariocíticas producidas a partir de células iPS con cuatro factores y de células iPS con tres factores. El eje vertical representa la cantidad de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de cada célula, donde la cantidad de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de células madre embrionarias el día 22 de cultivo se establece en 1. El eje horizontal representa la cantidad de días después del inicio del cultivo de células iPS y de células madre embrionarias. "3-f" indica una línea celular derivada de células iPS con tres factores, "4-f" indica una línea celular derivada de células iPS con cuatro factores y "ES" indica células madre embrionarias.

En la figura 2 se muestra una vista para la confirmación de la reactivación de transgenes en células megacariocíticas derivadas de células iPS humanas. Se analizó la expresión de cada transgén (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) en células iPS con cuatro factores (TkDA3-2, TkDA3-4 y TkDA3-5) y en células iPS con tres factores (TkDN4-M) para células iPS no diferenciadas y células megacariocíticas diferenciadas. También se analizó la expresión de cada gen introducido en fibroblastos dérmicos humanos (HDF, por sus siglas en inglés) como control de introducción de genes. "endo" indica un gen endógeno y "Tg" indica un transgén. También se

analizó la expresión de REX1 y NANOG para células iPS no diferenciadas.

En la figura 3, se muestra un aumento de la cantidad de células megacariocíticas mediante la expresión forzada de c-MYC en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de células madre embrionarias. Se extrajeron las células progenitoras de sangre de una estructura similar a una red el día 15 de cultivo de células madre embrionarias humanas, se introdujeron los genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) cada uno, por separado, en las células progenitoras de sangre y se recontó, a lo largo del tiempo, la cantidad de células megacariocíticas producidas posteriormente. El eje vertical representa la cantidad de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de cada célula, donde la cantidad de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de células progenitoras hematopoyéticas (mock) en las que sólo se introdujo un vector viral, se establece en 1. El eje horizontal representa la cantidad de días después del inicio del cultivo de células madre embrionarias.

En la figura 4, se muestra un gráfico para la comparación de la cantidad de plaquetas producidas a partir de células iPS con cuatro factores y de células iPS con tres factores. El eje vertical representa la cantidad de plaquetas derivadas de cada célula, donde la cantidad de plaquetas derivadas de células madre embrionarias el día 21 de cultivo se establece en 1. El eje horizontal representa la cantidad de días después del inicio del cultivo de células iPS y de células madre embrionarias. "3-f" indica una línea celular derivada de células iPS con tres factores, "4-f" indica una línea celular derivada de células iPS con cuatro factores y "ES" indica células madre embrionarias.

En la figura 5, se muestra un experimento de transfusión en un modelo de ratón mediante la utilización de plaquetas derivadas de células iPS. Se proporcionaron con antelación ratones con deficiencia inmunitaria de un modelo con trombocitopenia mediante irradiación (A). Las plaquetas producidas a partir de una línea celular TkDA3-4 se transfundieron a través de la vena caudal de los ratones con deficiencia inmunitaria. B se refiere a los cambios en función del tiempo después de la transfusión (30 minutos, 2 horas, 24 horas). "PB" se refiere a sangre periférica humana.

En la figura 6, se muestra una vista para la confirmación de la capacidad de formación de trombos de plaquetas derivadas de células iPS humanas *in vivo*. Las plaquetas derivadas de células iPS humanas se tiñeron con éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE: pigmento rojo), se mezclaron con hematóporfirina y se inyectaron a través de la vena caudal de los ratones. Se observó un estado de formación de trombos en el vaso sanguíneo 0 segundos, 6 segundos, 13 segundos y 20 segundos después de la irradiación de la arteria mesentérica con láser mediante microscopía confocal secuencial. "Flujo sanguíneo" indica corriente sanguínea.

En la figura 7, se muestra de manera esquemática un protocolo de introducción de genes en células progenitoras hematopoyéticas preparadas a partir de células madre embrionarias.

En la figura 8, se muestran los resultados del análisis FACS el día 9 después de la introducción del gen c-MYC en células progenitoras hematopoyéticas preparadas a partir de células madre embrionarias. A hace referencia a los resultados del análisis FACS y B hace referencia a las fotomicrografías de las células el día 9 después de la introducción de c-MYC. Las células en las que solamente se introdujo un vector viral MYC se utilizaron como control.

En la figura 9, se muestra la capacidad de crecimiento de células progenitoras megacariocíticas que expresan el gen c-MYC. El eje vertical representa la cantidad de células CD42b positivas. El eje horizontal representa la cantidad de días después de la introducción del gen c-MYC en las células. ■ se refiere a los resultados de un control en el que solamente se introdujo un vector viral, en lugar de c-MYC.

En la figura 10, se muestran los resultados del análisis FACS de células progenitoras megacariocíticas en las que se introdujo el gen c-MYC y el gen BMI1. c-MYC/BMI1 (vista superior) hace referencia a los resultados del análisis FACS de las células en las que se introdujo tanto el gen c-MYC como el gen BMI1, mientras que c-MYC únicamente (vista inferior) hace referencia a los resultados del análisis FACS de las células en las que solamente se introdujo el gen c-MYC.

En la figura 11, se muestran los resultados del análisis FACS de las células el día 35 de cultivo, en las que se introdujo el gen c-MYC y el gen BMI1. A hace referencia, de manera esquemática, a las moléculas funcionales específicas de los megacariocitos y B hace referencia a los resultados del análisis FACS.

En la figura 12, se muestran los resultados del análisis de la capacidad de crecimiento de las células de expresión de MYC/BMI1. El eje vertical representa la cantidad de células. El eje horizontal representa la cantidad de días después de la introducción de los genes en las células.

En la figura 13, se muestra una imagen de plaquetas liberadas de células progenitoras megacariocíticas derivadas de células de expresión de c-MYC/BMI1, según se observa a través de un microscopio electrónico.

En la figura 14, se muestran los resultados del análisis FACS de las células el día 105 después de la introducción del gen c-MYC y del gen HOXA2 en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de células madre embrionarias (KhES) y el día 27 después de la introducción del gen c-MYC y el gen BCLXL en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de células madre embrionarias (KhES).

En la figura 15, se muestra una vista para la confirmación de un sistema de regulación de expresión de genes mediante un vector pMX tet off. Se expresó un constructo en el que c-MYC y BMI1 se unieron al vector pMX tet off con 2A en medio en células 293GPG para analizar si la regulación de la expresión de genes funciona o no. A se refiere al constructo y el mecanismo del vector y B se refiere a los resultados del análisis de la expresión de c-MYC en células en un estado en el que se añade o no tetraciclina y  $\beta$ -estradiol, mediante la utilización de un citómetro de flujo. El eje horizontal en B representa un nivel de expresión de c-MYC. "293gpg" se refiere a los resultados de las células 293GPG de un control.

En la figura 16, se muestran los resultados del análisis de la capacidad de crecimiento y la capacidad de diferenciación de líneas celulares de expresión de vector de regulación de genes. A se refiere a los resultados

del análisis de la capacidad de crecimiento de las células de expresión de c-MYC y BMI1 mediante diversos vectores. El eje vertical representa la cantidad de células y el eje horizontal representa la cantidad de días después de la introducción de los genes en las células. B se refiere a los resultados del análisis de las células teñidas con un anticuerpo anti-CD42b (GPIb-alfa) y un anticuerpo anti-CD41a (complejo integrina alfaIIb/beta3) (vista superior) y un anticuerpo antiglicoforina A y un anticuerpo anti-CD41a (vista inferior), mediante la utilización de un citómetro de flujo. Tanto en la vista superior como en la inferior de B, se muestran por separado los resultados de células que expresan forzosamente pMX c-MYC y Dsam BMI1 en el lado izquierdo y en el lado derecho se muestran los resultados de las células que expresan pMX tet off c-MYC 2A BMI1.

En la figura 17, se muestra el análisis del grado de multinucleación de una línea celular megacariocítica que expresa pMX tet off c-MYC 2A BMI1 en presencia de  $\beta$ -estradiol. A se refiere a los resultados de las células de un control con solamente un vector (una línea celular que no expresa genes) y B se refiere a los resultados de las células que expresan c-MYC y BMI1.

En la figura 18, se muestran los resultados de la realización de ensayos de unión de fibrinógenos en plaquetas derivadas de megacariocitos que expresan de forma forzada c-MYC y BMI1. En la vista superior (plaqueta humana), se muestran los resultados de plaquetas derivadas de sangre periférica humana; en la vista media (pMX tet off c-MYC 2A BMI1), se muestran los resultados de plaquetas derivadas de una línea celular de pMX tet off c-MYC 2A BMI1 en presencia de  $\beta$ -estradiol; y en la vista inferior (pMX Myc Dsam Bmi1), se muestran los resultados de plaquetas derivadas de una línea celular que expresa de forma forzada c-MYC y BMI1 mediante pMX c-MYC y Dsam BMI1.

En la figura 19, se muestran los resultados del análisis de la capacidad de activación de integrina de plaquetas producidas a partir de una línea celular megacariocítica en la que se suprimió la expresión de c-MYC y BMI1. En la vista izquierda, se muestra el análisis de la capacidad de activación de integrina en ausencia de ADP mediante la utilización de un citómetro de flujo, mientras que en la vista derecha se muestra un análisis de la capacidad de activación de integrina en presencia de ADP (50  $\mu$ M) mediante la utilización de un citómetro de flujo.

En la figura 20, se muestra una vía de diferenciación desde células madre embrionarias a una línea celular megacariocítica.

#### Modo de llevar a cabo la invención

En la presente memoria, se da a conocer un método para la producción de células específicas mediante la inducción de la diferenciación de células que sirven como fuente, donde un oncogén se expresa de forma forzada en células en una fase de diferenciación deseada en un proceso de diferenciación desde las células que sirven como fuente en las células específicas, con el fin de amplificar (o hacer crecer) las células en la fase de diferenciación deseada.

En el presente documento, "células que sirven como fuente" corresponden a células progenitoras de células diana (células específicas) obtenidas mediante la inducción de la diferenciación y pueden ser cualesquiera células que conserven la capacidad de diferenciación distintas de las células terminalmente diferenciadas. Por ejemplo, las "células que sirven como fuente" pueden ser células madre pluripotentes completamente no diferenciadas o células que están diferenciadas en cierta medida pero todavía conservan la capacidad de diferenciación (p. ej., células progenitoras hematopoyéticas de glóbulos). Asimismo, las "células específicas" producidas en este modo de realización son células diferentes a células completamente no diferenciadas (p. ej., células madre pluripotentes) y pueden ser células que presentan un estado no diferenciado en cierta medida. Es decir, las "células específicas" son células que aparecen entre una fase no diferenciada completa y una fase diferenciada terminal, excepto células completamente no diferenciadas. Cuando se toman glóbulos como ejemplo, las "células específicas" en este modo de realización son células megacariocíticas maduras, plaquetas, células eritroides o similares.

Tal y como se expone en la presente memoria, las "células en una fase de diferenciación" que se han de amplificar (o crecer) son células que aparecen entre la fase no diferenciada completa y la fase diferenciada terminal, es decir, células diferentes de células en la fase no diferenciada completa (p. ej., células madre pluripotentes, etc.) y células en la fase de diferenciación terminal. Cuando se toman los glóbulos como ejemplo, las "células en una fase de diferenciación" en este modo de realización son células progenitoras hematopoyéticas o células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, que son células progenitoras de células megacariocíticas maduras. Por ejemplo, las células inducidas de células madre pluripotentes como células madre embrionarias o células iPS pueden utilizarse como "células en una fase de diferenciación".

Las células madre embrionarias que se usan en la presente memoria no están particularmente limitadas. Normalmente, se cultivan conjuntamente huevos fecundados que se encuentran en la fase de blastocisto con células alimentadoras, se separan células derivadas de masa celular interior desarrollada y se vuelve a repetir el subcultivo, lo que permite posiblemente el establecimiento de una línea de células madre embrionarias. Por lo tanto, las células madre embrionarias se obtienen, normalmente, de huevos fecundados. De forma alternativa, pueden utilizarse células similares a células madre embrionarias que se obtienen, por ejemplo, de tejidos adiposos, vellosidades coriales, fluidos amnióticos, placentas, células testiculares, entre otros, distintos a huevos fecundados, que presentan características similares a células madre embrionarias y presentan pluripotencia.

Las células iPS pueden ser células de cualquier origen, siempre y cuando sean células que adquieren una pluripotencia equivalente a la de las células madre embrionarias como resultado de la introducción de diversos tipos

de genes de factor de transcripción (en lo sucesivo, denominado "factor de pluripotencia") para proporcionar pluripotencia en células somáticas (p. ej., células de fibroblastos, glóbulos, etc.). Ya se han dado a conocer muchos factores como factores de pluripotencia. Entre los ejemplos de los factores, se incluye la familia Oct (p. ej., Oct3/4), la familia SOX (p. ej., SOX2, SOX1, SOX3, SOX15, SOX 17, etc.), la familia Klf (p. ej., Klf4, Klf2, etc.), la familia MYC (p. ej., c-MYC, N-MYC, L-MYC, etc.), NANOG, LIN28, entre otros, aunque la divulgación del presente documento no se limita a estos. En muchos documentos, a los que se puede hacer referencia, se describen métodos de establecimiento de células iPS (véase, por ejemplo, Takahashi *et al.*, Cell 2006, 126: 663-676; Okita *et al.*, Nature 2007, 448: 313-317; Wernig *et al.*, Nature 2007, 448: 318-324; Maherali *et al.*, Cell Stem Cell 2007, 1: 55-70; Park *et al.*, Nature 2007, 451: 141-146; Nakagawa *et al.*, Nat Biotechnol 2008, 26: 101-106; Wernig *et al.*, Cell Stem Cell 2008, 10: 10-12; Yu *et al.*, Science 2007, 318: 1917-1920; Takahashi *et al.*, Cell 2007, 131: 861-872; Stadtfeld *et al.*, Science 2008, 322: 945-949, etc.).

Un oncogén utilizado en la presente invención y, según se expone en la presente memoria, es un gen que induce la cancerización de una célula en la que reside el gen. Entre los ejemplos del gen, se incluyen los genes de la familia MYC, los genes de la familia SRC, los genes de la familia RAS, los genes de la familia RAF, los genes de la familia de proteína quinasa, tales como c-Kit, PDGFR y Abl, entre otros.

La expresión forzada del oncogén o del gen polycomb mencionado a continuación en las células en la fase de diferenciación deseada puede alcanzarse de una manera en la que se introduce el oncogén o el gen polycomb en las células en la fase de diferenciación deseada y se expresa, de forma forzada, el gen, de modo que se introduce el gen en las células progenitoras de las células en la fase de diferenciación deseada, se expresa de forma forzada el gen y se continúa con la diferenciación al tiempo que se mantiene la expresión, de manera que se mantiene el estado de expresión forzada del gen en las células en la fase de diferenciación deseada o de una manera en la que se introduce el gen en células progenitoras de las células en la fase de diferenciación deseada y, cuando las células progenitoras se diferencian en las células en la fase de diferenciación deseada, se induce la expresión forzada del gen. Por ejemplo, en el caso de amplificar las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple como células en la fase de diferenciación deseada, el oncogén o el gen polycomb pueden introducirse en células progenitoras hematopoyéticas (que se describen más adelante), que se encuentran en una fase progenitora de las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, y expresarse de forma forzada. En el caso de expresar de forma forzada tanto el oncogén como el gen polycomb en las células en la fase de diferenciación deseada, el oncogén y el gen polycomb pueden introducirse en las células al mismo tiempo o en momentos distintos.

En la presente memoria, se da a conocer un método para amplificar (o hacer crecer) las células en la fase de diferenciación deseada, donde se suprime la senescencia inducida por oncogenes, que se induce mediante la expresión forzada del oncogén en las células en la fase de diferenciación deseada.

La senescencia inducida por oncogenes (OIS) es senescencia inducida por estrés inducida mediante estímulos de crecimiento anormales, entre otros, por medio de un oncogén tal como RAS o MYC. Cuando se expresa de forma excesiva un producto oncogénico en las células, se induce la expresión de un producto génico supresor de tumores, tal como p16 o p19, codificados en un locus CDKN2a (INK4a/ARF). De esta manera, se induce la senescencia de las células y la apoptosis, lo que provoca un descenso de la actividad de crecimiento celular. Por lo tanto, se espera que se mantenga una capacidad de crecimiento celular elevada evitando la OIS inducida por el oncogén.

Por ejemplo, la senescencia inducida por oncogenes puede suprimirse mediante la expresión del gen polycomb en las células en las que se expresa el oncogén. El gen polycomb (grupo polycomb: PcG) regula, de forma negativa, el locus CDKN2a (INK4a/ARF) y sirve para evitar la senescencia (véase, por ejemplo, Oguro *et al.*, "Regulation of stem cell senescence by polycomb group protein complex", Regenerative Medicine, vol. 6, nº. 4, pp. 26-32; Jseus *et al.*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 7, pp. 667-677, 2006; Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., vol. 100, pp. 211-216, 2003). En consecuencia, mediante la expresión del gen polycomb en las células además del oncogén, tal como un gen de la familia MYC, puede evitarse la senescencia inducida por oncogenes y puede mejorarse todavía más el efecto de crecimiento celular del producto oncogénico.

Entre los ejemplos del gen del grupo polycomb usados en la presente invención, incluyen BMI1, Mel18, Ring1a/b, Phc1/2/3, Cbx2/4/6/7/8, Ezh2, Eed, Suz12, HADC, Dnmt1/3a/3b, entre otros. Un gen del grupo polycomb especialmente preferible es el gen BMI1.

La senescencia inducida por oncogenes también puede suprimirse mediante la expresión del gen HOXA2 o del gen BCLXL.

Con el fin de expresar de forma forzada el oncogén y el gen polycomb en las células, puede emplearse cualquier método conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, puede introducirse un oncogén exógeno o un gen polycomb exógeno en las células por medio de la utilización de un sistema de introducción de genes, tal como un lentivirus o un retrovirus, y expresarse. En el caso de expresar el gen mediante un vector de introducción de genes viral, el gen puede unirse, de manera operativa, a un lado en dirección 3' de un promotor adecuado que, a continuación, se inserta en el vector de introducción de genes y se introduce en las células para expresar el gen

diana. En la presente memoria, la unión "operable" se refiere a que el promotor y el gen diana están unidos con el fin de que el gen diana sea dominado en posición cis por el promotor y se lleve a cabo la expresión deseada del gen diana. Por ejemplo, el gen diana puede expresarse de forma constitutiva 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, donde el gen diana se expresa de forma inducible mediante regulación por medio de la adición de fármacos o similares. Por definición, un experto en la materia puede seleccionar fácilmente un sistema de expresión de genes basado en fármacos, un sistema adecuado con el fin de llevar a cabo la regulación de la expresión deseada del oncogén o del gen polycomb. Puede adquirirse un kit disponible en el mercado para un sistema de expresión de este tipo y ponerse en práctica. Si bien el oncogén y el gen polycomb, que son los genes diana en la regulación de la expresión, pueden insertarse en vectores por separado, es más preferible insertar el oncogén y el gen polycomb en el mismo vector.

En la presente memoria, también se da a conocer un método para la producción de células específicas diana, mediante la inducción adicional de la diferenciación de las células en la fase de diferenciación deseada, en la que se expresa el oncogén o el oncogén y el gen polycomb. Para inducir aún más la diferenciación de las células en la fase de diferenciación deseada, las células en la fase de diferenciación pueden cultivarse en condiciones de cultivo (condiciones tales como un medio de cultivo y una temperatura de cultivo) adecuadas para la inducción de la diferenciación y, asimismo, la expresión del oncogén o del gen polycomb en las células en la fase de diferenciación puede regularse de forma supresora en función de las necesidades. En este caso, puede suprimirse la expresión del oncogén o del gen polycomb, por ejemplo, mediante la eliminación de la inducción de la expresión génica inducida por medio del sistema de expresión inducible mencionado anteriormente, por medio de la eliminación del fármaco, por ejemplo. De forma alternativa, el oncogén o el gen polycomb pueden unirse de forma operativa a un promotor supresor que lleva a cabo la regulación de la expresión constitutiva en ausencia de un fármaco, por ejemplo, y lleva a cabo la regulación de la expresión supresora en presencia del fármaco, por ejemplo, para regular, de forma supresora, la expresión del gen. Asimismo, el oncogén o el gen polycomb introducidos pueden eliminarse mediante la utilización de un sistema Cre/Lox, por ejemplo, de manera que se regula, de forma supresora, la expresión del gen. 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 polycomb.

En la presente memoria, se da a conocer un método para amplificar (hacer crecer) células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple como células en la fase de diferenciación deseada y producir, como células específicas, células megacariocíticas maduras a partir de las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple. En la presente memoria, en el caso de expresar, de forma forzada, el oncogén o el oncogén y el gen polycomb en las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, es preferible expresar el oncogén o el oncogén y el gen polycomb en células progenitoras hematopoyéticas en una fase progenitora de las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple.

En la presente memoria, "células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple" se refieren a células mononucleares o binucleares CD41a positivas/CD42a positivas/CD42b positivas con marcador específico de megacariocitos que no se han sometido a poliploidización nuclear. Asimismo, "células progenitoras hematopoyéticas" se refiere a células hematopoyéticas caracterizadas como células CD34+ (células CD34 positivas), que pueden ser células derivadas de células madre embrionarias o de células iPS, por ejemplo y, preferiblemente, células obtenidas de una estructura similar a una red (también denominadas saco madre embrionario o saco iPS) preparadas a partir de células madre embrionarias o células iPS (en particular, las células inmediatamente después de la separación de la estructura similar a una red). En la presente memoria, "estructura similar a una red" preparada a partir de células madre embrionarias o células iPS se refiere a una estructura similar a un saco tridimensional (que contiene un espacio en la misma) derivada de células madre embrionarias o células iPS formada por una población celular endotelial, por ejemplo, y contiene en su interior células progenitoras hematopoyéticas. Para obtener más información sobre estructuras similares a una red, véase, por ejemplo, Takayama *et al.*, Blood 2008, 111: 5298-5306.

Las condiciones de cultivo celular adecuadas para la preparación de la estructura similar a una red a partir de células madre embrionarias humanas o células iPS humanas difieren en función del tipo de células madre embrionarias o células iPS utilizadas. Sin embargo, a modo de ejemplo, un medio de cultivo puede ser IMDM, al que se le añade FBS en una concentración final de un 15 %. Puede utilizarse otro medio exento de suero con factores de crecimiento, suplementos y similares, con su adición según sea necesario. Asimismo, se añaden, preferiblemente entre 0 y 100 ng/ml y más preferiblemente aproximadamente 20 ng/ml de VEGF, con el fin de formar, de forma eficaz, la estructura similar a una red. Un entorno de cultivo difiere en función del tipo de células madre embrionarias o de células iPS utilizadas. Sin embargo, a modo de ejemplo, pueden utilizarse condiciones de un 5 % de CO<sub>2</sub> y de entre 36 y 38 °C, preferiblemente 37 °C. Si bien un período de cultivo, hasta que se forma la estructura similar a una red, difiere en función del tipo de células madre embrionarias o de células iPS, la presencia de la estructura similar a una red puede reconocerse, aproximadamente, los días 14 a 16 después de la siembra en células alimentadoras.

La estructura similar a una red formada presenta una estructura folicular y contiene células progenitoras hematopoyéticas en un estado concentrado. Las células progenitoras hematopoyéticas en el interior de la estructura

similar a una red pueden separarse con medios físicos, por ejemplo, pasando a través de un instrumento de tamiz esterilizado (p. ej., un tamiz celular, etc.). Las células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de esta manera pueden utilizarse en la presente invención.

- 5 Si bien el oncogén expresado de forma forzada en las células progenitoras hematopoyéticas puede ser cualquiera de los oncogenes mencionados anteriormente, se prefiere especialmente un gen de la familia MYC. Entre los ejemplos de genes de la familia MYC, se incluye c-MYC, N-MYC, L-MYC, entre otros. De entre estos genes, se prefiere especialmente c-MYC. Si bien el gen polycomb expresado de forma forzada en las células progenitoras hematopoyéticas puede ser cualquiera de los genes polycomb mencionados anteriormente, se prefiere especialmente el gen BMI1.

15 Las células progenitoras hematopoyéticas que expresan el oncogén, tal como el gen de la familia MYC y el gen polycomb, tal como el gen BMI1, se cultivan en condiciones en las que se añade cualquiera o una combinación de al menos dos de entre SCF (10 a 200 ng/ml, p. ej., 100 ng/ml), TPO (10 a 200 ng/ml, p. ej., 40 ng/ml), FL (10 a 200 ng/ml, p. ej., 100 ng/ml), VEGF (10 a 200 ng/ml, p. ej., 40 ng/ml) y similares, y se convierten en células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple que han adquirido una capacidad de crecimiento elevada, aproximadamente, entre los días 4 y 7 después de la introducción de los genes. Las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple obtenidas de esta manera mantienen su crecimiento celular al menos durante aproximadamente entre 30 y 50 días, preferiblemente durante entre aproximadamente 50 y 60 días o más y, más preferiblemente, durante 60 días o más, y se amplifican en la cantidad de células a aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  veces o más, preferiblemente aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  veces o más y, más preferiblemente aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  veces o más la cantidad de células cuando se introduce el gen c-MYC y el gen BMI1 (véase, por ejemplo, la figura 12).

25 En el presente documento se da a conocer un método para la producción de células megacariocíticas maduras y la producción adicional de plaquetas mediante el cultivo, en condiciones adecuadas para la inducción de la diferenciación de glóbulos, de las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple producidas por medio del método de acuerdo con las divulgaciones en la presente memoria. Las condiciones adecuadas para la inducción de la diferenciación de los glóbulos consisten en, por ejemplo, la adición de cualquiera o una combinación de al menos dos de entre TPO, IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, ligando Flt3, heparina, entre otros. En el caso de la inducción de la diferenciación de las células megacariocíticas maduras y las plaquetas, por ejemplo, el cultivo puede realizarse durante aproximadamente entre 7 y 15 días en presencia de TPO (10 a 200 ng/ml, preferiblemente aproximadamente 100 ng/ml) o en presencia de TPO (10 y 200 ng/ml, preferiblemente aproximadamente 100 ng/ml), SCF (10 a 200 ng/ml, preferiblemente aproximadamente 50 ng/ml) y heparina (10 a 100 U/ml, preferiblemente aproximadamente 25 U/ml). Se puede aplicar cualquier entorno de cultivo adecuado para la inducción de la diferenciación de los glóbulos *in vitro*. A modo de ejemplo, el cultivo se lleva a cabo en condiciones de un 5 % de CO<sub>2</sub> y entre 36 y 38 °C, y preferiblemente 37 °C.

40 En el caso de inducir la diferenciación de las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, que han adquirido una capacidad de crecimiento elevada como resultado de la introducción del oncogén y el gen polycomb en células megacariocíticas maduras, plaquetas y similares, la expresión del oncogén y el gen polycomb puede regularse de forma supresora en función de las necesidades, tal y como se menciona anteriormente.

45 La presente invención proporciona un método para la producción de células eritroides, donde las células eritroides se producen mediante la expresión forzada de un oncogén y de un gen HOXA2 o el gen BCLXL en células progenitoras hematopoyéticas para amplificar las células progenitoras eritroides. Explicado con mayor detalle, la invención se refiere a un método mediante el cual un gen de la familia MYC, se expresa de forma forzada en células progenitoras eritroides, que son células en una fase de diferenciación deseada, y se suprime la senescencia inducida por oncogenes como consecuencia mediante la expresión del gen HOXA2 o del gen BCLXL para amplificar las células progenitoras eritroides, de manera que se producen células eritroides como células específicas. Esta realización se basa en el descubrimiento de que, como consecuencia de la introducción de docenas de tipos de factores de transcripción hematopoyéticos y genes asociados a antiapoptosis en células progenitoras hematopoyéticas junto con MYC como oncogén y de la realización de pruebas de detección, HOXA2 o BCLXL induce el crecimiento de células progenitoras eritroides.

55 Si bien puede utilizarse cualquier oncogén a modo de oncogén expresado de forma forzada en las células progenitoras hematopoyéticas, tal y como se menciona anteriormente, se prefiere un gen de la familia MYC y el gen c-MYC es especialmente preferible.

60 En la presente memoria, "células progenitoras eritroides" son células previas a la enucleación de glicoforina A positiva de moléculas específicas de eritrocitos.

65 Las células progenitoras hematopoyéticas que expresan el oncogén, tal como el gen de la familia MYC y el gen HOXA2 o el gen BCLXL, se cultivan en condiciones en las que se añade cualquiera o una combinación de al menos dos de entre SCF (10 a 200 ng/ml, p. ej., 100 ng/ml), TPO (10 a 200 ng/ml, p. ej., 40 ng/ml), FL (10 a 200 ng/ml, p. ej., 100 ng/ml), VEGF (10 a 200 ng/ml, p. ej., 40 ng/ml), EPO (1 a 100 U/ml, p. ej., 6 U/ml) y similares, y se

convierten en células progenitoras eritroides previas a la enucleación que han adquirido una capacidad de crecimiento elevada, aproximadamente, entre los días 4 y 7 después de la introducción de los genes.

5 Las condiciones adecuadas para la inducción de la diferenciación de las células eritroides maduras a través de las células progenitoras eritroides obtenidas a partir de las células progenitoras hematopoyéticas que expresan el gen de la familia MYC y el gen BCLXL o el gen HOXA2 consisten en, por ejemplo, la adición de cualquiera o una combinación de al menos dos de entre TPO, IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, ligando Flt3, heparina, entre otros. En particular, las células eritroides pueden cultivarse durante entre aproximadamente 7 y 15 días en presencia de EPO (2 a 100 U/ml, preferiblemente aproximadamente 10 U/ml) o en presencia de EPO (2 a 100 U/ml, preferiblemente aproximadamente 10 U/ml) y SCF (10 a 200 ng/ml, preferiblemente aproximadamente 50 ng/ml). Se puede aplicar cualquier entorno de cultivo adecuado para la inducción de la diferenciación de los glóbulos *in vitro*. A modo de ejemplo, el cultivo se lleva a cabo en condiciones de un 5 % de CO<sub>2</sub> y entre 36 y 38 °C, preferiblemente 37 °C.

15 En el presente documento se dan a conocer glóbulos en una fase de diferenciación deseada en la que se expresa, de forma forzada, un oncogén. En la presente memoria, el oncogén puede ser cualquiera de los oncogenes mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede aplicar un gen de la familia MYC, entre otros, y se prefiere especialmente el gen c-MYC. Asimismo, los "glóbulos en una fase de diferenciación" son glóbulos que aparecen entre una fase no diferenciada completa y una fase diferenciada terminal, es decir, glóbulos diferentes de células en la fase no diferenciada completa y células en la fase de diferenciación terminal. Por ejemplo, "glóbulos en una fase de diferenciación" pueden ser células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple o similares. Por definición, pueden utilizarse, por ejemplo, glóbulos en la fase de diferenciación, células inducidas de células madre embrionarias o células iPS. Se prefieren, especialmente, los glóbulos obtenidos de una estructura similar a una red (también denominados saco madre embrionario o saco iPS) preparados a partir de células madre embrionarias o células iPS (en particular, células inmediatamente después de la separación de la estructura similar a una red). Los glóbulos también incluyen glóbulos en una fase de diferenciación donde tanto el oncogén como el gen polycomb mencionado anteriormente, se expresan de forma forzada. La expresión forzada del oncogén y del gen polycomb puede inducirse mediante la utilización de un promotor inducible, entre otros, según se menciona anteriormente.

30 La expresión forzada del oncogén o del gen polycomb en las células en la fase de diferenciación deseada puede alcanzarse de una manera en la que se introduce el oncogén o el gen polycomb en los glóbulos en la fase de diferenciación deseada y se expresa, de forma forzada, el gen, de modo que se introduce el gen en las células progenitoras de los glóbulos en la fase de diferenciación deseada, se expresa de forma forzada el gen y se continúa con la diferenciación al tiempo que se mantiene la expresión, de manera que se mantiene la expresión forzada del gen en los glóbulos en la fase de diferenciación deseada o de una manera en la que se introduce el gen en células progenitoras de los glóbulos en la fase de diferenciación deseada y, cuando las células progenitoras se diferencian en los glóbulos en la fase de diferenciación deseada, se induce la expresión forzada del gen. Por ejemplo, en el caso de amplificar las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple como glóbulos en la fase de diferenciación deseada, el oncogén o el gen polycomb pueden introducirse en células progenitoras hematopoyéticas que se encuentran en una fase progenitora de las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, y expresarse de forma forzada.

Los glóbulos, tales como las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, presentan una resistencia a la congelación y a la descongelación y conservan la capacidad de crecimiento celular y la capacidad de diferenciación incluso cuando se crioconservan y, a continuación, se descongelan. Esto permite que los glóbulos se congelen y se descongelen en función de las necesidades, de manera que se producen glóbulos inducidos por diferenciación. Mediante la utilización de estas células, se elimina la necesidad de llevar a cabo una serie de operaciones para la producción de glóbulos, tales como plaquetas a partir de células madre embrionarias o células iPS desde el principio. Es decir, mediante la preparación, como materias primas, de una gran cantidad de glóbulos en los que el oncogén o el oncogén y el gen polycomb se expresan de forma forzada de acuerdo con la presente invención y la crioconservación de los glóbulos en función de las necesidades, puede racionalizarse el proceso de fabricación y mejorarse su eficacia. Por lo tanto, puede establecerse un mecanismo capaz de suministrar, de forma rápida, diversos glóbulos, tales como plaquetas.

55 En el caso de producir una composición celular congelada mediante la utilización de los glóbulos, tales como las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple de acuerdo con la presente invención, la composición celular congelada puede comprender los glóbulos, tales como las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple y una solución de crioconservación. La composición también puede comprender un aditivo, por ejemplo, en función de las necesidades.

60 Por ejemplo, puede utilizarse una solución de congelación que contiene DMSO a modo de solución de crioconservación. Entre los ejemplos específicos, se encuentran Cell Banker (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.), Bambanker (Nippon Genetics Co., Ltd.), TC-Protector (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) y CP-1 suplementado con albúmina (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.).

65 El gen de la familia MYC, el gen polycomb (p. ej., el gen BMI1), el gen HOXA2 y el gen BCLXL incluyen tanto genes

cuyas secuencias de ADNc ya se han publicado, como equivalentes identificados con técnicas convencionales a partir de la homología de estas secuencias de ADNc conocidas. Un equivalente del gen c-MYC entre los genes de la familia MYC es un gen cuya secuencia de ADNc consiste, por ejemplo, en una secuencia considerablemente idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 1. En la presente memoria, ADNc que  
 5 consiste en una secuencia considerablemente idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 1 es, bien ADN que consiste en una secuencia que presenta una identidad de aproximadamente un 60 % o superior, preferiblemente aproximadamente un 70 % o superior, más preferiblemente aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % y, todavía más preferiblemente aproximadamente un 99 % con ADN que consiste en la secuencia establecida en SEQ  
 10 ID NO: 1 o ADN que puede hibridarse a ADN que consiste en una secuencia complementaria de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 1 en condiciones estrictas, donde la proteína codificada por un ADN de este tipo contribuye a la amplificación de las células en la fase de diferenciación, tal como las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple.

15 Un equivalente del gen BMI1 es un gen cuya secuencia de ADNc consiste, por ejemplo, en una secuencia considerablemente idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 2. En la presente memoria, ADNc que consiste en una secuencia considerablemente idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 2 es, bien ADN que consiste en una secuencia que presenta una identidad de aproximadamente un 60 % o superior, preferiblemente aproximadamente un 70 % o superior, más preferiblemente  
 20 aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % y, todavía más preferiblemente aproximadamente un 99 % con ADN que consiste en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 2 o ADN que puede hibridarse a ADN que consiste en una secuencia complementaria de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 2 en condiciones estrictas, donde la proteína codificada por un ADN de este tipo suprime la senescencia inducida por oncogenes inducida en las células  
 25 en las que se expresa el oncogén, tal como el gen de la familia MYC, de manera que se facilita la amplificación de las células.

El gen HOXA2 o el gen BCXL usado en la presente invención es un gen cuya secuencia de ADNc consiste, por ejemplo, en una secuencia considerablemente idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID  
 30 NO: 3 o 4. En la presente memoria, ADNc que consiste en una secuencia considerablemente idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 3 o 4 es, bien ADN que consiste en una secuencia que presenta una identidad de aproximadamente un 60 % o superior, preferiblemente aproximadamente un 70 % o superior, más preferiblemente aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % y, todavía más preferiblemente aproximadamente un 99 %  
 35 con ADN que consiste en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3 o 4 o ADN que puede hibridarse a ADN que consiste en una secuencia complementaria de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 3 o 4 en condiciones estrictas, donde la proteína codificada por un ADN de este tipo hace que las células progenitoras eritroides crezcan.

40 Las condiciones estrictas mencionadas en la presente memoria son condiciones de hibridación que los expertos en la materia determinan 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 la renaturalización adecuada aumenta cuando se utiliza una sonda más larga y disminuye cuando se utiliza una sonda más corta. La formación híbrida, normalmente, depende de la capacidad de renaturalización en un entorno en el que  
 45 una cadena complementaria tiene una temperatura ligeramente inferior que su punto de fusión.

Con mayor detalle, las condiciones estrictas bajas son, por ejemplo, condiciones en las que el lavado se lleva a cabo en una solución de 0,1X SSC, 0,1 % SDS en condiciones de temperatura de 37 °C a 42 °C en una fase de lavado  
 50 con filtro después de la hibridación. Las condiciones estrictas elevadas son, por ejemplo, condiciones en las que el lavado se lleva a cabo en una solución de 5X SSC, 0,1 % SDS a 65 °C en la fase de lavado. Puede obtenerse un polinucleótido de identidad superior con la mejora adicional de las condiciones estrictas.

En la presente memoria, también se da a conocer un kit para la producción de células en una fase de diferenciación deseada (p. ej., células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple o células progenitoras eritroides) o  
 55 células específicas de producción final (p. ej., células megacariocíticas, plaquetas o células eritroides). El kit comprende reactivos y vectores de expresión, entre otros, necesarios para la expresión del oncogén, el gen polycomb, el gen BCLXL, el gen HOXA2, entre otros, en células, así como también comprende un medio de cultivo para el cultivo celular, suero, suplementos, tales como factores de crecimiento (p. ej., TPO, EPO, SCF, heparina, IL-6, IL-11, etc.), antibióticos y demás. Asimismo, por ejemplo en el caso de utilizar células derivadas de células madre embrionarias o de células iPS, el kit comprende, además, anticuerpos para la confirmación de marcadores para la  
 60 identificación de una estructura similar a una red preparada a partir de estas células (p. ej., anticuerpos contra Flk1, CD31, CD34, lectina UEA-I, etc.). Los reactivos, los anticuerpos y similares comprendidos en el kit se suministran en cualquier tipo de recipiente en el que los componentes mantienen, de forma eficaz, su actividad durante un largo periodo de tiempo sin ser absorbidos o deteriorados por el material del recipiente.

65 Las plaquetas dadas a conocer en el presente documento y las células eritroides producidas de acuerdo con la

presente invención pueden suministrarse de manera estable en forma de producto farmacéutico. Las plaquetas producidas por medio del método que se da a conocer en el presente documento pueden prepararse mediante la recuperación de una fracción de una solución de cultivo en la que las plaquetas liberadas de las células megacariocíticas son abundantes y mediante la eliminación de los componentes de los glóbulos distintos a las plaquetas, tales como células megacariocíticas, por medio de la utilización de un filtro de eliminación de leucocitos (p. ej., comercializado por Terumo Corporation, Asahi Kasei Medical Co., Ltd., etc.), entre otros. En la preparación de un producto sanguíneo, el producto sanguíneo puede comprender otros componentes que contribuyen a la estabilización de plaquetas o células eritroides. Para tales componentes que contribuyen a la estabilización, puede seleccionarse un método conocido por un experto en la materia.

Con mayor detalle, las plaquetas obtenidas pueden formularse por medio del método siguiente, por ejemplo.

Se prepara una solución ACD-A y PFC (plasma fresco congelado, que se prepara a partir de sangre total obtenida de donaciones de sangre y comprende todos los componentes diferentes de los componentes sanguíneos, tal como albúmina y un factor de coagulación) a una proporción de 1:10, y se conservan con agitación a entre 20 y 24 °C después de irradiación entre 15 y 20 Gy. La solución ACD-A se prepara mediante la mezcla de 22 g de citrato de sodio, 8 g de ácido cítrico y 22 g de glucosa con agua para su inyección a una cantidad total de 1 L.

En caso de utilizar el método mencionado anteriormente, es deseable que una concentración de plaquetas sea aproximadamente de  $1 \times 10^9$  plaquetas/ml, por ejemplo.

Asimismo, la adición de GM6001 (inhibidor de metaloproteasa basado en ácido hidroxámico de rango amplio) (Calbiochem, La Jolla, California, EE. UU.) permite la prevención de la inactivación provocada por una escisión de una molécula funcional de plaqueta GPIb-V-IX o GPVI, que se produce durante la crioconservación o la conservación a temperatura ambiente. Los presentes inventores han confirmado que puede evitarse la inactivación en plaquetas derivadas de células madre embrionarias de ratón por medio de este método. Para obtener más información sobre un mecanismo que es la base de esta inactivación de plaquetas mediante la utilización de plaquetas humanas, véase Bergmeier, W. *et al.*, *Cir Res* 95: 677-683, 2004 y Gardiner, EE. *et al.*, *J Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1530-1537, 2007.

Como material de un recipiente para contener un producto farmacéutico que comprende plaquetas, es preferible no utilizar un material como el vidrio, que activa las plaquetas.

Asimismo, las células eritroides pueden formularse de la siguiente manera. Con mayor detalle, los eritrocitos obtenidos pueden formularse por medio del método siguiente, por ejemplo.

Se añade una solución MAP (cuya composición se describe a continuación) a un concentrado de eritrocitos obtenido mediante la concentración de un sobrenadante del cultivo después de la centrifugación y preparado y conservado a entre 2 y 6 °C después de irradiación de entre 15 y 50 Gy.

En caso de utilizar el método mencionado anteriormente, es deseable que una concentración de eritrocitos sea aproximadamente de  $1 \times 10^{10}$  eritrocitos/ml, por ejemplo. Para los eritrocitos obtenidos, por ejemplo, puede utilizarse una solución de carga para la conservación de eritrocitos (solución MAP) preparada mediante la disolución de D-manitol (14,57 g), adenina (0,14 g), cristal de fosfato de dihidrógeno de sodio (0,94 g), citrato de sodio (1,50 g), ácido cítrico (0,20 g), glucosa (7,21 g) y cloruro sódico (4,97 g) con agua para su inyección a una cantidad total de 1000 ml.

Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente cualquier otro método conocido que sea adecuado para la formulación de eritrocitos, según proceda.

[En el presente documento, también se da a conocer una composición congelada de glóbulos de acuerdo con la presente invención. La composición puede comprender tanto los glóbulos como un medio de cultivo necesario para conservar los glóbulos, una solución tampón y DMSO, glicerol, entre otros, para la protección de las células durante la congelación. La composición puede comprender también cualquier otra sustancia normal necesaria para la congelación de las células. En caso de que se utilice un reactivo de congelación de células disponible en el mercado, la composición puede comprender sustancias contenidas en el reactivo.

Las "células" descritas en la presente descripción pueden proceder de humanos o de animales no humanos (p. ej., ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, ovejas, monos, perros, gatos, pájaros, etc.). Si bien la procedencia no se limita en particular, se prefieren especialmente las células derivadas de humanos.

La presente invención y las divulgaciones se describen con mayor detalle a modo de ejemplo a continuación, aunque no se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

Ejemplo de referencia 1. Comparación del rendimiento de la producción de megacariocitos a partir de células iPS con cuatro factores y de células iPS con tres factores

5 Se comparó la cantidad de células megacariocíticas producidas a partir de células iPS (TkDA3-2, TkDA3-4 y TkDA3-5) establecidas mediante la utilización de cuatro genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4 c-MYC), células iPS (253G1 (suministradas por el Prof. Shinya Yamanaka, de la Universidad de Kyoto) y TkDN4-M) establecidas mediante la utilización de los tres genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4) distintos a c-MYC, y células madre embrionarias humanas (KhES-3 (suministradas por el Prof. Norio Nakatsuji, de la Universidad de Kyoto)) (fig. 1). El día 15 de cultivo de las células iPS y las células madre embrionarias, se sembraron células progenitoras hematopoyéticas extraídas de una estructura similar a una red en células alimentadoras y se cultivaron en IMDM al que se le añadió FBS en una concentración final de un 15 %, en presencia de TPO (100 ng/ml), SCF (50 ng/ml) y heparina (25 U/ml). Se contó a lo largo de un periodo de tiempo la cantidad de células megacariocíticas CD42b positivas inducidas posteriormente. (fig.1). Como consecuencia, la cantidad de células megacariocíticas aumentó en las tres líneas celulares de las células iPS con cuatro factores (con c-MYC), en comparación con las células iPS con tres factores (sin c-MYC) y las células madre embrionarias humanas.

20 A continuación, se analizó la activación de la expresión de los genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC), que se introdujeron durante la producción de las células iPS en células iPS no diferenciadas. El análisis mostró que la expresión de todos los genes se suprimió mediante un mecanismo de silenciamiento (fig. 2A). Asimismo, en células megacariocíticas inducidas por diferenciación el día 25 de cultivo, se confirmó la reactivación de la expresión de cada transgén (fig. 2B).

25 Estos resultados sugieren una posibilidad de que la reactivación de la expresión de cualquiera de los genes introducidos durante la producción de las células iPS esté relacionada con el aumento de la cantidad de células megacariocíticas producidas. Por consiguiente, se analizó el gen causal relacionado con el aumento de la cantidad de células megacariocíticas. Por separado, se expresó cada gen de forma forzada mediante un retrovirus en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de células madre embrionarias humanas (en las que no se introdujo de forma exógena OCT3/4, SOX2, KLF-4 ni c-MYC, a diferencia de las células iPS) y se recontó la cantidad de células megacariocíticas CD42b positivas producidas. Como consecuencia, se demostró que la cantidad de células megacariocíticas CD42b positivas producidas aumentó aproximadamente 10 veces en caso de introducir c-MYC, en comparación con la introducción de los otros genes (fig. 3). Estos resultados indican que el rendimiento elevado de inducción de megacariocitos a partir de las células iPS con cuatro factores puede deberse a la reactivación de la expresión del gen c-MYC.

40 También se confirmó que las células megacariocíticas inducidas a partir de las células iPS con cuatro factores mostraron un índice de supervivencia superior después de la congelación-descongelación que las células megacariocíticas inducidas a partir de las células madre embrionarias o las células iPS con tres factores. Con mayor detalle, mientras que el índice de supervivencia después de la congelación-descongelación de las células megacariocíticas inducidas a partir de las células madre embrionarias humanas (KhES-3) y las células iPS humanas con tres factores (TkDN4-M) era, respectivamente, de un 56,7 % y de un 54,5 %, es decir, simplemente aproximadamente 1/2, el índice de supervivencia después de la congelación-descongelación de las células megacariocíticas inducidas a partir de las células iPS humanas con cuatro factores (TkDA3-4) era de un 81,0 %, y alcanzaba aproximadamente 4/5. Esto indica que las células progenitoras megacariocíticas en las que se produce la reactivación del oncogén, tal como el gen c-MYC, son más adecuadas para la crioconservación y se suministran más fácilmente después de la descongelación.

50 Se estudió la cantidad de plaquetas producidas de la misma manera que las células megacariocíticas. El día 15 de cultivo de las células iPS y de las células madre embrionarias, se sembraron células progenitoras hematopoyéticas extraídas de una estructura similar a una red y se recontó a lo largo de un periodo de tiempo la cantidad de plaquetas inducidas posteriormente. Como consecuencia, se produjeron plaquetas de forma eficiente a partir de las células iPS con cuatro factores, como en el caso de las células megacariocíticas (fig. 4).

55 A continuación, se llevó a cabo un experimento de transfusión de plaquetas producidas *in vitro* mediante la utilización de la línea celular TkDA3-4, que tenía la capacidad de producción de plaquetas más elevada. Se suministraron con antelación ratones con deficiencia inmunitaria de un modelo con trombocitopenia mediante irradiación, y se transfundieron las plaquetas derivadas de células iPS a través de la vena caudal (fig. 5A). Se observó quimerismo de las plaquetas de aproximadamente un 20 % 30 minutos después de la transfusión. Incluso 2 horas después de la transfusión, se seguía observando quimerismo de las plaquetas de aproximadamente un 10 %. Por lo tanto, se mostraron las mismas características que las plaquetas frescas derivadas de la sangre periférica humana (fig. 5B).

65 Asimismo, se analizó la capacidad de formación de trombos de las plaquetas derivadas de células iPS humanas *in vivo* mediante microscopía confocal secuencial.

Las plaquetas derivadas de células iPS se tiñeron con éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE: pigmento rojo), se mezclaron con hematoporfirina y se inyectaron a través de la vena caudal de ratones. Mediante la tinción de la corriente sanguínea (distinta de los componentes celulares) con FITC-dextrano (verde), se descoloraron componentes sanguíneos en el vaso sanguíneo, permitiendo que se reconocieran componentes de glóbulos por su forma y tamaño. Cuando la hematoporfirina reaccionó mediante láser y se provocó daño endotelial vascular, las plaquetas formaron una capa sólida y se adhirieron al endotelio dañado o al punto de denudación endotelial y se indujo la formación de trombos.

La arteria pequeña mesentérica de los ratones se irradió con láser de una longitud de onda de 488 nm a 30 mW. Tras 13 segundos, las plaquetas derivadas de células iPS teñidas de rojo se adhirieron al endotelio dañado (el área indicada como "derivada de iPS" por las flechas en la fig. 6). Tras 20 segundos, las plaquetas indujeron la formación de trombos en coordinación con otras plaquetas derivadas del huésped (plaquetas de ratones), lo que produjo la oclusión de vaso sanguíneo. Por lo tanto, se demostró que las plaquetas derivadas de células iPS eran capaces de la formación de trombos en corriente sanguínea *in vivo*.

Estos resultados demuestran que las plaquetas preparadas a partir de células iPS, que se establecen mediante la introducción de los cuatro genes, incluido el gen c-MYC, y en las que se reactiva el gen c-MYC poseen las mismas características fisiológicas que las plaquetas derivadas de sangre periférica humana.

Como se desprende del análisis anterior, con el fin de inducir de forma eficiente las células megacariocíticas y las plaquetas a partir de células iPS, es importante inducir la expresión del gen c-MYC y mantener el efecto del producto génico c-MYC en las células. Por consiguiente, se espera que una manera eficaz de inducir células megacariocíticas y plaquetas a partir de células iPS consista en la expresión del gen c-MYC en células progenitoras megacariocíticas mononucleares, que son células progenitoras megacariocíticas no diferenciadas y también en la supresión de la senescencia inducida por oncogenes (OIS) con el fin de mantener el efecto del producto génico c-MYC. Por este motivo, el gen polycomb se expresó de forma simultánea con el gen c-MYC para la supresión de la OIS, y se analizó su efecto.

Ejemplo de referencia 2. Rendimiento de la producción de células megacariocíticas maduras a partir de células progenitoras megacariocíticas que expresan el gen c-MYC y el gen BMI1

Como consecuencia de la comparación del rendimiento de la producción megacariocítica entre la línea celular iPS establecida mediante la utilización de los cuatro genes y la línea celular iPS establecida mediante la utilización de los tres genes, se descubrió que la reactivación del gen c-MYC en las células progenitoras megacariocíticas influía en la cantidad de células megacariocíticas maduras inducidas posteriormente. Por lo tanto, se analizó cómo influye la expresión del gen c-MYC en células progenitoras megacariocíticas derivadas de células madre embrionarias, que son células madre pluripotentes en las que no se introduce el gen c-MYC, en la inducción posterior de células megacariocíticas.

Se preparó una estructura similar a una red a partir de una línea de células madre embrionarias humanas (KhES-3) en presencia de 20 ng/ml de VEGF. Se sembraron células progenitoras megacariocíticas (previas a la multinucleación) extraídas de esta estructura similar a una red en células 10T1/2 a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y, tras 0 horas, 12 horas y 24 horas a partir de la siembra, se infectaron con un vector retroviral portador del gen c-MYC (SEQ ID NO: 1). Después de 36 horas, el medio de cultivo se cambió a un medio que no contenía el retrovirus y se continuó el cultivo. La introducción de genes por medio del retrovirus se llevó a cabo mediante infección por rotación mediante la utilización de una placa de 6 pocillos a la que se añadieron entre 2 y 3 ml de medio de cultivo, en condiciones de 900 rpm y 90 minutos. El cultivo se llevó a cabo mediante la utilización del medio de cultivo en el que también se añadieron 100 ng/ml de SCF, 40 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de FL, 40 ng/ml de VEGF y protamina a IMDM, al que se añadió FBS en una concentración final de un 15 % (fig. 7).

Como consecuencia del análisis FACS el día 9 después de la infección retroviral, se observó que las células que tienen CD41a y CD42b aumentaron predominantemente en las células en las que se introdujo c-MYC, en comparación con un vector control (fig. 8A). Asimismo, cuando se examinaron las células mediante un cytopspin, se observaron células multinucleadas en el control, mientras que en las células en las que se introdujo c-MYC se observaron células mononucleares previas a la multinucleación (fig. 8B). Estos resultados indican que la expresión forzada de c-MYC hace que las células megacariocíticas inmaduras mononucleares aumenten. Los resultados son similares a los de ratones transgénicos en los que se expresó c-MYC de manera específica de megacariocitos (véase Alexander *et al.*, Deregulated expression of c-MYC in megakaryocytes of transgenic mice increases megakaryopoiesis and decreases polyploidization, J. Biol. Chem., 1996 sep 20; 271 (38): 22976-82).

A continuación, se analizó la capacidad de crecimiento celular en el estado expresado de c-MYC. Como consecuencia, se observó que el crecimiento disminuyó desde el día 14 después de la infección (fig. 9). Este fenómeno es un mecanismo de evitación de la cancerización de células de efectuar la detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis en respuesta a una señal de crecimiento anormal debido a la expresión excesiva de un oncogén, tal como c-MYC, y se denomina senescencia inducida por oncogenes (OIS) (descrito anteriormente). Habida cuenta de ello, en un intento de evitar la OIS, BMI1, que es uno de los genes polycomb para regular, de

forma negativa, el gen *Ink4a/Arf*, que codifica los productos génicos supresores de tumores p16 y p19, se introdujo en las células progenitoras megacariocíticas. El gen *c-MYC* y el gen *BMI1* (SEQ ID NO: 2) se introdujeron en las células mediante el método de introducción de gen retroviral mencionado anteriormente, después del cual se llevó a cabo el análisis FACS. Como consecuencia, se obtuvo una colonia celular CD41a positiva/CD42b positiva (marcador megacariocítico) de forma estable y con crecimiento exponencial con el tiempo después de la introducción de genes (fig. 10). Se confirmó que, mientras que la cantidad de células CD41a positivas/CD42b positivas disminuyó considerablemente el día 20 después de la introducción de genes en el caso de introducir solamente el gen *c-MYC* en las células (resultado del análisis inferior en la fig. 10), la cantidad de células CD41a positivas/CD42b positivas aumentó día tras día en caso de introducir el gen *c-MYC* y el gen *BMI1* (resultado del análisis superior en la fig. 10). Esto demuestra que las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple en las que se introduce tanto el gen *c-MYC* como el gen *BMI1* como uno de los genes *polycomb*, se diferencian en células megacariocíticas al tiempo que conservan una capacidad de crecimiento elevada mediante la evitación de la OIS. En la presente memoria, con el fin de determinar las características de las células megacariocíticas obtenidas, se llevó a cabo el análisis FACS sobre si CD9 y CD42a, que son otras moléculas funcionales específicas de megacariocitos, están presentes en las superficies celulares (véase la fig. 11A). Como consecuencia, pudo confirmarse la presencia de CD9 y CD42b en la línea celular en la que se introdujo el gen *c-MYC* y el gen *BMI1* (fig. 11B).

A continuación, se analizó la capacidad de crecimiento de las células que expresan *c-MYC/BMI1*. Las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple en las que se introdujo el gen *c-MYC* y el gen *BMI1*, se cultivaron en un medio de cultivo en el que se añadieron también 100 ng/ml de SCF, 40 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de FL y 40 ng/ml de VEGF a IMDM al que se añadió FBS en una concentración final de un 15 %, y se recató la cantidad de células durante un periodo de tiempo. Como consecuencia, se obtuvieron aproximadamente  $4 \times 10^7$  células CD41a positivas el día 49 después de la introducción de genes (fig. 12). Además, cuando se observaron plaquetas liberadas por las células progenitoras megacariocíticas derivadas de las células de expresión de *c-MYC/BMI1* a través de un microscopio electrónico, se pudieron confirmar estructuras microtubulares, sistemas canaliculares abiertos y gránulos de plaquetas característicos de las plaquetas (fig. 13).

Ejemplo de referencia 3. Inducción de eritrocitos a partir de células progenitoras hematopoyéticas en las que se introdujo el gen *c-MYC* a través de células progenitoras eritroides

A continuación, se trató de alcanzar la producción de eritrocitos a partir de células progenitoras eritroides obtenidas de células progenitoras hematopoyéticas en las que se introdujo el gen *c-MYC*. De la misma manera que la introducción del gen *c-MYC* o el gen *BMI1* descritos en la sección anterior 2, se produjeron células de expresión de *c-MYC/HOXA2* (SEQ ID NO: 3) y células de expresión de *c-MYC/BCLXL* (SEQ ID NO: 4) y se llevó a cabo el análisis FACS. Como consecuencia, se confirmó la presencia de una colonia celular CD71 positiva/GlyA positiva marcadora de eritroides en las células de expresión de *c-MYC/HOXA2* el día 105 después de la introducción de genes (vista superior derecha en la fig. 14). Asimismo, también se confirmó la presencia de una colonia celular GlyA positiva en las células de expresión de *c-MYC/BCLXL* (vista inferior derecha en la fig. 14). Esto demuestra que las células progenitoras hematopoyéticas en las que se introduce el gen *c-MYC* también pueden diferenciarse en eritrocitos cambiando la combinación de factores introducidos.

Ejemplo de referencia 4. Producción de plaquetas funcionales mediante la utilización del sistema de inducción de expresión de genes

Según se desprende de lo anterior, una manera eficaz de preparar células megacariocíticas y plaquetas de forma eficiente en grandes cantidades consiste en aumentar la cantidad de células progenitoras megacariocíticas. A tales efectos, es necesario coexpresar el gen de la familia *c-MYC* y el gen *polycomb* de manera simultánea en células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple para, de esta manera, mejorar la capacidad de crecimiento de las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple. Con el fin de facilitar la maduración de células megacariocíticas (multinucleación), sin embargo, es deseable regular, de manera supresora, la expresión del gen de la familia *c-MYC* y el gen *polycomb*, en función de las circunstancias.

Habida cuenta de ello, las plaquetas se produjeron mediante la regulación de manera inducible de la expresión del gen *c-MYC* y el gen *BMI1* mediante la utilización de un sistema pMX tet off, y se analizó la funcionalidad fisiológica de las plaquetas.

Ejemplo de referencia 4-1. Confirmación de la funcionalidad del vector de regulación de genes

Se preparó un vector todo en uno en el que se incorporó *c-MYC-2A-BMI1* en un vector pMX tet off (suministrado por el Prof. Hiroyuki Mano, de la Jichi Medical University) ("2A" es un péptido que tiene actividad propia de escisión derivado del virus de la fiebre aftosa, donde puede obtenerse una pluralidad de proteínas de manera eficiente a partir de un único promotor mediante el atrapamiento de esta secuencia entre una pluralidad de proteínas (Hasegawa *et al.*, 2007 Stem Cells)). El vector pMX tet off *c-MYC 2A BMI1* induce la expresión del gen *c-MYC* y el gen *BMI1* en presencia de estradiol, y suprime la expresión del gen *c-MYC* y el gen *BMI1* en presencia de tetraciclina y en ausencia de estradiol.

El vector pMx tet off c-MYC 2A BMI1 preparado se expresó en células 293GPG y el estado de regulación de expresión del gen c-MYC y el gen BMI1 se confirmó mediante FACS. En la figura 15, se muestran los resultados del análisis FACS en el que se tiñó la proteína c-MYC en las células con un anticuerpo de proteína anti-c-MYC y, a continuación, se tiñó con un anticuerpo secundario marcado con Alexa647. Según se desprende del dibujo, en las células 293GPG en las que se incorporó pMX tet off c-MYC 2A BMI1, el nivel de expresión del gen c-MYC era similar al de las células 293GPG de un control en presencia de tetraciclina (los gráficos que se indican como 293gpg y +tetraciclina en la fig. 15), pero se estimuló la expresión del gen c-MYC en presencia de estradiol (el gráfico que se indica como + $\beta$ -estradiol en la fig. 15).

Estos resultados demuestran que la expresión del gen diana puede regularse mediante el vector pMx tet off c-MYC 2A BMI1 utilizado en la presente memoria.

Ejemplo de referencia 4-2. Producción de línea celular megacariocítica mediante vector de regulación de genes

El vector de regulación de genes que se describe en la sección anterior 4-1 se utilizó para expresar el gen c-MYC y el gen BMI1 en células progenitoras megacariocíticas derivadas de una línea de células madre embrionarias humanas (KhES-3), y se analizó su capacidad de crecimiento y su capacidad de diferenciación.

El análisis se llevó a cabo en células en las que sólo se introdujo un vector (fig. 16A(a)), una línea celular en la que se expresaron de manera forzada, por separado, pMX c-MYC y Dsam BMI1 (fig. 16A(b)), una línea celular en la que se expresaron, por separado, pMX tet off c-MYC y pMX tet off BMI1 (fig. 16A(c)), una línea celular en la que se expresó pMX tet off c-MYC 2A BMI1 (fig. 16A(d)) y una línea celular en la que se expresó pMX tet off BMI1 2A c-MYC (fig. 16A(e)). En la presente memoria, (d) y (e) son constructos que difieren en el orden de disposición del gen c-MYC y el gen BMI1 con la secuencia 2A en medio.

En la figura 16A, se muestran curvas de crecimiento de la célula CD41a+ para estas líneas celulares. Cada línea celular se tiñó con un anticuerpo anti-CD41a y un anticuerpo anti-CD42b como marcadores megacariocíticos, y se analizaron mediante la utilización de un citómetro de flujo. La línea celular generada mediante la utilización de pMX tet off c-MYC 2A BMI1 (en la fig. 16A(d)) se muestra el mismo fenotipo que la línea celular que expresa, de forma forzada, pMX c-MYC y Dsam BMI1 por separado (fig. 16A(b)), donde la mayoría de las poblaciones celulares expresaron el marcador megacariocítico (panel superior de la fig. 16B). Asimismo, la línea celular generada mediante la utilización de pMX tet off c-MYC 2A BMI1 (la fig. 16A(d)) presentó una capacidad de crecimiento superior que la línea celular en la que se introdujo, por separado, pMX tet off c-MYC y pMX tet off BMI1 (fig. 16A(c)) y la línea celular generada mediante la utilización de pMX tet off BMI1 2A c-MYC (fig. 16A(e)).

Cuando se tiñó con un anticuerpo antiglicoforina-a y un anticuerpo anti-CD41a, una población de células CD41a+/Gly-a+ del marcador común de megacariocitos/eritoblastos estaba presente en la línea celular de expresión forzada de pMX c-MYC y Dsam BMI1 por separado (panel inferior de la fig. 16B, izquierda), mientras que Gly-a desapareció en la línea celular generada mediante la utilización de pMX tet off c-MYC 2A BMI1 (panel inferior de la fig. 16B, derecha). Esto indica que la línea celular generada mediante la utilización de pMX tet off c-MYC 2A BMI1 es una línea celular más diferenciada en megacariocitos que la línea celular de expresión forzada de pMX c-MYC y Dsam BMI1, por separado.

Ejemplo de referencia 4-3. Sobre la multinucleación de megacariocitos

Se examinó el grado de multinucleación de la línea celular de expresión forzada del gen c-MYC y el gen BMI1 por medio del vector pMx tet off c-MYC 2A BMI1 en presencia de  $\beta$ -estradiol. Los megacariocitos derivados de humanos normalmente se multinuclearon a aproximadamente 32 N (fig. 17A).

Por otro lado, la línea celular que expresaba de forma forzada el gen c-MYC y el gen BMI1 por medio del vector pMx tet off c-MYC 2A BMI1 prácticamente no se multinucleó, siendo el grado de multinucleación de entre 2N y 4N.

Ejemplo de referencia 4-4. Análisis funcional de plaquetas derivadas de la línea celular megacariocítica de expresión del gen c-MYC y el gen BMI1

Los ensayos funcionales se realizaron en plaquetas derivadas de una línea celular megacariocítica de expresión del gen c-MYC y el gen BMI1.

Plaquetas derivadas de sangre periférica humana de un control se unieron a fibrinógeno en presencia de ADP (difosfato de adenosina, factor intracelular para la activación de plaquetas), y mostraron una capacidad de activación de integrina normal (señal al revés) necesaria para una fase inicial de formación de trombos (vista superior derecha en la fig. 18). Mientras tanto, ni la línea celular pMX tet off c-MYC 2A BMI1 (en presencia de estradiol) ni la línea celular de expresión forzada de pMX c-MYC y Dsam BMI1 se unieron a fibrinógeno incluso con la adición de ADP (vista media e inferior de la fig. 18). Por lo tanto, se reveló que las plaquetas que presentan funcionalidad normal no se liberan cuando el gen c-MYC y el gen BMI1 siguen expresándose de forma forzada.

A continuación, para la línea celular que expresa de forma forzada el gen c-MYC y el gen BMI1 por medio del vector pMx tet off c-MYC 2A BMI1, después de inactivar la expresión forzada en condiciones de +tetraciclina y -β-estradiol, se analizó la capacidad de activación de integrina de las plaquetas CD41a+/CD42b el día 4 de cultivo mediante la utilización de un citómetro de flujo (fig. 19). Como consecuencia, se descubrió que un anticuerpo PAC1 (anticuerpo unido a integrina αIIbβ3 activada) se unió en presencia de ADP, y mostró de esta manera capacidad de activación de integrina normal (señal al revés) (fig. 19B estimulación de ADP).

Estos resultados indican que, si bien las plaquetas producidas a partir de una línea celular megacariocítica que ha crecido mediante la expresión forzada del gen c-MYC presentan un trastorno funcional, las plaquetas que presentan funcionalidad normal pueden producirse mediante la inactivación de la expresión forzada del gen c-MYC, entre otros, en la línea celular megacariocítica.

La regulación de la expresión del gen c-MYC y del gen BMI1 en las células progenitoras megacariocíticas descritas anteriormente también puede aplicarse al gen de la familia MYC, el gen BCLXL, y el gen HOXA2 utilizados para establecer una línea de células progenitoras eritroides, de forma que se permite la inducción de eritrocitos maduros.

Se reveló que MYC y BMI1 provocan crecimiento celular en una fase de fracciones MEP, que son células progenitoras comunes a las células megacariocíticas y las células eritroides o en una fase de células progenitoras megacariocíticas más diferenciadas que las fracciones MEP (fig. 20). Puesto que las células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple en las que se introduce el gen c-MYC y el gen BMI1 pueden crioconservarse, las células megacariocíticas y las plaquetas pueden prepararse a partir de *stock* congelado, en función de las necesidades.

De la misma manera, una línea de células progenitoras eritroides producida mediante la introducción del gen MYC y del gen BCLXL u HOXA2 puede crioconservarse y descongelarse y prepararse en función de las necesidades.

Asimismo, mediante el aumento o descenso de la expresión del gen MYC y el gen BMI1 introducidos, las plaquetas o células eritroides que mantienen bioactividad pueden prepararse en cantidad suficiente.

### 30 **Aplicabilidad industrial**

En la presente memoria, se da a conocer un método de amplificación de células en una fase de diferenciación para producir células específicas más diferenciadas. Mediante la aplicación del método a, por ejemplo, glóbulos, las células en una fase de diferenciación deseada pueden suministrarse en una cantidad elevada. Por lo tanto, el método especialmente constituye una contribución considerable al desarrollo del tratamiento en el campo de la medicina.

Los aspectos a título de ejemplo de las divulgaciones en el presente documento se describen en las siguientes cláusulas:

1. Un método para producir células específicas induciendo la diferenciación de las células, en donde un oncogén se expresa de manera forzada en las células en una etapa de diferenciación deseada para amplificar las células en la etapa de diferenciación deseada.

2. El método para producir células específicas de acuerdo con la cláusula 1, en donde la senescencia inducida por oncogén que se induce mediante la expresión forzada del oncogén en las células en la etapa de diferenciación deseada se suprime.

3. El método para producir células específicas de acuerdo con la cláusula 1 o 2, en donde la supresión de la senescencia inducida por oncogén se logra mediante la expresión de un gen polycomb.

4. El método para producir células específicas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en donde las células en la etapa de diferenciación deseada son células inducidas por diferenciación de células madre embrionarias o células iPS.

5. El método para producir células específicas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 4, en donde se introduce un oncogén exógeno o se introduce un oncogén y un gen polycomb en las células en la etapa de diferenciación deseada, y el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducido se expresan de manera forzada.

6. El método para producir células específicas de acuerdo con la cláusula 5, en donde el oncogén exógeno o el gen polycomb se introduce en las células progenitoras de las células en la etapa de diferenciación deseada, y el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducidos se expresan de manera inducida y forzada.

7. El método para producir células específicas de acuerdo con la cláusula 5 o 6, en donde el oncogén y/o el gen polycomb están unidos cada uno de manera operativa a un lado en dirección 3' de un promotor inducible, y el

oncogén unido o el oncogén y el gen polycomb se expresan de manera inducida y forzada.

8. El método para producir células específicas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 5 a 7, en donde la expresión del oncogén o la expresión del oncogén y del gen polycomb en las células en la etapa de diferenciación deseada se suprime para promover la diferenciación de las células en la etapa de diferenciación deseada.

9. El método para producir células específicas de acuerdo con la cláusula 8, en donde la supresión de la expresión del oncogén o la expresión del oncogén y del gen polycomb se logra uniendo de forma operativa el oncogén o el oncogén y el gen polycomb cada uno a un lado en sentido 3' de un promotor supresor para suprimir de este modo la expresión del oncogén o la expresión del oncogén y del gen polycomb.

10. El método para producir células específicas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 9, en donde el oncogén es un gen de la familia MYC.

11. El método para producir células específicas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 3 a 10, en donde el gen polycomb es BMI1.

12. El método para producir células específicas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 6 a 11, en donde las células progenitoras de las células en la etapa de diferenciación deseada son células progenitoras hematopoyéticas, las células en la etapa de diferenciación deseada son células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, y las células específicas son células megacariocíticas maduras.

13. El método para producir células específicas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 6 a 11, en donde las células progenitoras de las células en la etapa de diferenciación deseada son células progenitoras megacariocíticas sin poliploidización múltiple, y las células específicas son plaquetas.

14. El método para producir células específicas de acuerdo con la cláusula 12 o 13, en donde las células progenitoras hematopoyéticas se localizan en la estructura similar a una red preparada de células madre embrionarias o células iPS.

15. Una célula megacariocítica madura que es una célula específica producida por el método de acuerdo con la cláusula 12 o 14.

16. Una plaqueta que es una célula específica producida por el método de acuerdo con la cláusula 13 o 14.

17. Un producto sanguíneo que comprende, como principio activo, la plaqueta de acuerdo con la cláusula 16.

18. Un kit para producir la célula megacariocítica madura de acuerdo con la cláusula 15 o la plaqueta de acuerdo con la cláusula 16.

19. Un glóbulo en una etapa de diferenciación deseada, en donde un oncogén se expresa de manera forzada.

20. El glóbulo de acuerdo con la cláusula 19, en donde el gen polycomb también se expresa de manera forzada.

21. El glóbulo de acuerdo con la cláusula 19 o 20, en donde el glóbulo en la etapa de diferenciación deseada es una célula inducida por diferenciación de una célula madre embrionaria o una célula iPS.

22. El glóbulo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 19 a 21, en donde se introduce un oncogén exógeno o se introduce un oncogén y un gen polycomb en el glóbulo en la etapa de diferenciación deseada, el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducidos se expresan de manera inducida y forzada.

23. El glóbulo de acuerdo con la cláusula 22, en donde el oncogén exógeno o el gen polycomb se introduce en una célula progenitora del glóbulo en la etapa de diferenciación deseada, y el oncogén introducido o el oncogén y el gen polycomb introducidos se expresan de manera forzada.

24. El glóbulo de acuerdo con la cláusula 22 o 23, en donde el oncogén y/o el gen polycomb está cada uno unido de forma operativa a un lado en sentido 3' de un promotor inducible, y el oncogén unido o el oncogén y el gen polycomb unidos se expresan de manera inducida y forzada.

25. El glóbulo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 19 a 24, en donde el oncogén es un gen de la familia MYC.

26. El glóbulo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 25, en donde el gen polycomb es BMI1.

27. El glóbulo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 23 a 26, en donde la célula progenitora del glóbulo en la etapa de diferenciación deseada es una célula progenitora hematopoyética, y el glóbulo en la etapa de

diferenciación deseada es una célula progenitora megacariocítica previa a la multinucleación.

28. El glóbulo de acuerdo con la cláusula 27, en donde la célula progenitora hematopoyética se localiza en una estructura similar a la red preparada de una célula madre embrionaria o una célula iPS.

5 29. Una composición celular congelada que comprende el glóbulo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 19 a 28.

30. Un kit para producir la célula progenitora megacariocítica previa a la multinucleación que es el glóbulo de acuerdo con la cláusula 27 o 28.

10

**Listado de secuencias**

<110> The University of Tokyo

15 <120> Método novedoso para la producción de células diferenciadas

<130>

<150> JP2009-213645

20

<151> 15-09-2009

<160> 4

25 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1319

<212> ADN

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 725 688 T3

atgccctca acgtagctt caccaacagg aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag 60  
 ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg 120  
 cagccccggg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc cccccgccc 180  
 ctgtccccta gccgcccgtc cgggctctgc tcgccctcct acgttgccgt cacacccttc 240  
 tcccttcggg gagacaacga cggcgggtggc gggagcttct ccacggccga ccagctggag 300  
 atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg cgaccgagc 360  
 gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgta tgtggagcgg cttctcggcc 420  
 gccgccaagc tcgtctcaga gaagctggcc tcctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc 480  
 agcccgaacc ccgcccggcg ccacagcgtc tgctccacct ccagcttcta cctgcaggat 540  
 ctgagcggcg ccgctcagag tgcacgacc cctcgggtgt cttcccctac cctctcaacg 600  
 acagcagctc gcccaagtcc tgccctcgc aagactccag cgccttctct ccgtcctcgg 660  
 attctctgct ctctcagc gagtcctccc cgcagggcag ccccgagccc ctggtgctcc 720  
 atgaggagac accgcccacc accagcagc actctgagga ggaacaagaa gatgaggaag 780  
 aatcgatgt tgtttctgtg gaaaagaggc aggtcctgg caaaaggctca gactctggat 840  
 caccttctgc tggaggccac agcaaacctc ctcacagccc actggtcctc aagagggtcc 900  
 acgtctccac acatcagcac aactacgcag cgcctccctc cactcggaag gactatcctg 960  
 ctgccaagag ggtcaagttg gacagtgtca gactcctgag acagatcagc aacaaccgaa 1020  
 aatgcaccag ccccagggtc tcggacaccg aggagaaatgt caagaggcga acacacaacg 1080  
 tcttggagcg ccagaggagg aacgagctaa aacggagctt ttttgccctg cgtgaccaga 1140  
 tcccggagtt ggaaaacaat gaaaaggccc ccaaggtagt tacccttaa aaagccacag 1200  
 catacatcct gtccgtccaa gcagaggagc aaaagctcat ttctgaagag gacttgtgtc 1260  
 ggaaacgacg agaacagttg aaacacaaac ttgaacagct acggaactct tgtgcgtaa 1319

5 <210> 2  
 <211> 981  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 725 688 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 ggaaccttta 600  
 aaggattatt atacactaat ggatattgcc tacatttata cctggagaag gaatggtcca 660  
 cttccattga aatacagagt tcgacctact tgtaaaagaa tgaagatcag tcaccagaga 720  
 gatggactga caaatgctgg agaactggaa agtgactctg ggagtgacaa ggccaacagc 780  
 ccagcaggag gtattcoctc cacctottct tgtttgcta gcccagtac tccagtgcag 840  
 tctcctcatc cacagtttcc tcacatttcc agtactatga atggaaccag caacagcccc 900  
 agcggtaacc accaatcttc ttttgccaat agacctcgaa aatcatcagt aaatgggtca 960  
 tcagcaactt cttctggttg a 981

<210> 3  
 <211> 1131  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

atgaattacg aatttgagcg agagattggt tttatcaata gccagccgtc gctcgctgag 60  
 tgcctgacat cttttccccc tgtcgctgat acatttcaa gttcatcaat caagacctcg 120  
 acgctttcac actcgacact gattcctcct ccttttgagc agaccattcc cagcctgaac 180  
 cccggcagtc accctcgcca cggcgctggc ggccgcccc a gccgagccc cgcgggcagc 240  
 cgcggcagcc cgggtgccgc cggcgccctg cagccgccc agtaccctg gatgaaggag 300  
 aagaaggcgg ccaagaaaac cgcacttctg ccggccgccc cccgcccgc caccgcccga 360  
 gccaccggcc ctgcttgctt cagccacaaa gaatccctgg aaatcgcccga tggcagcggc 420

10

ES 2 725 688 T3

gggggatcgc ggcgcctgag aactgcttac accaacacac agcttctaga gctggaaaaa 480  
 gaatttcatt tcaacaagta cctttgcaga ccccgaaggg tggagattgc agcgcctgctg 540  
 gatttgactg agagacaagt gaaagtgtgg tttcagaacc ggaggatgaa gcacaagagg 600  
 cagaccagtg gcaaggaaaa ccaaaacagc gaagggaaat gtaaaagcct tgaggactcc 660  
 gagaaagtag aggaggacga ggaagagaag acgctctttg agcaagccct tagcgtctct 720  
 ggggcccttc tggagaggga aggctacact tttcagcaa atgccctctc tcagcagcag 780  
 gctcccaatg gacacaatgg cgactcccaa agtttcccag tctcgccttt aaccagcaat 840  
 gagaaaaatc tgaaacattt tcagcaccag tcacccactg ttcccaactg cttgtcaaca 900  
 atgggccaga actgtggagc tggcctaaac aatgacagtc ctgaggccct tgaggtcccc 960  
 tctttgcagg actttagcgt tttctccaca gattcctgcc tgcagctttc agatgcagtt 1020  
 tcaccagtt tgccaggttc cctcgacagt cccgtagata tttcagctga cagcttagac 1080  
 ttttttacag acacactcac cacaatcgac ttgcagcatc tgaattacta a 1131

<210> 4  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

atgtctcaga gcaaccggga gctggtggtt gactttctct cctacaagct ttcccagaaa 60  
 ggatacagct ggagtcagtt tagtgatgtg gaagagaaca ggactgaggc cccagaaggg 120  
 actgaatcgg agatggagac cccagtgcc atcaatggca acccatcctg gcacctggca 180  
 gacagccccg cggatgaatgg agccactggc cacagcagca gtttggatgc ccgggaggtg 240  
 atccccatgg cagcagtaaa gcaagcgctg agggaggcag gcgacgagtt tgaactgcgg 300  
 taccggcggg cattcagtgga cctgacatcc cagctccaca tcaccccagg gacagcatat 360  
 cagagctttg aacaggtagt gaatgaactc ttccgggatg gggtaaactg gggtcgcatt 420  
 gtggcctttt tctccttcgg cggggcactg tgcgtggaaa gcgtagacaa ggagatgcag 480  
 gtattggtga gtcggatcgc agcttggatg gccacttacc tgaatgacca cctagagcct 540  
 tggatccagg agaacggcgg ctgggatact tttgtggaac tctatgggaa caatgcagca 600  
 gccgagagcc gaaagggcca ggaacgcttc aaccgctggt tcctgacggg catgactgtg 660  
 gccggcgtgg ttctgctggg ctcactcttc agtcggaaat ga 702

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para producir células eritroides que comprende: expresar de manera forzada un gen de la familia MYC y uno del gen HOXA2 y el gen BCLXL en células progenitoras eritroides o células previas a la enucleación positivas en glicoforina A, y amplificar las células mediante cultivo; y diferenciar las células amplificadas en las células eritroides.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de diferenciación se realiza cultivando las células amplificadas tras suprimir la expresión forzada del gen de la familia MYC y uno del gen HOXA2 y del gen BCLXL o eliminar el gen de la familia MYC y uno del gen HOXA2 y del gen BCLXL de las células amplificadas.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente crioconservar las células amplificadas tras la etapa de amplificación, en donde la etapa de diferenciación se realiza después de que se descongelen las células crioconservadas.
- 20 4. Un método para producir un producto sanguíneo que comprende: producir células eritroides mediante el método de la reivindicación 1; y mezclar las células eritroides con otros componentes para obtener el producto sanguíneo.
- 25 5. Una población de células que comprende células progenitoras eritroides o células previas a la enucleación positivas en glicoforina A en las que se introducen el gen de la familia MYC y uno del gen HOXA2 y el gen BCLXL, en donde las células comprenden un vector para introducir el gen de la familia MYC y uno del gen HOXA2 y el gen BCLXL.
6. Una composición celular congelada que comprende la población de células de la reivindicación 5.

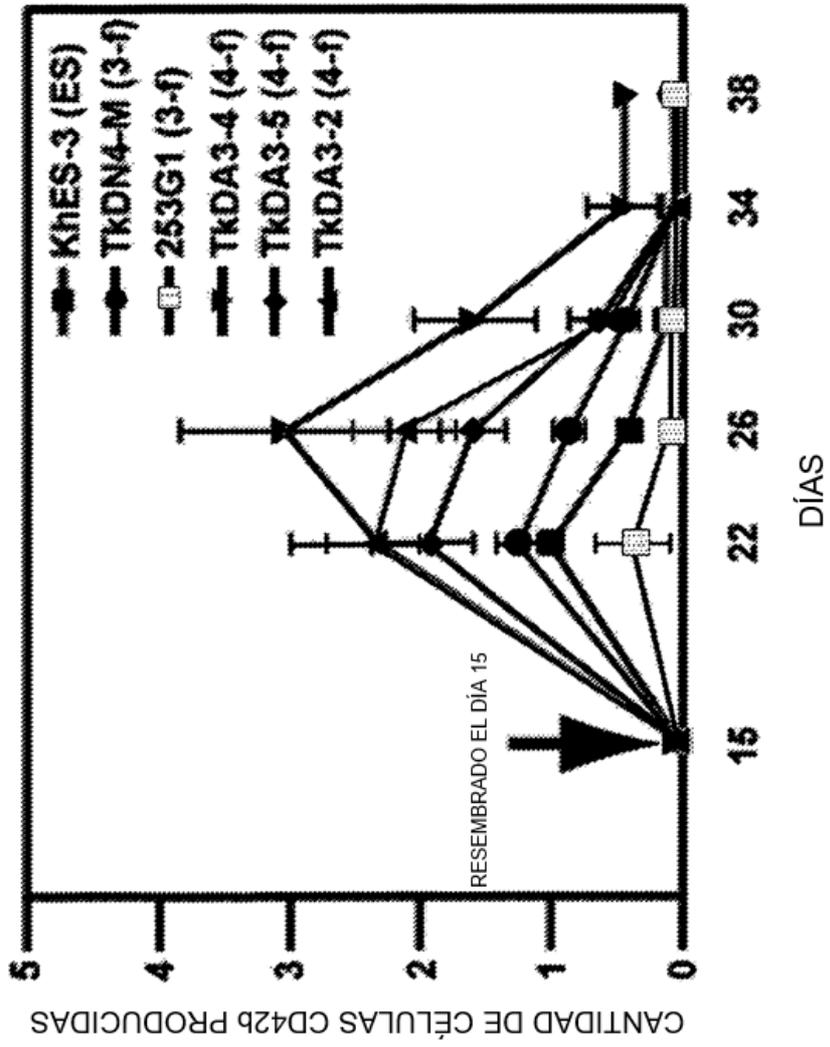


FIG. 1

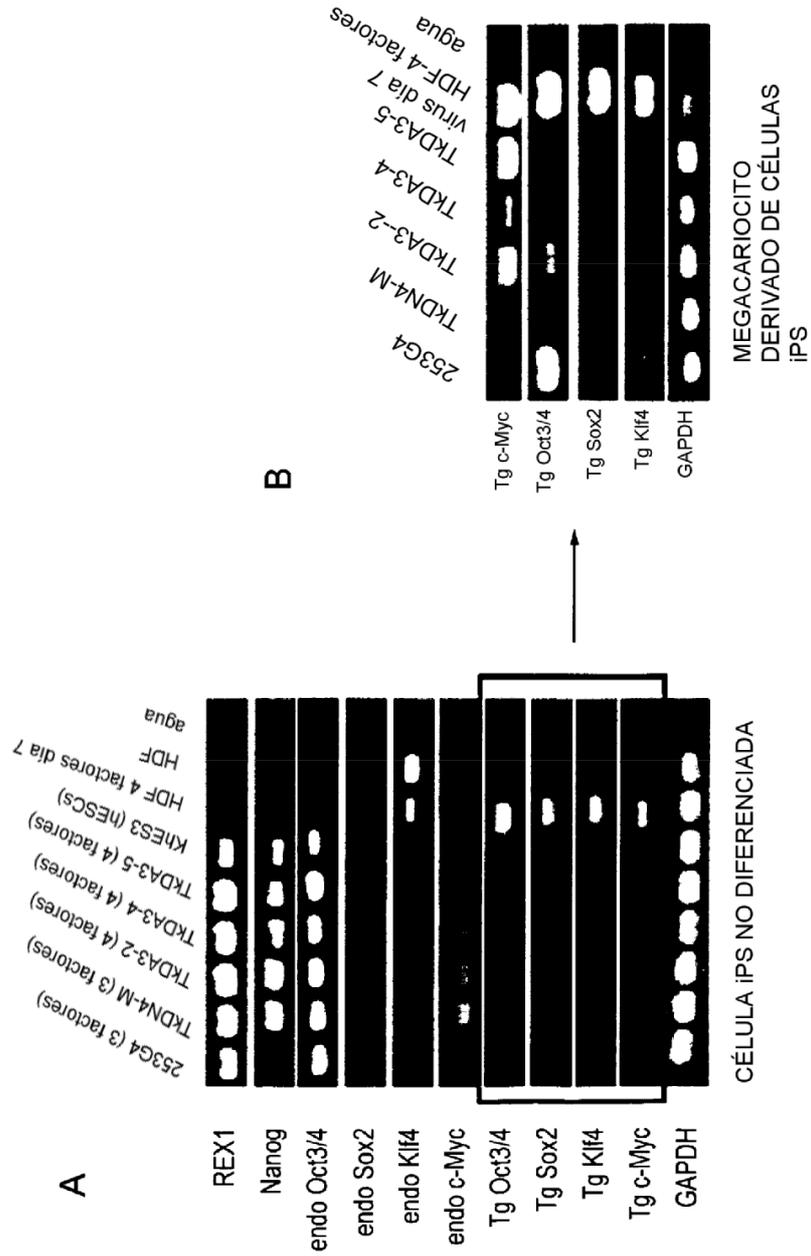


FIG. 2

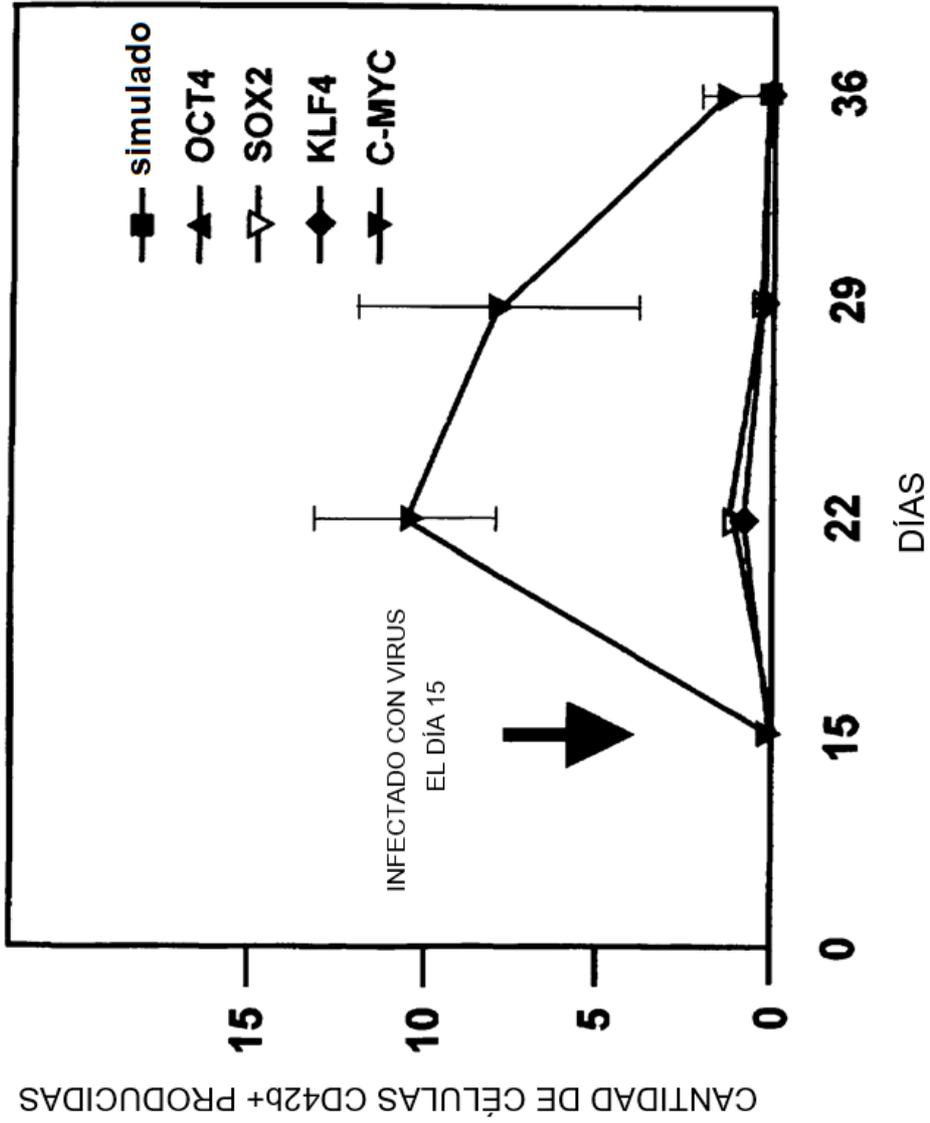


FIG. 3

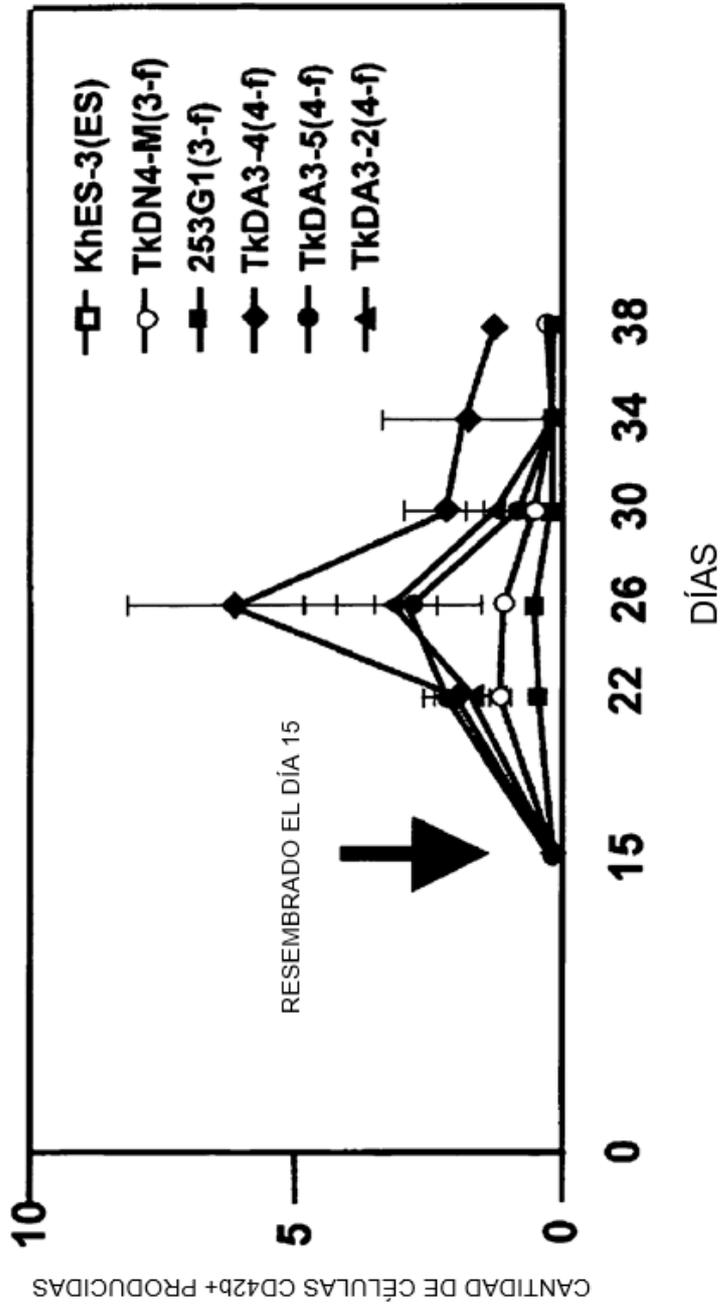


FIG. 4

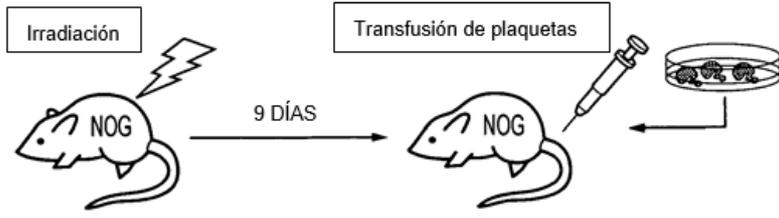


FIG. 5A

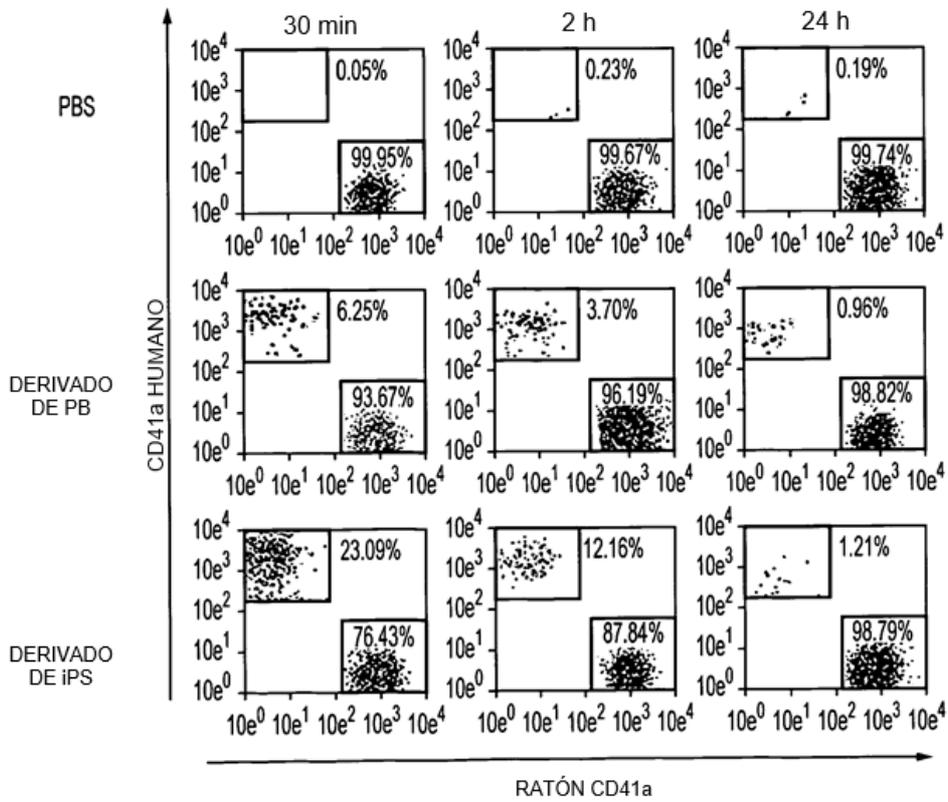


FIG. 5B

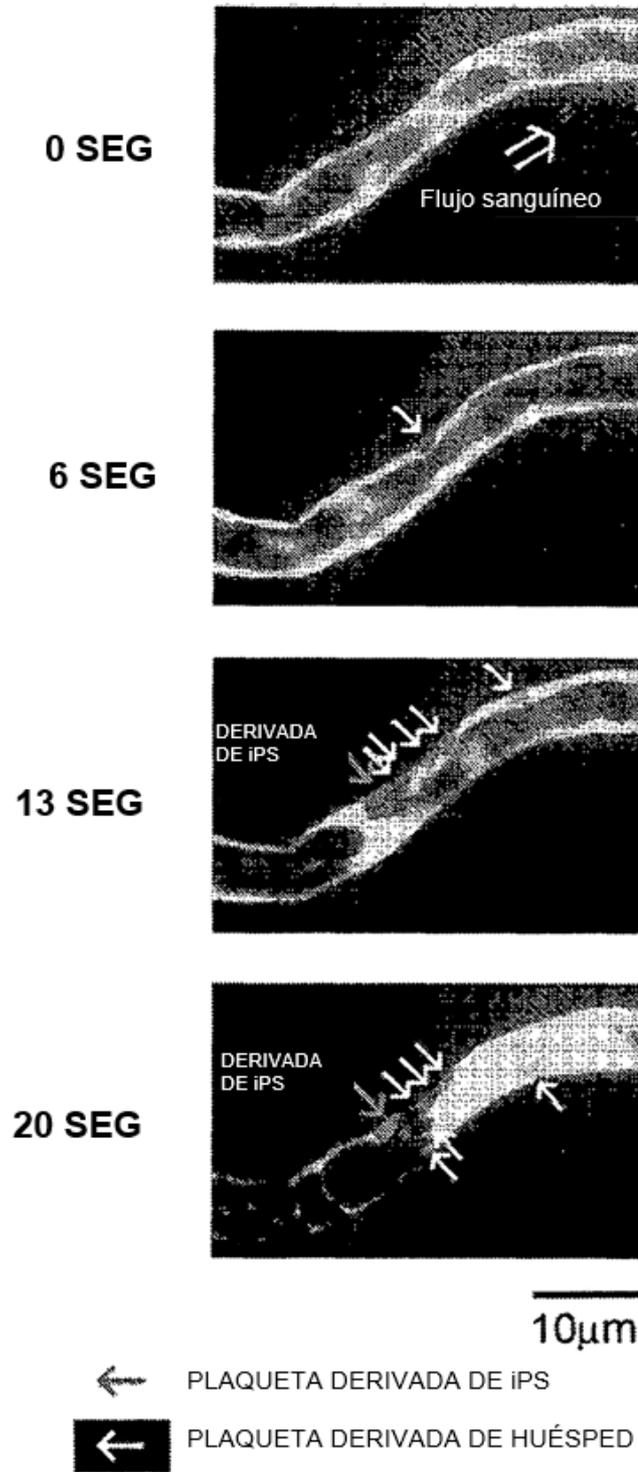


FIG. 6

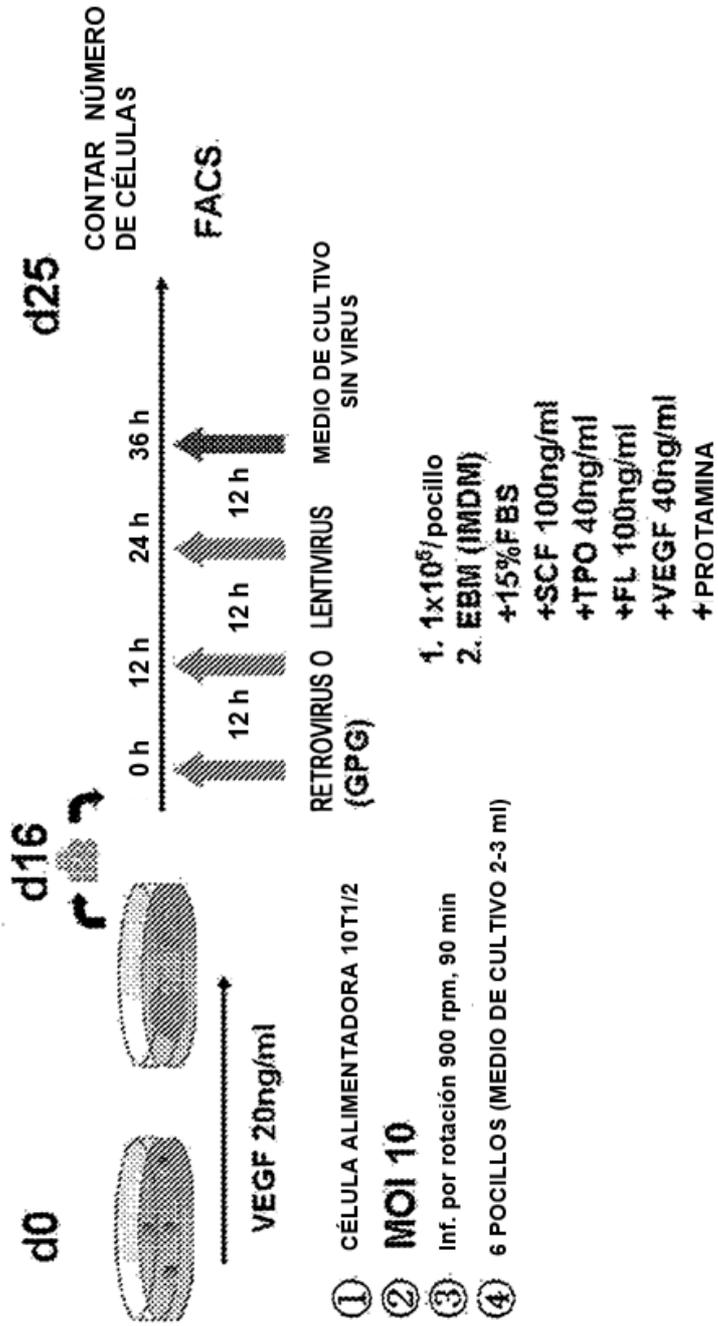


FIG. 7

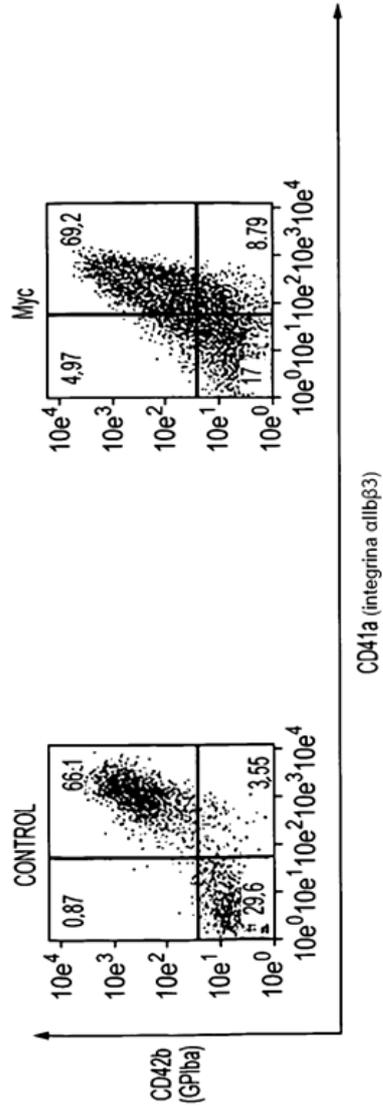


FIG. 8A

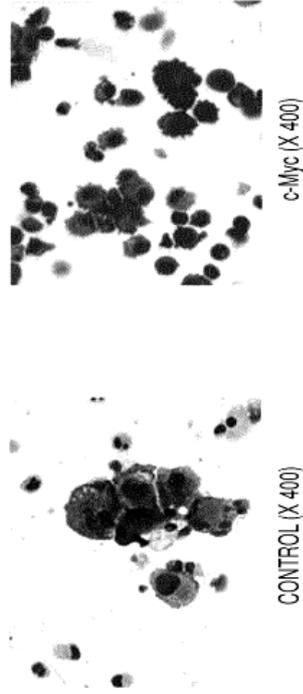


FIG. 8B

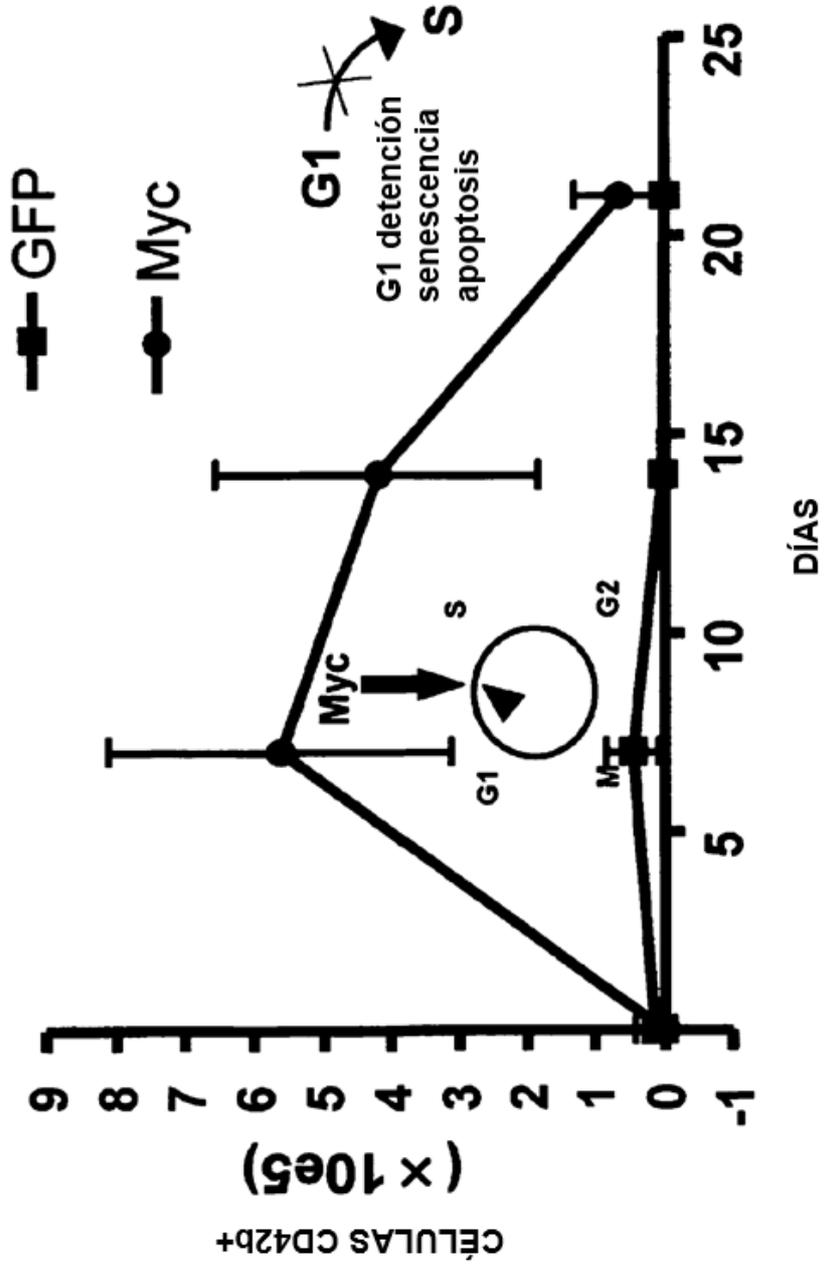
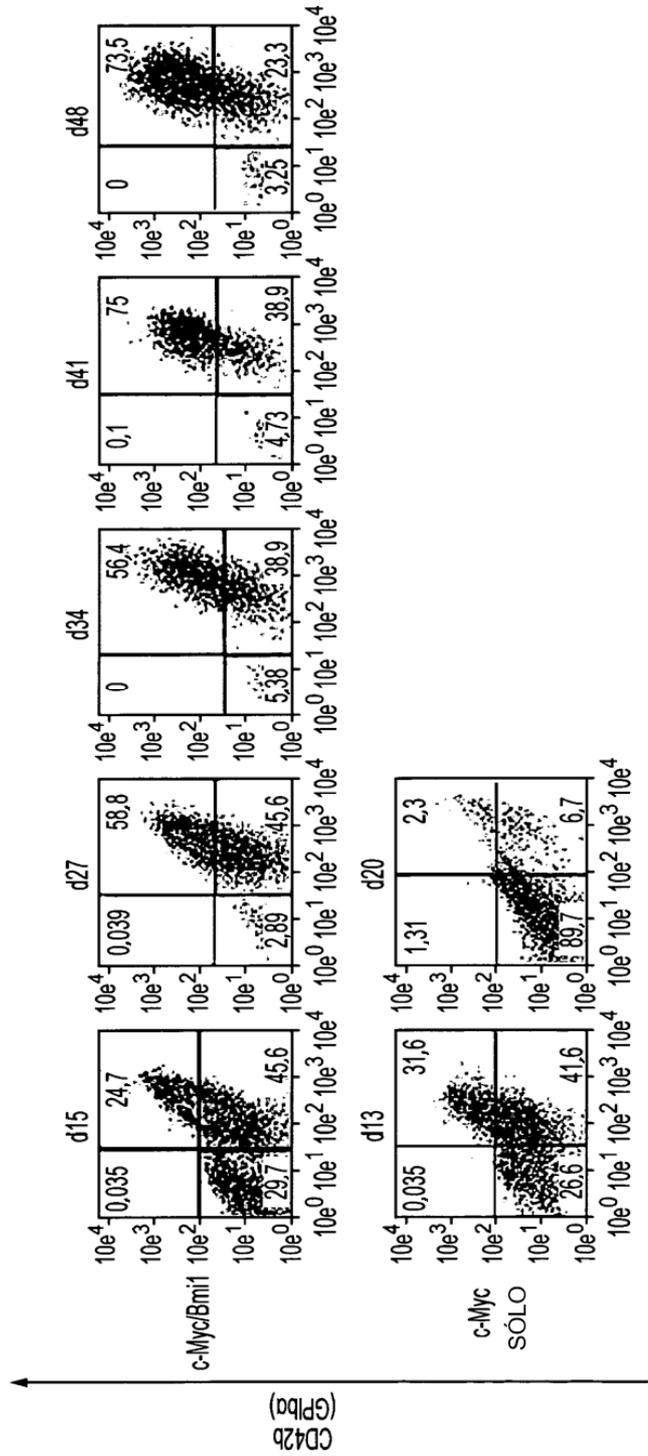


FIG. 9



CD41a (integrina αIIb subunidad)

FIG. 10



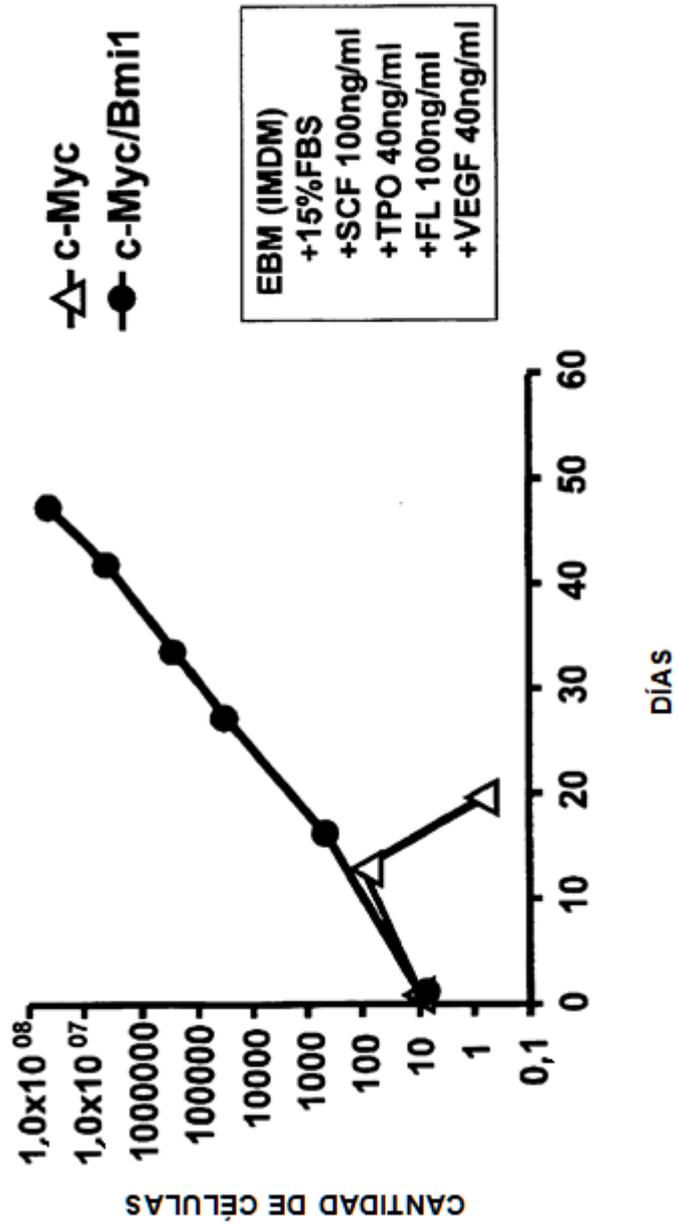
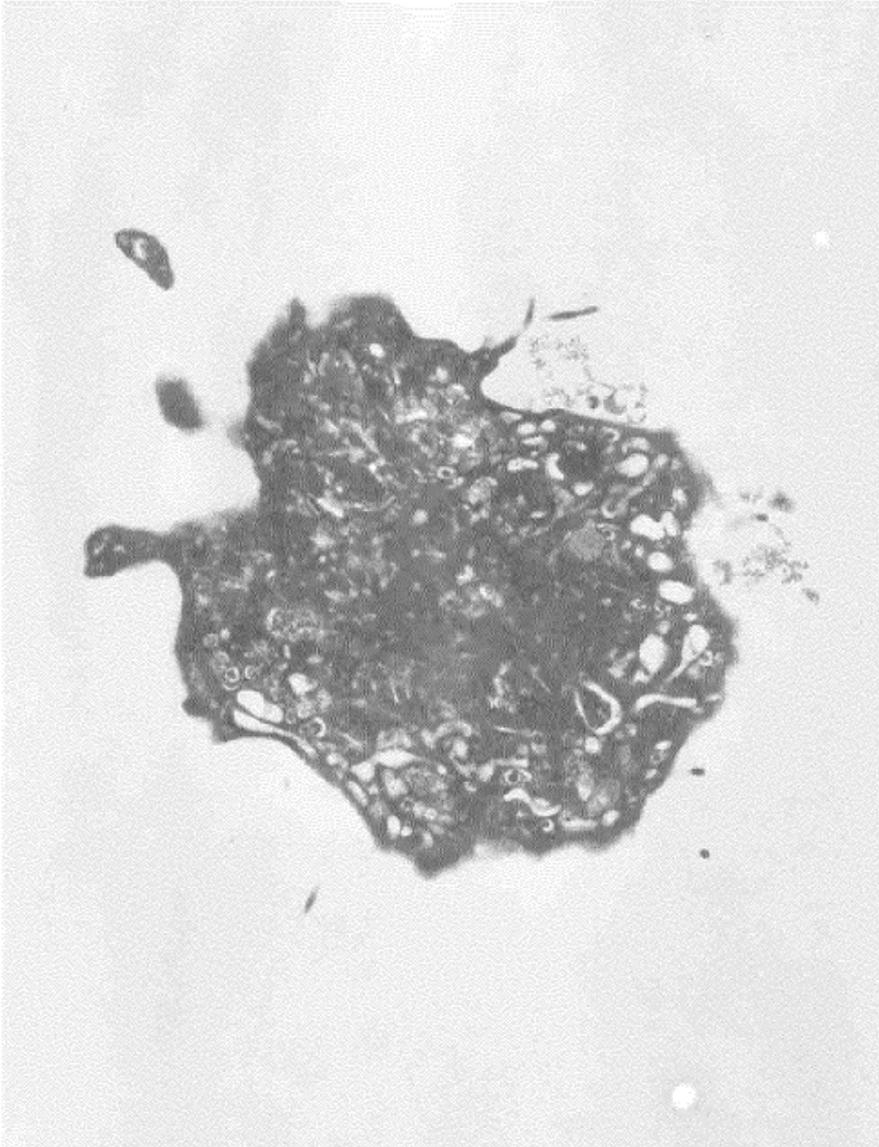


FIG. 12



2 μm

FIG. 13

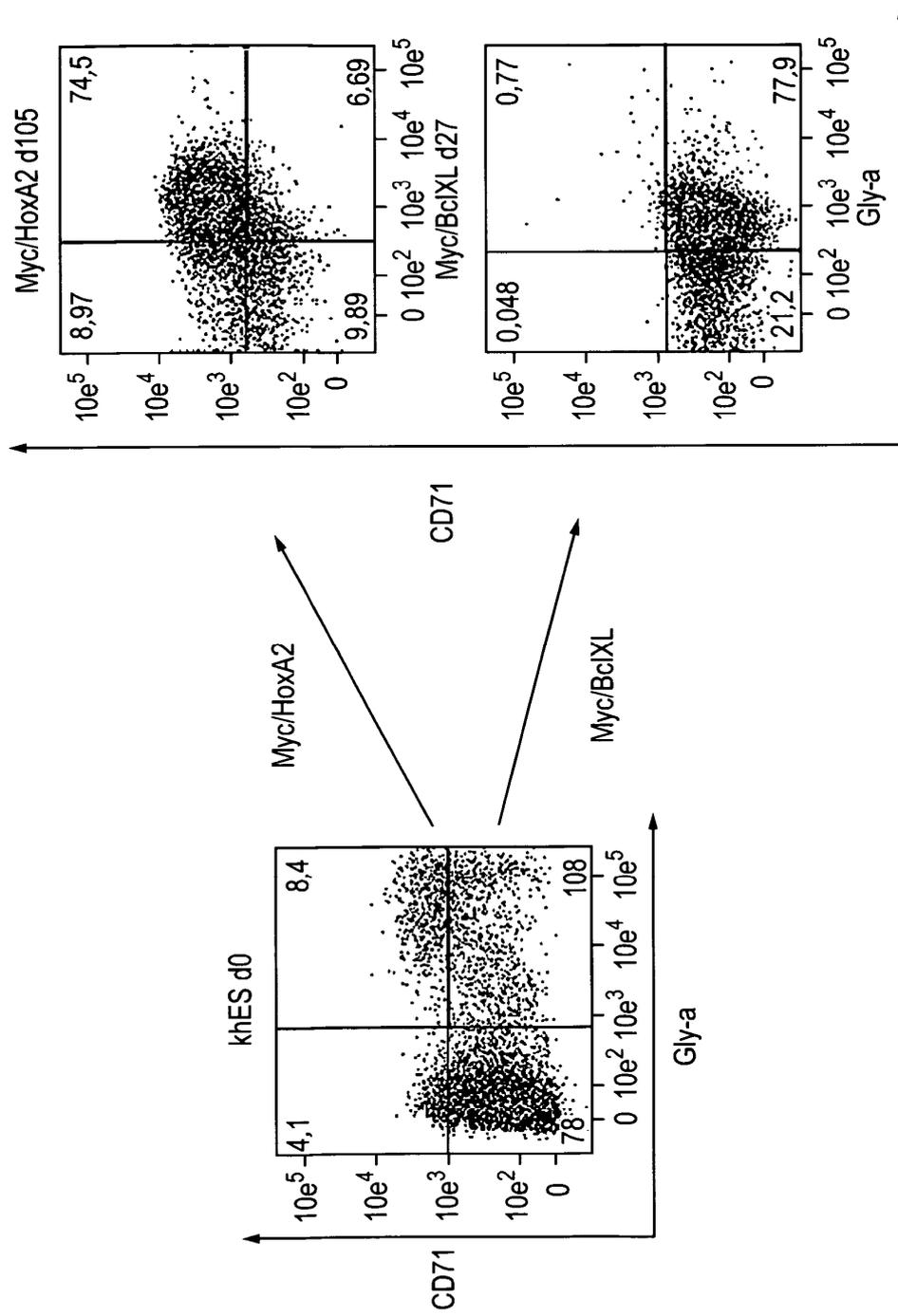
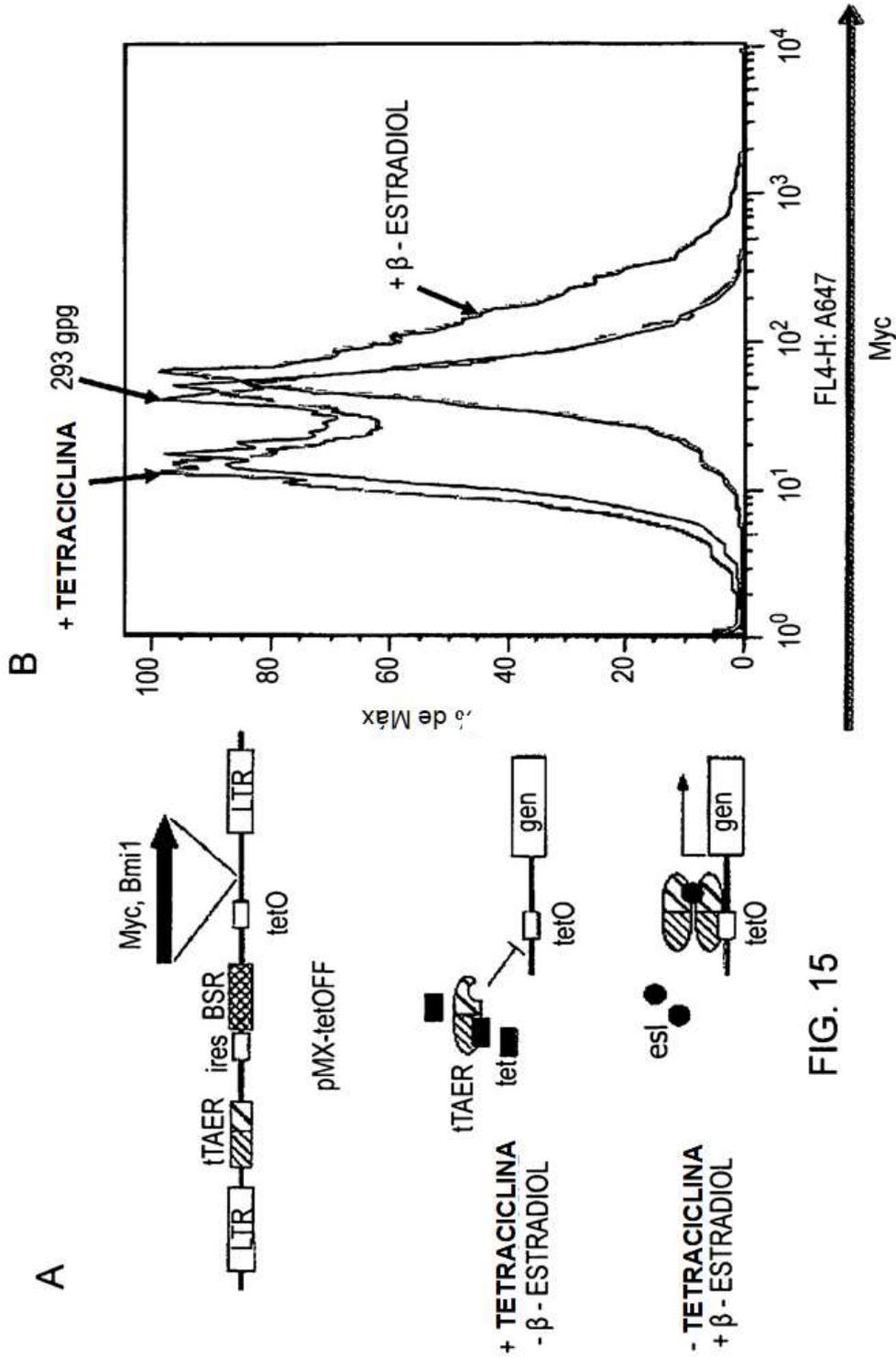


FIG. 14



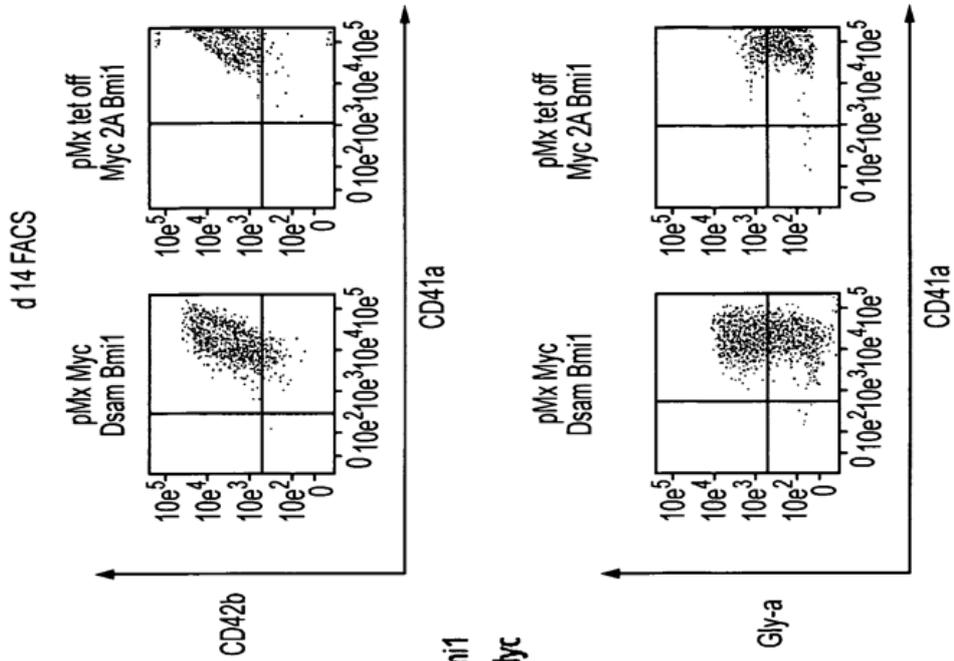


FIG. 16B

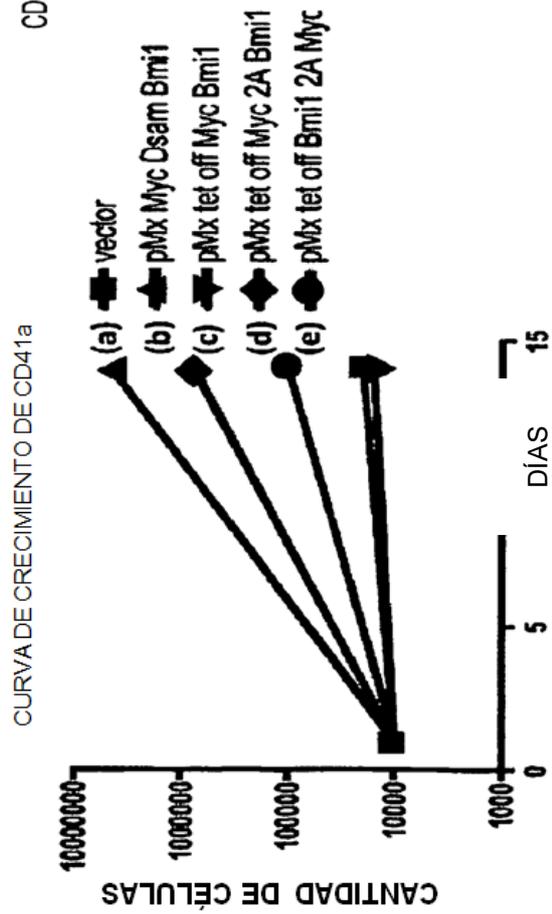


FIG. 16A

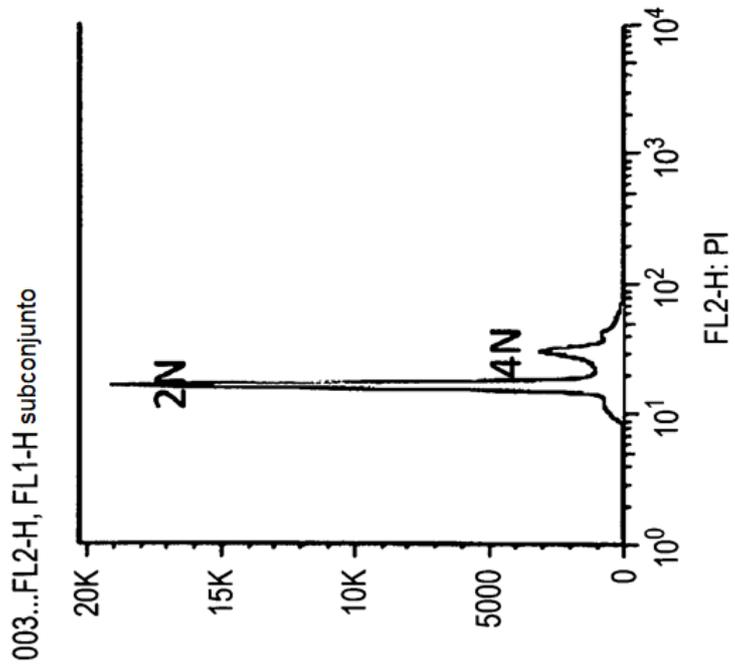


FIG. 17B

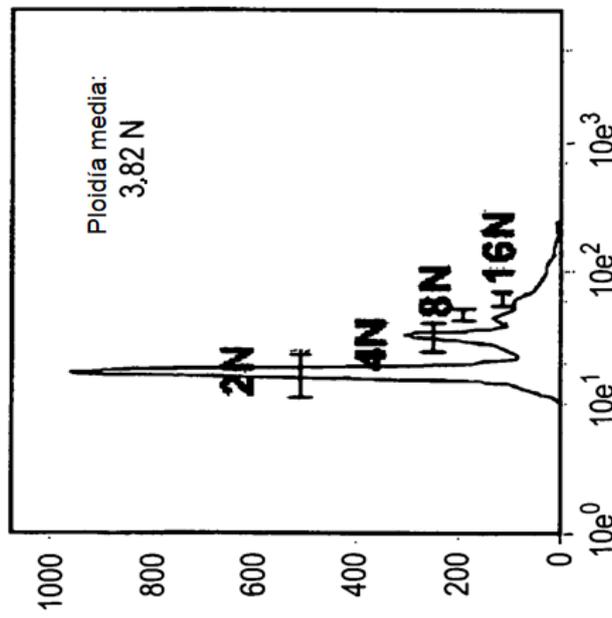


FIG. 17A

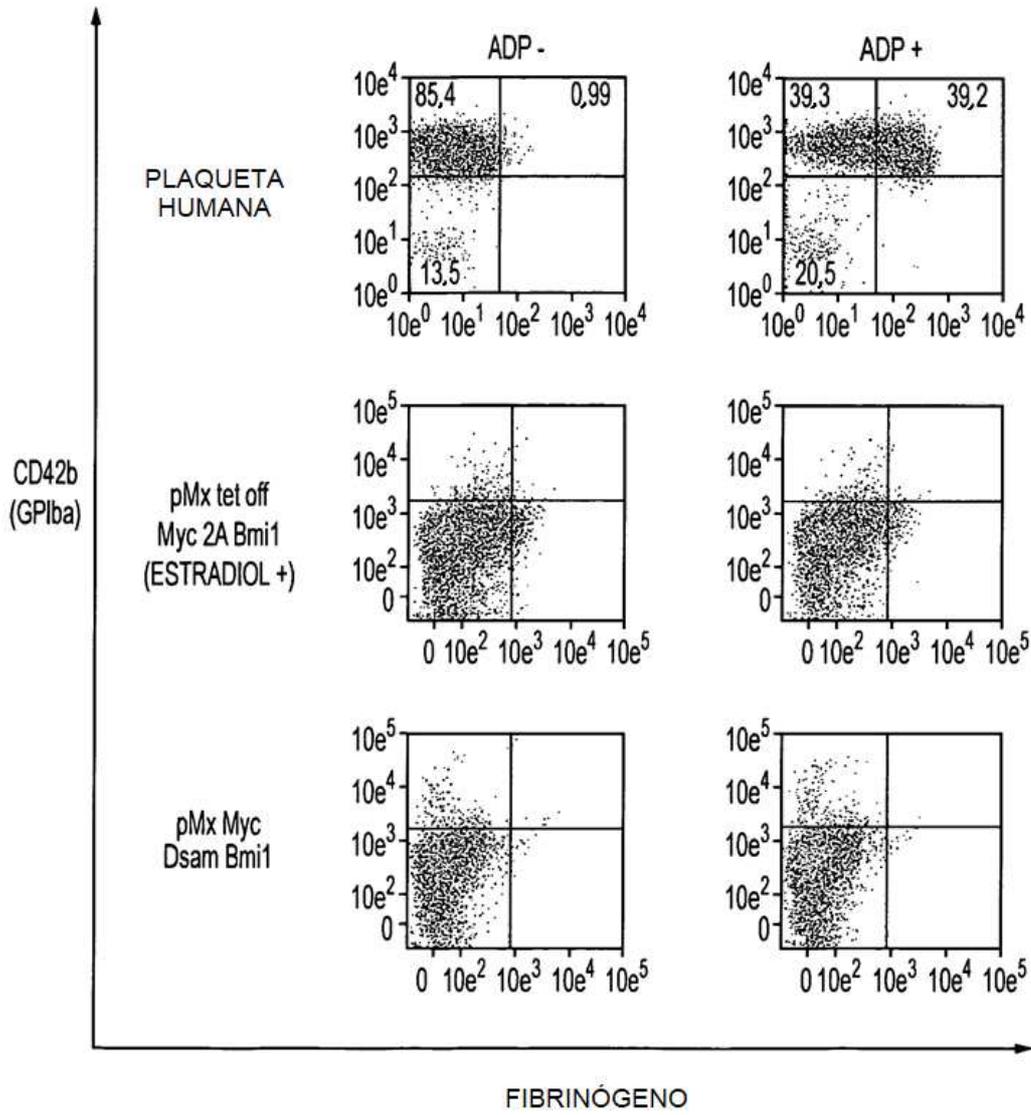
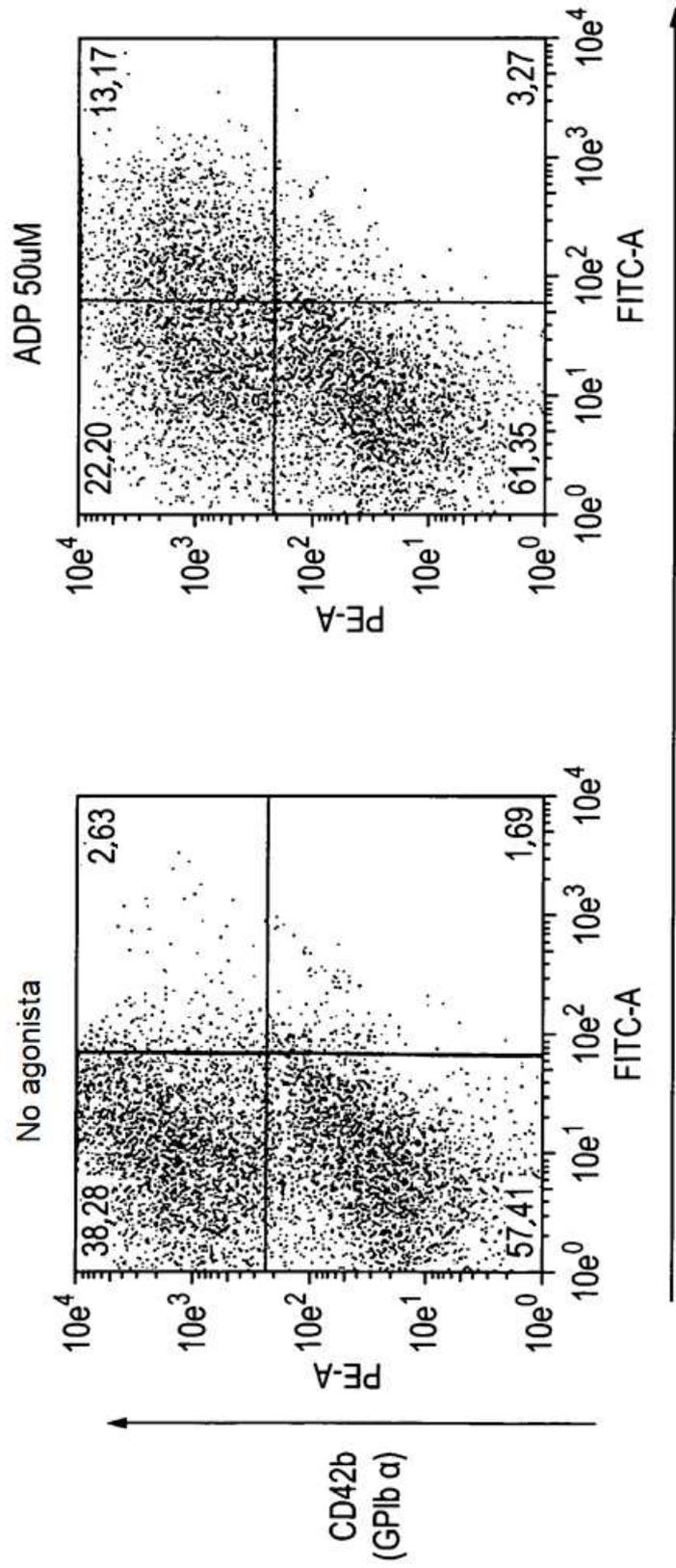


FIG. 18



PAC1 (ANTICUERPO DE INTEGRINA  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 ACTIVADA)

FIG. 19

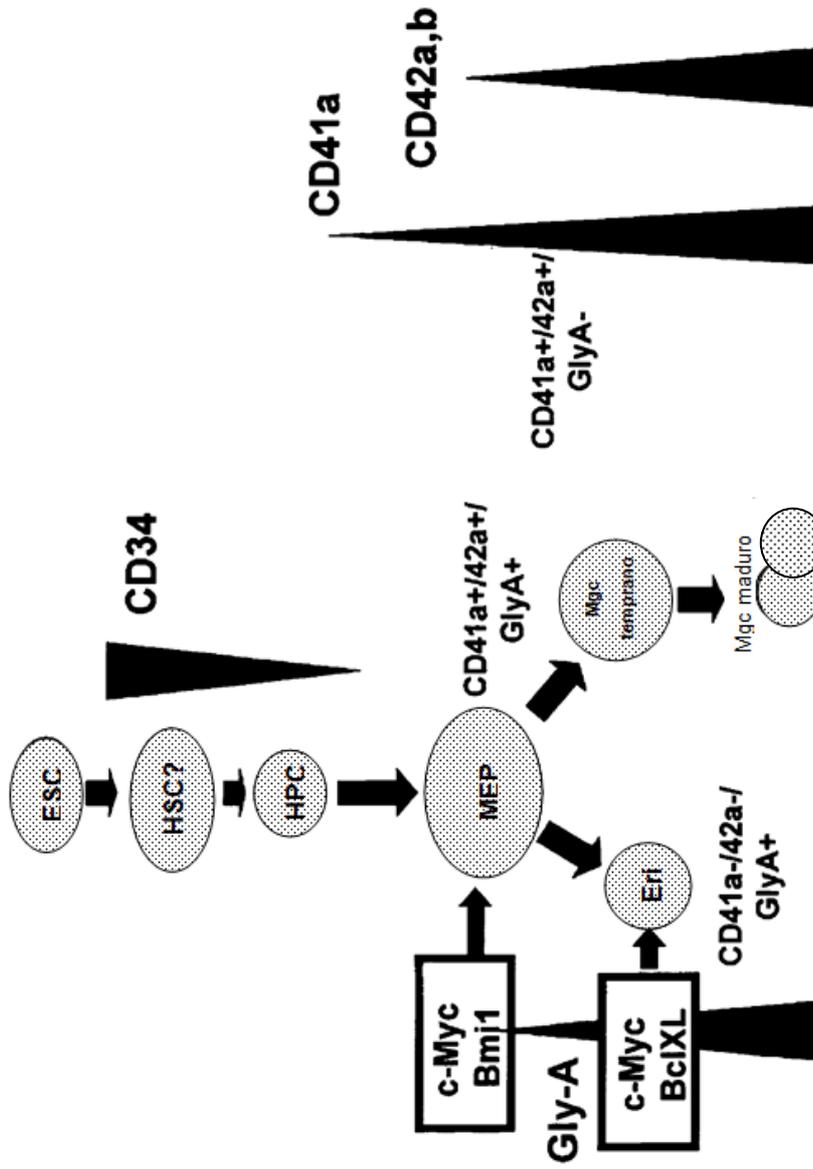


FIG. 20