(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 896 354**

(51) Int. CI.:

A61K 35/14 (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)
C12N 5/078 (2010.01)
C12N 5/095 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2013 PCT/US2013/077334**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14100779**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2013 E 13865661 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021 EP 2934555**

(54) Título: **Métodos para la producción de plaquetas a partir de células madre pluripotentes**

(30) Prioridad:

21.12.2012 US 201261740699 P
15.03.2013 US 201361787476 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2022

(73) Titular/es:

ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE (100.0%)
9 Technology Drive
Westborough, MA 01581, US

(72) Inventor/es:

FENG, QIANG;
LU, SHI-JIANG y
LANZA, ROBERT, P.

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Métodos para la producción de plaquetas a partir de células madre pluripotentes

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las plaquetas son glóbulos rojos diminutos que realizan la función vital y altamente especializada de la coagulación de la sangre. Casi un billón de plaquetas circulan en la sangre de una persona promedio, y el recambio es tal que toda la población de plaquetas se reemplaza cada 10 días. Esto representa una enorme cantidad de producción de plaquetas en curso. Las plaquetas tienen un citoesqueleto muy organizado y reservas intracelulares de más de 300 proteínas, que segregan en sitios de lesión de los vasos sanguíneos. Las plaquetas también desempeñan un papel en la inflamación, el crecimiento de los vasos sanguíneos, y la metástasis tumoral.

Después de una lesión vascular, las plaquetas se adhieren rápidamente a los vasos sanguíneos dañados y desencadenan una cascada compleja de eventos que dan como resultado la formación de trombos. La demanda de transfusiones de plaquetas ha seguido aumentando durante las últimas décadas (51). Usando métodos convencionales, las plaquetas solo se pueden almacenar durante menos de una semana, creando un reto continuo para los programas dependientes de donantes. La escasez en el suministro de plaquetas puede tener consecuencias potencialmente mortales, especialmente en pacientes en los que se necesitan múltiples transfusiones. Las transfusiones repetidas también pueden dar lugar a respuestas refractarias que están relacionadas con la reacción del hospedante mediada por la inmunidad, y pueden requerir un emparejamiento de pacientes costoso (52; 53). La capacidad de generar plaquetas *in vitro*, particularmente las plaquetas adaptadas al paciente, proporcionarían ventajas significativas en estos escenarios clínicos.

Las limitaciones en el suministro de plaquetas pueden tener consecuencias potencialmente mortales para los pacientes dependientes de transfusiones con tipos sanguíneos raros o inusuales, en particular los que están aloinmunizados, y los pacientes con cáncer o leucemia que, como sucede a menudo, desarrollan aloinmunidad plaquetaria. La transfusión frecuente de plaquetas es clínicamente necesaria en estos pacientes debido a que la vida media de las plaquetas humanas transfundidas es 4-5 días. Además, las plaquetas de los programas de donantes voluntarios corren un riesgo constante de contaminación por diversos patógenos. Las plaquetas no se pueden almacenar congeladas usando técnicas convencionales; de ahí que la capacidad de generar plaquetas *in vitro* proporcionaría avances significativos para la terapia de reemplazo de plaquetas en entornos clínicos.

Durante más de una década, las células madre hematopoyéticas humanas (HSC, CD34+) de la médula ósea (BM), la sangre del cordón umbilical (CB) o la sangre periférica (PB) se han estudiado para la generación de megacariocitos (MK) y plaquetas. Usando ciertas combinaciones de citocinas, factores de crecimiento y/o células alimentadoras estromales, se han producido plaquetas funcionales a partir de HSC con un éxito significativo (1; 2). Sin embargo, las HSC todavía se obtienen de donantes y tienen una capacidad de expansión limitada en las condiciones de cultivo actuales, lo que interfiere con la producción a gran escala y las aplicaciones clínicas futuras.

Las células madre embrionarias humanas (hESC) se pueden propagar y expandir *in vitro* indefinidamente, proporcionando una fuente de células potencialmente inagotable y sin donantes para la terapia humana. La diferenciación de las hESC en células hematopoyéticas *in vitro* ha sido ampliamente investigada durante la última década. La diferenciación hematopoyética dirigida de las hESC se ha logrado con éxito *in vitro* por medio de dos tipos diferentes de sistemas de cultivo. Uno de ellos emplea co-cultivos de hESC con células alimentadoras estromales, en medio que contiene suero (3; 4). El segundo tipo de procedimiento emplea condiciones de cultivo en suspensión en placas de unión celular ultrabaja, en presencia de citocinas con/sin suero (5-7); su punto final es la formación de agregados celulares o cuerpos embrioides (“EB”). Se han identificado precursores hematopoyéticos, así como progenies funcionales maduras que representan linajes eritroides, mieloides, macrófagos, megacariocíticos y linfoides en los dos sistemas de cultivo de hESC de diferenciación anteriores (3-6; 8-14). Estudios anteriores también generaron megacariocitos/plaquetas a partir de hESC mediante el cocultivo con células estromales en presencia de suero (15; 16). Sin embargo, el rendimiento de megacariocitos/plaquetas en los estudios descritos anteriormente fue bajo (15; 16).

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un cultivo de megacariocitos no adherente y sin células alimentadoras;

b) poner en contacto los megacariocitos con TPO o un agonista de TPO para provocar la formación en cultivo de proplaquetas, en el que las proplaquetas liberan plaquetas, al menos 60% de las cuales son positivas para la expresión de CD41a y CD42b; o poner en contacto los megacariocitos con medio de expansión hematopoyético y (1) TPO o un agonista de TPO, SCF, IL-6 e IL-9, o (2) TPO o un agonista de TPO, SCF e IL-11, para provocar la formación en cultivo de pro-plaquetas, en el que las pro-plaquetas liberan plaquetas, al menos 60% de las cuales son positivas para la expresión de CD41a y CD42b, en el que dicho agonista de TPO comprende uno o más de: ADP, epinefrina, trombina, colágeno, romiplostim, eltrombopag (SB497115, Promacta), trombopoyetina humana

recombinante (TPO), factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos humanos recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF), Fab 59, AMG 531, Peg-TPOmp, AKR-501, anticuerpos monoclonales agonistas de TPO, anticuerpos policlonales agonistas de TPO, minicuerpos de TPO, VB22B sc(Fv)2, anticuerpos agonistas de TPO con conversión de subclases de dominio, MA01G4G344, trombopoyetinas humanas recombinantes, o proteínas de fusión de TPO recombinantes, es una molécula o compuesto que se une y activa el receptor de TPO; y c) aislar las plaquetas, opcionalmente en el que sustancialmente todas las plaquetas aisladas son funcionales.

La presente invención también proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos o progenitores específicos del linaje de megacariocitos (MLP), que comprende cultivar una población de megacariocitos o MLP no adherente y sin células alimentadoras en presencia de TPO o un agonista de TPO para provocar la formación de proplaquetas, en el que las proplaquetas liberan plaquetas, y en el que los megacariocitos o MLP se cultivan:

(i) en condiciones de fuerza de cizallamiento, opcionalmente condiciones de fuerza de cizallamiento constante, en presencia de un inhibidor de proteasa, opcionalmente añadido en un momento de producción máxima de plaquetas dentro del cultivo, o

(ii) a una temperatura mayor que 37ºC e igual o menor que 40ºC, opcionalmente a una temperatura de alrededor de 39ºC, y

recolectar y opcionalmente aislar plaquetas del cultivo,

en el que dicho agonista de TPO comprende uno o más de: ADP, epinefrina, trombina, colágeno, romiplostim, eltrombopag (SB497115, Promacta), trombopoyetina humana recombinante (TPO), factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos humanos recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF), Fab 59, AMG 531, Peg-TPOmp, AKR-501, anticuerpos monoclonales agonistas de TPO, anticuerpos policlonales agonistas de TPO, minicuerpos de TPO, VB22B sc(Fv)2, anticuerpos agonistas de TPO con conversión de subclases de dominio, MA01G4G344, trombopoyetinas humanas recombinantes, o proteínas de fusión de TPO recombinantes,

en el que el inhibidor de proteasa es un inhibidor de MMP seleccionado de GM6001, N-Dansil-D-fenilalanina, 4-epi-Clortetraciclina, Hidrocloruro de Piridoxatina, ARP 100, ARP 101, Batimastat, Clorhexidina, Dihidrocloruro, cis-ACCP, CL 82198 hidrocloruro, Minociclina, Hidrocloruro, Alendronato, Sal sódica, GM 1489, TAPI-1, TAPI-2, Marimastat, Inhibidor II de MMP, Inhibidor III de MMP, EGTA, Inhibidor V de MMP, Inhibidor de MMP-13, Inhibidor I de MMP-2, Inhibidor II de MMP-2, CP 471474, Inhibidor I de MMP-2/MMP-3, Inhibidor II de MMP-2/MMP-3, Inhibidor I de MMP-2/MMP-9, Inhibidor II de MMP-2/MMP-9, Inhibidor V de MMP-2/MMP-9, Ecotina, E. coli, Inhibidor de MMP-3, Inhibidor III de MMP-3, Inhibidor IV de MMP-3, Actinonina, Inhibidor V de MMP-3, Inhibidor VIII de MMP-3, Oligonucleótido Antisentido de MMP-7, Sal de sodio, Inhibidor I de MMP-8, Inhibidor I de MMP-9, Inhibidor I de MMP-9/MMP-13, Inhibidor II de MMP-9/MMP-13, NNGH, NSC 23766, PD166793, Pro-Leu-Gly hidroxamato hidrocloruro, Ro 32-3555, PF-356231, SB-3CT, Phosphoramidon, WAY 170523, UK 370106, UK 356618, cloruro de bario deshidratado, luteolina, isobavacalcona, hiclato de doxiciclina, inhibidor I de colagenasa, o-fenantrolina, TAPI-0, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, metilprednisolona, prinomastat, BAY 12-9566, MMI270(B), BMS-275291, metastat, BB-94, BB-1101, BB-2516, SE205, CT1746, CGS 27023A, AG3340, D2163, D1927, PNU-142372, CMT-1, o un inhibidor de MMP-1 a MMP-26, opcionalmente GM6001 o un inhibidor específico de MMP8, opcionalmente en el que el inhibidor específico de MMP8 es MMP8-I ((3R)-(+)-[2-(4-metoxibencenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-hidroxamato]),

opcionalmente en el que las condiciones de fuerza de cizallamiento comprenden una fuerza de cizallamiento de 1-4,1 dinas/cm2, opcionalmente en el que los megacariocitos o MLP derivan de células iPS, células ES, o células CD34+ de origen natural, opcionalmente células CD34+ de médula ósea o sangre de cordón umbilical, y opcionalmente en el que los megacariocitos o MLP se cultivan en un dispositivo microfluídico.

La presente descripción proporciona métodos para la producción de plaquetas a partir de células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias humanas (hESC), y células madre pluripotentes inducidas (iPSC o células iPS), tales como células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC o células hiPS). Estos métodos pueden realizarse sin formar cuerpos embrioides, y pueden realizarse sin el uso de células inductoras del estroma. Además, el rendimiento y/o la pureza pueden ser mayores de lo que se ha dado a conocer para los métodos previos de producción de plaquetas a partir de células madre pluripotentes. Debido a que las plaquetas se pueden producir con mayor eficacia y a mayor escala, los métodos de la presente descripción tienen un gran potencial para uso en transfusiones medicinales. Además, debido a que las plaquetas no tienen núcleo y contienen solo material genético mínimo, las preparaciones de la presente descripción pueden irradiarse antes de la transfusión para eliminar eficazmente cualquier célula nucleada contaminante, tal como una hESC indiferenciada. Por lo tanto, la posible presencia de células nucleadas no debería representar un problema de seguridad.

Las plaquetas recolectadas de donantes tienen una vida útil muy limitada y son cada vez más necesarias para transfusiones profilácticas en pacientes. A diferencia de las células madre hematopoyéticas humanas CD34+ de sangre de cordón o médula ósea dependientes de donantes, las células madre embrionarias humanas (hESC) pueden ser una fuente alternativa prometedora para la producción *in vitro* continua de plaquetas en condiciones controladas. Como se describe adicionalmente aquí, la descripción proporciona sistemas y métodos para generar megacariocitos (MK) a partir de células madre pluripotentes en condiciones sin suero ni células estromales. En realizaciones

ejemplares, las células madre pluripotentes se dirigen hacia megacariocitos a través de la diferenciación de células endoteliales hemogénicas (PVE-HE, que se describen con más detalle a continuación). Se ha identificado, al final del cultivo de PVE-HE, una población de células multipotenciales transitoria que expresa marcadores CD31, CD144 y CD105. En presencia de TPO, SCF y otras citocinas en un cultivo en suspensión sin células alimentadoras y sin suero, se puede lograr una expansión de hasta 100 veces desde hESC o células hiPS a MK en 18-20 días. Dichos métodos pueden proporcionar una generación *in vitro* robusta de MK a partir de células madre pluripotentes. Cuando se cultivan en condiciones sin células alimentadoras, los MK derivados de células madre pluripotentes se pueden usar para generar partículas similares a las plaquetas (plaquetas o partículas similares a las plaquetas producidas a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC-PLT) o de células madre embrionarias humanas (ES PLT)). Estas hiPSC-PLT y ES-PLT responden a la estimulación de la trombina y pueden participar en la formación de microagregados.

En un aspecto, la descripción se refiere a una preparación farmacéutica que es adecuada para uso en un paciente humano, que comprende al menos 10^8 plaquetas.

Además, la preparación farmacéutica puede comprender plaquetas diferenciadas de células madre humanas, por ejemplo, al menos 10^8 plaquetas. Opcionalmente, la preparación puede estar sustancialmente libre de leucocitos. De forma opcional, sustancialmente todas las plaquetas pueden ser funcionales.

La preparación farmacéutica puede comprender 10^9 - 101^4 plaquetas, opcionalmente 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} o 10^{14} plaquetas.

Las plaquetas pueden tener uno o más de los siguientes atributos: un intervalo de volumen plaquetario medio de 9,7-12,8 fl; una distribución unimodal de tamaño en la preparación; y/o una distribución logarítmica normal del volumen plaquetario, en la que una desviación estándar es menor que 2 μm^3 (preferiblemente menor que 1,5 μm^3, 1 μm^3, o incluso 0,5 μm^3).

Las plaquetas pueden ser positivas para al menos uno de los siguientes marcadores: CD41a y CD42b.

Las plaquetas pueden ser plaquetas humanas.

Al menos el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las plaquetas pueden ser funcionales, y opcionalmente pueden ser funcionales durante al menos 2, 3 o 4 días después del almacenamiento a temperatura ambiente.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un biorreactor que tiene megacariocitos débilmente adherentes o no adherentes que producen plaquetas funcionales sin células alimentadoras.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición que comprende al menos 10^9 progenitores específicos del linaje de megacariocitos (MLP).

En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición crioconservada que comprende MLP.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un banco que comprende MLP crioconservados.

Los MLP pueden ser de tipos HLA definidos.

La composición crioconservada puede ser compatible con el HLA de un paciente.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición o banco crioconservado que comprende 10^9 a 10^{14} MLP, opcionalmente 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} o 10^{14} MLP.

Según las reivindicaciones, la descripción proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos o MPL, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un cultivo no adherente de megacariocitos; (b) poner en contacto los megacariocitos o MPL con TPO o un agonista de TPO para provocar la formación de proplaquetas en cultivo, en el que las proplaquetas liberan plaquetas; y (c) aislar las plaquetas.

Según las reivindicaciones, la descripción proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos o MPL, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un cultivo no adherente de megacariocitos o MPL; (b) poner en contacto los megacariocitos o MPL con medio de expansión hematopoyético y (1) TPO o un agonista de TPO, SCF, IL-6 e IL-9, o (2) TPO o un agonista de TPO, SCF e IL-11, que pueden provocar la formación de pro-plaquetas en cultivo, en el que las pro-plaquetas liberan plaquetas. Dicho método puede comprender además (c) aislar las plaquetas.

El agonista de TPO comprende uno o más de: ADP, epinefrina, trombina, colágeno, agonistas de TPO-R, miméticos de TPO, agentes trombopoyéticos de segunda generación, romiplostim, eltrombopag (SB497115, Promacta), trombopoyetina humana recombinante (TPO), factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos humanos recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF), Fab 59, AMG 531, Peg-TPOmp, miméticos no peptídicos de TPO, AKR-501, anticuerpos monoclonales agonistas de TPO, anticuerpos policlonales agonistas de TPO, minicuerpos de TPO, VB22B

sc(Fv)2, anticuerpos agonistas de TPO con conversión de subclases de dominio, MA01G4G344, trombopoyetinas humanas recombinantes, proteínas de fusión de TPO recombinantes, o miméticos no peptídicos de TPO.

El cultivo en la etapa (b) puede estar en un medio que comprende uno o más de: factor de células madre (SCF) a 0,5-100 ng/ml, trombopoyetina (TPO) a 10-100 ng/ml, e interleucina-11 (IL-11) a 10-100 ng/ml, al menos un inhibidor de ROCK, y/o heparina a 2,5-25 Unidades/ml.

El cultivo en la etapa (b) puede estar en un medio que comprende uno o más de: TPO a 10-100 ng/ml, SCF a 0,5-100 ng/ml, IL-6 a 5-25 ng/ml, IL-9 a 5-25 ng/ml, al menos un inhibidor de ROCK, y/o heparina a 2,5-25 unidades/ml.

El al menos un inhibidor de ROCK puede comprender Y27632, pudiendo estar Y27632 en una concentración de 2-20 μM, alrededor de 3-10 μM, alrededor de 4-6 μM, o alrededor de 5 μM.

El método puede comprender además someter los megacariocitos a una fuerza de cizallamiento.

Se pueden producir al menos 2, 3, 4 o 5 plaquetas por megacariocito.

Se pueden producir al menos 50 plaquetas por megacariocito.

Se pueden producir al menos 100, 500, 1000, 2000, 5000, o 10000 plaquetas por megacariocito.

Al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% de dichas plaquetas pueden ser CD41a+ y/o CD42b+, por ejemplo, CD41a+ y CD42b+.

Las plaquetas pueden producirse en ausencia de células alimentadoras, y/o pueden producirse en ausencia de células alimentadoras estromales.

Las plaquetas se pueden producir en ausencia de células xenogénicas.

Las plaquetas pueden ser humanas.

Los megacariocitos o MPL se pueden cultivar en presencia de un inhibidor de proteasa añadido exógenamente. Dichos megacariocitos o MPL pueden cultivarse en presencia de un inhibidor de MMP añadido exógenamente. Dichos megacariocitos o MPL pueden cultivarse en presencia de un inhibidor de MMP8 añadido exógenamente. Dichos megacariocitos o MPL pueden cultivarse en presencia de un inhibidor específico de MMP8 añadido exógenamente y un inhibidor de pan-MMP.

Los megacariocitos o MPL se pueden cultivar a una temperatura de alrededor de 39ºC.

Los megacariocitos o MPL se pueden generar mediante etapas que comprenden: (a) cultivar células madre pluripotentes para formar células endoteliales hemogénicas (PVE-HE); (b) cultivar las células endoteliales hemogénicas para formar MLP; y opcionalmente (c) cultivar los MLP para formar megacariocitos. Las células madre pluripotentes pueden ser humanas.

Las células endoteliales hemogénicas pueden cultivarse en la etapa (b) en presencia de un inhibidor de BET. Dicho inhibidor de BET puede ser IBET151.

Las células endoteliales hemogénicas pueden derivar sin formación de cuerpos embrioides.

Las células madre pluripotentes pueden ser células madre pluripotentes inducidas (iPSC). La iPSC puede ser humana.

Las células endoteliales hemogénicas pueden derivar sin formación de cuerpos embrioides.

Las células endoteliales hemogénicas se pueden diferenciar de las células madre pluripotentes en condiciones de bajo contenido en oxígeno que comprenden 1% a 10% de oxígeno, 2% a 8% de oxígeno, 3% a 7% de oxígeno, 4% a 6% de oxígeno, o alrededor de 5% de oxígeno.

Los megacariocitos se pueden diferenciar de los MLP a una temperatura entre 38-40 grados C, o alrededor de 39 grados C.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una preparación farmacéutica que comprende plaquetas producidas mediante cualquiera de los métodos descritos aquí, por ejemplo, cualquiera de los métodos anteriores.

La preparación puede ser adecuada para uso en un paciente humano. Por ejemplo, la preparación puede ser adecuada para uso en un paciente humano y sustancialmente libre de leucocitos. Dicha preparación puede comprender al menos 10^8 plaquetas.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere al uso de una composición que comprende plaquetas (por ejemplo, una composición como se describe aquí, tal como en los párrafos anteriores), o una composición que comprende plaquetas producidas por un método como se describe aquí (por ejemplo, un método descrito en los párrafos

precedentes), en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que lo necesite o que padezca una enfermedad o trastorno que afecte a la coagulación o una enfermedad o trastorno tratable por el mismo.

La enfermedad o trastorno puede comprender trombocitopenia, traumatismo, un parásito transmitido por la sangre, o malaria.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar a un paciente que necesita una transfusión de plaquetas, que comprende administrar una composición que comprende plaquetas (por ejemplo, una composición como se describe aquí, tal como en los párrafos anteriores) o una composición que comprende plaquetas producidas por un método como se describe aquí (por ejemplo, un método descrito en los párrafos anteriores) a dicho paciente.

El método puede ser eficaz para tratar una enfermedad o trastorno que comprende trombocitopenia, traumatismo, un parásito transmitido por la sangre, o malaria.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende una célula PVE-HE aislada, que deriva opcionalmente de una célula madre pluripotente, y que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende una célula iPS-PVE-HE aislada, que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende una hES-PVE-HE aislada, que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un PVE-HE-MLP aislada que deriva opcionalmente de una célula madre pluripotente y que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un iPS-PVE-HE-MLP aislada, que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un hES-PVE-HE-MLP aislada, que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un PVE-HE-MLP-MK aislada que deriva opcionalmente de una célula madre pluripotente, y que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un iPS-PVE-HE-MLP-MK aislada, que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un hES-PVE-HE-MLP-MK aislada, que se produce opcionalmente según los métodos descritos aquí.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una preparación farmacéutica que es adecuada para uso en un paciente humano, que comprende al menos 10^8 plaquetas, en la que la preparación está sustancialmente libre de leucocitos, y en la que sustancialmente todas las plaquetas son funcionales.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden irradiar para eliminar o inactivar las células nucleadas.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una preparación farmacéutica que es adecuada para uso en un paciente humano, que comprende al menos 10^8 plaquetas funcionales, en la que la semivida plasmática media de las plaquetas funcionales en la preparación es al menos cuatro días.

La preparación farmacéutica puede comprender 10^9-10^{14} plaquetas, opcionalmente 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} o 10^{14} plaquetas.

La preparación farmacéutica puede comprender plaquetas que tienen uno o más de los siguientes atributos: un intervalo de volumen plaquetario medio de 9,7-12,8 fl; una distribución unimodal de tamaño en la preparación; y/o una distribución logarítmica normal del volumen plaquetario, en la que una desviación estándar es menor que 2 μm^3 (preferiblemente menor que 1,5 μm^3, 1 μm^3, o incluso 0,5 μm^3).

La preparación farmacéutica puede comprender plaquetas que son positivas para al menos uno de los siguientes marcadores: CD41a y CD41b.

Al menos la mitad de las plaquetas pueden ser funcionales durante al menos dos, tres, cuatro o cinco días después del almacenamiento a temperatura ambiente, por ejemplo (22 - 25ºC). Por ejemplo, al menos 60%, 70%, 80% o 90% pueden ser funcionales durante al menos dos días. Las plaquetas se pueden almacenar a temperatura ambiente durante al menos cinco días.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un banco o preparación crioconservados de MLP.

Los MLP se pueden recolectar de la PVE-HE cuando comienzan a flotar en suspensión. Los MLP no se colocan en placas, y no se permite que los MLP se adhieran, evitando así la diferenciación en otros tipos de células y facilitando la producción de los MK.

El banco o preparación puede comprender 10^9 a 10^{14} MLP, opcionalmente 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} o 10^{14} MLP.

Un MLP puede producir al menos 2, 3, 4, 5, o más plaquetas. En realizaciones ejemplares, se proporciona una composición de 6 x 10^{10} hasta 1,2 x 10^{11} MLP suficiente para generar una dosis terapéutica de 300 - 600 x 10^9 plaquetas con un rendimiento de 5 plaquetas por MLP. En realizaciones ejemplares, se proporciona una composición de 3-6 x 10^9 MLP suficiente para generar una dosis terapéutica con un rendimiento de al menos 100 plaquetas por MLP.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un biorreactor que tiene megacariocitos débilmente adherentes o no adherentes que producen plaquetas funcionales sin células alimentadoras. Las células débilmente adherentes, incluyendo dichos megacariocitos, pueden separarse mecánicamente entre sí o de una superficie, por ejemplo, lavando con fuerza suave usando una pipeta serológica. Preferiblemente, los MK se cultivan en condiciones no adherentes, lo que se cree que promueve el mantenimiento de los fenotipos de MK. Se pueden aplicar fuerzas de cizallamiento al cultivo de MK para mejorar la eficiencia de la producción de plaquetas. Por ejemplo, se puede usar una cámara microfluídica o un chip para controlar el esfuerzo cortante, lo que puede aumentar el rendimiento de plaquetas por MK. En un aspecto, los MK se pueden sembrar en un canal de un chip microfluídico, y los medios pueden fluir más allá de los MK a velocidades casi fisiológicas.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición que comprende al menos 10^9 MLP.

En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición crioconservada que comprende MLP.

Según las reivindicaciones, la descripción proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos, que comprende las etapas de: a) proporcionar un cultivo no adherente de megacariocitos; b) poner en contacto los megacariocitos con TPO o agonistas de TPO para provocar la formación de proplaquetas en cultivo, en el que las proplaquetas liberan plaquetas; y c) aislar las plaquetas.

Se cree que la trombopoyetina (TPO) es una citocina clave implicada en la trombopoyesis y la megacariopoyesis, y es el ligando endógeno del receptor de trombopoyetina que se expresa en la superficie de las plaquetas, los megacariocitos, y los precursores megacariocíticos. La TPO es una glicoproteína de 332 aminoácidos (95 kDa) que contiene 2 dominios: un dominio de unión al receptor (restos 1-153) y un dominio rico en hidratos de carbono (restos 154-332) que está altamente glicosilado y es importante para la estabilidad de las proteínas. El receptor de TPO, c-Mpl (también conocido como CD110), es un receptor de citocina hematopoyético típico, y contiene 2 módulos de homología de receptor de citocina. La TPO se une solo al módulo de homología del receptor de citocina distal, e inicia de ese modo la transducción de señales. En ausencia del módulo de homología del receptor de citocina distal, c-Mpl se activa, lo que sugiere que el módulo de homología del receptor de citocina distal funciona como un inhibidor de c-Mpl hasta que se une a TPO. La unión por TPO activa la ruta de señalización de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) de Janus cinasa 2 (Jak2) para impulsar la proliferación y diferenciación celulares. El factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF) es otro factor de crecimiento trombopoyético. Las formas recombinantes de TPO y MGDF, que incluyen las formas humana y pegilada, pueden usarse para inducir la diferenciación y maduración de megacariocitos y plaquetas. En lugar de TPO, se pueden usar péptidos y proteínas de fusión activadores del receptor de TPO (es decir, Fab 59, romiplostim/AMG 531, o pegiladas (Peg-TPOmp)). Los miméticos no peptídicos (Eltrombopag (SB497115, Promacta), y AKR-501) se unen y activan el receptor de TPO mediante un mecanismo diferente al de TPO, y pueden tener un efecto aditivo a TPO. Para imitar el efecto de TPO, también pueden usarse anticuerpos agonistas de TPO (es decir, MA01G4G344) o minicuerpos (es decir, VB22B sc(Fv)2) que activan el receptor de TPO. Los agonistas de TPO ejemplares se describen en Stasi et al., Blood Reviews 24 (2010) 179-190, y Kuter, Blood. 2007; 109:4607-4616. Los agonistas de TPO ejemplares incluyen: ADP, epinefrina, trombina y colágeno, y otros compuestos identificados en la bibliografía como agonistas de TPO-R o miméticos de TPO, agentes trombopoyéticos de segunda generación, Romiplostim, Eltrombopag (SB497115, Promacta), factores de crecimiento trombopoyéticos de primera generación, trombopoyetina humana recombinante (TPO), factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos humanos recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF), peptidomiméticos de TPO, péptidos activadores del receptor de TPO insertados en regiones determinantes de la complementariedad de Fab (Fab 59), AMG 531 (un “pepticuerpo” compuesto por 2 regiones constantes de IgG1-HC humana unidas por enlaces de disulfuro (un fragmento Fc), cada una de las cuales está unida covalentemente en el resto 228 con 2 secuencias peptídicas idénticas unidas mediante poliglicina), Peg-TPOmp (un agonista peptídico de TPO pegilado), agonistas de TPO disponibles por vía oral, miméticos no peptídicos de TPO, AKR-501, anticuerpos monoclonales agonistas de TPO, anticuerpos policlonales agonistas de TPO, minicuerpos de TPO tal como VB22B sc(Fv)2, anticuerpos agonistas de TPO con conversión de subclases de dominio tal como MA01G4G344, trombopoyetinas humanas recombinantes, o proteínas de fusión de TPO recombinantes, miméticos no peptídicos de TPO. Dondequiera que se use TPO como una realización de la invención, en realizaciones adicionales de la invención los agonistas de TPO ejemplares pueden ser sustituidos por TPO.

Según las reivindicaciones, la descripción proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos, que comprende las etapas de a) proporcionar un cultivo no adherente de megacariocitos o progenitores de megacariocitos, b) poner en contacto los megacariocitos o progenitores de megacariocitos con una composición que comprende medios de expansión hematopoyéticos para provocar la formación de proplaquetas en cultivo, en el que las proplaquetas liberan plaquetas, y c) aislar las plaquetas.

En realizaciones ejemplares, sustancialmente todas las plaquetas aisladas son funcionales. En realizaciones ejemplares, el cultivo no adherente de megacariocitos o progenitores de megacariocitos es un cultivo sin células alimentadoras y/o está libre de células xenogénicas. Por consiguiente, la descripción proporciona métodos para generar plaquetas sin células alimentadoras.

El cultivo en la etapa (b) se puede realizar en un medio que comprende uno o más de factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), interleucina-11 (IL-11), un inhibidor de ROCK tal como Y27632, y/o heparina. El cultivo en la etapa (b) puede estar en un medio que comprende uno o más de TPO, SCF, IL-6, IL-9, un inhibidor de ROCK tal como Y27632, y/o heparina.

En una realización, el medio de expansión hematopoyético comprende StemSpam™ ACF (ACF) (disponible de StemCell Technologies Inc.), y puede comprender además TPO (trombopoyetina) o agonista de TPO, SCF (factor de células madre), IL-6 (interleucina 6) e IL-9 (interleucina 9), que puede proporcionarse como cóctel de citocinas StemSpam™ CC220 (CC220) (disponible de StemCell Technologies Inc.). Opcionalmente, puede comprender un inhibidor de ROCK y/o heparina. TPO, SCF, IL-6, IL-9 e IL-11 son factores conocidos de maduración y desarrollo de megacariocitos (Stasi et al., Blood Reviews 24 (2010) 179-190).

En una realización, el medio de expansión hematopoyético comprende medio de expansión de células madre hematopoyéticas Stemline-II (Stemline-II) (disponible de Sigma Aldrich), y puede comprender además TPO o agonista de TPO, SCF, e IL-11. Opcionalmente, puede comprender un inhibidor de ROCK y/o heparina. El inhibidor de ROCK puede ser, pero no se limita a, Y27632.

En otra realización, el medio de expansión hematopoyético comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) como medio basal, seroalbúmina humana (recombinante o purificada), transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), y colesterol (que puede denominarse aquí como un medio de componente definido), y puede comprender además TPO o agonista de TPO, SCF e IL-11. Opcionalmente, puede comprender un inhibidor de ROCK y/o heparina. El inhibidor de ROCK puede ser, pero no se limita a, Y27632.

En otra realización, el medio de expansión hematopoyético comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) como medio basal, seroalbúmina humana (recombinante o purificada), transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), y colesterol (que puede denominarse aquí como un medio de componente definido), y puede comprender además TPO (trombopoyetina) o agonista de TPO, SCF (factor de células madre), IL-6 (interleucina 6) e IL-9 (interleucina 9). Opcionalmente, puede comprender un inhibidor de ROCK y/o heparina.

El cultivo en la etapa (b) se puede realizar en un medio que comprende ACF, Stemline-II o el medio de componente definido del párrafo anterior, así como (1) uno o más de SCF (por ejemplo, a 0,5-100 ng/ml), TPO (por ejemplo, a 10-100 ng/ml), IL-6 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), IL-9 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml) y heparina (por ejemplo, a 2,5-25 Unidades/ml); (2) uno o más de TPO (por ejemplo, a 10-100 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 0,5-100 ng/ml), IL-6 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), IL-9 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), Y27632 (por ejemplo, a 5 μM, u opcionalmente 2-20 μM, u opcionalmente una concentración eficaz de otro inhibidor de ROCK) y heparina (por ejemplo, a 0,5-25 unidades/ml); (3) uno o más de TPO (por ejemplo, a 10-100 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 0,5-100 ng/ml), IL-11 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), Y27632 (por ejemplo, a 5 μM u opcionalmente 2-20 μM, u opcionalmente una concentración eficaz de otro inhibidor de ROCK) y heparina (por ejemplo, a 2,5-25 Unidades/ml); o (4) uno o más de TPO (por ejemplo, a 10-100 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 0,5-100 ng/ml), IL-6 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), IL-9 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), Y27632 (por ejemplo, a 5 μM u opcionalmente 2-20 μM, u opcionalmente una concentración eficaz de otro inhibidor de ROCK) y heparina (por ejemplo, a 2,5-25 Unidades/ml).

El método puede comprender además someter los megacariocitos a una fuerza de cizallamiento.

El método puede producir al menos 2, 3, 4 o 5 plaquetas por megacariocito, al menos 20, 30, 40 o 50 plaquetas por megacariocito, o al menos 100, 500, 1000, 2000, 5000 o 10000 plaquetas por megacariocito.

Al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas plaquetas pueden ser CD41a+ y CD42b+.

Las plaquetas se pueden producir en ausencia de células alimentadoras o células alimentadoras estromales.

Las plaquetas se pueden producir en ausencia de células xenogénicas.

Las plaquetas pueden ser humanas.

Las plaquetas pueden ser CD41a+ y/o CD42b+.

Según las reivindicaciones, la descripción proporciona métodos para producir progenitores de megacariocitos (también denominados aquí MLP) (tales como los que se usan en un método de producción de plaquetas o para otro fin) que pueden generarse mediante las etapas de (a) cultivar células madre pluripotentes para formar células endoteliales hemogénicas (PVE-HE); y (b) cultivar las células endoteliales hemogénicas para formar progenitores de megacariocitos (MLP). La etapa (a) puede llevarse a cabo en presencia de un medio libre de componentes animales compuesto por medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) (por ejemplo, a 50 ng/ml), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (por ejemplo, a 50 ng/ml), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, a 50 ng/ml). La etapa (b) puede llevarse a cabo en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), mezcla de nutrientes F-12 de Ham, Albucult (albúmina rh), alcohol polivinílico (PVA), ácido linoleico, SyntheChol (colesterol sintético), monotioglicerol (a-MTG), disolución de insulina rh-transferrina-selenio-etanolamina, mezcla de hibridoma libre de proteínas II (PFHMII), ácido ascórbico 2 fosfato, Glutamax I (L-alanil-L-glutamina), penicilina/estreptomicina, factor de células madre (SCF) a 25 ng/ml, trombopoyetina (TPO) (por ejemplo, a 25 ng/ml), ligando de tirosina cinasa 3 relacionado con Fms (FL) (por ejemplo, a 25 ng/ml), interleucina-3 (IL-3) (por ejemplo, a 10 ng/ml), interleucina-6 (IL-6) (por ejemplo, a 10 ng/ml) y heparina (por ejemplo, a 5 Unidades/ml).

En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para producir megacariocitos (tales como los utilizados en un método para producir plaquetas o para otro fin) que pueden generarse mediante las etapas de (a) cultivar células madre pluripotentes para formar células endoteliales hemogénicas (PVE-HE); (b) cultivar las células endoteliales hemogénicas para formar MLP; y (c) cultivar los MLP para formar megacariocitos como se muestra en los Ejemplos 1 y 2. Las etapas (a) y (b) pueden llevarse a cabo como se describe en el párrafo anterior. La etapa (c) puede llevarse a cabo en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) como medio basal, seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, TPO (por ejemplo, a 30 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 1 ng/ml), IL-6 (por ejemplo, a 7,5 ng/ml), IL-9 (por ejemplo, a 13,5 ng/ml), y opcionalmente un inhibidor de ROCK tal como, pero sin limitarse a, Y27632 (por ejemplo, a 5 μM), y/o heparina (por ejemplo, a 5-25 unidades/ml).

En otro aspecto, la descripción se refiere a una preparación farmacéutica que comprende plaquetas producidas mediante los métodos anteriores. La preparación puede ser adecuada para uso en un paciente humano, y/o puede comprender al menos 10^8 plaquetas, y/o puede estar sustancialmente libre de leucocitos.

En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de las plaquetas de cualquier composición descrita aquí, o producidas por cualquier método descrito aquí, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que lo necesita o que padece una enfermedad o trastorno que afecta la coagulación.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar a un paciente que necesita una transfusión de plaquetas, que comprende administrar plaquetas de cualquier composición descrita aquí, o producidas mediante cualquier método descrito aquí, a dicho paciente, que puede ser en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o trastorno que afecta a la coagulación y/u otra función plaquetaria y/u otro trastorno que puede tratarse de ese modo, tal como trombocitopenia o traumatismo. La trombocitopenia es el resultado de alteraciones en la producción, distribución, o destrucción de plaquetas. Se encuentra con frecuencia en una variedad de afecciones médicas, que incluyen cirrosis hepática, infección por VIH, enfermedad autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, mielosupresión inducida por quimioterapia, y trastornos de la médula ósea. Un recuento bajo de plaquetas se asocia con un mayor riesgo de hemorragia. Una enfermedad o trastorno ejemplar adicional que se puede tratar de este modo es la malaria y otras infecciones parasitarias, que aunque no se pretende limitar por la teoría, se cree que está mediada por la capacidad del factor plaquetario 4 humano para matar los parásitos de la malaria dentro de los eritrocitos mediante lisis selectiva la vacuola digestiva del parásito (véase Love et. al., Cell Host Microbe 12 (6): 815-23).

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método de suministro de fármacos, que comprende administrar plaquetas de cualquier composición descrita aquí, o producidas mediante cualquier método descrito aquí, a dicho paciente, en el que dichas plaquetas suministran dicho fármaco. Por ejemplo, se cree que debido a su vida útil in vivo, a la falta de injerto después de la administración, y a las propiedades de localización, las plaquetas pueden ser útiles como portadores de fármacos. Las hESC, hiPC y los MLP pueden modificarse genéticamente y usarse para producir plaquetas que expresan un fármaco deseado para el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, las hESC, hiPC o los MLP podrían modificarse genéticamente para expresar un agente antitumoral. Las plaquetas producidas a partir de tales hESC, hiPSC y MLP modificados genéticamente pueden usarse para suministrar tal agente antitumoral a un tumor para el tratamiento de una enfermedad neoplásica.

Las plaquetas producidas por los métodos de la presente invención pueden manipularse para incluir uno o más agentes terapéuticos que son liberados por las plaquetas de manera pasiva (difunden fuera de las plaquetas con el tiempo) o de manera activa (se liberan con la activación y desgranulación de las plaquetas). Se puede usar una amplia gama de fármacos. Las plaquetas manipuladas mediante ingeniería se pueden preparar de modo que incluyan uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en fármacos que actúan en los sitios de unión sináptica y neuroefectora; fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central; fármacos que modulan las respuestas

inflamatorias; fármacos que afectan la función renal y/o cardiovascular; fármacos que afectan la función gastrointestinal; antibióticos; agentes contra el cáncer; agentes inmunomoduladores; fármacos que actúan sobre la sangre y/o los órganos hematopoyéticos; hormonas; antagonistas de hormonas; agentes que afectan la calcificación y el recambio óseo, vitaminas, agentes de terapia génica; u otros agentes tales como agentes dianizadores, etc.

En ciertas realizaciones, las plaquetas se han manipulado para incluir uno o más agentes terapéuticos, tales como un fármaco de molécula pequeña, aptámero, u otro agente de ácido nucleico, o proteínas recombinantes, por ejemplo, que pueden almacenarse en los gránulos de las plaquetas (gránulos α, por ejemplo), y preferiblemente se liberan tras la activación de las plaquetas.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes exógenos que promueven o aceleran la sanación normal de heridas, reducen la cicatrización, reducen la fibrosis, o una combinación de las mismas.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes antifibróticos exógenos. Las plaquetas manipuladas para suministrar agentes antitrombóticos/antirrestenosis se pueden usar durante los procedimientos de angioplastia y trombólisis. En ciertas realizaciones, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería se pueden usar para prevenir o reducir la gravedad de la aterosclerosis. En ciertas realizaciones, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería se pueden usar para prevenir o reducir la gravedad de la restenosis. En todavía otras realizaciones, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería pueden usarse como parte de un tratamiento para tumores sólidos. Las plaquetas manipuladas mediante ingeniería pueden incluir uno o más agentes inmunoestimuladores.

Un aspecto adicional de la descripción se refiere a un método para producir una plaqueta deficiente en microglobulina β2, por ejemplo, una plaqueta "universal" o con inmunogenicidad reducida, que comprende el uso de cualquier método como se describe aquí para producir una plaqueta a partir de una célula manipulada mediante ingeniería para ser deficiente en la expresión de microglobulina β2, tal como una célula pluripotente inactivada para microglobulina β2. La descripción también proporciona una plaqueta deficiente en microglobulina β2, un megacariocito, o un progenitor plaquetario que carece de expresión de microglobulina β2. Una plaqueta deficiente en microglobulina β2 generalmente tiene pocas moléculas de MHC de Clase I, o preferiblemente indetectables, presentes en su membrana plasmática, reduciendo así la inmunogenicidad de la plaqueta.

Según las reivindicaciones, se proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos o MLP, que comprende cultivar una población no adherente de megacariocitos de MLP en condiciones de fuerza de cizallamiento en presencia de un inhibidor de proteasa, y recolectar y opcionalmente aislar plaquetas del cultivo.

El inhibidor de proteasa puede ser un inhibidor de MMP.

Las condiciones de fuerza de cizallamiento pueden ser condiciones de fuerza de cizallamiento constante. Las condiciones de fuerza de cizallamiento pueden comprender una fuerza de cizallamiento de 1-4,1 dinas/cm^2.

Los megacariocitos o MLP se pueden cultivar en un dispositivo microfluídico.

Los megacariocitos o MLP pueden derivar de células iPS, células ES, o células CD34$^+$ de origen natural, opcionalmente células CD34$^+$ de médula ósea o de sangre de cordón umbilical.

El inhibidor de proteasa puede ser un inhibidor de MMP tal como GM6001.

El inhibidor de proteasa puede ser un inhibidor específico de MMP8 tal como MMP8-I ((3R)-(+)-[2-(4-metoxibencenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-hidroxamato]).

El inhibidor de proteasa puede ser dos o más inhibidores de proteasa.

Los dos inhibidores de proteasa pueden ser un inhibidor general (pan) de MMP y un inhibidor específico de MMP8.

El inhibidor de proteasa puede añadirse en un momento de producción máxima de plaquetas dentro del cultivo.

Los megacariocitos o MPL se cultivan en presencia de TPO o un agonista de TPO para provocar la formación de proplaquetas, en la que las proplaquetas liberan plaquetas. Los megacariocitos o MPL se cultivan en medio de expansión hematopoyético y opcionalmente en (1) TPO o un agonista de TPO, SCF, IL-6 e IL-9, o (2) TPO o un agonista de TPO, SCF e IL-11, para causar la formación de pro-plaquetas en cultivo, en el que las pro-plaquetas liberan plaquetas.

Los megacariocitos o MPL pueden cultivarse a una temperatura mayor que 37ºC e igual o menor que 40ºC.

Los megacariocitos o MPL se pueden cultivar a una temperatura de alrededor de 39ºC.

Según las reivindicaciones, se proporciona un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos o MPL, que comprende cultivar una población no adherente de megacariocitos o MPL a una temperatura mayor que 37ºC e igual o menor que 40ºC, y recolectar y opcionalmente aislar plaquetas del cultivo.

Los megacariocitos o MPL se pueden cultivar a una temperatura de alrededor de 39ºC.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir MPL a partir de células PVE-HE, que comprende cultivar una población de células PVE-HE derivadas de células iPS o células ES en presencia de un inhibidor de BET, y recolectar y opcionalmente aislar MPL del cultivo.

El inhibidor de BET puede ser I-BET151.

El inhibidor de BET se puede añadir a las células PVE-HE en las últimas 48 horas, últimas 36 horas, últimas 24 horas, últimas 18 horas, últimas 12 horas, o últimas 6 horas de cultivo.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un método para producir MPL a partir de células PVE-HE, que comprende cultivar una población de células PVE-HE derivadas de células iPS o células ES en presencia de un inhibidor o supresor de c-myc, y recolectar y opcionalmente aislar MPL del cultivo.

El supresor o inhibidor de c-myc se puede añadir a las células PVE-HE en las últimas 48 horas, últimas 36 horas, últimas 24 horas, últimas 18 horas, últimas 12 horas, o últimas 6 horas de cultivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Procedimiento por etapas que representa la generación de plaquetas a partir de células madre pluripotentes. Esta Figura muestra la progresión de la diferenciación de células madre pluripotentes a través de células endoteliales hemogénicas derivadas de pluripotentes (PVE-HE) a través de células progenitoras específicas de linaje de megacariocitos (MLP) y a través de megacariocitos (MK).

FIG. 2. Progresión de la diferenciación de células iPS a través de células de morfología de diferenciación avanzada (ADM). Esta Figura muestra la progresión de las células iPS hacia PVE-HE. FIG. 2A: después de 48 horas, las células adheridas muestran una morfología típica de células madre pluripotentes en condiciones sin células alimentadoras. FIG. 2B: se muestra la transición casi completa desde la morfología de células madre pluripotentes a agrupaciones de células pequeñas dispersas. FIG. 2C: después de 96 hasta 146 horas tras el inicio de la diferenciación de PVE-HE, se observó una morfología de diferenciación avanzada que mostraba agrupaciones de células compactas pequeñas que crecen en la parte superior de la monocapa.

FIG. 3. Caracterización de la morfología de diferenciación avanzada de PVE-HE. Esta Figura muestra el fenotipo y la morfología de las células ADM que se han diferenciado en PVE-HE. Las células ADM muestran el fenotipo $CD31^{+}CD144(VE\text{-}Cad)^{+}CD105^{+}$ de PVE-HE en esta etapa de diferenciación (FIG. 3A). Las células ADM también se analizaron en busca de cambios morfológicos (FIG. 3B).

FIG. 4. Caracterización de progenitores específicos de linaje megacariocítico (MLP) derivados de iPS-PVE-HE mediante citometría de flujo. Esta Figura muestra el fenotipo de las células iPS-PVE-HE-MLP humanas como $CD34^{+}CD31^{+}CD41a^{+}CD43^{+}CD13^{+}CD14^{-}CD42b^{-/+}$.

FIG. 5. Análisis morfológico de células MK en maduración derivadas de iPS-PVE-HE-MLP humanas. Esta Figura muestra núcleos dentro de las células MK (indicados por “N”), y células formadoras de proplaquetas fácilmente observables con pseudópodos alargados (indicadas por flechas). A las 72 horas después del inicio de la diferenciación plaquetaria, los MK de poliploidía muy grandes (50 μM) se volvieron abundantes con la progresión de la maduración (FIG. 5A y B. La barra de escala en 5A es 100 μM, N en 5B indica núcleo dentro de MK). Entre 72 y 96 horas, se observaron fácilmente de forma microscópica células formadoras de proplaquetas con pseudópodos alargados. (FIG. 5A y 5C, indicadas por flechas).

FIG. 6A-E. Comparación de fenotipo y pureza de preparaciones de plaquetas de diferentes fuentes. Esta Figura muestra el análisis de citometría de flujo de la morfología y la expresión en la superficie celular de CD41a y CD42b en plaquetas humanas derivadas de sangre periférica y plaquetas derivadas de iPS-PVE-HE-MLP-MK. Entre 72-96 horas después de la iniciación, la cantidad de plaquetas CD41a+CD42b+ aumentó drásticamente, alcanzando niveles tan altos como alrededor de 70% (Figura 6D). Las FIGS. 6A-6B muestran la dispersión directa (“FSC-A”) y la dispersión lateral (“SSC-A”) para plaquetas humanas derivadas de donantes (6A) y plaquetas derivadas de hES (hES-PVE-HE-MLP) producidas como se describe en el Ejemplo 3 (6B). Las FIGS. 6C-E muestran la expresión de CD41a y CD42B por plaquetas humanas derivadas de donantes (6C), plaquetas derivadas de iPS (iPS-PVE-HE-MLP) (6D), y plaquetas derivadas de hES (hES-PVE-HE-MLP) (6E), habiéndose producido las dos últimas muestras como se describe en el Ejemplo 3.

FIG. 7. Comparación ultraestructural de plaquetas humanas derivadas de sangre periférica y plaquetas producidas por diferenciación de células pluripotentes inducidas humanas (hiPSC-PLT) mediante microscopía de barrido de transmisión. Esta Figura muestra las similitudes en las características celulares de las plaquetas humanas derivadas de sangre periférica y las hiPSC-PLT de la presente descripción. Las hiPSC-PLT son discoides.

FIG. 8. Comparación de plaquetas humanas derivadas de sangre periférica (hPRP) y hiPSC-PLT. Esta Figura muestra similitudes entre las dos preparaciones celulares en el diámetro de las plaquetas (panel izquierdo), y la

expresión de proteínas celulares estructurales beta1-tubulina y F-actina (a través de la unión de FITC-faloidina) (panel derecho), que están implicadas en cambios en la forma de plaquetas inducidas por activación. La tinción de Hoechst negativa (arriba a la derecha) confirmó la ausencia de ADN nuclear en las iPSC-PLT y las PLT derivadas de donantes.

FIG. 9. Comparación de plaquetas humanas derivadas de sangre periférica y hiPSC-PLT. Esta Figura muestra las similitudes en las características morfológicas de las plaquetas humanas derivadas de sangre periférica y las hiPSC-PLT de la presente descripción usando microscopía de células vivas de contraste de interferencia diferencial (DIC). Tanto las plaquetas humanas derivadas de sangre periférica como la hiPSC-PLT muestran una emisión de pseudópodos indicativa de activación cuando se unen a la superficie de vidrio cargada negativamente.

FIG. 10. Comparación de plaquetas humanas derivadas de sangre periférica y hiPSC-PLT. Esta Figura muestra las similitudes de la expresión de gránulos alfa como lo demuestra el marcaje de trombospondina 4 (TSP4) y factor plaquetario 4 (PF4). TSP4 y PF4 son quimiocinas liberadas de gránulos alfa de plaquetas activadas. Se observó que las hiPSC-PLT (FIG. 10B) tenían una expresión de gránulos alfa normal en relación con las plaquetas humanas normales (FIG. 10A), como se demostró mediante el marcaje de TSP4 y PF4.

FIG. 11. Evaluación funcional de las hiPSC-PLT. Esta Figura muestra la activación *in vitro* de las hiPSC-PLT con trombina, según se mide por el aumento de dos moléculas de adhesión CD62p y αIIbβIII (según se mide mediante el Ab PAC-1).

FIG. 12. Comparación funcional de plaquetas humanas circulantes y plaquetas derivadas de iPSC y ESC humanas. Esta Figura muestra el potencial *in vivo* de formación de coágulos de plaquetas humanas circulantes, hiPSC-PLT y hESC-PLT. Los experimentos se realizaron con plaquetas humanas naturales (“hPLT”), iPSC-PLT y plaquetas derivadas de células hES (“hESC-PLT”). La FIG. 12A muestra imágenes representativas de trombos formados en un modelo de lesión de pared vascular de ratón. La FIG. 12B ilustra gráficamente el número medio de plaquetas unidas al trombo en cada experimento. La unión de plaquetas se inhibió mediante el tratamiento con ReoPro, un fragmento de anticuerpo anti-αIIbβIII, lo que indica que la unión dependía de αIIbβIII como se esperaba. (FIG. 12B).

FIG. 13. Cinética de PLT en ratones NOD/SCID empobrecidos en macrófagos después de la infusión. Esta Figura muestra una circulación detectable de hiPSC-PLT y hESC-PLT de ocho horas.

FIG. 14 A-D. Diagrama de flujo del procedimiento ejemplar para la producción de plaquetas a partir de células madre pluripotentes.

FIG. 15. Análisis de FACS, CD41a, CD42b - MLP derivado de hiPSC.

FIG. 16. MLP representativas derivadas de hiPSC.

FIG. 17. Análisis de FACS CD31+, CD43+ - MLP derivado de hiPSC.

FIG. 18. MK representativos derivados de hESC.

FIG. 19. Formación de proplaquetas de MK.

FIG. 20. Análisis de FACS CD41a, CD42b.

FIG. 21. Microscopía DIC con tinción con β1-tubulina, PLT de donante humano (arriba), hESC-PLT (abajo).

FIG. 22. Pureza plaquetaria en función del tiempo en presencia de DMSO (diamantes), inhibidor de MMP GM6001 (cuadrados), y GM6001 y 8% de dextrano (denominado “viscosidad”) (triángulos), en condiciones de cultivo con fuerza de cizallamiento constante. El eje x corresponde al número de muestra, retirándose una muestra cada 30 minutos durante un cultivo de más de 6 horas.

FIG. 23. Número de plaquetas en función del tiempo en presencia de DMSO (diamantes), inhibidor de MMP GM6001 (cuadrados), y GM6001 y 8% de dextrano (denominado “viscosidad”) (triángulos), en condiciones de cultivo con fuerza de cizallamiento constante. GM6001 se añadió al cultivo el día 0.

FIG. 24. Número de plaquetas en presencia de DMSO (barra izquierda) e inhibidor de MMP GM6001 (barra central) en condiciones de cultivo con fuerza de cizallamiento constante y en condiciones de cultivo estático (en ausencia del inhibidor de MMP GM6001) (barra derecha).

FIG. 25. Pureza plaquetaria en función del tiempo en presencia del inhibidor de MMP GM6001 en un dispositivo microfluídico a un caudal de 12 microlitros/min (cuadrados) y a un caudal de 16 microlitros/min (triángulos). El control (diamantes) está en presencia de DMSO, ya que el inhibidor de MMP se disuelve en DMSO.

FIG. 26. Número de plaquetas en función del caudal. Barra izquierda: 12 microlitros/min, barra derecha: 16 microlitros/min.

FIG. 27. Pureza plaquetaria como resultado del cultivo estático en presencia del inhibidor específico de MMP8 MMP8-I (segunda barra), inhibidor de pan-MMP GM6001 (tercera barra), o la combinación de MMP8-I y GM6001 (cuarta barra). El MMP8-I es (3R)-(+)-[2-(4-metoxibencenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-hidroxamato], y está disponible comercialmente de Millipore. La primera barra es el control.

FIG. 28. Número de plaquetas como resultado del cultivo estático en presencia del inhibidor específico de MMP8 MMP8-I (segunda barra), inhibidor de pan-MMP GM6001 (tercera barra), o la combinación de MMP8-I y GM6001 (cuarta barra). La primera barra es el control.

FIG. 29. Pureza plaquetaria en función del tiempo en cultivo a 37ºC (barra izquierda por par) y 39ºC (barra derecha por par). La temperatura se fijó al comienzo y se mantuvo durante todo el cultivo.

FIG. 30. Número de plaquetas en función del tiempo en cultivo a 37ºC (barra izquierda por par) y 39ºC (barra derecha por par).

FIG. 31. Números de progenitores de megacariocitos (MLP) recolectados el día 6+4 (es decir, día 10 de diferenciación) en función del aumento de la dosis de iBET-151 (en μM). iBET se añade al cultivo en el marco de tiempo de 6+3 días, y los MLP se exponen a iBET durante un período de alrededor de 24 horas antes de su recolección. Concentraciones de iBET: 0 (barra izquierda), 0,1 microM (barra central), 0,25 microM (barra derecha).

FIG. 32. Análisis cuantitativo relativo de ARNm de c-myc y GATA-1 el día 6+4 en función del aumento de la dosis de iBET-151. Concentraciones de iBET: 0 (barra izquierda), 0,1 microM (barra central), 0,25 microM (barra derecha) para cada triplete.

FIG. 33. Pureza de células CD14+ en la población celular recolectada el día 6+4 en función del aumento de la dosis de iBET-151. Concentraciones de iBET: 0 (barra izquierda), 0,1 microM (barra central), 0,25 microM (barra derecha).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Las listas de definiciones y abreviaturas usadas en esta descripción se proporcionan al final de la Descripción Detallada.

Como se señaló anteriormente, las limitaciones en el suministro de plaquetas pueden tener consecuencias potencialmente mortales para los pacientes dependientes de transfusiones. Las células pluripotentes se pueden propagar *in vitro* indefinidamente, y representan una fuente de plaquetas potencialmente inagotable y sin donantes para la terapia humana. La capacidad de crear bancos de líneas de hESC con incompatibilidad igualadas o reducidas podría potencialmente disminuir o eliminar la necesidad de fármacos inmunosupresores y/o protocolos inmunomoduladores. Las realizaciones ejemplares proporcionan un método que comprende producir células iPS específicas del paciente (por ejemplo, usando los métodos descritos aquí o cualesquiera otros conocidos en la técnica), y producir plaquetas específicas del paciente a partir de dichas células iPS específicas del paciente, plaquetas que pueden usarse para el tratamiento de pacientes, tales como pacientes que han desarrollado o están en riesgo de desarrollar aloinmunidad plaquetaria.

Las realizaciones ejemplares proporcionan un método eficaz para generar megacariocitos (MK) a partir de células madre pluripotentes en condiciones libres de suero y sin células alimentadoras. Preferiblemente, los MK se producen a partir de células progenitoras específicas del linaje de megacariocitos (MLP, que se describen con más detalle aquí). Preferiblemente, los MK no se producen a partir de hemangioblastos o células formadoras de hemangiocolonias, tales como las descritas en la patente US No. 8017393. Usando métodos descritos aquí, las células madre pluripotentes (iPSC y ESC) se dirigieron hacia la diferenciación de MK. La eficiencia de diferenciación de megacariocitos a partir de MLP ha sido muy alta (hasta 90%). Sin purificación adicional, el 85% de las células vivas de los cultivos en suspensión de MK eran CD41a+ CD42b+, y los MK maduros también eran CD29+ y CD61+. Estas células MK derivadas *in vitro* pueden sufrir endomitosis y convertirse en MK poliploides maduros. Es importante destacar que las células formadoras de proplaquetas con pseudópodos alargados se observaron en la etapa tardía del cultivo de MK, lo que indica que los MK generados en este sistema pueden experimentar una diferenciación terminal y generar plaquetas funcionales en condiciones sin células alimentadoras.

Se describe aquí un sistema eficiente que es adaptable para la producción *in vitro* a gran escala y eficiente de megacariocitos usando, como células fuente, iPSC u otras células madre pluripotentes en condiciones controladas. Además, las plaquetas se pueden producir en cantidades suficientes para complementar o suplantar la necesidad de plaquetas derivadas de donantes. Además, los métodos descritos se pueden usar para producir plaquetas y células progenitoras de plaquetas de una manera predecible, de modo que las células se pueden producir “a demanda” o en cantidades deseadas para satisfacer la necesidad anticipada. Las células expresaron CD41a y CD42b, experimentaron endomitosis, y formaron MK poliploides maduros. Tras una mayor maduración, generaron plaquetas funcionales o activadas que fueron estimuladas por la trombina para volverse positivas para las moléculas de adhesión celular, CD62p y αIIbβIII (que se cree que ocurre por exposición del sitio de unión de PAC-1 después de un cambio conformacional de αIIbβIII tras la activación, mientras que se cree que CD62p está expuesta en la membrana exterior debido a la liberación de gránulos). Se sabe que ambos marcadores se expresan en la superficie de las plaquetas

activadas, y se detectaron en las hiPSC-PLT usando un ensayo de unión de PAC-1 y CD62p (p-selectina). Debido a que no se necesitan células inductoras del estroma para la producción de megacariocitos, los métodos descritos aquí pueden proporcionar la generación de plaquetas sin células alimentadoras, tal como la generación de plaquetas sin ningún uso de células xenogénicas.

En realizaciones ejemplares, también se pueden usar factores adicionales que incluyen estradiol, vitamina B3, inhibidores de metaloproteinasas de la matriz (MMP), inhibidores de la expresión de c-myc, y proteínas de la matriz extracelular, para potenciar la producción de plaquetas, tal como estimulando la maduración de megacariocitos y/o estimulando la producción de plaquetas, que puede llevarse a cabo en ausencia de células estromales.

La producción de megacariocitos en condiciones sin suero y sin estroma puede permitir la detección de factores que son críticos para regular la megacariopoyesis y la trombopoyesis en condiciones bien definidas. Los factores así identificados pueden contribuir a las aplicaciones clínicas. Los avances en esta área, también pueden proporcionar igualmente información sobre los mecanismos celulares y moleculares que regulan diferentes aspectos de la megacariopoyesis, incluyendo el compromiso, la expansión y la maduración del linaje.

Las realizaciones ejemplares integran inducciones por etapas de diferenciación de megacariocitos a partir de células madre pluripotentes. Se puede realizar una mayor optimización y establecimiento de controles en el proceso para mejorar la consistencia y eficiencia de este sistema para aplicaciones clínicas. Los mecanismos celulares o extracelulares subyacentes que regulan la maduración de los megacariocitos no necesitan estar completamente definidos para practicar estos métodos. Se pueden identificar e incluir otros factores que promueven la poliploidización y la maduración citoplasmática a fin de facilitar la diferenciación terminal de megacariocitos derivados *in vitro*. Por ejemplo, se puede usar al menos un inhibidor de la cinasa ROCK para inducir la endomitosis de megacariocitos en una etapa temprana. Sin embargo, se cree que este efecto se debe probablemente a un bloqueo artificial de la segregación cromosómica y la citocinesis en lugar de una maduración celular y nuclear orquestada de un megacariocito diferenciador. Puede ser ventajoso alcanzar un equilibrio entre la expansión, la endomitosis y la maduración citoplasmática para lograr el mayor rendimiento *in vitro* de megacariocitos, estado de diferenciación terminal, y producción posterior de plaquetas funcionales en condiciones definidas.

Estos resultados actuales demostraron que las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes comparten propiedades morfológicas y funcionales de las plaquetas sanguíneas normales. Estas plaquetas humanas derivadas de células madre pluripotentes pueden funcionar igualmente *in vivo*.

Pueden ocurrir eventos hemodinámicos adicionales durante la generación y propagación de trombos plaquetarios en el organismo vivo, que pueden no ser completamente imitados por sistemas *in vitro*. La disponibilidad de tecnología de formación de imágenes intravitales proporciona un medio para examinar y cuantificar directamente el proceso trombótico dependiente de plaquetas que ocurre después de una lesión vascular en sistemas complejos in vivo. Usando microscopía intravital de campo amplio de alta velocidad, los inventores demostraron que las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes se incorporan en el trombo de plaquetas de ratón en desarrollo en el sitio de lesión de la pared arteriolar inducida por láser en ratones vivos de forma similar a las plaquetas sanguíneas humanas normales. El pretratamiento de las plaquetas derivadas de células pluripotentes y de control con ReoPro redujo notablemente el número de plaquetas tanto donadas como derivadas de células madre pluripotentes que se incorporaron a los trombos, lo que confirma que la unión estaba mediada por la integrina αIIbβIII. Estos resultados indican que las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes son funcionales en el sitio de la lesión vascular en animales vivos.

Las plaquetas son células anucleadas que se adhieren al tejido y entre sí en respuesta a una lesión vascular. Este proceso está mediado principalmente por la integrina plaquetaria αIIbβIII, que se une a varios sustratos adhesivos, tal como el factor de von Willebrand (vWF) y el fibrinógeno, para unir y activar posteriormente las plaquetas en un trombo en crecimiento (36). Los resultados aquí demuestran que las plaquetas generadas a partir de células madre pluripotentes son funcionalmente similares a las plaquetas sanguíneas normales tanto *in vitro* como en animales vivos. Se demostró que las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes poseen funciones importantes involucradas en la hemostasia, incluyendo la capacidad de agregarse cuando se estimulan con agonistas fisiológicos. Además, los resultados del microscopio electrónico de transmisión e inmunofluorescencia demuestran además que las plaquetas generadas a partir de células madre pluripotentes son similares a las plaquetas sanguíneas normales.

Como se describe adicionalmente en los ejemplos siguientes, se observaron numerosas similitudes entre las plaquetas derivadas de células pluripotentes y las plaquetas humanas normales purificadas. Estas similitudes incluyen lo siguiente.

Las hiPSC-PLT son discoides (como lo demuestra la microscopía electrónica de transmisión)

Las hiPSC-PLT son en su mayoría ultraestructuralmente idénticas a las PLT humanas circulantes (como se demuestra por microscopía electrónica de transmisión).

El tamaño de las hiPSC-PLT es comparable al de las PLT humanas circulantes (2,38 μm ± 0,85 μm frente a 2,27 μm ± 0,49 μm) como se demuestra mediante microscopía DIC y de IF con β1-tubulina)

Las hiPSC-PLT fueron capaces de extenderse sobre vidrio y formar tanto filopodios como lamelopodios, como lo demuestran las imágenes de microscopía DIC de células vivas).

Las hiPSC-PLT son anucleadas - comparables a las PLT humanas circulantes (como lo demuestra el marcaje de Hoechst).

Las hiPSC-PLT tienen un citoesqueleto de tubulina normal con respecto a las PLT humanas circulantes (como lo demuestra el marcaje con β1-tubulina).

Las hiPSC-PLT tienen actina filamentosa normal con respecto a las PLT humanas circulantes (como lo demuestra el marcaje con faloidina).

Las hiPSC-PLT tienen una expresión de gránulos alfa normal con respecto a las PLT humanas circulantes (como se demuestra por el marcaje de TSP4 y PF4).

Otro problema científico y clínico es si las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes son funcionales en el marco *in vivo* complejo. En la última década se estableció un gran número de modelos experimentales para investigar la formación de trombos en ratones, incluyendo el modelo de trombosis por lesión por láser usado recientemente por varios grupos (37:38:39). El modelo de trombosis inducida por láser inicia la formación de trombos plaquetarios tan rápido como 5-30 segundos después de la lesión. Por lo tanto, este modelo permite la monitorización de la incorporación en tiempo real de plaquetas humanas rápidamente aclaradas y hESC-PLT en el trombo de plaquetas de ratón en desarrollo, lo que implica una gran cantidad de rutas de señalización, cascadas enzimáticas, así como la interacción de una miríada de componentes celulares y proteicos. Este modelo también refleja las reacciones inflamatorias asociadas con la trombosis inducida por trombina.

Usando el modelo de lesión vascular inducida por láser, los análisis de microscopía intravital demuestran que las hiPSC-PLT y las hESC-PLT, como las plaquetas sanguíneas, se incorporan en el trombo plaquetario de ratón en desarrollo a través de la integrina αIIbβIII después de una lesión vascular (FIG. 12A). Se determinó que las capacidades funcionales de hiPSC-PLT y hESC-PLT están mediadas por αIIbβIII mediante pretratamiento con ReoPro, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino que se une específicamente a αIIbβIII e inhibe la función plaquetaria (FIG. 12B). Estos resultados proporcionan pruebas de que las hESC-PLT son funcionales en el sitio de la lesión vascular in vivo. De forma importante, se muestra por primera vez que las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes en condiciones sin suero y sin células alimentadoras son capaces de facilitar la coagulación y la formación del trombo in vivo.

Dos estudios anteriores han dado a conocer la generación de MK a partir de hESC. El rendimiento en estos sistemas es extremadamente bajo, y a diferencia del sistema actual, se basa en el cocultivo con células estromales de animal suplementadas con suero (15, 16). Además, no se dio a conocer la funcionalidad in vivo (15, 16). La eliminación de estas dos variables en la diferenciación de células madre pluripotentes permite la generación de plaquetas sin exposición a productos animales. Además, la presente descripción demuestra que el sistema sin células alimentadoras descrito aquí puede generar MK con alta eficiencia, y que las plaquetas funcionales se pueden generar de manera eficiente en las condiciones sin células alimentadoras.

La trombopoyesis es un proceso muy complejo, con una sofisticada reorganización de membranas y microtúbulos y distribuciones precisas de gránulos y orgánulos (40). A pesar de los avances recientes en la comprensión de la biogénesis plaquetaria, los detalles mecanicistas que subyacen a la reorganización de la membrana, el inicio de las proplaquetas, el transporte de los orgánulos plaquetarios y gránulos secretores, y el control del tamaño de las plaquetas permanecen sin dilucidar. La capacidad de generar MK en condiciones sin suero y sin células alimentadoras debería ayudar en la selección de factores que son críticos para regular diferentes aspectos de la megacariopoyesis en condiciones bien definidas, incluyendo el compromiso, la expansión y la maduración del linaje.

Esta descripción proporciona diversos métodos para producir células PVE-HE, MLP, MK, proplaquetas y plaquetas in vitro (o ex vivo) que derivan de iPS o derivan de ESC.

Esta descripción proporciona métodos para la transición desde una célula iPS o una célula ES a una célula PVE-HE, o a un MLP, o a un MK, o a una plaqueta. Esta descripción proporciona métodos para la transición desde una célula PVE-HE a un MLP, o a un MK, o a una plaqueta. Esta descripción proporciona métodos para la transición desde un MLP a un MK, o a una plaqueta. Esta descripción proporciona métodos para la transición desde un MK a una plaqueta. Estos diversos cultivos se describen brevemente a continuación.

Las células PVE-HE se pueden producir a partir de células iPS o ES mediante un método que comprende cultivar células iPS o células ES en un medio de cultivo que comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) como medio basal, seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, y que además comprende proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) (por ejemplo, a 50 ng/ml), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (por ejemplo, a 50 ng/ml), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, a 50 ng/ml). Este período de cultivo puede durar un promedio de 6 días.

Los MLP se pueden producir a partir de células PVE-HE mediante un método que comprende el cultivo de células PVE-HE en un medio de cultivo que comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), mezcla de nutrientes F-12 de Ham, Albucult (Albúmina rh), alcohol polivinílico (PVA), ácido linoleico, SyntheChol (colesterol sintético), monotioglicerol (a-MTG), disolución de insulina rh-transferrina-selenio-etanolamina, mezcla de hibridoma libre de proteínas II (PFHMII), ácido ascórbico 2 fosfato, Glutamax I (L-alanil-L-glutamina), penicilina/estreptomicina, y que comprende además factor de células madre (SCF) (por ejemplo, a 25 ng/ml), trombopoyetina (TPO) (por ejemplo, a 25 ng/ml), ligando de tirosina cinasa 3 relacionada con Fms (FL) (por ejemplo, a 25 ng/ml), interleucina-3 (IL-3) (por ejemplo, a 10 ng/ml), interleucina-6 (IL-6) (por ejemplo, a 10 ng/ml), y opcionalmente heparina (por ejemplo, a 5 Unidades/ml). Este período de cultivo puede durar un promedio de 3-4 días. En la segunda mitad del cultivo, incluyendo las últimas 48 horas, las últimas 36 horas, las últimas 24 horas, las últimas 18 horas, las últimas 12 horas, o las últimas 6 horas, se puede añadir al cultivo un inhibidor de BET, preferiblemente a niveles subcitotóxicos. Los MLP recolectados de estos cultivos pueden crioconservarse o usarse inmediatamente para la producción de plaquetas u otros análisis.

Los megacariocitos se pueden producir a partir de los MLP a través de un método que comprende cultivar los MLP en un medio que comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, y que comprende además TPO (por ejemplo, a 30 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 1 ng/ml), IL-6 (por ejemplo, a 7,5 ng/ml), IL-9 (por ejemplo, a 13,5 ng/ml), y opcionalmente un inhibidor de ROCK tal como Y27632 (por ejemplo, a 5 μM), y/o heparina (por ejemplo, a 5-25 unidades/ml).

Los megacariocitos se pueden producir a partir de los MLP a través de un método que comprende cultivar los MLP en un medio que comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, y que comprende además uno o más de TPO (por ejemplo, a 10-100 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 0,5-100 ng/ml), IL-11 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), y opcionalmente un inhibidor de ROCK tal como Y27632 (por ejemplo, a 5 μM), y/o heparina (por ejemplo, a 2,5-25 Unidades/ml).

Este último cultivo produce MK y plaquetas dependiendo de la duración del cultivo. Las plaquetas se observan típicamente alrededor de los días 3-4 de cultivo. Se entenderá que, durante el período de cultivo, el MLP madurará en MK, y el MK madurará en proplaquetas, y las proplaquetas madurarán en plaquetas.

Por lo tanto, las plaquetas se pueden producir a partir de MLP o MK a través de un método que comprende cultivar los MLP o MK en un medio que comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja de densidad (LDL), colesterol, y que comprende además TPO (por ejemplo, a 30 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 1 ng/ml), IL-6 (por ejemplo, a 7,5 ng/ml), IL-9 (por ejemplo, a 13,5 ng/ml), y opcionalmente un inhibidor de ROCK tal como Y27632 (por ejemplo, a 5 μM), y/o heparina (por ejemplo, a 5-25 unidades/ml). Este período de cultivo puede tener una duración de 4-8 días o más.

Las plaquetas se pueden producir a partir de MLP o MK a través de un método que comprende cultivar los MLP o MK en un medio que comprende medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, y que comprende además uno o más de TPO (por ejemplo, a 10-100 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 0,5-100 ng/ml), IL-11 (por ejemplo, a 5-25 ng/ml), y opcionalmente un inhibidor de ROCK tal como Y27632 (por ejemplo, a 5 μM), y/o heparina (por ejemplo, a 2,5-25 Unidades/ml).

Estos métodos de producción de plaquetas incluyen el cultivo de MLP o MK en condiciones de cultivo estáticas o con fuerza de cizallamiento. Una condición de cultivo estática es una condición de cultivo en la que el medio de cultivo en contacto con las células cultivadas es relativamente estático. Una condición de cultivo con fuerza de cizallamiento es una condición de cultivo que comprende el movimiento deliberado y constante del medio de cultivo en contacto con las células cultivadas. La fuerza de cizallamiento se mide en dinas/cm^2. En algunos casos, la fuerza de cizallamiento se aproxima a la fuerza de cizallamiento que se produce en el entorno hematopoyético de la médula ósea. Se ha dado a conocer que la fuerza de cizallamiento en la sinusoide de la BM es alrededor de 1,3 a 4,1 dinas/cm^2. La descripción contempla que se puede llevar a cabo un cultivo con fuerza de cizallamiento a una fuerza de cizallamiento que oscila de alrededor de 1 a alrededor de 4,5 dinas/cm^2, o alrededor de 1,3 a alrededor de 4,1 dinas/cm^2, incluyendo cualquier fuerza o cualquier intervalo de fuerzas entre ellas, incluyendo alrededor de 1,5, alrededor de 2,0, alrededor de 2,5, alrededor de 3,0, alrededor de 3,5, alrededor de 4,0, y alrededor de 4,1 dinas/cm^2.

Se entenderá que el cultivo se puede llevar a cabo a un caudal que produzca tales fuerzas de cizallamiento. Para un cultivo dado, la fuerza de cizallamiento está asociada con el caudal (volumen/tiempo). La fuerza de cizallamiento se puede determinar con conocimiento del caudal, para cualquier cultivo o dispositivo de cultivo dado, usando conocimientos en la técnica. Algunos de los resultados experimentales proporcionados aquí comparan la producción de plaquetas en un dispositivo microfluídico dado a caudales de 12 microlitros/min y 16 microlitros/min. En algunos casos, el caudal puede estar en el intervalo de 5-25 microlitros/min, o dentro de 10-20 microlitros/min. En algunos casos, el caudal puede estar en el intervalo de 10-15 microlitros/min, y en otros puede estar en el intervalo de 16-20 microlitros/min.

Cuando se usa un cultivo con fuerza de cizallamiento, el método de producción de plaquetas puede comprender un primer período de cultivo en un cultivo estático durante 3-4 días, o hasta que se observen las plaquetas, seguido de un segundo cultivo en un entorno de fuerza de cizallamiento, tal como un dispositivo microfluídico u otro dispositivo capaz de inducir una fuerza de cizallamiento.

Debe entenderse que se pueden recolectar alícuotas de dichos cultivos y se pueden medir para determinar el contenido de plaquetas usando, por ejemplo, FACS. Esto identificará los períodos de máxima producción de plaquetas.

También debe entenderse que los métodos de producción de plaquetas tienen a menudo como material de partida una mezcla de MLP y MK, o comprenden en su medio de cultivo en algún momento durante el período de cultivo una mezcla de MLP y MK.

La descripción contempla que el MLP o MK se cultive en dispositivos microfluídicos u otros dispositivos de cultivo en los que se puede lograr una condición de fuerza de cizallamiento. En algunos casos, el dispositivo está diseñado de manera que el MLP o MK esté inmovilizado dentro del dispositivo, pero no conectado al mismo. En algunos casos, el dispositivo está hecho de una resina sintética tal como polidimetilsiloxano (PDMS) o dimeticona. Éstos se usan comúnmente en dispositivos microfluídicos y chips.

La descripción contempla además que, cuando se producen plaquetas usando condiciones de cultivo con fuerza de cizallamiento, se obtienen mejores rendimientos y funcionalidad de plaquetas si se añaden al cultivo inhibidores de proteasa particulares. Según esta descripción, se encontró que cuando las plaquetas se colocan bajo fuerza de cizallamiento, CD42b de la superficie celular puede perderse de la superficie plaquetaria, haciendo la plaqueta menos activa. Para evitar esto, y aún así cosechar los beneficios de un cultivo con cizallamiento, la descripción contempla el uso de un inhibidor de proteasa que previene el cizallamiento o pérdida de CD42b. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen inhibidores de metaloproteasas, y más específicamente inhibidores de metaloproteasas de la matriz (MMP). Otro ejemplo de inhibidores que pueden usarse en el cultivo con cizallamiento son los inhibidores del activador del plasminógeno. Estos inhibidores pueden ser pan-inhibidores, con la intención de que un único inhibidor pueda inhibir más de una y posiblemente todas las proteasas dentro de la clase. Alternativamente, pueden ser inhibidores específicos, con la intención de que un único inhibidor inhiba una proteasa dentro de la clase total o predominantemente.

En algunos casos, los cultivos se realizan en presencia de un inhibidor de MMP. Los inhibidores pueden ser moléculas pequeñas tales como moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido o ARNi, y similares.

Los ejemplos de inhibidores de MMP incluyen, pero no se limitan a, GM6001 (un pan-inhibidor), N-Dansil-D-fenilalanina, 4-epi-Clortetraciclina, Hidrocloruro de Piridoxatina, ARP 100, ARP 101, Batimastat, Clorhexidina, Dihidrocloruro, cis-ACCP, CL 82198 hidrocloruro, Minociclina, Hidrocloruro, Alendronato, Sal sódica, GM 1489, TAPI-1, TAPI-2, GM 6001, Marimastat, Inhibidor II de MMP, Inhibidor III de MMP, EGTA, Inhibidor V de MMP, Inhibidor de MMP-13, Inhibidor I de MMP-2, Inhibidor II de MMP-2, CP 471474, Inhibidor I de MMP-2/MMP-3, Inhibidor II de MMP-2/MMP-3, Inhibidor I de MMP-2/MMP-9, Inhibidor II de MMP-2/MMP-9, Inhibidor V de MMP-2/MMP-9, Ecotina, E. coli, Inhibidor de MMP-3, Inhibidor III de MMP-3, Inhibidor IV de MMP-3, Actinonina, Inhibidor V de MMP-3, Inhibidor VIII de MMP-3, Oligonucleótido Antisentido de MMP-7, Sal de sodio, Inhibidor I de MMP-8, Inhibidor I de MMP-9, Inhibidor I de MMP-9/MMP-13, Inhibidor II de MMP-9/MMP-13, NNGH, NSC 23766, PD166793, Pro-Leu-Gly hidroxamato hidrocloruro, Ro 32-3555, PF-356231, SB-3CT, Phosphoramidon, WAY 170523, UK 370106, UK 356618, cloruro de bario deshidratado, luteolina, isobavacalcona, hiclato de doxiciclina, inhibidor I de colagenasa, o-fenantrolina, TAPI-0 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. También incluyen TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, GM6001, metilprednisolona, batimastat, marimastat, prinomastat, BAY 12-9566, MMI270(B), BMS-275291, metastat, y otros inhibidores de MMP-1 a MMP-26. Debe entenderse que un inhibidor de MMP puede inhibir solo un miembro de la familia de MMP, o puede inhibir más de uno o todos los miembros de la familia de MMP.

Ciertos inhibidores de MMP sintéticos generalmente contienen un grupo quelante que se une firmemente al átomo de zinc catalítico en el sitio activo de la MMP. Los grupos quelantes comunes incluyen hidroxamatos, carboxilatos, tioles, y fosfinilos.

Otros inhibidores de MMP incluyen BB-94, Ro 32-3555, BB-1101, BB-2516, SE205, CT1746, CGS 27023A, AG3340, BAY 12-9566, D2163, D1927, PNU-142372, CMT-1, y actinonina.

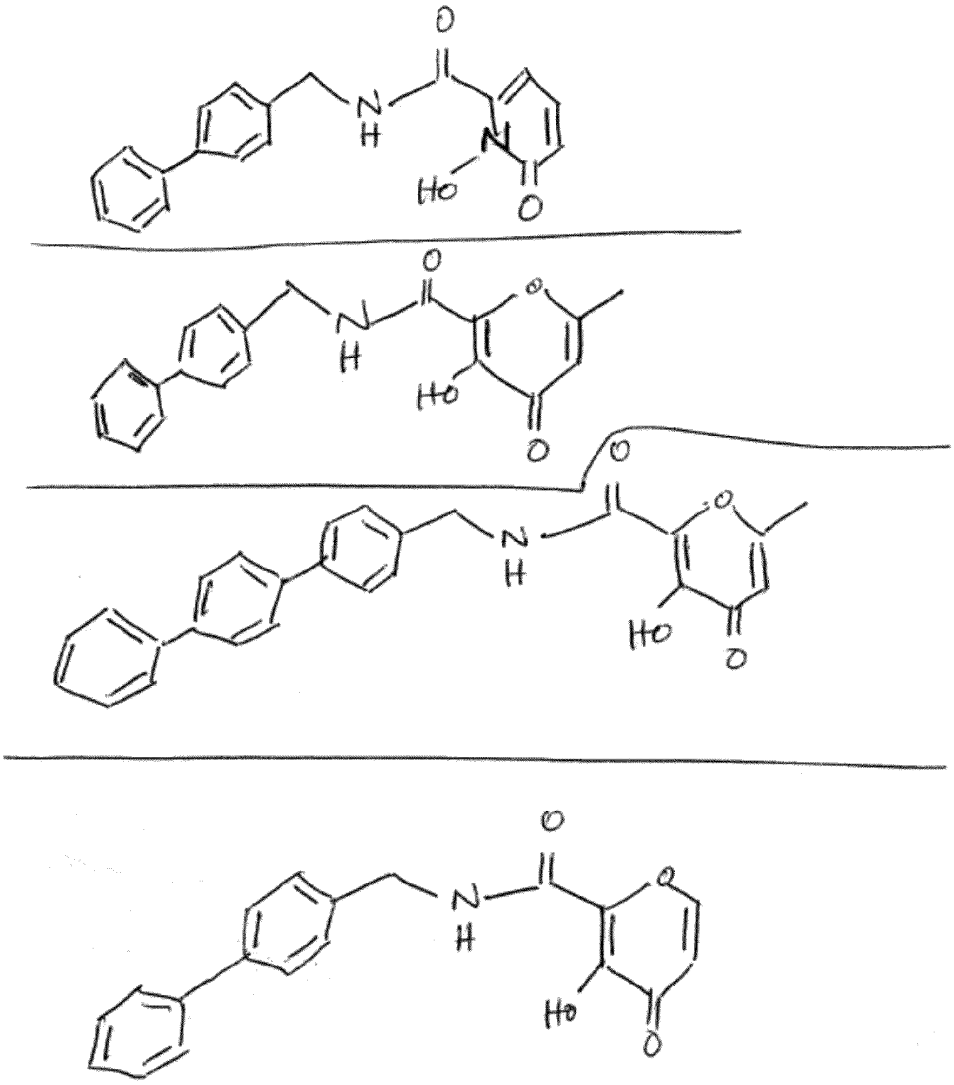
Muchos inhibidores de MMP están disponibles comercialmente.

La técnica está familiarizada con los inhibidores de MMP, y se proporcionan más ejemplos en las patentes U.S. Nos. 4.877.805; 5.837.224; 6.365.630; 6.630.516; 6.683.069; 6.919.072; 6.942.870; 7.094.752; 7.029.713; 6.942.870; 6.919.072; 6.906.036; 6.890.937; 6.884.425; 6.858.598; 6.759.432; 6.750.233; 6.750.228; 6.713.074; 6.699.486; 6.645.477; 6.630.516; 6.548.667; 6.541.489; 6.379.667; 6.365.630; 6.130.254; 6.093.398; 5.962.466; 5.837.224; 7.705.164; 7.786.316; 8.008.510; 7.579.486; 8.318.945; y 7.176.217; solicitudes de patente U.S. publicadas 20070037253; 20060293345; 20060173183; 20060084688; 20050058709; 20050020607; 20050004177; 20040235818; 20040185127; 20040176393; 20040067883; 20040048852; 20040034098; 20040034086; 20040034085; 20040023969; 20040019055; 20040019054; 20040019053; 20040006137; 20040006077;

20030212048; 20030004165; 20020198176; 20020177588; 20020169314; 20020164319; 20020106339; 20020061866; 20020054922; 20020049237; 20020010162; 20010039287; y 20010014688; y solicitudes PCT publicadas WO 02/064552, WO 05/1103399, WO 06/028523, WO2008/024784, WO 02/064552, WO 05/110399, WO 06/028523, WO01/62261, y WO2008/024784.

Los inhibidores de MMP también se han descrito en la bibliografía científica; véanse, por ejemplo, Whittaker et al. Chem Rev. 99:2735-2776, 1999; Whittake et al. Celltransmissions 17(1):3-14 (Tabla AB) y Harrison, Nature Reviews Drug Discovery 6:426-427, 2007 (Tabla AC).

Algunos inhibidores de MMP pueden ser



En algunos casos, se puede usar un inhibidor de MMP8, tal como un inhibidor de MMP8 específico, en un cultivo estático o con fuerza de cizallamiento. En algunos casos, el inhibidor de MMP8 puede usarse en cultivos de MLP y MK de origen natural, tal como MLP (por ejemplo, células progenitoras $CD34^+$) o MK derivado de médula ósea o de sangre de cordón umbilical.

Un ejemplo de un inhibidor específico de MMP8 es MMP8-I, que tiene el nombre químico (3R)-(+)-[2-(4-metoxibencenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-hidroxamato], y que está disponible comercialmente de Millipore.

En algunos casos, el inhibidor de proteasa puede ser un inhibidor del activador del plasminógeno. Los ejemplos de inhibidores del activador del plasminógeno incluyen, pero no se limitan a, inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), inhibidor 2 del activador del plasminógeno (PAI-2), e inhibidor del activador del plasminógeno tisular (tPA). Otros inhibidores del activador del plasminógeno incluyen los descritos en la patente U.S. 4.923.807; Solicitudes PCT internacionales WO/13063331; WO/1316974; y referencias bibliográficas Fortenberry YM. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors: a patent review (2006-present). Expert Opin Ther Pat. 2013 Jul; 23(7):801-15; y Pannekoek et al., EMBO J. 1986; 5(10):2539-44.

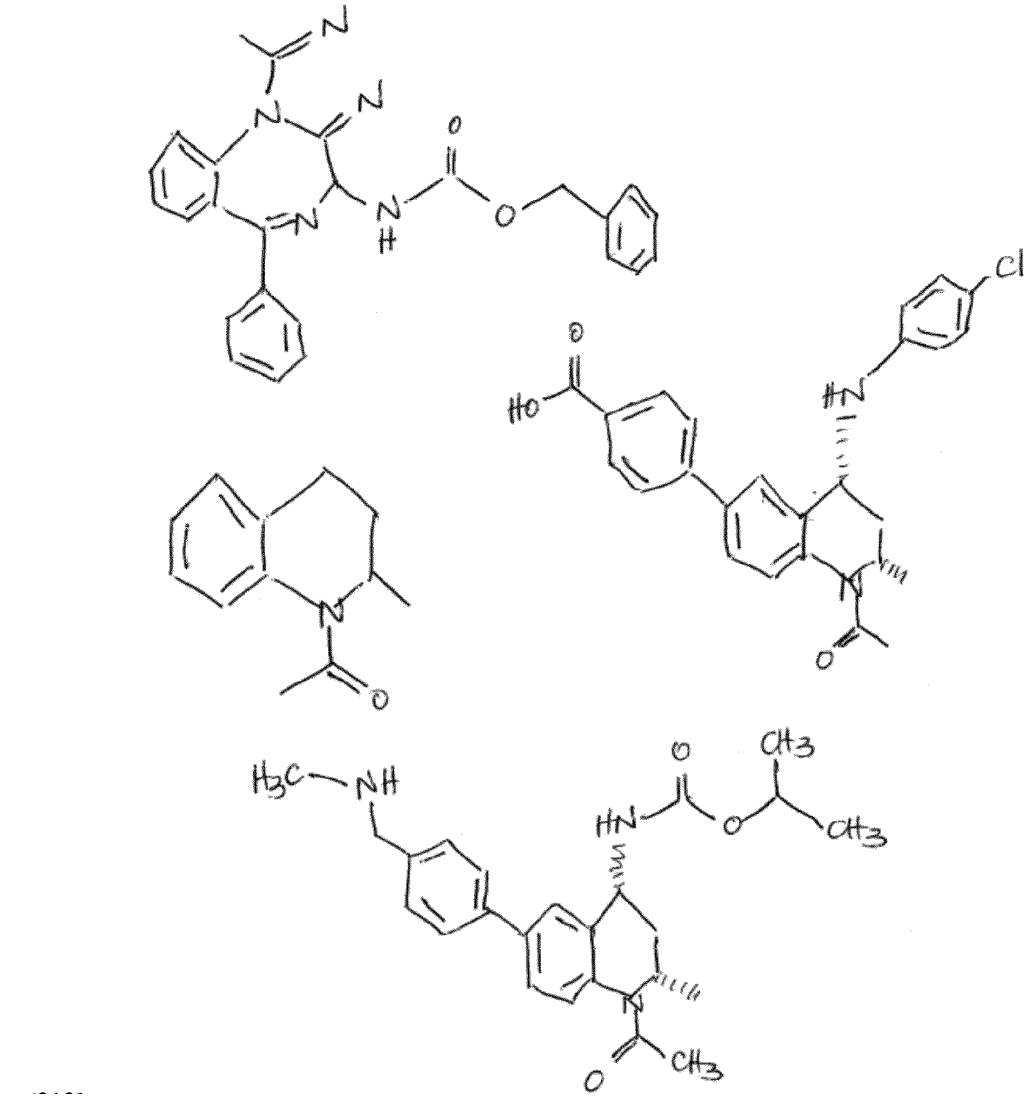
En algunos casos, en un cultivo se pueden usar dos o más inhibidores de proteasa juntos. Como ejemplo, el inhibidor de MMP GM6001 puede usarse junto con el inhibidor específico de MMP8 MMP8-I.

En algunos casos, los cultivos se pueden realizar a una temperatura mayor que 37ºC. La temperatura de cultivo puede estar en el intervalo de 37ºC a 45ºC, o 37ºC a 42ºC, o 38ºC a 41ºC, o 39ºC a 40ºC, o alrededor de 39ºC, o alrededor de 40ºC. El cultivo se realiza a la temperatura establecida. El cultivo a una temperatura mayor que 37ºC se denomina aquí cultivo a temperatura elevada.

En algunos casos, el método que produce los MLP a partir de células PVE-HE se realiza en presencia de inhibidores de la familia BET de proteínas que contienen bromodominio. El inhibidor de BET puede ser cualquier molécula o compuesto que inhiba un miembro de la familia BET, y puede ser un ácido nucleico tal como el aptámero de ADN y ARN, oligonucleótido antisentido, ARNip y ARNhc, un péptido pequeño, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y una molécula pequeña tal como un compuesto químico pequeño. Un inhibidor de BET puede prevenir o reducir la unión del bromodominio de al menos un miembro de la familia BET a restos de acetil-lisina de proteínas. Debe entenderse que un inhibidor de BET puede inhibir solo un miembro de la familia BET, o puede inhibir más de uno o todos los miembros de la familia BET.

Los ejemplos de inhibidores de BET se describen en los documentos US 2011143651, WO2009/084693A1, WO 2011143669, WO 2011143660, WO 2011054851, y JP 2008156311.

Los ejemplos de inhibidores de BET conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, RVX-208 (Resverlogix), PFI-1 (Structural Genomics Consortium), OTX015 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation), BzT-7, GSK525762A (iBET, GlaxoSmithKline), JQ1 (Cell 2011 146(6):904-17), y los compuestos a continuación (documento WO 2011054851, GlaxoSmithKline):



En algunas realizaciones, el inhibidor de BET es un compuesto de molécula pequeña (por ejemplo, JQ1 o derivados del mismo) que se une al bolsillo de unión del primer bromodominio de un miembro de la familia BET (por ejemplo BRD1, BRD2, BRD3, BRD4, BRD7, BRDT; véase documento WO 2011143669). Otros inhibidores de BET incluyen JQ1S, JQ1R, JQ20, JQ8, JQ6, JQ13, JQ19, JQ18, JQ11, JQ21, JQ24B, y KS1.

Otro ejemplo de un inhibidor de BET (denominado aquí iBET) es GSK1210151A (denominado aquí I-BET-151). Otros inhibidores de BET incluyen IBET151 e IBET762.

Muchos inhibidores de BET son útiles como agentes antileucémicos. Cuando se usan en los métodos de esta descripción, se usan típicamente como concentraciones bajas (es decir, por debajo del nivel en el que se observan sus efectos citotóxicos).

La descripción contempla que los inhibidores de BET se utilicen durante el período de cultivo que diferencia (o madura) las células PVE-HE a MLP. Este período de cultivo suele durar unos 4 días. El inhibidor de BET generalmente se añade en la última mitad del cultivo, incluyendo en las últimas 48 horas, las últimas 36 horas, las últimas 24 horas, las últimas 12 horas, o las últimas 6 horas del cultivo.

Los inhibidores de myc incluyen 10058-F4 y CX-3543.

Progenitores del linaje de megacariocitos

Diversas realizaciones de la presente descripción proporcionan un método para generar progenitores de linaje de megacariocitos (MLP) a partir de células madre pluripotentes (que incluyen iPS humanas y ES humanas).

Las células endoteliales hemogénicas de linaje temprano son negativas para CD41a, expresando CD41a durante la diferenciación hemogénica en etapa tardía en progenitores hematopoyéticos. CD42b se expresa exclusivamente en megacariocitos maduros. Los cultivos de MLP pueden ser heterogéneos, con un alto porcentaje de células CD41+ y un bajo porcentaje de células CD42+.

Los MLP pueden evaluarse para determinar el porcentaje de células doblemente positivas para CD41a y CD42b mediante análisis de FACS. CD41a es una subunidad del receptor de fibrinógeno (αIIbβIII), y CD42b es una subunidad del receptor del factor de von Willebrand (GPIb-V-IX). La expresión de ambos receptores es específica para los linajes de megacariocitos, y se cree que ambos son necesarios para la función plaquetaria.

Antes de la recolección para crioconservación, los MLP pueden evaluarse para determinar el porcentaje aproximado de células adheridas y el grado de células grandes diferenciadas con una relación baja de núcleos a citoplasma. Las células adheridas pueden aparecer como colonias difusas sin bordes de colonia claros. Puede haber una abundancia de MLP flotantes descansando sobre la población de células adheridas. Los MLP flotantes viables pueden parecer transparentes, con una birrefringencia mínima, delimitados por una membrana celular lisa.

Los MLP y sus composiciones se pueden proporcionar opcionalmente como una composición crioconservada.

También se describe aquí un método de cribado de un modulador de la diferenciación celular, que comprende: proporcionar una cantidad de células PVE-HE o progenitores de megacariocitos (MLP); poner en contacto las células PVE-HE o los MLP con un compuesto de ensayo; y determinar la presencia o ausencia de un efecto funcional a partir del contacto entre las células PVE-HE o los MLP y el compuesto de ensayo, en el que la presencia de un efecto funcional indica que el compuesto de ensayo es un factor megacariopoyético, trombopoyético, y/o hematopoyético que modula la diferenciación celular, y la ausencia de un efecto funcional indica que el compuesto de ensayo no es un factor megacariopoyético, trombopoyético, y/o hematopoyético que modula la diferenciación celular. En otras realizaciones, los factores megacariopoyéticos, trombopoyéticos, y/o hematopoyéticos se relacionan con la expansión, endomitosis, maduración citoplasmática, y diferenciación terminal de plaquetas funcionales.

Megacariocitos

Diversas realizaciones de la presente descripción proporcionan un método para generar megacariocitos a partir de células madre pluripotentes (que incluyen iPS humanas y ES humanas) en condiciones sin estroma y/o en condiciones sin suero. Estas realizaciones incluyen la generación de megacariocitos. Otras realizaciones proporcionan un método para generar megacariocitos a partir de células endoteliales hemogénicas derivadas de células pluripotentes. Dichos megacariocitos son preferiblemente capaces de producir plaquetas, por ejemplo cuando se cultivan en las condiciones descritas aquí.

En una realización, el método comprende: proporcionar células madre pluripotentes; y diferenciar las células madre pluripotentes en megacariocitos. En una realización, las células madre pluripotentes son células humanas. En otra realización, las células madre pluripotentes son hESC producidas opcionalmente sin la destrucción del embrión, tal como la línea NED7. En otra realización, las células pluripotentes son células ES humanas. En otra realización, los megacariocitos derivan de células madre pluripotentes inducidas. En otra realización, las células madre pluripotentes son células iPS humanas derivadas de la reprogramación de células somáticas. En una realización, las células somáticas son de tejido fetal. En otra realización, las células somáticas son de tejido adulto.

También se describe aquí un método de cribado de un modulador de la diferenciación celular, que comprende: proporcionar una cantidad de megacariocitos (MK); poner en contacto los MK con un compuesto de ensayo; y determinar la presencia o ausencia de un efecto funcional a partir del contacto entre los MK y el compuesto de ensayo, en el que la presencia de un efecto funcional indica que el compuesto de ensayo es un factor megacariopoyético, trombopoyético, y/o hematopoyético que modula la diferenciación celular, y la ausencia de un efecto funcional indica que el compuesto de ensayo no es un factor megacariopoyético, trombopoyético, y/o hematopoyético que modula la diferenciación celular. Los factores megacariopoyéticos, trombopoyéticos, y/o hematopoyéticos se relacionan con la expansión, endomitosis, maduración citoplasmática, y diferenciación terminal de plaquetas funcionales.

Plaquetas

Otras realizaciones de la presente descripción proporcionan un método para generar plaquetas a partir de células madre embrionarias humanas y células madre pluripotentes (incluyendo iPSC e iPSC humanas). En una realización, el método comprende: proporcionar células madre embrionarias humanas (hESC); formar células PVE-HE que diferencian las células PVE-HE en megacariocitos; y diferenciar los megacariocitos en plaquetas.

En otra realización, el método de generación de plaquetas comprende: proporcionar células PVE-HE; diferenciar las células PVE-HE en MLP o megacariocitos; y opcionalmente diferenciar los MLP en megacariocitos; y después diferenciar (o madurar) los megacariocitos en plaquetas, típicamente a través de una etapa de proplaquetas. El proceso de diferenciación de las células PVE-HE en megacariocitos se puede realizar como se describió anteriormente. En una realización, las células PVE-HE derivan de células ES humanas. En otra realización, las células PVE-HE derivan de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En una realización, las células iPS son células iPS humanas derivadas de la reprogramación de células somáticas. En una realización, las células somáticas son de tejido fetal. En otra realización, las células somáticas son de tejido adulto. En diversas realizaciones, el proceso de diferenciar los megacariocitos en plaquetas comprende continuar cultivando los megacariocitos para permitir que los megacariocitos se diferencien en plaquetas. En diversas realizaciones, el proceso de diferenciar los megacariocitos en plaquetas se realiza en condiciones sin células alimentadoras, y comprende recoger los megacariocitos diferenciados de las células progenitoras específicas del linaje de megacariocitos.

En otras realizaciones, las plaquetas se recogen desde el día 4 hasta el día 10 de cultivo de megacariocitos en medio MK-M u otro medio que comprenda medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) como medio basal, seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, TPO (por ejemplo, a 30 ng/ml), SCF (por ejemplo, a 1 ng/ml), IL-6 (por ejemplo, a 7,5 ng/ml), IL-9 (por ejemplo, a 13,5 ng/ml), y opcionalmente un inhibidor de ROCK tal como Y27632 (por ejemplo, a 5 μM), y/o heparina (por ejemplo, a 5-25 unidades/ml). En una realización preferida, las plaquetas se recogen de 3 a 5 días después de la primera aparición de células formadoras de proplaquetas en el cultivo de megacariocitos en medio MK-M. En ciertas realizaciones, las plaquetas se purifican usando centrifugación en gradiente de densidad. En realizaciones adicionales, la centrifugación en gradiente de densidad usa medio Percoll. En realizaciones adicionales, la centrifugación en gradiente de densidad usa medio BSA/HSA. En otra realización, el método de purificación de plaquetas separa las partículas que son negativas para CD41a. En otra realización, el método de purificación de plaquetas separa las partículas que son negativas para CD42b. En otra realización, el método de purificación de plaquetas conserva la viabilidad celular y la integridad morfológica. En otras realizaciones, las plaquetas expresan CD41a y CD42b. En otras realizaciones, las plaquetas responden a la estimulación con trombina. En otra realización, las plaquetas pueden extenderse sobre superficies de fibrinógeno y factor de von Willebrand (vWF). En realizaciones adicionales, las plaquetas tienen capacidad para unirse a PAC-1 y activar la integrina. En otra realización, las plaquetas forman microagregados y facilitan la formación y retracción del coágulo. En otra realización, las plaquetas no se activan en presencia de apirasa y/o EDTA.

También se describe aquí un método para usar plaquetas derivadas de células madre pluripotentes. Las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes pueden usarse en transfusiones de plaquetas. El método puede comprender proporcionar una cantidad de plaquetas derivadas de células madre pluripotentes; y administrar la cantidad de plaquetas derivadas de células madre pluripotentes a un sujeto que lo necesite. En diversas realizaciones, las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes pueden ser plaquetas del mismo paciente. En otra realización, las plaquetas derivan de iPSC. En cierta realización, las plaquetas derivan de células iPS humanas. En otras realizaciones, las plaquetas se almacenan en una disolución que no contribuye a una respuesta aloinmunogénica de HLA en un sujeto tras la administración de las plaquetas al sujeto. En realizaciones ejemplares adicionales, las plaquetas derivadas de células madre pluripotentes pueden estar sustancialmente libres de leucocitos, por ejemplo conteniendo menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, o menos de 1% de leucocitos, preferiblemente menos de 0,1%, 0,001%, o incluso 0,0001%. Realizaciones ejemplares adicionales proporcionan una preparación de plaquetas derivadas de células madre pluripotentes que contiene menos de 10^6 leucocitos en la preparación, más preferiblemente menos de 10^5, 10^4, o incluso 10^3 leucocitos.

También se describe aquí una composición que contiene al menos 10^8 plaquetas, más preferiblemente al menos 10^9, al menos 10^{10}, o al menos 10^{11} plaquetas.

Usando las condiciones actuales de almacenamiento del banco de sangre a 22-24ºC, la viabilidad y función de las plaquetas humanas (recolectadas por aféresis) se pueden mantener durante solo 5 días - aunque el tiempo de

almacenamiento limitado se debe al envejecimiento de las plaquetas y al aumento del riesgo de proliferación bacteriana. Se espera que las plaquetas producidas por los métodos de la presente invención tengan una vida útil más larga que las plaquetas almacenadas en bancos, de manera que se puedan mantener durante al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o incluso 15 días a 22-24ºC, y mantener la viabilidad adecuada para uso en pacientes humanos.

En ciertas realizaciones, las plaquetas se pueden tratar - después del aislamiento o durante una o más de las etapas de cultivo que conducen a la producción de plaquetas - con uno o más agentes que prolongan el almacenamiento de plaquetas a 22-24ºC, refrigerado (por ejemplo, 4ºC) y/o congelado.

Por ejemplo, la presente invención contempla tratar las plaquetas con agentes, o derivar las plaquetas en condiciones, que reducen la actividad de la sialidasa y (opcionalmente) inhiben la proliferación de una o más bacterias en una preparación de producto plaquetario. El método puede incluir las etapas de poner en contacto la preparación del producto plaquetario con una cantidad de un inhibidor de sialidasa, para obtener de ese modo una preparación del producto plaquetario tratada con sialidasa; en el que se reduce la actividad de sialidasa y se inhibe la proliferación de una o más bacterias, en comparación con una preparación de producto plaquetario no sometida a un inhibidor de sialidasa.

El tipo de bacterias inhibidas incluye las que se encuentran comúnmente en las preparaciones de productos plaquetarios. Ejemplos de tales bacterias incluyen: Aspergillus, Bacillus sp, Bacteroides eggerthii, Candida albicans, Citrobacter sp, Clostridium perfringens, Corynebacterium sp, Diphtheroid, Enterobacter aerogenes, Enterobacter amnigenus, Enterobacter cloacae, Enterococcus avium, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Fusobacterium spp., Granulicatella adiacens, Heliobacter pylori, Klebsiella sp, (K. pneumonia, K. oxytoca), Lactobacillus sp, Listeria sp, Micrococcus sp, Peptostreptococcus, Proteus vulgaris, Pseudomonas sp, Pseudomys oxalis, Propionibacterium sp, Salmonella sp, Serratia sp, Serratia marcescens Staphylococcus sp (Staphylococcus negativo a coagulasa, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus), Streptococcus sp, (S. gallolyticus, S. bovis, S. pyogenes, S. viridans), y Yersinia enterocolitica..

Los inhibidores de sialidasa que se pueden usar con la presente invención incluyen, por ejemplo, fetuína, ácido 2,3-deshidro-2-desoxi-N-acetilneuramínico (DANA) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; (3R,4R,5S)-5-amino-4-acetamido-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-en-1-carboxilato de etilo; ácido (2R,3R,4S)-4-guanidino-3-(prop-1-en-2-ilamino)-2-((1R,2R)-1,2,3-trihidroxipropil)-3,4-dihidro-2H-piran-6-carboxílico; ácido (4S,5R,6R)-5-acetamido-4-carbamimidamido-6-[(1R,2R)-3-hidroxi-2-metoxipropil]-5,6-dihidro-4H-piran-2-carboxílico; y ácido (1S,2S,3S,4R)-3-[(1S)-1-acetamido-2-etil-butil]-4-(diaminometilidenamino)-2-hidroxi-ciclopentan-1-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Se pueden añadir a las plaquetas uno o más agentes modificadores de glicanos. Dichos agentes modificadores de glicanos incluyen, por ejemplo, CMP-ácido siálico, un precursor de CMP-ácido siálico, UDP galactosa, o una combinación de los mismos. En un aspecto, también se puede añadir a las plaquetas una enzima que convierte el precursor de CMP-ácido siálico en CMP-ácido siálico.

En ciertas realizaciones, las plaquetas se pueden tratar con al menos un agente modificador de glicanos en una cantidad eficaz para reducir el aclaramiento de la población de plaquetas. En algunas realizaciones, el agente modificador de glicanos se selecciona del grupo que consiste en UDP-galactosa y precursores de UDP-galactosa. En algunas realizaciones preferidas, el agente modificador de glicanos es UDP-galactosa.

En ciertas realizaciones, las plaquetas pueden tratarse con ciertas moléculas de azúcar que conducen a la glicación de los restos GlcNAc expuestos en GP1b, y de ese modo reducen el aclaramiento plaquetario, bloquean la fagocitosis plaquetaria, aumentan el tiempo de circulación plaquetaria, y/o aumentan el tiempo de almacenamiento plaquetario.

En ciertas realizaciones, las plaquetas se pueden tratar con trehalosa u otros polisacáridos de bajo peso molecular.

En ciertas realizaciones, las plaquetas se pueden tratar con inhibidores de proteasa, tales como inhibidores de metaloproteasas de la matriz.

En algunas realizaciones, el tiempo de circulación in vivo de las plaquetas aumenta en al menos alrededor de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 150%, 200%, o más

Las plaquetas de la presente invención se pueden almacenar refrigeradas durante al menos alrededor de 3 días, al menos alrededor de 5 días, al menos alrededor de 7 días, al menos alrededor de 10 días, al menos alrededor de 14 días, al menos alrededor de 21 días, o al menos alrededor de 28 días.

Además, derivar plaquetas de células madre en cultivo brinda la oportunidad de preacondicionar las plaquetas y los megacariocitos, e incluso modificar genéticamente las células madre o células progenitoras tales como los megacariocitos de una manera que extiende la vida útil de las plaquetas y mejora el rendimiento y viabilidad después del almacenamiento en refrigeración y/o crioconservación. Por ejemplo, los MK pueden modificarse por ingeniería genética para que tengan niveles alterados de expresión de genes implicados en relaciones de lípidos de membrana, patrones de glicosilación de proteínas, proteínas inducidas por estrés, translocación 14-3-3ζ, y similares.

En una realización adicional, las plaquetas son plaquetas funcionales. En una realización adicional, el porcentaje de plaquetas funcionales es al menos alrededor de 60%, es al menos alrededor de 70%, es al menos alrededor de 80%, o es al menos alrededor de 90%. En aún otra realización, las plaquetas funcionales están activas durante al menos 2 días cuando se almacenan a 22 - 37ºC.

La descripción contempla además que las plaquetas generadas según los métodos proporcionados aquí se pueden manipular mediante ingeniería para incluir uno o más agentes terapéuticos que son liberados por las plaquetas de manera pasiva (por ejemplo, pueden difundirse fuera de las plaquetas con el tiempo) o de manera activa (por ejemplo, se liberan tras la activación y desgranulación de las plaquetas). Se puede usar una amplia gama de fármacos, y puede incluir un antibiótico, agente antivírico, anestésico, agente esteroideo, agente antiinflamatorio, agente antineoplásico, antígeno, vacuna, anticuerpo, descongestionante, antihipertensivo, sedante, agente anticonceptivo, agente progestágeno, anticolinérgico, analgésico, antidepresivo, antipsicótico, agente bloqueante β-adrenérgico, diurético, agente activo cardiovascular, agente vasoactivo, agente antiinflamatorio no esteroideo, agente nutricional, etc.

Por ejemplo, las plaquetas manipuladas pueden prepararse de modo que incluyan uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en fármacos que actúan en los sitios de unión sináptica y neuroefectora (por ejemplo, acetilcolina, metacolina, pilocarpina, atropina, escopolamina, fisostigmina, succinilcolina, epinefrina, norepinefrina, dopamina, dobutamina, isoproterenol, albuterol, propranolol, serotonina); fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central (por ejemplo, clonazepam, diazepam, lorazepam, benzocaína, bupivacaína, lidocaína, tetracaína, ropivacaína, amitriptilina, fluoxetina, paroxetina, ácido valproico, carbamazepina, bromocriptina, morfina, fentanilo, naltrexona, naloxona); fármacos que modulan las respuestas inflamatorias (por ejemplo, aspirina, indometacina, ibuprofeno, naproxeno, esteroides, cromoglicato sódico, teofilina); fármacos que afectan la función renal y/o cardiovascular (por ejemplo, furosemida, tiazida, amilorida, espironolactona, captopril, enalapril, lisinopril, diltiazem, nifedipina, verapamilo, digoxina, isordil, dobutamina, lidocaína, quinidina, adenosina, digitalis, mevastatina, lobastatina, simvastatina, mevalonato); fármacos que afectan la función gastrointestinal (por ejemplo, omeprazol, sucralfato); antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, clindamicina, anfotericina B, quinina, meticilina, vancomicina, penicilina G, amoxicilina, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacino, doxiciclina, aciclovir, zidovudina (AZT), ddC, ddI, ribavirina, cefaclor, cefalexina, estreptomicina, gentamicina, tobramicina, cloranfenicol, isoniazida, fluconazol, amantadina, interferón); agentes contra el cáncer (por ejemplo, ciclofosfamida, metotrexato, fluorouracilo, citarabina, mercaptopurina, vinblastina, vincristina, doxorrubicina, bleomicina, mitomicina C, hidroxiurea, prednisona, tamoxifeno, cisplatino, decarbazina); agentes inmunomoduladores (por ejemplo, interleucinas, interferones, GM-CSF, TNFα, TNFβ, ciclosporina, FK506, azatioprina, esteroides); fármacos que actúan sobre la sangre y/o los órganos que forman la sangre (por ejemplo, interleucinas, G-CSF, GM-CSF, eritropoyetina, vitaminas, hierro, cobre, vitamina B12, ácido fólico, heparina, warfarina, cumarina); hormonas (por ejemplo, hormona del crecimiento (GH), prolactina, hormona luteinizante, TSH, ACTH, insulina, FSH, CG, somatostatina, estrógenos, andrógenos, progesterona, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), tiroxina, triyodotironina); antagonistas de hormonas; agentes que afectan la calcificación y el recambio óseo (por ejemplo, calcio, fosfato, hormona paratiroidea (PTH), vitamina D, bisfosfonatos, calcitonina, fluoruro), vitaminas (por ejemplo, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico, biotina, colina, inositol, carnitina, vitamina C, vitamina A, vitamina E, vitamina K), agentes de terapia génica (por ejemplo, vectores virales, liposomas que portan ácido nucleico, conjugados de ADN-proteína, agentes antisentido); u otros agentes tales como agentes dirigidos, etc.

En ciertas realizaciones, las plaquetas se han manipulado por ingeniería para incluir uno o más agentes terapéuticos, tales como un fármaco de molécula pequeña, aptámero u otro agente de ácido nucleico, o proteínas recombinantes, es decir, que pueden almacenarse en los gránulos de las plaquetas (gránulos α, por ejemplo), y preferiblemente se liberan tras la activación de las plaquetas, tal como en el sitio de una lesión vascular u otra herida, placa aterosclerótica o erosión de células endoteliales, infección, o un entorno protrombótico capaz de activación plaquetaria, tal como la vasculatura de un tumor sólido. En otras realizaciones, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería se pueden usar para reducir la gravedad de o prevenir la fibrosis, tal como en el tratamiento de la fibrosis pulmonar, es decir, tal como se pueden seleccionar del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, y fibrosis quística.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes exógenos que promueven o aceleran la sanación normal de heridas, reducen la cicatrización, reducen la fibrosis, o una combinación de los mismos. Una proteína recombinante ejemplar que puede expresarse en los megacariocitos y empaquetarse en los gránulos de las plaquetas producidas a partir de ellos incluye eritropoyetina. El suministro localizado de eritropoyetina acelera la respuesta de cicatrización de heridas inducida por fibrina, y las plaquetas cargadas con EPO recombinante se pueden usar en el tratamiento de heridas abiertas y llagas, incluyendo úlceras diabéticas, quemaduras, etc., así como heridas cerradas (internas) que incluyen procedimientos quirúrgicos (lesión quirúrgica, tal como la resultante de laminectomía, discectomía, cirugía articular, cirugía abdominal, o cirugía torácica). Otras proteínas de cicatrización de heridas, particularmente factores de crecimiento no fibróticos, para los que se puede lograr según la presente invención la expresión en células MK y el almacenamiento en gránulos de plaquetas, incluyen el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1); factor de básico crecimiento de fibroblastos (bFGF); factor de crecimiento transformante β-3 (TGFβ-3), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), fibronectina, vitronectina, trombospondina, laminina, tenasina.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes antifibróticos exógenos, tales como, pero sin limitarse a, anticuerpos (particularmente anticuerpos monocatenarios) contra TGFβ-1, TGFβ-2 y/o PDGF; proteínas de unión que evitan que TGFβ-1, TGFβ-2 y/o PDGF se unan a sus receptores ya sea uniéndose al propio factor de crecimiento o uniéndose al receptor (por ejemplo, péptidos que contienen la secuencia del sitio de unión del receptor) o a formas solubles del receptor de factor de crecimiento o los dominios de unión al factor de crecimiento de estos receptores; o aptámeros que inhiben la interacción receptor-ligando.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes exógenos que modulan la cicatrización de heridas, tales como proteasas; sustancias vasoactivas tales como serotonina y/o histamina; fibronectina; colagenasas; activador del plasminógeno; proteasas neutras; elastina; colágenos; proteogicanos; factor de crecimiento epidérmico (EGF); hormonas tales como estradiol, testosterona o progesterona; factor de crecimiento derivado de macrófagos (MDGF); adrenomedulina; angiogenina; angiopoyetina-1; factor de crecimiento relacionado con angiopoyetina; factor neurotrófico derivado del cerebro; hormona liberadora de corticotropina; Cyr16; folistatina; factor de crecimiento de hepatocitos; interleucinas; midkina; neuroquinina A; neuropéptido Y (NPY); pleiotrofina; progranulina, proliferina; secretoneurina; sustancia P; VG5Q; y factores que reclutan pericitos; y becaplermina.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más aptámeros nucleicos que pueden promover la cicatrización de heridas y/o reducir la fibrosis y la cicatrización en el sitio de una herida. Se cree que la cicatrización es causada tanto por la inflamación persistente como por la activación excesiva de los fibroblastos. La osteopontina (OPN) es una citocina que promueve la activación celular. La ausencia de OPN in vivo reduce la cicatrización dérmica. Los aptámeros de ARN son moléculas de ARN cortas que se unen a proteínas diana con alta afinidad. El aptámero OPN-R3 (R3) bloquea la señalización de OPN. En ciertas realizaciones, las plaquetas se pueden cargar con OPN-R3 para ser liberadas de forma activa o pasiva, preferiblemente de forma activa en el sitio de activación plaquetaria. En el documento US20110190386 se describen aptámeros inhibidores de OPN ejemplares.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes pequeños (orgánicos) que pueden promover la cicatrización de heridas y/o reducir la fibrosis y la formación de cicatrices en el sitio de una herida. El cierre de la herida por escisión, por ejemplo, puede acelerarse significativamente mediante agonistas del receptor A2A, tal como CGS-21680 (Montesinos et al. JEM 1997, 186(9) páginas 1615-1620). Por consiguiente, meramente como ilustración, las plaquetas pueden cargarse con agonistas del receptor A2A para ser liberadas activa o pasivamente, preferiblemente de forma activa, en el sitio de activación plaquetaria. Otros agentes de molécula pequeña incluyen esteroides, compuestos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de la 5-lipoxigenasa (5-LO), antagonistas del receptor del leucotrieno B4 (LTB4), inhibidores de leucotrieno A4 (LTA4) hidrolasa, agonistas del 5-HT, inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), antagonistas H2, agentes antineoplásicos, e inhibidores de ciclooxigenasa-2.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes antibióticos exógenos. Los antibióticos ejemplares incluyen cloranfenicol, clortetraciclina, clindamicina, clioquinol, eritromicina, framicetina, gramicidina, ácido fusídico, gentamicina, mafenida, mupiroicina, neomicina, polimixina B, bacitracina, sulfadiazina de plata, tetraciclina, clortetraciclina, tobramicina, amikacina, bancomicina, ramoplanina, levofloxacino, ofloxacino, moxifloxacino, clindamicina, o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, las plaquetas incluyen uno o más agentes analgésicos o anestésicos y/o antiinflamatorios exógenos. Los agentes antiinflamatorios ejemplares pueden seleccionarse de acetaminofeno, aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, indometacina, piroxicam, fenoprofeno, flubiprofeno, ketoprofeno, naproxeno, suprofeno, loxoprofeno, cinnoxicam, tenoxicam, y una combinación de los mismos.

Las plaquetas manipuladas para suministrar agentes antitrombóticos/antirrestenosis se pueden usar durante los procedimientos de angioplastia y trombólisis.

En ciertas realizaciones, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería se pueden usar para prevenir o reducir la gravedad de la aterosclerosis, y pueden incluir uno o más agentes antiateroesclerosis exógenos (es decir, un agente que reduce las lesiones ateroscleróticas o previene la formación), y pueden incluir: agentes antiproliferativos/antimitóticos, incluyendo productos naturales tales como alcaloides de la vinca (es decir, vinblastina, vincristina y vinorrelbina), paclitaxel, epidipodofilotoxinas (es decir, etopósido, tenipósido), antibióticos (dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorrubicina, e idarrubicina), antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina, enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente la L-asparagina y priva a las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos tales como mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), alquilsulfonatos-busulfán, nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos - dacarbazinina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como análogos del ácido fólico (metotrexato), análogos de pirimidina (fluorouracilo, floxuridina, y citarabina), análogos de purina e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, y 2-clorodesoxiadenosina {cladribina}); complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazina, hidroxiurea, mitotano, aminoglutetimida; hormonas (es decir, estrógeno); agentes fibrinolíticos (tales como activador de plasminógeno tisular, estreptoquinasa y uroquinasa), aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; antimigratorio; antisecretor (breveldina); antiinflamatorios: tales como esteroides adrenocorticales (cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisona, prednisolona, 6a-metilprednisolona, triamcinolona, betametasona, y dexametasona),

agentes no esteroideos (derivados del ácido salicílico, es decir, aspirina; derivados del para-aminofenol, es decir, acetaminofeno; ácidos indol- e indenoacéticos (indometacina, sulindaco, y etodolaco), ácidos heteroarilacéticos (tolmetina, diclofenaco, y ketorolaco), ácidos arilpropiónicos (ibuprofeno y derivados), ácidos antranílicos (ácido mefenámico, y ácido meclofenámico), ácidos enólicos (piroxicam, tenoxicam, fenilbutazona, y oxifentatrazona), nabumetona, compuestos de oro (auranofina, aurotioglucosa, tiomalato de oro y sodio); inmunosupresores: (ciclosporina, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina), azatioprina, micofenolato mofetilo); agentes antiangiogénicos: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); bloqueadores del receptor de angiotensina; donantes de óxido nítrico; oligonucleótidos antisentido y combinaciones de los mismos; inhibidores del ciclo celular, inhibidores de mTOR, e inhibidores de la cinasa de transducción de señales del receptor del factor de crecimiento; retinoides; inhibidores de ciclina/CDK; inhibidores de la HMG coenzima reductasa (estatinas); e inhibidores de proteasa.

En ciertas realizaciones, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería pueden usarse para prevenir o reducir la gravedad de la restenosis, y pueden incluir una o más sustancias antiproliferativas exógenas, antiflogísticos, así como compuestos antitrombóticos como agentes activos. Los agentes activos ejemplares para la restenosis incluyen sirolimus, everolimus, somatostatina, tacrolimus, roxitromicina, dunaimicina, ascomicina, bafilomicina, eritromicina, midecamicina, josamicina, concanamicina, claritromicina, troleandomicina, folimicina, cerivastatina, simvastatina, lovastatina, fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina, pravastatina, pitavastatina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorrelbina, etopósido, tenipósido, nimustina, carmustina, lomustina, ciclofosfamida, 4-hidroxiciclofosfamida, estramustina, melfalán, ifosfamida, tropofosfamida, clorambucilo, bendamustina, dacarbazina, busulfán, procarbacina, tresulfán, tremozolomida, tiotepa, daunorrubicina, doxorrubicina, aclarrubicina, epirrubicina, mitoxantrona, idarrubicina, bleomicina, mitomicina, dactinomicina, metotrexato, fludarabina, fludarabina-5'-dihidrogenofosfato, cladribina, mercaptopurina, tioguanina, citarabina, florouracilo, gemcitabina, capecitabina, docetaxel, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, amsacrina, irinotecán, topotecán, hidroxicarbamida, miltefosina, pentostatina, aldesleucina, tretinoína, asparaginasa, pegasparasa, anastrozol, exemestano, letrozol, formestano, aminoglutetemida, adriamicina, azitromicina, espiramicina, cefarantina, inhibidor 2w de la proliferación de smc, epotilona A y B, mitoxantrona, azatioprina, micofenolato mofetilo, oligonucleótidos antisentido de c-myc, oligonucleótidos antisentido de b-myc, ácido betulínico, camptotecina, lapachol, β-lapachona, podofilotoxina, betulina, 2-etilhidrazida del ácido podofílico, molgramostim, peginterferón α-2b, lenograstim; filgrastim, macrogol, dacarbazina, basiliximab, daclizumab, selectina, antagonista de citocinas, inhibidor de CETP, cadherinas, inhibidores de citoquinina, inhibidor de COX-2, NFK.B, angiopeptina, ciprofloxacino, camptotecina, fluroblastina, anticuerpos monoclonales, que inhiben la proliferación de células musculares, antagonistas de bFGF, probucol, prostaglandinas, 1,11-dimetoxicantin-6-ona, 1-hidroxi-11-metoxicantin-6-ona, escopolectina, colchicina, donantes de NO, tetranitrato de pentaeritritol, sindoiminas, S-nitrosoderivados, tamoxifeno, estaurosporina, β-estradiol, α-estradiol, estriol, estrona, etinilestradiol, fosfestrol, medroxiprogesterona, cipionatos de estradiol, benzoatos de estradiol, tranilast, kamebakaurina y otros terpenoides, que se aplican en la terapia del cáncer, verapamilo, inhibidores de tirosina cinasa, tirfostinas, ciclosporina A, paclitaxel y derivados del mismo, bacatina, taxotere, y otras fuentes tanto sintéticas como nativas obtenidas de oligómeros macrocíclicos de subóxido de carbono (MCS) y derivados de los mismos, mofebutazona, acemetacina, diclofenaco, lonazolaco, dapsona, ácido o-carbamoilfenoxiacético, lidocaína, ketoprofeno, ácido mefenámico, piroxicam, meloxicam, fosfato de cloroquina, penicilamina, hidroxicloroquina, auranofina, aurotiomalato de sodio, oxaceprol, celecoxib, β-sitosterina, ademetionina, mirtecaína, polidocanol, nonivamida, levomentol, benzocaína, escina, elipticina, Calbiochem D-24851, colcemid, citocalasina A-E, indanocina, nocadazol, proteína S 100, bacitracina, antagonistas del receptor de vitronectina, azelastina, inhibidor tisular estimulante de guanidil ciclasa de metaloproteinasa 1 y 2, ácidos nucleicos libres, ácidos nucleicos incorporados en transmisores de virus, fragmentos de ADN y ARN, inhibidor del activador del plasminógeno-1, inhibidor del activador del plasminógeno-2, oligonucleótidos antisentido, inhibidores de VEGF, IGF-1, antibióticos, antitrombóticos, argatrobán, aspirina, abciximab, antitrombina sintética, bivalirudina, cumadina, enoxoparina, heparina desulfatada y N-reacetilada, activador del plasminógeno tisular, receptor de membrana plaquetaria GpIIb/IIIa, anticuerpo inhibidor del factor Xa, hirudina, r-hirudina, PPACK, protamina, prouroquinasa, estreptoquinasa, warfarina, uroquinasa, vasodilatadores, dipiramidol, trapidil, nitroprusiato, antagonistas de PDGF, triazolopirimidina y seramina, inhibidores de ACE, captopril, cilazapril, lisinopril, enalapril, losartán, inhibidores de tioproteasa, prostaciclina, vapiprost, interferón α, β y γ, antagonistas de histamina, bloqueadores de serotonina, inhibidores de la apoptosis, reguladores de la apoptosis, oligonucleótidos antisentido de p65 NF-K.B y de Bcl-xL, halofunginona, nifedipina, tocoferol, tranirast, molsidomina, polifenoles de té, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina, ácidos boswélicos y derivados de los mismos, leflunomida, anakinra, etanercept, sulfasalazina, etopósido, dicloxacilina, tetraciclina, triamcinolona, mutamicina, procainimida, ácido retinoico, quinidina, disopirimida, flecainida, propafenona, sotolol, amidorona, esteroides naturales y obtenidos sintéticamente, briofilina A, inotodiol, makirosida A, galakinosida, mansonina, estreblosida, hidrocortisona, betametasona, dexametasona, fenoporfeno, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, fenilbutazona, agentes antivirales, antimicóticos, agentes antiprozoarios, terpenoides naturales, hipocaesculina, barringtogenol-C21-angelato, 14-deshidroagrostistaquina, agroskerina, agrostistaquina, 17-hidroxiagrostistaquina, ovatodiólidos, ácido 4,7-oxiciclоanisomélico, bacarinoides B1, B2, B3 y B7, tubeoimosida, bruceanol A, B y C, bruceantinósido C, yadanziósidos N y P, isodesoxielefantopina, tomenfantopina A y B, coronarina A, B, C y D, ácido ursólico, ácido hiptático A, zeorina, isoiridogermanal, maytenfoliol, efusantina A, excisanina A y B, longikaurina B, esculponeatina C, kamebaunina, leukamenina A y B, 13,18-deshidro-6-α-senecioiloxicaparrina, taxamairina A y B, regenilol, triptolida, cimarina, apocimarina, ácido aristolóquico, anopterina, hidroxianopterina, anemonina, protoanemonina, berberina, cloruro de queliburina, cictoxina, sinococulina, bombrestatina A y B, cudraisoflavona A, curcumina, dihidronitidina,

cloruro de nitidina, 12-β-hidroxipregnadien-3,20-diona, bilobol, ginkgol, ácido ginkgólico, helenalina, indicina, N-óxido de indicina, lasiocarpina, inotodiol, glucósido Ia, podofilotoxina, justicidina A y B, larreatina, malloterina, mallotocromanol, isobutirilmallotocromanol, maquirosida A, marchantina A, maitansina, licoridicina, margetina, pancratistatina, liriodenina, bispartenolidina, oxoushinsunina, aristolactam-AII, bispartenolidina, periplocosida A, galakinosida, ácido ursólico, desoxipsorospermina, psicorrubina, ricina A, sanguinarina, ácido de trigo manwu, metilsorbifolina, esfateliacromen, estizofilina, mansonina, estreblosida, akagerina, dihidrousambaraensina, hidroxiusambarina, estricnopentamina, estricnofilina, usambarina, usambarensina, berberina, liriodenina, oxoushinsunina, dafnoretina, lariciresinol, metoxilariciresinol, siringaresinol, umbeliferona, afromosona, acetilvismiona B, desacetilvismiona A, o vismiona A y B.

En todavía otras realizaciones, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería pueden usarse como parte de un tratamiento para tumores sólidos. Los tumores sólidos generan un entorno protrombótico capaz de activar las plaquetas. Hallazgos recientes indican que las plaquetas activadas son reguladores cruciales de la homeostasis vascular del tumor, ya que previenen la hemorragia tumoral. Sorprendentemente, este efecto es independiente de la capacidad de las plaquetas para formar trombos, y por contra se basa en la secreción de su contenido de gránulos. De este modo, el uso de actividades secretoras de plaquetas para dianizar la liberación de agentes antitumorales y/o antiangiogénicos representa un enfoque para destruir específicamente células tumorales y/o desestabilizar la vasculatura tumoral. En ciertas realizaciones preferidas, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería pueden cargarse con agentes anti-angiogénicos y/o agentes que causan la rotura de la estructura vascular del tumor.

Para ilustrar adicionalmente, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería pueden cargarse con agentes anticancerígenos tales como agentes antineoplásicos o quimioterapéuticos, que pueden incluir (a) agentes alquilantes, tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, hexametilmelamina, tiotepa, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, etc.; (b) antimetabolitos, tales como metotrexato, 5-FU, FudR, citarabina, 6 MP, tioguanina, pentostatina, etc.; (c) productos naturales, tales como taxol, vinblastina, vincristina, etopósido, tenipósido, etc.; (d) antibióticos tales como dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina c, etc.; (e) enzimas tales como L-asparaginasa, heparinasas, condroitinasas, etc.; (f) interferones e interleucinas, tales como interferón-α, interferón-γ, factor de necrosis tumoral, etc.; (g) complejos de coordinación de platino tales como cisplatino, carboplatino o sus derivados; y (h) otros agentes diversos tales como mitoxantrona, biscloroetil nitrosourea, hidroxiurea, cloroetil-ciclohexil nitrosourea, prednisona, dietilestilbestrol, medroxiprogesterona, tamoxifeno, mitotano, procarbazina, aminoglutetimida, progestágenos, andrógenos, antiandrógenos, leuprolida, etc.

En una realización ejemplar, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería incluyen una proteína recombinante que actúa como inhibidor de VEGF (es decir, antagonistas de VEGF). Dichas proteínas incluyen anticuerpos y análogos de anticuerpos (tales como anticuerpos monocatenarios, monocuerpos, sitios de unión a antígenos, y similares) tales como ranibizumab, trampas de VEGF tal como Aflibercept, que son proteínas solubles que incluyen dominios de unión a ligandos de receptores de VEGF, que se unen a VEGF o el receptor de VEGF y bloquean la activación del receptor. En realizaciones preferidas, el antagonista del polipéptido VEGF se expresa en las células MK de una manera en la que se incorpora a los gránulos, particularmente los gránulos α, de las plaquetas, y se libera tras la activación de las plaquetas.

Aunque un uso preferido de la composición de plaquetas manipuladas mediante ingeniería sería en la terapia de tumores, tanto sólidos como mieloides, el mismo principio se materializa en el tratamiento de otras patologías basadas en angiogénesis anormales. Otras patologías pueden incluir artritis, retinopatías, psoriasis, tumores sólidos, tumores benignos, sarcoma de Kaposi, y neoplasias hematológicas. Esto podría incluir medicamentos descritos anteriormente; o, por ejemplo, en el caso de la artritis, puede comprender fármacos modificadores de la enfermedad (DMARD), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), colchicina, metotrexato, etc.

En realizaciones ejemplares, las plaquetas manipuladas mediante ingeniería pueden cargarse con fármacos contra el cáncer que se pueden seleccionar de acivicina, aclarrubicina, acodazol, acronicina, adozelesina, alanosina, aldesleucina, alopurinol sódico, altretamina, aminoglutetimida, amonafida, ampligén, amsacrina, andrógenos, anguidina, glicinato de afidicolina, asaley, asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, Bacillus calmette-guerin (BCG), Antifol de Baker (soluble), beta-2'-desoxitioguanosina, bisantreno HCl, sulfato de bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, BWA 773U82, BW 502U83.HCl, BW 7U85 mesilato, ceracemida, carbetímero, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cloroquinoxalina-sulfonamida, clorozotocina, cromomicina A3, cisplatino, cladribina, corticosteroides, Corynebacterium parvum, CPT-11, crisnatol, ciclocitidina, ciclofosfamida, citarabina, citembena, dabis maleato, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina HCl, desazauridina, dexrazoxano, dianhidrogalactitol, diaziquona, dibromodulcitol, didemnina B, dietilditiocarbamato, diglicoaldehído, dihidro-5-azacitidina, doxorrubicina, equinomicina, edatrexato, edelfosina, eflornitina, disolución de Elliott, elsamitrucina, epirrubicina, esorrubicina, fosfato de estramustina, estrógenos, etanidazol, etiofos, etopósido, fadrazol, fazarabina, fenretinida, filgrastrim, finasterida, ácido flavonacético, floxuridina, fosfato de fludarabina, 5-fluorouracilo, fluosol, flutamida, nitrato de galio, gemcitabina, acetato de goserelina, hepsulfam, hexametilen bisacetamida, homoharringtonina, sulfato de hidrazina, 4-hidroxiandrostenodiona, hidroziurea, idarrubiciina HCl, ifosfamida, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleucina-1 alfa y beta, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-6, 4-ipomeanol, iproplatino, isotretinoína, leucovorina cálcica, acetato de leuprolida, levamisol, daunorrubicina liposomal, doxorrubicina encapsulada en liposomas, lomustina, lonidamina, maitansina, hidrocloruro de mecloretamina, melfalán, menogaril, merbarona, 6-

mercaptopurina, mesna, residuo de extracción con metanol de Bacillus calmette-guerin, metotrexato, N-metilformamida, mifepristona, mitoguazona, mitomicina-C, mitotano, hidrocloruro de mitoxantrona, factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos, nabilona, nafoxidina, neocarzinostatina, acetato de octreotida, ormaplatino, oxaliplatino, paclitaxel, pala, pentostatina, piperazindiona, pipobromano, pirarrubicina, piritrexim, hidrocloruro de piroxantrona, PIXY-321, plicamicina, porfímero sódico, prednimustina, procarbazina, progestinas, pirazofurina, razoxano, sargramostim, semustina, espirogermanio, espiromustina, estreptonigrina, estreptozocina, sulofenur, suramina sódica, tamoxifeno, taxotere, tegafur, tenipósido, tereftalamidina, teroxirona, tioguanina, tiotepa, inyección de timidina, tiazofurina, topotecán, toremifeno, tretinoína, hidrocloruro de trifluoperazina, trifluridina, trimetrexato, factor de necrosis tumoral, mostaza de uracilo, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina vinorrelbina, vinzolidina, Yoshi 864, zorrubicina, y mezclas de los mismos.

Las plaquetas modificadas mediante ingeniería pueden incluir uno o más agentes inmunoestimuladores con el fin de promover la activación inmunitaria contra las células tumorales, por lo que pueden incluir agentes tales como un agonista del receptor de tipo Toll (TLR), TLR4, TLR7, TLR9, N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), lipopolisacáridos (LPS), LPS genéticamente modificado y/o degradado, alumbre, glucano, factores estimulantes de colonias, EPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, G-CSF pegilado, SCF, IL-3, IL6, PIXY 321, interferones, interferón-γ, interferón-α, interleucinas, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, péptidos de unión al MHC de clase II, saponinas, QS2I, secuencias de CpG sin metilar, l-metiltriptófano, inhibidores de arginasa, ciclofosfamida, o anticuerpos que bloquean funciones inmunosupresoras, anticuerpos anti-CTLA4, o mezclas de dos o más de los mismos.

En ciertos casos, en particular para crear plaquetas manipuladas mediante ingeniería que incluyen fármacos de molécula pequeña y/o ácidos nucleicos, el agente o agentes activos se pueden introducir en las plaquetas mediante la adición al medio de cultivo para megacariocitos, proplaquetas u otras células a lo largo de la ruta de diferenciación, o se pueden proporcionar en medios/disoluciones en los que se incuban las plaquetas.

En otros casos, en particular para crear plaquetas manipuladas mediante ingeniería que incluyen sustancias terapéuticas proteicas, el agente o agentes activos pueden expresarse de forma recombinante por los megacariocitos, proplaquetas u otras células a lo largo de la ruta de diferenciación, y de este modo pueden estar presentes en las plaquetas resultantes. En realizaciones preferidas, la proteína recombinante se empaqueta en los gránulos de plaquetas (especialmente los gránulos α). Ciertas proteínas recombinantes se transportan automáticamente a los gránulos, tal como el Factor VIII; de otro modo, pueden requerir el uso de proteínas de fusión que incluyen restos dianizadores de gránulos que transportan la proteína de fusión a los gránulos de plaquetas. Un resto dianizador de gránulos ejemplar es el factor plaquetario 4 (PF4), o una porción del mismo suficiente para transportar la proteína de fusión resultante a los gránulos plaquetarios. Véanse, por ejemplo, Briguet-Laugier et al., J Thromb Haemost. 2004 2(12):2231-40; El Goli et al. J Biol Chem. 2005 280(34):30329-35;

Una realización ejemplar de una proteína recombinante que no requiere adición de resto de tráfico de gránulos es el Factor VIII. La presente invención contempla plaquetas que han sido manipuladas mediante ingeniería para tener Factor VIII almacenado en sus gránulos α, y que liberan la proteína recombinante tras la activación, por ejemplo en el sitio de una herida. La hemofilia A es un trastorno hemorrágico ligado al cromosoma X causado por defectos en el gen del factor VIII (FVIII) y que afecta aproximadamente a 1:5000 varones. El tratamiento actual consiste en la sustitución del factor mediante el uso de un concentrado de FVIII combinado o un producto recombinante. Las limitaciones de estos productos incluyen su coste y la capacidad limitada de estos productos para prevenir secuelas a largo plazo a menos que se utilicen en un régimen de profilaxis riguroso. Alrededor del 10% de la población con hemofilia A desarrolla inhibidores contra el producto de infusión, lo que requiere formas de terapia alternativas, incluso más caras y menos eficaces. Las preocupaciones sobre las complicaciones infecciosas de los productos de reemplazo derivados de la sangre han continuado siendo un problema incluso con las nuevas técnicas preparativas. Los altos costes del tratamiento, las complicaciones infecciosas e inmunes de la terapia, y las limitaciones para prevenir las complicaciones a largo plazo de la hemofilia A hacen que una estrategia de suministro de plaquetas para el tratamiento de la hemofilia A sea una forma alternativa atractiva de terapia.

Para ilustrar adicionalmente, Yarovoi et al. Blood, 2003 102(12): 4007 describen una construcción de expresión que puede usarse para generar las plaquetas manipuladas mediante ingeniería genética con el Factor VIII de la presente invención. En particular, la secuencia codificante del Factor VIII (humano) puede colocarse bajo el control regulador de la región promotora próxima de la glicoproteína Ib (GPIbα) específica de megacariocitos. Véase Fujita et al. Blood. 1998; 92:488-495. El factor VIII expresado ectópicamente en los megacariocitos en desarrollo se almacena en gránulos α, que están contenidos dentro de las plaquetas producidas por los MK, y después se liberan de las plaquetas circulantes tras la activación.

Preparaciones farmacéuticas

Las composiciones ejemplares de la presente descripción pueden ser formulaciones adecuadas para uso en el tratamiento de un paciente humano, tales como libres de pirógenos o esencialmente libres de pirógenos, y libres de patógenos. Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas para uso en esta descripción pueden estar en una forma fisiológicamente aceptable, libre de patógenos y libre de pirógenos.

Las composiciones ejemplares adicionales de la presente descripción pueden irradiarse, por ejemplo, antes de la administración. Por ejemplo, las células pueden irradiarse con radiación gamma, por ejemplo, con una dosis aproximadamente 25 gy. Por ejemplo, la composición puede irradiarse con una dosis suficiente para inactivar mitóticamente cualquier célula eucariota nucleada y/o patógenos contenidos en la composición, por ejemplo, en una dosis suficiente para inactivar mitóticamente cualquier célula madre pluripotente, MK, leucocitos, y/o PVE-HE que pueda contener.

Suministro de plaquetas

Se han propuesto y evaluado diversas membranas, dispositivos y métodos de su fabricación como medio de trasplante de células y sus productos segregados al cuerpo humano, y se denominan colectivamente en la bibliografía de patentes como implantes bioartificiales. Por lo general, comparten un principio de funcionamiento común, es decir, las células están secuestradas dentro de una cámara delimitada por una membrana semipermeable. Se cree que la viabilidad celular a largo plazo depende del intercambio difusivo sostenido de nutrientes y productos de desecho con el tejido vascularizado adyacente. (Patentes US Nos 6.372.244, 6.113.938, 6.322.804, 4.911.717, 5.855.613, 6.083.523, 5.916.554, 6.511.473, 6.485.723). Hay tres tipos principales de dispositivos descritos en la bibliografía científica y de patentes para la implantación de células en diversos compartimentos tisulares, que incluyen: diseños de disco plano, diseños basados en fibras huecas, y diseños basados en sólidos geométricos. Por lo general, estos dispositivos están diseñados para colocarse en una cavidad corporal.

DEFINICIONES

“Cuerpos embrioides” se refiere a agregaciones o agrupamientos de células pluripotentes (por ejemplo, iPSC o ESC) que pueden formarse cultivando células pluripotentes en condiciones no adheridas, por ejemplo, en un sustrato poco adherente o en una “gota colgante”. En estos cultivos, las células pluripotentes pueden formar agregaciones o agrupamientos de células denominadas cuerpos embrioides. Véase Itskovitz-Eldor et al., Mol Med. 2000 Feb; 6(2):88-95. Por lo general, los cuerpos embrioides se forman inicialmente como agregaciones o agrupamientos sólidos de células pluripotentes, y con el tiempo algunos de los cuerpos embrioides llegan a incluir cavidades llenas de líquido, denominándose aquellos primeros en la bibliografía como EB “simples”, y los últimos como cuerpos embrioides “císticos”.

La expresión “células madre embrionarias” (células ES) se usa aquí como se usa en la técnica. En la medida en que las mencionadas hESC puedan obtenerse exclusivamente mediante la destrucción de un embrión humano o de una línea celular que haya sido establecida por la destrucción de un embrión humano, las hESC no forman parte de la invención reivindicada y se mencionan solamente con fines de referencia. Esta expresión incluye células derivadas de la masa celular interna de blastocistos o mórulas humanos, incluyendo aquellos que se han hecho pasar en serie como líneas celulares. Las células ES pueden derivar de la fertilización de un óvulo con espermatozoides, así como mediante el uso de ADN, transferencia nuclear, partenogénesis, o mediante la generación de células ES con homocigosidad en la región HLA. Las células ES también son células derivadas de un cigoto, blastómeros, o embriones de mamíferos en estadios de blastocisto producidos por la fusión de un espermatozoide y un óvulo, transferencia nuclear, partenogénesis, androgénesis, o la reprogramación de cromatina y posterior incorporación de la cromatina reprogramada en una membrana plasmática para producir una célula. Las células madre embrionarias, independientemente de su fuente o del método particular usado para producirlas, se pueden identificar en función de (i) la capacidad para diferenciarse en células de las tres capas germinales, (ii) la expresión de al menos Oct 4 y fosfatasa alcalina, y (iii) la capacidad para producir teratomas cuando se trasplantan a animales inmunodeficientes. Las células madre embrionarias que pueden usarse en realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células ES humanas (“ESC” o “células hES”) tales como células madre embrionarias MA01, MA09, ACT-4, No. 3, H1, H7, H9, H14 y ACT30. Las líneas celulares ejemplares adicionales incluyen NED1, NED2, NED3, NED4, NED5 y NED7. Véase también el Registro de Células Madre Embrionarias Humanas del NIH. Una línea de células madre embrionarias humanas ejemplar que puede usarse son las células MA09. El aislamiento y preparación de células MA09 se describió previamente en Klimanskaya, et al. (2006) “Human Embryonic Stem Cell lines Derived from Single Blastomeres”. Nature 444: 481-485. El aislamiento y preparación de otras células ES que pueden usarse según esta descripción también se describió previamente en Chung et al. (2008) “Human Embryonic Stem Cell Line Generated Without Embryo Destruction”, Cell Stem Cell, 2:113-117. Las células ES humanas usadas según realizaciones ejemplares de la presente invención pueden derivarse y mantenerse según estándares GMP.

Como se usa aquí, la expresión “células madre pluripotentes” incluye células madre embrionarias, células madre derivadas de embriones, y células madre pluripotentes inducidas, independientemente del método mediante el cual derivan las células madre pluripotentes. Las células madre pluripotentes se definen funcionalmente como células madre que son: (a) capaces de inducir teratomas cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes (SCID); (b) capaces de diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales (por ejemplo, pueden diferenciarse en tipos de células ectodérmicas, mesodérmicas, y endodérmicas); y (c) expresan uno o más marcadores de células madre embrionarias (por ejemplo, expresan Oct 4, fosfatasa alcalina, antígeno de superficie SSEA-3, antígeno de superficie SSEA-4, nanog, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1, etc.). En ciertas realizaciones, las células madre pluripotentes expresan uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: OCT-4, fosfatasa alcalina, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81. Las células madre pluripotentes ejemplares pueden generarse usando, por ejemplo, métodos conocidos en la técnica. Las células madre pluripotentes ejemplares incluyen células madre embrionarias

derivadas de la ICM de embriones en etapa de blastocisto, así como células madre embrionarias derivadas de uno o más blastómeros de un embrión en etapa de escisión o en etapa de mórula (opcionalmente sin destruir el resto del embrión). Dichas células madre embrionarias se pueden generar a partir de material embrionario producido por fertilización o por medios asexuales, incluyendo la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), partenogénesis, y androgénesis. Otras células madre pluripotentes ejemplares incluyen células madre pluripotentes inducidas (iPSC) generadas reprogramando una célula somática expresando una combinación de factores (denominados aquí factores de reprogramación). Las iPSC se pueden generar usando células somáticas fetales, postnatales, de neonato, juveniles, o adultas.

En ciertas realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar células somáticas en células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct 4 (a veces denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc, y Klf4. En otras realizaciones, los factores que pueden usarse para reprogramar células somáticas a células madre pluripotentes incluyen, por ejemplo, una combinación de Oct 4, Sox2, Nanog, y Lin28. En ciertas realizaciones, se expresan al menos dos factores de reprogramación en una célula somática para reprogramar con éxito la célula somática. En otras realizaciones, se expresan al menos tres factores de reprogramación en una célula somática para reprogramar con éxito la célula somática. En otras realizaciones, se expresan al menos cuatro factores de reprogramación en una célula somática para reprogramar con éxito la célula somática. En otras realizaciones, se identifican factores de reprogramación adicionales y se usan solos o en combinación con uno o más factores de reprogramación conocidos para reprogramar una célula somática a una célula madre pluripotente. Las células madre pluripotentes inducidas se definen funcionalmente, e incluyen células que se reprograman usando cualquiera de una variedad de métodos (vectores integradores, vectores no integradores, medios químicos, etc.). Las células madre pluripotentes pueden modificarse genéticamente o modificarse de otro modo para aumentar la longevidad, la potencia, la localización, para prevenir o reducir las respuestas aloinmunes, o para suministrar un factor deseado en las células que se diferencian de dichas células pluripotentes (por ejemplo, plaquetas).

Las “células madre pluripotentes inducidas” (células iPS o iPSC) pueden producirse mediante la transducción de proteínas de factores de reprogramación en una célula somática. En ciertas realizaciones, al menos dos proteínas de reprogramación se transducen en una célula somática para reprogramar con éxito la célula somática. En otras realizaciones, al menos tres proteínas de reprogramación se transducen en una célula somática para reprogramar con éxito la célula somática. En otras realizaciones, al menos cuatro proteínas de reprogramación se transducen en una célula somática para reprogramar con éxito la célula somática.

Las células madre pluripotentes pueden ser de cualquier especie. Se han obtenido con éxito células madre embrionarias, por ejemplo, en ratones, múltiples especies de primates no humanos, y seres humanos, y se han generado células de tipo madre embrionarias a partir de numerosas especies adicionales. De este modo, un experto en la técnica puede generar células madre embrionarias y células madre derivadas de embriones de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a, ser humano, primates no humanos, roedores (ratones, ratas), ungulados (vacas, ovejas, etc.), perros (perros domésticos y salvajes), gatos (gatos domésticos y salvajes tales como leones, tigres, guepardos), conejos, hámsteres, jerbos, ardillas, conejillos de indias, cabras, elefantes, pandas (incluyendo el panda gigante), cerdos, mapache, caballo, cebra, mamíferos marinos (delfines, ballenas, etc.), y similares. En ciertas realizaciones, la especie es una especie en peligro de extinción. En ciertas realizaciones, la especie es una especie actualmente extinta.

De manera similar, las células iPS pueden ser de cualquier especie. Estas células iPS se han generado con éxito usando células humanas y de ratón. Además, las células iPS se han generado con éxito usando tejido embrionario, fetal, neonato, y de adulto. Por consiguiente, se pueden generar fácilmente células iPS usando una célula donante de cualquier especie. De este modo, se pueden generar células iPS de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a, ser humano, primates no humanos, roedores (ratones, ratas), ungulados (vacas, ovejas, etc.), perros (perros domésticos y salvajes), gatos (gatos domésticos y salvajes tales como leones, tigres, guepardos), conejos, hámsteres, cabras, elefantes, pandas (incluyendo el panda gigante), cerdos, mapaches, caballos, cebras, mamíferos marinos (delfines, ballenas, etc.), y similares. En ciertas realizaciones, la especie es una especie en peligro de extinción. En ciertas realizaciones, la especie es una especie actualmente extinta.

Las células madre pluripotentes inducidas se pueden generar usando, como punto de partida, prácticamente cualquier célula somática de cualquier etapa de desarrollo. Por ejemplo, la célula puede ser de un donante embrionario, feto, neonato, juvenil, o adulto. Los ejemplos de células somáticas que pueden usarse incluyen fibroblastos, tales como fibroblastos dérmicos obtenidos mediante una muestra de piel o biopsia, sinoviocitos de tejido sinovial, células del prepucio, células de las mejillas, o fibroblastos pulmonares. Aunque la piel y las mejillas proporcionan una fuente de células apropiadas fácilmente disponible y fácilmente alcanzable, se puede usar prácticamente cualquier célula. En ciertas realizaciones, la célula somática no es un fibroblasto.

La célula madre pluripotente inducida puede producirse expresando o induciendo la expresión de uno o más factores de reprogramación en una célula somática. La célula somática puede ser un fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, un fibroblasto sinovial, o un fibroblasto pulmonar, o una célula somática no fibroblástica. La célula somática puede reprogramarse provocando la expresión de (por ejemplo, a través de la transducción viral, vectores de integración o no integrantes, etc.) y/o el contacto con (por ejemplo, usando dominios de transducción de proteínas, electroporación, microinyección, anfífilos catiónicos, fusión con bicapas lipídicas, permeabilización con detergentes,

etc.) al menos 1, 2, 3, 4, 5 factores de reprogramación. Los factores de reprogramación se pueden seleccionar de Oct 3/4, Sox2, NANOG, Lin28, c Myc, y Klf4. La expresión de los factores de reprogramación puede inducirse poniendo en contacto las células somáticas con al menos un agente, tal como un agente de molécula orgánica pequeña, que induce la expresión de factores de reprogramación.

Otras células madre pluripotentes ejemplares incluyen células madre pluripotentes inducidas generadas reprogramando una célula somática expresando o induciendo la expresión de una combinación de factores ("factores de reprogramación"). Las células iPS se pueden obtener de un banco de células. La fabricación de células iPS puede ser una etapa inicial en la producción de células diferenciadas. Las células iPS pueden generarse específicamente usando material de un paciente particular o de un donante compatible, con el objetivo de generar megacariocitos y plaquetas compatibles con el tejido. Las iPSC se pueden producir a partir de células que no son sustancialmente inmunogénicas en un receptor previsto, por ejemplo, producidas a partir de células autólogas o de células histocompatibles para un receptor previsto.

La célula somática también se puede reprogramar usando un enfoque combinatorio en el que se expresa el factor de reprogramación (por ejemplo, usando un vector viral, plásmido, y similares) y se induce la expresión del factor de reprogramación (por ejemplo, usando una molécula orgánica pequeña). Por ejemplo, los factores de reprogramación pueden expresarse en la célula somática mediante infección usando un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral. También, los factores de reprogramación pueden expresarse en la célula somática usando un vector no integrador, tal como un plásmido episomal. Véase, por ejemplo, Yu et al., Science. 2009 May 8; 324(5928):797-801. Cuando los factores de reprogramación se expresan usando vectores no integradores, los factores pueden expresarse en las células usando electroporación, transfección, o transformación de las células somáticas con los vectores. Por ejemplo, en células de ratón, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, c myc, y Klf4) usando vectores virales integradores es suficiente para reprogramar una célula somática. En células humanas, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, NANOG, y Lin28) usando vectores virales integradores es suficiente para reprogramar una célula somática.

Una vez que los factores de reprogramación se expresan en las células, las células pueden cultivarse. Con el tiempo, aparecen células con características de ES en la placa de cultivo. Las células pueden escogerse y subcultivarse basándose, por ejemplo, en la morfología de ES, o basándose en la expresión de un marcador seleccionable o detectable. Las células pueden cultivarse para producir un cultivo de células que se asemejen a las células ES - que son células iPS putativas.

Para confirmar la pluripotencia de las células iPS, las células se pueden analizar en uno o más ensayos de pluripotencia. Por ejemplo, las células pueden analizarse para determinar la expresión de marcadores de células ES; las células se pueden evaluar para determinar la capacidad para producir teratomas cuando se trasplantan a ratones SCID; las células se pueden evaluar para determinar la capacidad para diferenciarse para producir tipos de células de las tres capas germinales. Una vez que se obtiene una iPSC pluripotente, se puede usar para producir células megacariocíticas y plaquetas.

La expresión "células endoteliales hemogénicas" (PVE-HE), como se usa aquí, se refiere a células capaces de diferenciarse para dar lugar a tipos de células hematopoyéticas o tipos de células endoteliales, que pueden expresar PECAM1, VE-Cadherina, y/o endoglina (por ejemplo, PVE-HE hemogénicas PECAM1+VE-Cad+Endoglina+), y que opcionalmente pueden derivar de células madre pluripotentes. Estas células pueden describirse basándose en numerosas propiedades estructurales y funcionales que incluyen, pero no se limitan a, la expresión (ARN o proteína) o la falta de expresión (ARN o proteína) de uno o más marcadores. Las células PVE-HE se caracterizan por la expresión de los marcadores CD31 (PECAM1). Por ejemplo, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, o al menos alrededor de 9 además, los resultados de inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión demuestran adicionalmente que el 9% de las células PVE-HE en una población pueden ser CD31+. Las células PVE-HE también pueden expresar los marcadores CD105 (endoglina), y CD144 (VE-Cadherina). Por ejemplo, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, o al menos alrededor de 99% de las células PVE-HE en una población pueden ser CD105+, CD144+, y CD31+. En ciertas realizaciones, las células PVE-HE se adhieren débilmente entre sí. CD31, la molécula 1 de adhesión de células endoteliales plaquetarias (PECAM-1), se ha usado como marcador para el desarrollo de progenitores de células endoteliales, vasculogénesis, y angiogénesis. CD31 se expresa constitutivamente en la superficie de las células endoteliales adultas y embrionarias, es un componente principal de la unión intercelular de las células endoteliales (en las que se concentran hasta 10^6 moléculas PECAM-1), y se expresa débilmente en muchos leucocitos periféricos y plaquetas.

En realizaciones ejemplares, PVE-HE puede exhibir una o más, preferiblemente todas, de las siguientes características: (1) Se puede detectar una cantidad significativa de células PVE-HE CD31+ tan pronto como 72 horas después del inicio de la diferenciación de PVE-HE. (2) Se alcanzará el nivel máximo alrededor de 120 a 146 horas después del inicio de la diferenciación PVE-HE. (3) La población de células PVE-HE CD31+ se puede aislar y crioconservar. (3) Expresan casi todos los marcadores de superficie de células progenitoras endoteliales, tales como CD31, CD105 (Endoglina), CD144 (VE-Cadherina). También pueden expresar CD34, CD309 (KDR), y CD146. (4) Una subpoblación de células PVE-HE CD31+ también expresa CXCR4 (CD184). (5) El potencial de linaje endotelial se puede confirmar cultivando células PVE-HE CD31+ en fibronectina en medio específico de células endoteliales (EC)

(tal como EGM-2 o EndoGro) para obtener una monocapa de células con morfología endotelial típica. (6) Las células endoteliales derivadas de PVE-HE (PVE-HE-EC) no solo expresan CD31 (localizado en la unión célula-célula), sino que también expresan el factor de von Willibrandt (vWF), y son capaces de captar LDL. (7) Las PVE-HE-EC son capaces de formar una estructura de red 3D cuando se cultivan sobre Matrigel. (8) Cuando se siembran en densidad baja extremada sobre fibronectina en medio específico de EC, las células PVE-HE CD31+ son capaces de formar colonias con una morfología endotelial típica que confirma su capacidad clonogénica. (9) Cuando se siembran en medio de metilcelulosa para el crecimiento de colonias blásticas, la colonia blástica solo se puede generar a partir de la fracción CD31+. A diferencia de las células CD31-, tanto CD34- como CD105- son capaces de generar colonias de blastos, lo que sugiere que la capacidad hemogénica se mantiene exclusivamente en la fracción CD31 solamente. (10) Las PVE-HE-EC recién derivadas mantienen el potencial hemogénico y darán lugar a células hemogénicas si se cultivan en condiciones favorables para los linajes hematopoyéticos.

La expresión “células progenitoras específicas de linaje de megacariocitos” (“MLP”), como se usa aquí, se refiere a células madre hematopoyéticas mononucleares comprometidas con al menos el linaje de megacariocitos, e incluye, pero no se limita a, células en la sangre del cordón umbilical, médula ósea, y sangre periférica, así como células madre hematopoyéticas, células derivadas de células madre embrionarias humanas, y células derivadas de células madre pluripotentes inducidas. Estas células pueden describirse basándose en numerosas propiedades estructurales y funcionales que incluyen, pero no se limitan a, la expresión (ARN o proteína) o la falta de expresión (ARN o proteína) de uno o más marcadores. Los MLP de esta descripción pueden ser una mezcla de células maduras e inmaduras. El porcentaje de MLP maduros frente a inmaduros puede variar en función del período de tiempo en cultivo en medio de expansión y derivación de MLP (MLP-DEM, también denominado aquí APEL) (descrito en el Ejemplo 2). Los MLP inmaduros se caracterizan por la expresión de los marcadores CD41a, CD31, CD34, CD13, y la falta de expresión de los marcadores CD14 y CD42b. Los métodos ejemplares de la descripción proporcionan la detección y/o purificación de los MLP mediante un método que comprende detectar la expresión de CD13 y/o enriquecer o purificar células positivas para CD13. Opcionalmente, en estos métodos, la expresión de CD13 puede detectarse y/o usarse como base para la purificación celular en combinación con la expresión de uno o más marcadores adicionales de MLP inmaduros o maduros descritos aquí. Los MLP maduros se caracterizan por la expresión de los marcadores CD41a, CD31, CD34, CD13, CD42b, y la falta de expresión de CD14. En ciertas realizaciones, los MLP generados en cultivo sin células alimentadoras pueden estar semi-desprendidos o desprendidos completamente, y pueden flotar en el medio de cultivo. Por ejemplo, los MLP se pueden recolectar de las PVE-HE cuando comienzan a flotar en suspensión. Preferiblemente, los MLP no se siembran y se dejan adherir, lo que puede permitir la diferenciación en linajes distintos de los MK o no MK (tales como células endoteliales). Los MLP se cultivan preferiblemente en suspensión para producir MK. Opcionalmente, los MLP se pueden crioconservar.

El término “megacariocitos” (MK), como se usa aquí, se refiere a células hematopoyéticas poliploides grandes que dan lugar a plaquetas, así como a MK más pequeños (que pueden producirse mediante los métodos en cuestión) que pueden ser diploides, pero completamente capaces de producir plaquetas. Una característica morfológica principal de los MK maduros es el desarrollo de un núcleo poliploide grande. Los MK maduros dejan de proliferar, pero continúan aumentando su contenido de ADN a través de la endomitosis; con un aumento paralelo en el tamaño de la celda. El gran núcleo poliploide, el gran volumen celular, y el amplio citoplasma de los MK permiten la producción de miles de plaquetas por célula. Los MK pueden describirse basándose en estas y en otras numerosas propiedades estructurales y funcionales que incluyen, pero no se limitan a, la expresión (ARN o proteína) o la falta de expresión (ARN o proteína) de uno o más marcadores. Los MK maduros expresan los marcadores CD41a y CD42b. Los MK maduros también pueden expresar CD61 y CD29. Por ejemplo, un MK de la presente descripción es preferiblemente funcional en el sentido de que puede producir plaquetas, por ejemplo, cuando se cultiva en las condiciones descritas aquí. Las realizaciones ejemplares proporcionan un método para detectar MK maduros, que comprende detectar la expresión de CD29 e identificar células positivas para CD29 como MK maduros. Las realizaciones ejemplares adicionales proporcionan un método para purificar MK, que comprende la purificación de células positivas para CD29 de una población, por ejemplo, usando sustracción con perlas magnéticas, FACS, otros métodos basados en inmunoafinidad, o similares. Opcionalmente, en estos métodos, la expresión de CD29 puede detectarse y/o usarse como base para la purificación celular en combinación con la expresión de uno o más marcadores adicionales de MK maduros, tales como los marcadores que se muestran en la Tabla 1 (que proporciona además la expresión de marcadores de la superficie celular ejemplares de MK maduros).

In vivo, los MK derivan de células precursoras de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Estas células madre multipotentes residen en los sinusoides de la médula, y son capaces de producir todo tipo de células sanguíneas en función de las señales que reciben. La señal principal para la producción de MK es TPO. La TPO induce la diferenciación de las células progenitoras en la médula ósea hacia un fenotipo MK final. El MK se desarrolla a través del siguiente linaje: CFU-ME (célula madre hemopoyética pluripotente o hemocitoblasto), megacarioblasto, promegacariocito, megacariocito. La célula finalmente alcanza la etapa de megacarioblasto y pierde su capacidad de dividirse. Sin embargo, todavía es capaz de replicar su ADN y continuar su desarrollo, convirtiéndose en poliploidía. El citoplasma continúa expandiéndose, y el complemento de ADN puede aumentar a más de 64 N.

Una vez que la célula ha completado la diferenciación y se convierte en un megacariocito maduro, comienza el proceso de producción de plaquetas. TPO desempeña un papel en la inducción de MK para formar pequeños procesos proplaquetarios. Las plaquetas se mantienen dentro de estas membranas internas dentro del citoplasma del MK. Hay dos mecanismos propuestos para la liberación de plaquetas. En un escenario, estos procesos proplaquetarios se

rompen explosivamente para convertirse en plaquetas. Alternativamente, la célula puede formar cintas de plaquetas en vasos sanguíneos. Las cintas se forman a través de pseudópodos, y pueden emitir plaquetas continuamente a la circulación. En cualquier escenario, cada uno de estos procesos proplaquetarios puede dar lugar a 2000-5000 nuevas plaquetas al romperse. En general, más del 75% de estas plaquetas recién producidas permanecerán en circulación mientras que el resto será secuestrado por el bazo.

El término “plaqueta”, como se usa aquí, se refiere a cuerpos citoplasmáticos anucleados derivados de células que están involucradas en los mecanismos celulares de la hemostasia primaria que conducen a la formación de coágulos sanguíneos. Las plaquetas (trombocitos) son pequeños fragmentos de células transparentes de forma irregular de 2 a 3 pm de diámetro, que *in vivo* derivan de la fragmentación de megacariocitos precursores (MK). Las plaquetas se pueden identificar basándose en numerosas propiedades estructurales y funcionales que incluyen, pero no se limitan a, la expresión (ARN o proteína) o la falta de expresión (ARN o proteína) de uno o más marcadores. Las plaquetas expresan los marcadores CD41a y CD42b. Las plaquetas se adhieren al tejido y entre sí en respuesta a una lesión vascular.

Las expresiones “plaqueta funcional” o “plaquetas que son funcionales”, como se usan aquí, se refieren a plaquetas que pueden ser activadas por trombina y participar en la retracción del coágulo. En realizaciones ejemplares, se puede determinar si las plaquetas son plaquetas funcionales usando un modelo animal, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 4 (FIG. 12), por ejemplo, en comparación con plaquetas derivadas naturalmente, que pueden ser de la misma especie. Además, las plaquetas activadas pueden identificarse mediante la expresión de CD62p y αIIbβIII, y las plaquetas funcionales pueden identificarse (opcionalmente de forma cuantitativa) por su expresión de estos marcadores tras la activación, tal como tras la activación con trombina. La frase “sustancialmente todas las plaquetas son funcionales” se refiere a una composición o preparación que comprende plaquetas, en la que, por ejemplo, al menos 60% de las plaquetas son plaquetas funcionales, o al menos 65%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de las plaquetas son plaquetas funcionales. Las plaquetas funcionales pueden estar activas durante al menos 5 días cuando se almacenan a 22 - 37ºC.

PECAM1 (CD31) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) que se expresa en la superficie de las plaquetas circulantes, monocitos, neutrófilos, y subconjuntos de células T particulares. También es un componente importante de la unión intercelular de las células endoteliales, en la que se concentra hasta aproximadamente 1 millón de moléculas. Debido a este patrón de expresión celular, PECAM1 está implicado en varias funciones, incluyendo la migración transendotelial de leucocitos, la angiogénesis, y la activación de la integrina. La superfamilia de Ig media la adhesión celular (por ejemplo, NCAM1, ICAM1, y VCAM1) o el reconocimiento de antígenos (por ejemplo, inmunoglobulinas, receptores de células T, y moléculas del MHC). Además, también se ha reconocido un subgrupo que comprende 30 miembros caracterizado por la presencia de 1 o más motivos inhibidores inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM) dentro de sus dominios citoplasmáticos. PECAM1, que tiene 6 ITIM dentro de su dominio citoplasmático, es un miembro de esta subfamilia.

La endoglina (ENG), también llamada CD105, es una glicoproteína de membrana homodimérica asociada principalmente con el endotelio vascular humano. También se encuentra en los proeritroblastos de la médula ósea, los monocitos activados, los fibroblastos, las células del músculo liso, y los linfoblastos en la leucemia infantil. La endoglina es un componente del complejo receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGFB), y se une a TGFB1 con alta afinidad. La endoglina participa en la organización citoesquelética que afecta a la morfología y migración celulares, en procesos tales como el desarrollo del sistema cardiovascular, y en la remodelación vascular. Su expresión está regulada durante el desarrollo del corazón. Los ratones experimentales sin el gen de la endoglina mueren debido a anomalías cardiovasculares.

VE-cadherina (CD144) es una cadherina clásica de la superfamilia de cadherinas. La VE-cadherina desempeña un papel importante en la biología de las células endoteliales a través del control de la cohesión y organización de las uniones intercelulares; por lo tanto, mantiene la integridad del endotelio. La VE-cadherina es indispensable para el desarrollo vascular adecuado. Los estudios en modelos de ratones transgénicos confirmaron que la deficiencia de VE-cadherina es embrionariamente letal debido a defectos vasculares. VE-cadherina sirve para mantener los vasos recién formados.

La expresión “inhibidor de ROCK”, como se usa aquí, se refiere a cualquier sustancia que inhibe o reduce la función de la cinasa asociada a Rho o su ruta de señalización en una célula, tal como una molécula pequeña, un ARNip, un miARN, un ARN antisentido, o similar. La “ruta de señalización de ROCK”, como se usa aquí, puede incluir cualquier procesador de señal implicado en la ruta de señalización relacionada con ROCK, tal como la ruta de señalización Rho-ROCK-Miosina II, su ruta de señalización aguas arriba, o su ruta de señalización aguas abajo en una célula. Un inhibidor de ROCK ejemplar que puede usarse es Stemolecule Y27632 de Stemgent, un inhibidor de la proteína cinasa asociada a rho (ROCK) (véase Watanabe et al., Nat Biotechnol. 2007 Jun; 25(6):681-6). Otros inhibidores de ROCK incluyen, por ejemplo, H-1152, Y-30141, Wf-536, HA-1077, hidroxil-HA-1077, GSK269962A y SB-772077-B. Doe et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 32:89-98, 2007; Ishizaki, et al., Mol. Pharmacol., 57:976-983, 2000; Nakajima et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 52:319-324, 2003; y Sasaki et al., Pharmacol. Ther., 93:225-232, 2002. Los inhibidores de ROCK se pueden usar con concentraciones y/o condiciones de cultivo conocidas en la técnica, por ejemplo como se describe en la PGPub US No. 2012/0276063. Por ejemplo, el inhibidor de ROCK puede tener una

concentración de alrededor de 0,05 a alrededor de 50 microM, por ejemplo, al menos o alrededor de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 microM, incluyendo cualquier intervalo derivable de los mismos, o cualquier concentración eficaz para promover el crecimiento o la supervivencia celular.

Por ejemplo, la viabilidad de las células madre pluripotentes puede mejorarse mediante la inclusión de un inhibidor de ROCK. En una realización ejemplar, las células madre pluripotentes pueden mantenerse en condiciones sin células alimentadoras. En otro ejemplo, la viabilidad de las células progenitoras específicas del linaje de megacariocitos puede mejorarse mediante la inclusión de un inhibidor de ROCK. En otro ejemplo, la viabilidad de los megacariocitos se puede mejorar mediante la inclusión de un inhibidor de ROCK. En otra realización ejemplar, la célula progenitora específica del linaje de megacariocitos puede mantenerse en condiciones sin células alimentadoras.

ABREVIATURAS

iPS: madre pluripotente inducida

iPSC: célula madre pluripotente inducida

hiPSC: célula madre pluripotente inducida humana

hES: madre embrionaria humana

hESC: célula madre embrionaria humana

MK: megacariocito

MLP: progenitor específico del linaje megacariocítico, también llamado progenitor de megacariocitos (MKP)

PVE-HE: célula endotelial hemogénica, que opcionalmente son PECAM1+VE-Cadherina+Endoglina+, y que opcionalmente derivan de células madre pluripotentes,

iPS-PVE-HE: célula endotelial hemogénica derivada de células iPS (tal como una célula PECAM1+VE-Cadherina+Endoglina+)

hES-PVE-HE: célula endotelial hemogénica derivada de células hES (tal como una célula PECAM1+VE-Cadherina+Endoglina+)

PVE-HE-MLP: progenitor específico de linaje megacariocítico producido a partir de una célula endotelial hemogénica

iPS-PVE-HE-MLP: PVE-HE-MLP producido a partir de una célula iPS

hES-PVE-HE-MLP: PVE-HE-MLP producido a partir de una célula hES

PVE-HE-MLP-MK: megacariocito producido a partir de un progenitor específico de linaje megacariocítico que se produjo a partir de una célula endotelial hemogénica

iPS-PVE-HE-MLP-MK: PVE-HE-MLP-MK producido a partir de una célula iPS

hES-PVE-HE-MLP-MK: PVE-HE-MLP-MK producido a partir de una célula hES

PLT: plaquetas

hiPSC-PLT: plaqueta o partícula similar a plaqueta producida a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas

hESC-PLT: plaqueta o partícula similar a plaqueta producida a partir de células madre embrionarias humanas

ADM: morfología de diferenciación avanzada.

Referencias

1. Guerriero R, Mattia G, Testa U et al. Stromal cell-derived factor 1 alpha increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. Blood 2001;97:2587-2595.

2. Matsunaga T, Tanaka I, Kobune M et al. Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34+ cells. Stem Cells 2006;24:2877-2887.

3. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 2001;98.: 10716-10721.

4. Lu S-J, Li F, Vida L, Honig GR. CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an embryonic gene expression pattern. Blood 2004; 103:4134-4141.

5. Chadwick K, Wang L, Li L et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood 2003 2003;102:906-915.

6. Chang KH, Nelson AM, Cao H et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. Blood 2006; 108: 1515-1523.

7. Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. Exp.Hematol. 2004;32: 1000-1009.

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

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

10. Woll PS, Martin CH, Miller JS, Kaufman DS. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. J.Immunol. 2005;175:5095-5103.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

24. Chang Y, Aurade F, Larbret F et al. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. Blood 2007;109:4229-4236.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No es una admisión de que cualquier información proporcionada aquí es técnica anterior o relevante para la invención actualmente reivindicada, o que cualquier publicación a la que se haga referencia específica o implícitamente es técnica anterior.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada, y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionen materiales específicos, es meramente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o agentes reaccionantes equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Generación de células endoteliales hemogénicas derivadas de pluripotentes (PVE-HE).

Se generaron células endoteliales hemogénicas derivadas de pluripotentes (PVE-HE) a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPS).

En primer lugar, las células iPS se expandieron cultivando en Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)) en el medio de cultivo de células madre pluripotentes sin células alimentadoras mTeSR1. Brevemente, las células iPS humanas se recolectaron mediante disociación usando amortiguador de disociación celular (CDB) químicamente definido, con EDTA como único componente activo. No se usaron enzimas ni otros productos animales en el medio de cultivo o CDB. Para los investigadores con experiencia normal en la técnica, debe entenderse que es posible usar otra matriz definida químicamente, tal como vitronectina recombinante o SyntheMax II, o un medio tal como mTeSR2, u otros reactivos de disociación celular compatibles.

En segundo lugar, se prepararon células iPS humanas recolectadas para la diferenciación en PVE-HE multipotente que eran PECAM1+VE-Cadherina+Endoglina+. No se requirió la formación de cuerpos embrioides (EB). Brevemente, las células recolectadas se resuspendieron en mTeSR1, y se colocaron en placa sobre el colágeno IV humano la matriz extracelular (Advanced BioMatrix, nº de cat. 5022). El inhibidor de ROCK de molécula pequeña Y27632 se añadió al cultivo a 10 μM, y se pensó que ayudaba a que las células iPS recolectadas se unieran a la superficie recubierta de Colágeno IV. Se dejó que las células iPS se unieran durante 12-48 horas a 37ºC con 5% de CO2. Como se muestra en la FIG. 2A, después de 48 horas, las células adheridas muestran una morfología típica de células madre pluripotentes en condiciones sin células alimentadoras.

En tercer lugar, las células iPS humanas preparadas se diferenciaron en células PVE-HE. Brevemente, se eliminó el medio mTeSR1 con Y27632, y se añadió un medio de iniciación de diferenciación (DIM). DIM es un medio libre de componentes animales (ACF) compuesto por medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) como medio basal, seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) a 50 ng/ml, factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) a 50 ng/ml, y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a 50 ng/ml. Después de incubar durante 48 horas a 37ºC con 5% de CO_2, se observó una morfología temprana de la diferenciación deseada de PVE-HE. La transición casi completa de la morfología de las células madre pluripotentes a los grupos de células pequeñas dispersas se puede ver en la FIG. 2B. Después de 96 a 146 horas tras el inicio de la diferenciación de PVE-HE, se observó una morfología de diferenciación avanzada que mostraba pequeños grupos de células compactas que crecían en la parte superior de la monocapa (FIG. 2C).

En cuarto lugar, después de 120 horas tras el inicio de la diferenciación de PVE-HE, se analizaron las células de morfología de diferenciación avanzada (ADM) en busca de cambios morfológicos (FIG. 3B) y diferenciación exitosa de PVE-HE. Brevemente, una pequeña muestra de células se sometió a análisis de citometría de flujo de marcadores específicos de linaje CD31 (PECAM), CD105 (Endoglina), CD144 (VE-Cadherina). Las células ADM muestran el fenotipo PVE-HE $CD31^+CD144^+CD105^+$ en esta etapa de diferenciación (FIG. 3A).

Ejemplo 2 - Generación de progenitores específicos de linaje megacariocítico (MLP) desprendidos a partir de células PVE-HE derivadas de iPS humanas.

En primer lugar, el inicio de la diferenciación de MLP se realizó 120 horas después de iniciar la diferenciación de PVE-HE. Brevemente, se eliminó el medio DIM que contenía 50 ng/ml de BMP4, 50 ng/ml de bFGF, y 50 ng/ml de VEGF, y se reemplazó con medio de Derivación y Expansión de MLP (MLP-DEM, también denominado APEL o Stemline II, como se muestra en la FIG. 1) compuesto por medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), mezcla de nutrientes F-12 de Ham, Albucult (albúmina rh), alcohol polivinílico (PVA), ácido linoleico, SyntheChol (colesterol sintético), monotioglicerol (a-MTG), disolución de insulina rh-transferrina-selenio-etanolamina, mezcla de hibridoma libre de proteínas II (PFHMII), ácido ascórbico 2 fosfato, Glutamax I (L-alanil-L-glutamina), penicilina/estreptomicina, factor de células madre (SCF) a 25 ng/ml, Trombopoyetina (TPO) a 25 ng/ml, ligando de tirosina cinasa 3 relacionada con Fms (FL) a 25 ng/ml, interleucina-3 (IL-3) a 10 ng/ml, interleucina-6 (IL-6) a 10 ng/ml, y heparina a 5 Unidades/ml. Después, las células se incubaron durante hasta 8 días a 37ºC con 5% de CO_2. La diferenciación de MLP se mantuvo durante 8 días.

Tabla 1. Comparación de marcadores de MLP/MK

	MLP maduros	MK maduros
CD43	95,9%	98,5%
CD41	89,3%	91,4%
CD61	77,2%	89,7%
CD42a	66,3%	88,8%
CD144	57,6%	15,1%
CD31	57,0%	80,6%
CD29	40,4%	96,2%
CD45	40,3%	66,1%
CD13	40,4%	59,4%
CD34	30,3%	44,1%
CD309	28,4%	73,2%
CD71	26,4%	59,6%
CD90	19,8%	2,0%
CD105	7,5%	46,0%
CD56	3,5%	3,3%
CD14	4,4%	4,7%
CD143	2,2%	6,8%
CD15	1,6%	11,0%
CD3	2,8%	4,2%
CD117	2,7%	10,2%
CD184	0,6%	8,5%
CD11c	0,4%	2,5%
CD73	0,0%	1,5%

La Tabla 1 muestra el análisis citométrico de flujo comparativo de la expresión de marcadores por células MLP maduras y MK maduras. El análisis caracteriza el fenotipo de las células MLP derivadas de PVE-HE antes de la crioconservación y posterior diferenciación en células MK del fenotipo definido.

En segundo lugar, los MLP flotantes y semidesprendidos en la parte superior de la población de células adheridas se recogieron mediante lavado con una fuerza leve usando una pipeta serológica. El medio que contenía estos MLP se transfirió a tubos cónicos y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos para recoger los MLP. Se descartó el medio, y el pelete de MLP se resuspendió en disolución salina amortiguada con fosfato, y se analizó para determinar la morfología (FIG. 5) y mediante citometría de flujo usando los marcadores que se ven en la Tabla 1. Resultados seleccionados que se ven en la FIG. 4. Los resultados demuestran que los MLP recolectados en esta etapa están compuestos principalmente (más del 90%) de dos poblaciones, una caracterizada por una población de MLP relativamente inmadura representada por $CD41a^+CD31^+CD34^+CD14^-CD13^+CD42b^-$, y una población de MLP más madura representada por $CD41a^+CD31^+CD34^+CD14^-CD13^+CD42b^+$.

En tercer lugar, las células MLP se crioconservaron. Brevemente, la crioconservación de los MLP se logró usando el medio de congelación celular CS10 (Sigma) que contenía DMSO al 10%.

Ejemplo 3 - Generación de plaquetas maduras a partir de megacariocitos (MK) derivados de iPS-PVE-HE-MLP humanas.

En primer lugar, se realizó el inicio de la diferenciación plaquetaria usando células MLP derivadas de iPS-PVE-HE humanas, como se describió anteriormente. Los MLP se sembraron en una superficie no adherente en medio MK (MK-M) compuesto por medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) como medio basal, seroalbúmina humana, transferrina saturada con hierro, insulina, b-mercaptoetanol, lipoproteína soluble de baja densidad (LDL), colesterol, TPO a 30 ng/ml, SCF a 1 ng/ml, IL-6 a 7,5 ng/ml, IL-9 a 13,5 ng/ml, Y27632 a 5 μM, y heparina a 5-25 unidades/ml. Después, las células se incubaron a 37ºC en 5% de CO_2 durante 3 días.

En algunos casos, los MLP se sembraron en una superficie no adherente en un medio de cultivo compuesto por medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), mezcla de nutrientes F-12 de Ham, Albucult (albúmina rh), alcohol polivinílico (PVA), ácido linoleico, ácido linolénico, SyntheChol (colesterol sintético), Monotioglicerol (a-MTG), disolución de Insulina rh-transferrina-selenio-etanolamina, mezcla de hibridoma sin proteínas II (PFHMII), ácido ascórbico 2 fosfato, Glutamax I (L-alanil-L-glutamina), Penicilina/estreptomicina, TPO a 30 ng/ml, SCF a 1 ng/ml, IL-6 a 7,5 ng/ml, IL-9 a 13,5 ng/ml, Y27632 a 5 μM, y heparina a 5-25 unidades/ml. Después, las células se incubaron a 37ºC en 5% de CO_2 durante 3 días.

En segundo lugar, se analizaron las células MK en maduración derivadas de iPS-PVE-HE-MLP. 72 horas después del inicio de la diferenciación plaquetaria, MK poliploides muy grandes (50 μM) se volvieron abundantes con la progresión de la maduración (FIG. 5A y B. La barra de escala en 5A es 100 μM, N en 5B indica núcleo dentro de MK). Entre 72 y 96 horas, se observaron fácilmente de forma microscópica células formadoras de proplaquetas con pseudópodos alargados. (FIG. 5A y 5C, indicadas por flechas), y se detectaron cantidades emergentes de partículas de plaquetas CD41a+CD42b+ usando análisis de citometría de flujo (FIG. 6). En la FIG. 6, las células en “A” eran plaquetas humanas circulantes, “B” es hES-PVE-HE-MLP, “C” es plaquetas humanas derivadas de sangre periférica, “D” es iPS-PVE-HE-MLP, y “E” es hES-PVE-HE-MLP). A las 84 horas posteriores al inicio, la cantidad de plaquetas CD41a+CD42b+ aumentó drásticamente, alcanzando niveles tan altos como 70% (FIG. 6D).

En tercer lugar, se recolectaron plaquetas de alta calidad sin dañar los MK en maduración en cultivos durante al menos 3-5 días consecutivos y posiblemente más, maximizando el rendimiento de plaquetas de MLP al menos 3-5 veces. Para separar los MK grandes de los medios que contienen plaquetas, se centrifugó la suspensión celular a 50 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendieron los peletes celulares de MK con MK-M reciente, lo que les permitió producir más plaquetas más tarde. Para separar las plaquetas de las proplaquetas, los restos de células grandes y los MK pequeños, se aplicó un método de sedimentación en gradiente BSA/HSA para obtener una población más pura de plaquetas del sobrenadante de la centrifugación a 50 x g. Las plaquetas purificadas se suspendieron con MK-M y se mantuvieron a temperatura ambiente. La calidad de las plaquetas con respecto a la granularidad, transparencia, tamaño, y expresión del marcador de superficie celular se caracterizó mediante análisis de FACS y se comparó con plaquetas humanas derivadas de sangre periférica. (FIG. 6A-E). Las plaquetas purificadas se almacenaron en medio MK-M a temperatura ambiente dentro de una superficie no adherente, asegurando una pérdida mínima de plaquetas funcionales.

Ejemplo 4 - Análisis de plaquetas maduras de megacariocitos (MK) derivados de iPS-PVE-HE-MLP.

En primer lugar, las plaquetas derivadas de iPS-PVE-HE-MLP (hiPSC-PLT) se analizaron para determinar la morfología. El análisis de inmunofluorescencia y de microscopía electrónica de transmisión se realizó según los métodos descritos anteriormente (Cell Research 2011 21: 530-45). Se encontró que las hiPSC-PLT eran discoides y en su mayoría ultraestructuralmente idénticas a las PLT humanas circulantes (como se demostró mediante microscopía electrónica de transmisión, FIG. 7). Las hiPSC-PLT fueron comparables en tamaño medio con las PLT humanas circulantes (2,38 μm ± 0,85 μm frente a 2,27 μm ± 0,49 μm) como se demostró mediante microscopía DIC y de IF con β1-tubulina (FIG. 8). Las hiPSC-PLT extendidas sobre vidrio forman tanto filopodios como lamelopodios

(como se demuestra por las imágenes de microscopía de células vivas DIC mostradas en la FIG. 9). Las hiPSC-PLT eran anucleadas y comparables a las PLT humanas circulantes (como se demuestra por la tinción de Hoechst, FIG. 8). Se observó que las hiPSC-PLT tenían un citoesqueleto de tubulina normal con respecto a las PLT humanas circulantes (como se demuestra por el marcaje con β1-tubulina, FIG. 8). Se observó que las hiPSC-PLT tenían actina filamentosa normal con respecto a las PLT humanas circulantes (como se demuestra mediante el marcaje con faloidina, FIG. 8). Se observó que las hiPSC-PLT tenían una expresión de gránulos alfa normal con respecto a las PLT humanas circulantes (como se demuestra por el marcaje de TSP4 y PF4 en las FIG. 10A y 10B).

En segundo lugar, las hiPSC-PLT se analizaron para determinar la funcionalidad usando un ensayo de activación *in vitro* que mide la expresión de moléculas de adhesión celular en una plaqueta activada. Brevemente, se analizaron dos moléculas de adhesión, usando un anticuerpo anti-CD62p y el anticuerpo PAC-1. PAC-1 reconoce la integrina αIIbβIII. Tanto CD62p como αIIbβIII se expresan en la superficie de plaquetas activadas. El ensayo se realizó según los métodos descritos anteriormente (Cell Research 2011 21:530-45). En respuesta a la exposición a la trombina, aumentaron tanto la unión de PAC-1 como la de P-selectina (FIG. 11).

En tercer lugar, las hiPSC-PLT se analizaron para determinar la funcionalidad usando un sistema de ensayo *in vivo* que mide la formación de trombos en ratones NOD/SCID empobrecidos en macrófagos. Brevemente, la microscopía intravital de las arteriolas del músculo cremaster se realizó como se describió anteriormente (Cell Research 2011 21:530-45). Se anestesiaron ratones NOD/SCID empobrecidos en macrófagos mediante inyección intraperitoneal de ketamina (125 mg/kg) y xilazina (25 mg/kg). Se insertó un tubo traqueal, y el ratón se colocó sobre una manta termocontrolada. Después de la incisión del escroto, se exteriorizó el músculo cremaster sobre una bandeja de microscopía intravital. La preparación del músculo se superfundió con disolución salina amortiguada con bicarbonato termocontrolada (37ºC) y aireada (95% de N2, 5% de CO2) durante todo el experimento. La pared arteriolar del músculo cremaster se lesionó mediante ablación con láser de micropuntos usando un sistema láser de micropuntos (Photonics Instruments). El trombo de plaquetas de ratón en desarrollo se visualizó mediante la infusión de anticuerpos anti-CD42c de ratón conjugados con Dylight 649 (Emfret Analytics, 0,05 μg/g de peso corporal) a través de una cánula yugular. También se infundieron con o sin ReoPro, 100 x g, en los ratones, HPLT marcada con calceína AM, iPSC-PLT y ESC-PLT, 3 x 10^6. Se generaron de dos a cuatro trombos en un ratón. Las imágenes de fluorescencia y de campo brillante se registraron usando un microscopio Olympus BX61W con un objetivo de inmersión en agua de 60 x/1,0 NA y una cámara de alta velocidad (Hamamatsu C9300) a través de un intensificador (Video Scope International). Los datos se recopilaron durante 5 minutos después de la lesión de la pared del vaso, y se analizaron usando Slidebook v5.0 (Intelligent Imaging Innovations). Los resultados que se ven en la FIG. 12A son una indicación de que las hiPSC-PLT contribuyen a la formación de coágulos en una configuración *in vivo*. También se determinó que las capacidades funcionales de hiPSC-PLT están mediadas por αIIβIII. Específicamente, las hiPSC-PLT se pretrataron con ReoPro, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino que se une específicamente a αIIβIII e inhibe la función plaquetaria (FIG. 12B). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los controles no tratados con ReoPro ($p < 0,01$ frente al control, prueba de la t de Student).

En cuarto lugar, se determinó la cinética de las hiPSC-PLT en ratones NOD/SCID empobrecidos en macrófagos después de la infusión. Para determinar si la cinética de hiPSC-PLT y ESC-PLT es similar a la de hPLT in vivo, se infundieron iPSC- o ESC-PLT en ratones NOD/SCID empobrecidos en macrófagos, y la sangre recolectada en diversos puntos de tiempo se analizó por citometría de flujo. Brevemente, los macrófagos se agotaron mediante inyección intravenosa de clodronato encapsulado en liposomas como se describió previamente. Se inyectaron liposomas de clodronato en ratones a través de la vena de la cola el día 0 (100 μl) y el día 2 (50 μl). En el día 3, se obtuvo plasma humano rico en plaquetas mediante centrifugación de sangre tratada con citrato de sodio a 200 x g durante 25 min y se centrifugó a 800 x g durante 10 min en presencia de PGE1 0,5 μM y amortiguador de citrato al 10%. El pelete se resuspendió con amortiguador HEPES-Tyrode que contenía PGE1 0,15 μM y amortiguador de citrato al 10% y se centrifugó a 800 x g durante 5 min. Las plaquetas se resuspendieron en amortiguador de HEPES-Tyrode que contenía BSA libre de ácidos grasos al 0,1%. Plaquetas humanas aisladas (hPLT, 1,5 x 10^7), plaquetas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC-PLT, 1,5 x 10^7) de la presente descripción, y plaquetas derivadas de células madre embrionarias (ESC-PLT, 1,0 x 10^7) de la presente descripción se infundieron por vía intravenosa en ratones empobrecidos en macrófagos. Se recogió sangre de ratón, 30 μl, a través de una vena yugular en diferentes puntos de tiempo (10, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos), y se analizó mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD41 humano conjugado con APC y anti-CD42c de ratón conjugado con Dylight 488. Los resultados demuestran que las hiPSC-PLT circulan durante varias horas en ratones NOD/SCID empobrecidos en macrófagos (FIG. 13).

Ejemplo 5. Producción de plaquetas a partir de células pluripotentes.

Este ejemplo proporciona métodos ejemplares adicionales para producir plaquetas a partir de células madre pluripotentes.

Como se indicó anteriormente, hESC-PLT y hiPSC-PLT son plaquetas humanas que se producen ex vivo a partir de células madre pluripotentes inducidas y embrionarias humanas. La caracterización inicial in vitro e in vivo descrita anteriormente ha demostrado que tanto hESC-PLT como hiPSC-PLT son morfológica y funcionalmente comparables a las plaquetas de donantes humanos. Por ejemplo, hiPSC-PLT pudo extenderse sobre un sustrato de vidrio.

La producción de intermedio a granel (progenitores de MK) se inicia con la descongelación de viales de un banco de células maestras (MCB) de hiPSC o hESC aprobado. El diagrama de flujo del proceso para la producción de intermedio a granel se presenta en la FIG. 14A-E. Los crioviales que contienen 1-2 millones de bancos de células maestras o de trabajo hiPSC o hESC se retiran de la fase de vapor del almacenamiento de nitrógeno líquido cGMP, y se transfieren a la sala limpia (ISO Clase 7). Todo el procesamiento se realiza en una cabina de bioseguridad certificada (ISO Clase 5 BSC). Después de descongelar y lavar para eliminar el DMSO, las células se siembran en recipientes recubiertos con Matrigel en medios de cultivo definidos mTeSR1. Se tiene cuidado de mantener las células como agregados. Las placas están etiquetadas con la fecha, el número de lote, y el número de pasadas, y la tapa de cada pocillo está etiquetada con un número único (por ejemplo, 1-6). Las placas sembradas se colocan en una incubadora a 37ºC, 5% de CO_2. Los cultivos se inspeccionan diariamente usando un estereomicroscopio y un microscopio óptico invertido. Observaciones sobre el tamaño de la colonia, morfología celular; incluyendo el grado de diferenciación y el color de los medios se registran en una hoja de trabajo. El medio mTeSR1 se cambia típicamente cada 1-2 días hasta que los cultivos tengan una confluencia del 60-90%. Cuando las evaluaciones de la morfología y la confluencia indican que los cultivos necesitan ser pasados, las colonias se recolectan usando amortiguador de disociación celular. Se vuelve a tener cuidado de mantener las células como agregados. Los cultivos se vuelven a sembrar en recipientes recubiertos con Matrigel en medio mTeSR1. Basado en el cm^2 cosechado y el cm^2 a sembrar, las células se dividen típicamente en una relación de 1:4 a 1:8 cada 3-7 días, dependiendo del rendimiento de células madre requerido. Los cultivos sembrados se devuelven a la incubadora a 37ºC, 5% de CO_2. Las células madre se pueden pasar de 1 a 6 veces antes de la inducción de la diferenciación hemogénica, según el tamaño de lote requerido.

Tres días después de la siembra para la diferenciación de células hemogénicas, se examinan los cultivos para confirmar la unión y el crecimiento celular. En esta etapa, los cultivos son típicamente de baja densidad con células adheridas que cubren menos del 10% de la superficie total. Las células bien adheridas deben demostrar un crecimiento con una transición significativa de la morfología de las células madre pluripotentes a las células diferenciadas: células más grandes con más citoplasma con respecto al tamaño del núcleo que crecen de manera más difusa sin fronteras claras de colonias.

Cuando se estima que la fase de expansión de las células madre cumple los requisitos de rendimiento celular, se inicia la diferenciación hemogénica. Se sacrifica un recipiente representativo para la recolección, y se crea una suspensión de células individuales. La concentración de células se cuantifica para establecer los parámetros de siembra de cultivos, y se descartan las células restantes. Las colonias se recolectan cuidadosamente usando amortiguador de disociación celular, y se vuelven a sembrar en vasos recubiertos de colágeno IV a una densidad de 5.000 células/cm^2 en medio mTeSR1 suplementado con 10 uM de Y27632 (inhibidor de ROCK). Los recipientes sembrados se colocan en una incubadora a 37ºC, 5% de CO_2.

Al día siguiente, se retira el medio, teniendo cuidado de minimizar la eliminación de cualquier grupo de células flotantes, y se reemplaza con StemSpan ACF (StemCell Technologies Inc.) suplementado con BMP-4 humana recombinante (rh) a 50 ng/ml, rh VEGF a 50 ng/ml, y rh bFGF a 50 ng/ml. Los cultivos se transfieren a un entorno con poco O_2 (~5%), 37ºC, 5% de CO_2, y se dejan en reposo durante 2 días. Después de 2 días, los cultivos se evalúan morfológicamente para determinar la unión celular y el crecimiento. Se retira el medio, teniendo cuidado de minimizar la eliminación de cualquier grupo de células flotantes, y se reemplaza con medio reciente. Los cultivos se devuelven al entorno con poco O_2 (~5%), 37ºC, 5% de CO_2 durante 2 días adicionales. Después de este período de tiempo, el medio se cambia una vez más, y los cultivos se colocan en condiciones de cultivo normóxicas. Después de 2 días de cultivo normóxico, se retira el medio de cultivo, teniendo cuidado de minimizar la eliminación de cualquier grupo de células flotantes, y se reemplaza con medio MLP que comprende STEMdiff APEL (StemCell Technologies Inc.) suplementado con 5 Unidades/ml de heparina, 25 ng/ml de rh TPO, 25 ng/ml de rh SCF, 25/ng de rh FL, rh IL-6, y rh IL-3. Estas condiciones se mantienen durante los próximos 2-6 días. Los cultivos se someten a una evaluación morfológica diaria para evaluar la calidad de los progenitores de MK flotantes. No se realizan cambios en los medios, pero se añaden medios adicionales si el cultivo comienza a indicar un agotamiento del medio (el medio de cultivo aparece en amarillo). Los cultivos se muestrean y analizan periódicamente mediante FACS para determinar la expresión de CD41a, CD42b. Cuando la morfología del cultivo y la expresión de CD41a, CD42b (~ ≥15% doble positivo) son apropiadas, los cultivos se recolectan. Las células se crioconservan a 3-5 millones de MLP viables/ml/criovial en medio de crioconservación de dimetilsulfóxido al 10%, suero fetal bovino al 90% (Hyclone). La crioconservación se logra colocando los viales en un recipiente de congelación (Nalgene) y después almacenándolos en un congelador a -80ºC durante 1-3 días, seguido de la transferencia a la fase de vapor del sistema de almacenamiento de nitrógeno líquido cGMP.

El procedimiento de producción del producto final hESC-PLT o hiPSC-PLT se inicia con la descongelación del intermedio a granel aprobado. Los crioviales que contienen 3-5 millones de MLP que han pasado las pruebas de calidad intermedia a granel se retiran de la fase de vapor del almacenamiento de nitrógeno líquido cGMP y se transfieren a la sala limpia. Las células se siembran en vasos de adhesión ultrabaja (ULA) a alrededor de 2,3 x 10^5/cm^2 en medio StemSpan ACF suplementado con 30 ng/ml de rh TPO, 1 ng/ml de rh SCF, 7,5 ng/ml de rh IL-6, 13,5 ng/ml de rh IL-9, y 5 uM de Y27632 (inhibidor de ROCK). Los recipientes de cultivo están etiquetados con la fecha y el número de lote, y la tapa de cada recipiente está etiquetada con un número único (por ejemplo, 1-6). Los cultivos se mantienen a 39ºC, en una atmósfera humidificada de CO_2 al 10%. Normalmente, no hay una expansión celular significativa durante esta fase de cultivo. Aproximadamente de 3 a 4 días en el cultivo, se harán evidentes grandes megacariocitos de maduración (MK). Los cultivos se controlan mediante muestreo periódico y análisis de FACS para

determinar la expresión de CD41a, CD42b. Por lo general, la formación de proplaquetas se observa por primera vez después de cinco días en cultivo. A medida que avanza la formación de proplaquetas y aumenta la expresión de CD41a, CD42b hasta alrededor de 30%-70%, se pueden recolectar los cultivos (días 6-7).

El medio recolectado se centrifuga a 50xg para eliminar la suspensión de megacariocitos. El sobrenadante se retira y se centrifuga a 1000xg para concentrar las plaquetas. Las plaquetas se resuspenden, y después se cargan en un gradiente discontinuo de albúmina (humana) (HSA) (12%, 10%, 7%, 5%, y 2%) para aislar más las plaquetas. El gradiente de HSA de plaquetas se centrifuga a 80xg durante 15 minutos. Las plaquetas se extraen del gradiente, y se añade PGE_1 a la suspensión para evitar la activación. Las plaquetas se concentran por centrifugación a 1000g durante 10 minutos. Actualmente, las plaquetas de hESC y hiPSC se almacenan en medios de cultivo. A los efectos del estudio propuesto, se investigará una estabilidad del producto diana de 48 a 72 horas. Los estudios preliminares indican una estabilidad mínima de 24 horas según lo determinado por los resultados de unión de PAC1 antes y después del almacenamiento.

Los análisis de FACS (CD31 y CD43) de la población de células MLP en el intermedio a granel han demostrado que alrededor de 98% de las células están comprometidas con un linaje hemogénico endotelial o hematopoyético, y por tanto se han diferenciado más allá de la pluripotencia.

Más adelante en el proceso, las células presentes durante la diferenciación de MK y la fase de fabricación de PLT se han evaluado mediante la expresión de vWF (factor de von Willebrand). Las células en esta fase de fabricación son alrededor de 100% vWF+. El mantenimiento de una población celular altamente diferenciada indica que el cultivo no está experimentando una expansión clonal de progenitores indiferenciados.

Los estudios preliminares indican una ausencia total de células pluripotentes en poblaciones de células MK derivadas de hiPS analizadas mediante tinción IFA para OCT4, NANOG, TRA-1-60, TRA-1-81 SSE3, SSE4, y fosfatasa alcalina. Estudios adicionales que usan tinción IFA para marcadores pluripotentes examinarán poblaciones de MLP y MK derivados de hES y hiPS, así como PLT purificadas derivadas de MK, para detectar la presencia de células pluripotentes. Se realizarán estudios de picos para determinar los LOD de este ensayo para detectar células madre en las diversas poblaciones de células.

Se han realizado estudios preliminares para caracterizar las poblaciones de MK usando análisis de FACS para marcadores pluripotentes (SSEA4 y TRA-1-60). Se han realizado estudios de picos en los que se mezclaron células hES con MK en concentraciones de 1% y de 0,1%. Los resultados indican un límite de detección de 0,1%. Un estudio inicial que caracterizó a los MK para SSEA4 y TRA-1-60 proporcionó un resultado de < 0,1% (por debajo del nivel de detección del ensayo) de células positivas a SSEA4/TRA-1-60 en la población de MK.

Refiriéndose a la FIG. 14, etapas 2-3, dado que las células madre recolectadas con amortiguador de disociación se desalojan como grupos de células, no son posibles recuentos celulares precisos. Por esta razón, se recolecta un recipiente de cultivo representativo usando tripsina-EDTA para asegurar una suspensión de una sola célula. Esta suspensión se cuenta en un hemocitómetro, y el número de células recolectadas se normaliza por cm^2. A continuación, se descartan las células usadas para el recuento. Los cultivos de producto restantes se recolectan usando amortiguador de disociación, y el rendimiento celular se calcula en base a las células normalizadas/cm^2 X cm^2 cosechado. El rendimiento celular calculado se usa para establecer la densidad celular requerida/cm^2 para sembrar vasos para inducir la diferenciación de células hemogénicas.

Refiriéndose a la FIG. 14, etapa 10, comenzando a los 2 días en medio MLP y hasta los 6 días en medio MLP, se toman muestras de células de recipientes de cultivo representativos, se agrupan, y se evalúa el porcentaje de células CD41a y CD42b doblemente positivas mediante análisis de FACS. CD41a es una subunidad del receptor de fibrinógeno ($\alpha IIb\beta III$), y CD42b es una subunidad del receptor del factor de von Willebrand (GPIb-V-IX). La expresión de ambos receptores es específica para los linajes de MK, y ambos son necesarios para la función plaquetaria. Las células endoteliales hemogénicas de linaje temprano son negativas para CD41a, y expresan CD41a durante la diferenciación hemogénica en etapa tardía en progenitores hematopoyéticos. CD42b se expresa exclusivamente en MK maduros. En este punto, los cultivos son heterogéneos con un alto porcentaje de células CD41+ y un bajo porcentaje de células CD42+ (Pineault, et. Al., Megakaryocyte and platelet production from human cord blood stem cells. Methods Mol Biol. 2012; 788:219-47).

La preparación de la muestra y el análisis de FACS se realizan de la siguiente manera. Brevemente, las células flotantes se recogen y se combinan. Con una pipeta serológica, se dirige un chorro suave de medio de crecimiento hacia la superficie del cultivo para separar cualquier MLP que se adhiera libremente y se mezcla con las células que flotan libremente. Se recoge una muestra (100-200 µl) de células agrupadas bien suspendidas y se centrifuga (160 x g durante 5 minutos). Los peletes se resuspenden en DPBS, se centrifugan de nuevo, y se resuspenden en DPBS más FBS al 3% (amortiguador FACS) que contiene CD41a-APC conjugado (aloficocianina) y CD42b-PE conjugado (ficoeritrina) (BD Bioscience, San Jose, CA). Los anticuerpos conjugados fluorescentes y los controles de isotipo apropiados (IgG1k-APC de ratón e IgG1k-PE de ratón) se incuban en presencia durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células marcadas se diluyen en amortiguador FACS, se centrifugan, y se resuspenden en amortiguador FACS. El análisis de FACS se realiza monitorizando 10.000 eventos. Los cultivos con un porcentaje aceptable de células que expresan MLP doblemente positivas (CD41a+CD42b+) se recogen y se crioconservan. La

especificación mínima tentativa es 10% de células dobles positivas. La FIG. 15 es un diagrama de puntos bidimensional representativo para MLP derivado de hiPSC. En esa figura, la población celular es 86,4% de CD41a+; 31,2% de CD42b+ con 29,9% de la población con tinción doble positiva.

Antes de la recolección para crioconservación, los cultivos de MLP se evalúan para determinar el porcentaje aproximado de células adheridas y la extensión de células grandes diferenciadas con una relación baja de núcleos a citoplasma. Las células adheridas deben aparecer como colonias difusas sin bordes de colonia claros. Debería haber una abundancia de MLP flotantes descansando sobre la población de células adheridas. Los MLP flotantes viables deben aparecer claros, con una birrefringencia mínima, delimitados por una membrana celular lisa. Normalmente, una superficie de 1 cm^2 genera 5.000 a 15.000 MLP por día. La FIG. 16 es una microfotografía de una población representativa de MLP derivada de la línea hiPSC MA-iPS-01 (Contraste de modulación de Hoffman, x 400).

Antes de los MLP de crioconservación, el recuento de células viables se realiza mediante exclusión con Azul de Tripano usando un hemocitómetro. Las células se evalúan para determinar el número de células viables y el porcentaje de viabilidad. Los viales representativos se evalúan para determinar el micoplasma y la esterilidad.

Además, se evalúa la expresión de CD31 y CD43 de un vial representativo de MLP crioconservados, como sigue. CD31 es un marcador de células endoteliales hemogénicas expresadas tanto en linajes endoteliales como hematopoyéticos. La expresión de CD43 confirma el compromiso hematopoyético. Un vial de muestra de MLP crioconservados se descongela, se aclara, se resuspende en DPBS más FBS al 3% (amortiguador FACS), y se centrifuga (160 x g durante 5 minutos). El pelete se resuspende en DPBS más FBS al 3% (amortiguador FACS) que contiene CD31-APC conjugado (aloficocianina) y CD43-FITC conjugado (BD Bioscience, San Jose, CA). Las muestras de MLP descongelados se incuban con los anticuerpos conjugados fluorescentes y los controles de isotipo apropiados (IgG-APC de ratón e IgG-FITC de ratón) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células marcadas se diluyen en amortiguador FACS, se centrifugan, y se resuspenden en amortiguador FACS. El análisis de FACS se realiza monitorizando 10.000 eventos. Los bancos de MLP aceptables tienen >/= 50% de células positivas para CD31 y >/= 50% de células positivas para CD43. La FIG. 17 es un diagrama de puntos bidimensional representativo para MLP derivado de la línea hiPSC MA-iPS-01. En el ejemplo mostrado, la población celular es 99,8% de CD31+; 98,5% de CD43+ con 98,4% de la población con tinción doble positiva.

Además, un vial representativo de MLP crioconservados se evalúa mediante análisis de FACS usando marcadores pluripotentes tales como SSEA4, TRA-1-60 para confirmar la ausencia de células pluripotentes.

Los crioviales de muestra de MLP crioconservados se descongelan y se evalúan para determinar la viabilidad y recuperación después de la descongelación. Los MLP se procesan adicionalmente hasta el punto de formación de proplaquetas, y se evalúan para determinar la morfología de los MK y el análisis de FACS para determinar CD41a+ y CD42b+ durante la maduración de MK. Los cultivos se monitorizan para determinar la formación de proplaquetas y para determinar la formación de plaquetas y la caracterización mediante análisis de FACS para células doblemente teñidas (CD41a+ y CD42b+). Los criterios de aceptación incluyen: esterilidad (negativo en el ensayo de inmersión <USP 21>), negativo para micoplasma (ensayado de forma directa (agar y caldo), indirecta (cultivo celular)), al menos 90% positivo para CD31 y CD43 por FACS, al menos 70% de viabilidad por Azul de Tripano, y negativo para la expresión de marcadores de células pluripotentes.

Con referencia a la FIG. 14, etapas 13-14, después de 2-3 días tras la descongelación y la siembra de los MLP, los cultivos se evalúan para determinar la aparición de células que flotan libremente en el linaje de MK. En este momento, las células son de tamaño heterogéneo, oscilando de 10-50 micrómetros de diámetro. La proporción aproximada de células viables se evalúa mediante observación visual en un microscopio de luz invertida con células precursoras de MK sanas y MK que muestran un citoplasma brillante y membranas celulares lisas. La FIG. 18 es una microfotografía de una población representativa de MK derivada de hESC (Contraste de modulación de Hoffman, x 400).

Con referencia a la FIG. 14, etapas 13-14, después de 2-3 días tras la descongelación de los MLP, las muestras de células se extraen de recipientes de cultivo representativos, se combinan, se procesan, se marcan con anticuerpos conjugados con fluorescencia para CD41a y CD41b, y se someten a análisis de FACS. Los cultivos con un porcentaje aceptable de células que expresan MLP tanto CD41a+ como CD42b+ se procesan adicionalmente (preferiblemente al menos 10% de células doble positivas).

Con referencia a la FIG. 14, etapa 15, comenzando a los 3 días y hasta 5 días después de la descongelación de los MLP, se evalúa la aparición de proplaquetas en los cultivos de MK. Las flechas de la FIG. 19 representan la morfología de las proplaquetas. Las proplaquetas que muestran MK exhiben proyecciones largas que se extienden desde las células y muestran algo de formación de perlas y ramificaciones antes de la fragmentación.

Con referencia a la FIG. 14, etapas 15-16, una vez confirmada la presencia de proplaquetas, comenzando a los 3 días y hasta 8 días después de la descongelación de los MLP, se recogen muestras de proplaquetas y plaquetas de cultivos representativos. Brevemente, usando una pipeta serológica de 10 ml, las muestras se transfieren a un tubo cónico de 50 ml y se extraen y expulsan al menos 5 veces para generar una fuerza de cizallamiento suficiente para fracturar las proplaquetas. Las muestras se devuelven a una incubadora a 39ºC gasificada con 10% de CO_2, y se dejan reposar durante 30 minutos. Aproximadamente 250 µl del sobrenadante que contiene plaquetas suspendidas se tiñen y se

someten a análisis de FACS para CD41a y CD42b. La recolección de plaquetas y el procesamiento posterior se inician cuando se detectan los niveles máximos de plaquetas, típicamente cuando el 30-70% de las plaquetas se tiñen de forma doble positiva (CD41a+CD42b+).

hiPSC-PLT y hESC-PLT se caracterizan por pH, recuento de plaquetas e identidad (determinada por la expresión de CD61, CD41a, CD42b), expresión de marcadores de activación plaquetaria (CD62P, PAC1, factor plaquetario 4), respuestas fisiológicas (agregación (ensayo de microplacas)), TEG (tromboelastografía), y extensión), y se evalúan morfológicamente por microscopía electrónica así como microscopía DIC con tinción de tubulina β1.

Las células se someten a ensayos adicionales de esterilidad (resultado negativo del ensayo de inmersión <USP 21>), endotoxina (Gel Clot USP <85> menor que 5 EU/ml), micoplasma (resultado negativo según el ensayo de Farmacopea Europea y Farmacopea US), identidad (por FACS, al menos 70% de CD41a+, CD42b+), recuento de PLT/mpPLT (FACS para CD61), morfología (microscopía DIC con tinción de tubulina β1), y potencia por unión a PAC1 (activada).

Las plaquetas purificadas se tiñen con anticuerpos conjugados con fluorescencia para CD41a y CD41b, y se someten a análisis de FACS como se describe anteriormente. A continuación se muestran gráficos de puntos bidimensionales representativos de PLT derivadas de iPS-01. En el ejemplo mostrado en la FIG. 20, la población es 81,8% CD41a+; 69,2% CD42b+, con 68,2% de la población con tinción doble positiva.

Junto con FACS para CD41a+, CD42b+ realizado en la FIG. 20, se añade yoduro de propidio (PI) a la muestra durante la tinción de CD para evaluar la viabilidad. El análisis de FACS se realiza contando 10.000 eventos como se describió anteriormente, con eventos adicionales recolectados en el canal de flujo 3 para detectar eventos positivos de PI (plaquetas no viables). Los datos se analizan para dar el porcentaje de plaquetas CD41a+/CD41b+ y el porcentaje de viabilidad (plaquetas totales detectadas - plaquetas PI+ / plaquetas totales detectadas).

Cada lote de producto final de plaquetas se evalúa para determinar el número de plaquetas y el número de micropartículas de plaquetas mediante la detección de eventos positivos para CD61 mediante análisis de citometría de flujo. Este ensayo se realiza usando un número conocido de perlas fluorescentes para normalizar los datos y obtener el número absoluto de PLT/µl y mpPLT/µl. En resumen, se diluyen muestras de plaquetas de 5-10 µl en disolución salina al 0,9% y se distribuyen en cada uno de dos tubos:

1) un tubo TruCount (BD nº de Cat. 340334) que contiene un pelete liofilizado con un número conocido de perlas fluorescentes e IgG anti-CD61 conjugado con ficoeritrina en un volumen de reacción final de 60 µl/tubo, y

2) un tubo de control de isotipo que contiene IgG de ratón conjugado con PE para tener en cuenta la unión no específica del anticuerpo primario en un volumen de reacción final de 60 µl/tubo.

Los tubos se mezclan suavemente, se incuban durante 20 minutos a 20-24ºC, seguido de la adición de 400 µl de formaldehído al 1% frío (2-8ºC) y almacenamiento en frío, protegidos de la luz durante dos horas. Antes de analizar las muestras de plaquetas fijas, la configuración de la máquina FACS para el canal de pico, selección de poblaciones, los ejes, las ubicaciones de los cuadrantes, y los límites de los marcadores para las regiones apropiadas de adquisición de datos se determinan mediante la recopilación de un mínimo de 10.000 eventos de una muestra de perlas de látex recién sometidas a ultrasonidos con un diámetro uniforme de 1 µM (CML nº de Cat. C37483) diluidas en disolución salina al 0,9%. Después de aplicar estos ajustes, se adquiere un mínimo de 100.000 eventos para el control de isotipo y para la muestra teñida con CD61. Los recuentos obtenidos en la muestra CD61 registrarán eventos para PLT teñidas con fluorescencia positivas para CD-61, mpPLT positivas para CD-61 y para el número de perlas fluorescentes Trucount detectadas. Los eventos contados en las regiones preestablecidas se analizan en el intervalo de tamaño de plaquetas de 2-4 micrómetros y en el cuadrante de mpPLT corregido para la unión no específica detectada en el control de isotipo. Los datos se normalizan a la eficiencia de las perlas Trucount detectadas usando la siguiente fórmula basada en el número conocido de perlas Trucount por tubo proporcionado por el fabricante.

nº eventos contados/nº perlas contadas X nº perlas TruCount por tubo/volumen de muestra = mpPLT/µl o PLT/µl.

Además, la inspección microscópica se usa para evaluar la morfología de hESC-PLT y hiPSC-PLT. La morfología se evalúa mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) y confirmando la tinción para β1-tubulina en una banda circunferencial característica de microtúbulos exclusiva de las plaquetas. Brevemente, las plaquetas se fijan en formaldehído al 4% y se centrifugan en cubreobjetos recubiertos con poli-1-lisina de 1 µg/ml, se permeabilizan con Triton X-100 al 0,5%, y se bloquean en amortiguador de bloqueo de inmunofluorescencia (0,5 g de BSA, 0,25 ml de azida sódica al 10%, y 5 ml de FCS en 50 ml de PBS) durante un mínimo de dos horas antes del marcaje del anticuerpo. Para demarcar las células permeabilizadas, las muestras se incuban con un anticuerpo primario policlonal de conejo para la β1-tubulina humana generado contra la secuencia del péptido C-terminal CKAVLEEDEEVTEEAEMEPEDKGH (Genemed Synthesis, Inc.) (SEQ ID NO:1). A continuación, las muestras se tratan con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 568 nm (Invitrogen; Molecular Probes), con lavados extensos con PBS entre y después de las incubaciones. Los cubreobjetos se montan (Aqua Polymount; Polysciences) en portaobjetos de microscopio. Como controles de fondo, los portaobjetos se incuban con el anticuerpo secundario solo, y las imágenes se ajustan para tener en cuenta la unión no específica de los anticuerpos. Las muestras se examinan con un microscopio equipado con un objetivo de inmersión en aceite o un objetivo de

contraste de interferencia diferencial. Las imágenes se obtienen usando una cámara de dispositivo acoplado con carga. Las imágenes se analizaron usando el software de análisis de imágenes MetaMorph (Molecular Devices) e ImageJ (National Institutes of Health). Los rasgos característicos de las plaquetas en reposo se evalúan de la siguiente manera: microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC): en forma de disco, aproximadamente 2-3 μm de diámetro; tinción con β1-tubulina: una banda circunferencial prominente de microtúbulos con un diámetro similar a las plaquetas en reposo. Véase la FIG. 21.

Las plaquetas (hESC-PLT y hiPSC-PLT) se analizan adicionalmente para confirmar la ausencia de células pluripotentes (por ejemplo, mediante PCR, inmunofluorescencia, y/o FACS para detectar marcadores de pluripotencia). Para mejorar la sensibilidad, los métodos de detección se pueden acoplar con procedimientos para concentrar contaminantes celulares potenciales atrapando con filtros, matrices o gradientes acoplados con centrifugación a baja velocidad para peletizar las células, y al mismo tiempo dejando las plaquetas en el sobrenadante.

Las plaquetas (hESC-PLT y hiPSC-PLT) se analizan adicionalmente para detectar la presencia de microorganismos según el método de inmersión, USP <21>, CFR 610.12.

Las plaquetas (hESC-PLT y hiPSC-PLT) también se analizan para detectar endotoxinas. Las endotoxinas bacterianas gramnegativas se cuantifican usando el Pyrotell® Gel Clot Endotoxin System (Associates of Cape Cod, Inc.). Se preparan controles negativos, positivos, y de producto positivos apropiados. Los controles de producto positivos son controles de inhibición, y consisten en la muestra o dilución de la muestra a la que se añade la endotoxina estándar. Las muestras se añaden directamente al reactivo Pyrotell® y se mezclan a conciencia. Los tubos de reacción se incuban a 37ºC ± 1ºC durante 60 ± 2 minutos. Un ensayo positivo está indicado por la formación de un gel que no se colapsa cuando se invierte el tubo. La endotoxina se cuantifica encontrando el punto final en una serie de diluciones de muestras. En ausencia de la serie de endotoxinas, se puede incluir con los ensayos un control positivo de concentración conocida. El ensayo de endotoxinas se validará para uso con muestras de PLT, y se realiza de manera coherente con las directrices de la FDA de 1987 sobre la validación de endotoxinas.

Las plaquetas (hESC-PLT y hiPSC-PLT) también se analizan para detectar micoplasmas. Después de la centrifugación de las plaquetas antes de ejecutar el gradiente de HSA, los sobrenadantes (por ejemplo, que consisten en medio StemSpan ACF acondicionado) se recogen y combinan. Las muestras de plaquetas purificadas del lote de producto final y el medio acondicionado se envían para el ensayo de micoplasmas. La detección de micoplasmas se realiza según las directrices de la Farmacopea Europea y de la Farmacopea US con cultivo indirecto en cultivos de células indicadoras e inoculación directa en placas de agar y en caldo.

Ejemplo 6. Ensayo de potencia plaquetaria y unión a PAC-1.

Las plaquetas de la descripción pueden evaluarse para determinar la potencia y/o la unión a PAC-1 usando los métodos descritos en este ejemplo.

La activación plaquetaria *in vivo* induce cambios conformacionales en la integrina αIIbβ3 activando la función del receptor de fibrinógeno del complejo GPIIb/IIIa que conduce a una unión mejorada del ligando. Las plaquetas activadas se unen a sustratos que incluyen fibrinógeno y factor de von Willebrand, y estimulan la formación de trombos en el sitio de la lesión vascular. Para determinar el grado de expresión de integrina αIIbβ3 funcional que se produce tras la activación plaquetaria, se activan hESC-PLT, iPSC-PLT y plaquetas humanas normales purificadas, y se evalúa el grado de unión a PAC-1 en comparación con las PLT de control en reposo. El PAC-1 es un mimético de fibrinógeno que se une exclusivamente a la conformación activada de la integrina αIIbβ3.

Las PLT se cuentan, y se extrae un mínimo de 100.000 PLT y se diluyen con medio adicional hasta una densidad de aproximadamente 20 PLT/ul. A la muestra de PLT se añaden PAC1-FITC (BD, dilución 1:100) y anticuerpos (conjugado con CD41a-APC (aloficocianina) 1:100, y conjugado con CD42b-PE (ficoeritrina) 1:100 (BD Bioscience, San Jose, CA). Se dispensa la mitad de la muestra (250 ul) en cada uno de los dos tubos FACS de 5 ml. A un tubo, se añade trombina (Sigma) hasta una concentración final de 1 U/ml. Las PLT activadas expuestas a trombina y las muestras de control se incuban a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Las muestras se someten a un análisis de FACS, determinándose la selección de dispersión frontal frente a la lateral usando plaquetas de sangre humana como controles. La unión (activación) de PAC-1 se cuantifica comparando el número de eventos positivos de CD41a y PAC-1 en el control activado con aquellos en el control no activado.

Ejemplo 7. Uso de proteasas tales como inhibidores de MMP para mejorar los rendimientos y la pureza de las plaquetas generadas bajo fuerza de cizallamiento.

Esta descripción también abarca métodos de producción de plaquetas que emplean condiciones de fuerza de cizallamiento (por ejemplo, el medio de cultivo fluye durante el cultivo. El cultivo se realizó usando un dispositivo microfluídico en el que los caudales en el intervalo de decenas de microlitros/min se aproximan a las fuerzas de cizallamiento en la cavidad de la médula ósea durante la hematopoyesis. En algunos casos, el caudal está en el intervalo de 5-25 microlitros/min. Se ha encontrado que los megacariocitos generados a partir de células iPS o células ES según esta descripción, cuando se cultivan bajo fuerza de cizallamiento, desprenden plaquetas de una manera mucho más eficiente.

El dispositivo usado para cultivar los MLP debe poder inmovilizar los MLP sin adherencia. En algunos casos, esto significa que los MLP están ubicados dentro de una región o cámara del dispositivo desde el cual son accesibles al medio de cultivo en movimiento, pero no pueden moverse significativamente por sí mismos.

Esta descripción reconoce que el rendimiento y la pureza de plaquetas pueden mejorarse en estos sistemas de cultivo. En un aspecto, la mejora se logra mediante el uso de uno o más determinados inhibidores de proteasa durante el cultivo con fuerza de cizallamiento. Este ejemplo demuestra el beneficio de añadir un inhibidor de metaloproteinasa de la matriz (MMP) durante estas condiciones de cultivo. Debe entenderse que el inhibidor de MMP es representativo de otros inhibidores de proteasa que de manera similar se pueden usar en estos métodos tales como, pero sin limitarse a, inhibidores del activador del plasminógeno.

En otro aspecto, una mejora en el rendimiento y la pureza de plaquetas se logra realizando el cultivo con una fuerza de cizallamiento aumentada. La fuerza de cizallamiento puede ser 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 o 4,5 dinas/cm^2.

Se usaron MK maduros, derivados de las líneas HA-iPS y MA09 hES. Se cargaron cantidades iguales de MK suspendidos en medio específico de MK en un dispositivo microfluídico en presencia o ausencia de inhibidor de MMP GM6001 20 μM. Se aplicó una fuerza de cizallamiento constante a los MK durante todo el período de cultivo. El medio MK aguas abajo de los MK se recogió a intervalos de 30 minutos durante un período de 6 horas. El número y pureza de las plaquetas (es decir, porcentaje del total de células que son CD41a$^+$CD42b$^+$) en el medio recolectado se midieron usando un citómetro de flujo.

Las FIGs. 22-24 proporcionan los resultados de la generación de plaquetas a partir de MK derivados de HA-iPS. Las plaquetas se generaron bajo una fuerza de cizallamiento constante definida por un caudal de [POR FAVOR PROPORCIONE] μl/min. La adición del inhibidor de MMP GM6001 al comienzo del cultivo mejoró significativamente la pureza (FIG. 22) y el rendimiento (FIG. 24) de las plaquetas recién generadas. La pureza se expresa en el porcentaje de células recolectadas totales que son CD41a$^+$ CD42b$^+$. El aumento de la viscosidad del medio de cultivo mediante la adición de dextrano al 8% tuvo un impacto negativo en la formación de plaquetas.

La FIG. 23 demuestra que se generaron significativamente más plaquetas a partir de MK en cultivo con fuerza de cizallamiento cuando está presente el inhibidor de MMP GM6001.

La FIG. 24 demuestra la diferencia en el rendimiento de plaquetas en cultivos con fuerza de cizallamiento en presencia del inhibidor de MMP GM6001 o DMSO, o en un cultivo estático.

La FIG. 25 demuestra que se logran resultados similares cuando se usaron MK derivados de MA09 (ES) para generar plaquetas. Las FIGs. 25 y 26 también demuestran que un cambio moderado de la fuerza de cizallamiento (representado por el cambio de caudal de 12 a 16 μl/min) también mejora la pureza y el rendimiento de las plaquetas.

Ejemplo 8. Inhibidor específico de MMP8 como inhibidor protector útil en la formación de plaquetas en cultivo estático.

Las proteasas tales como las MMP participan en la eliminación de CD42b, que también se denomina GPIbα. El CD42b plaquetario es el receptor de vWF y media la participación plaquetaria inicial en la cicatrización de heridas. Por tanto, la pérdida de CD42b puede provocar una mala calidad de las plaquetas. Se da a conocer que un inhibidor de MMP de amplio espectro, GM6001, inhibe la eliminación de CD42b de las plaquetas.

En un estudio comparativo que utilizó varios inhibidores de MMP específicos, se identificó que un inhibidor de MMP8 tiene más potencia que GM6001 en la protección de la función plaquetaria. Como se muestra en la FIG. 26, la adición de un inhibidor específico de MMP8 en el pico de producción de plaquetas de MK mejoró significativamente la pureza de las plaquetas derivadas de iPS de 43,7% a 65,5%, la última de las cuales es alrededor de un 10% más que la obtenida de cultivos tratados con GM6001. En presencia de un inhibidor específico de MMP8, en comparación con GM6001, se producen significativamente más plaquetas CD41a$^+$CD42b$^+$. Cuando el inhibidor específico de MMP8 y GM6001 se usan en combinación, los niveles de pureza parecen no verse afectados (FIG. 27), mientras que los rendimientos de plaquetas aumentan (FIG. 28). El pico de producción de plaquetas se determina midiendo el contenido de plaquetas en el cultivo, por ejemplo, diariamente durante varios días. Por lo general, es de 4 a 7 días después del comienzo del período de cultivo de diferenciación de MLP, aunque puede ser más largo, o puede cambiar.

Mientras que los datos de las FIGs. 27 y 28 se generaron usando megacariocitos derivados de iPS, esta descripción proporciona el uso de un inhibidor específico de MMP8 en cultivos de fuentes de origen natural de plaquetas, tales como células progenitoras CD34$^+$ de médula ósea y de sangre del cordón umbilical.

Ejemplo 9. Generación de plaquetas iPS a temperatura elevada.

Las FIGs. 29 y 30 demuestran que el cultivo de megacariocitos en condiciones hipertérmicas suaves mejoró significativamente tanto la pureza como el rendimiento de las plaquetas. El porcentaje de plaquetas CD41a$^+$CD42b$^+$ es significativamente mayor en cultivos incubados a 39ºC que a 37ºC. El efecto es más evidente antes de alcanzar el pico de producción de plaquetas. Además de mejorar la pureza, la incubación a mayor temperatura de los megacariocitos también contribuyó a un mayor rendimiento de plaquetas a partir del mismo número inicial de

megacariocitos, lo que indica que la temperatura elevada no tiene ningún efecto adverso sobre los megacariocitos o plaquetas en los sistemas de cultivo proporcionados aquí.

Ejemplo 10. iBET promueve el compromiso de megacariocitos y aumenta el rendimiento total de plaquetas mediante la regulación por disminución del gen c-myc.

En nuestro nuevo método de diferenciación específica del linaje de megacariocitos, la aparición de progenitores de megacariocitos más adecuados para la producción de plaquetas solo se puede recolectar en un período corto de 3-4 días desde el comienzo del período de cultivo de células PVE-HE. El aumento gradual de células $CD14^+$ del linaje mieloide parece estar asociado con una disminución en la calidad de los megacariocitos y la producción de plaquetas. En un esfuerzo por lograr mayores y mejores rendimientos de progenitores de megacariocitos, el gen c-myc se seleccionó como diana como un gen regulador importante durante la megacariopoyesis temprana, con el objetivo de identificar nuevos factores promotores de megacariocitos.

GSK1210151A (I-BET151) es un inhibidor a base de imidazolonoquinolina disponible por vía oral de la familia BET de bromodominios. Se demostró que I-BET151 tiene una profunda eficacia contra líneas celulares leucémicas de fusión MLL humanas y murinas, a través de la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular temprano. El modo de acción se debe en parte a la inhibición de la transcripción de genes clave (BCL2, C-MYC y CDK6) a través del desplazamiento de los componentes BRD3/4, PAFc y SEC a través de la cromatina.

Aunque la dosis alta de i-BET-151 desencadena la apoptosis masiva, el tratamiento de células que experimentan megacariopoyesis in vitro con dosis más bajas en el intervalo micromolar (o intervalo submicromolar) dio como resultado un mayor número de progenitores de MK. La FIG. 31 demuestra, mediante análisis cuantitativo de ARNm, una inhibición dependiente de la dosis de la expresión del gen c-myc por i-BET-151. Por el contrario, el gen GATA1 del gen pro-MK se reguló positivamente (FIG. 32) en respuesta a i-BET-151. El tratamiento con i-BET-151 también dio como resultado una disminución dependiente de la dosis en el número de células mieloides $CD14^+$.

De este modo, usando los métodos proporcionados aquí para la generación *in vitro* de megacariocitos y plaquetas derivados de iPS (y derivados de ES), se ha descubierto además que la supresión de la expresión del gen c-myc endógeno en células que experimentan megacariopoyesis puede cambiar el equilibrio de la diferenciación celular a favor del linaje de MK.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un cultivo de megacariocitos no adherente y sin células alimentadoras;

b) poner en contacto los megacariocitos con TPO o un agonista de TPO para provocar la formación en cultivo de proplaquetas, en el que las proplaquetas liberan plaquetas, al menos 60% de las cuales son positivas para la expresión de CD41a y CD42b; o poner en contacto los megacariocitos con medio de expansión hematopoyético y (1) TPO o un agonista de TPO, SCF, IL-6 e IL-9, o (2) TPO o un agonista de TPO, SCF, e IL-11, para provocar la formación en cultivo de pro-plaquetas, en el que las pro-plaquetas liberan plaquetas, al menos 60% de las cuales son positivas para la expresión de CD41a y CD42b, en el que dicho agonista de TPO comprende uno o más de: ADP, epinefrina, trombina, colágeno, romiplostim, eltrombopag (SB497115, Promacta), trombopoyetina humana recombinante (TPO), factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos humanos recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF), Fab 59, AMG 531, Peg-TPOmp, AKR-501, anticuerpos monoclonales agonistas de TPO, anticuerpos policlonales agonistas de TPO, minicuerpos de TPO, VB22B sc(Fv)2, anticuerpos agonistas de TPO con conversión de subclases de dominio, MA01G4G344, trombopoyetinas humanas recombinantes, o proteínas de fusión de TPO recombinantes; y

c) aislar las plaquetas, opcionalmente en el que sustancialmente todas las plaquetas aisladas son funcionales.

2. El método de la reivindicación 1, en el que (1) el cultivo en la etapa (b) es en un medio que comprende uno o más de: factor de células madre (SCF) a 0,5 -100 ng/ml, trombopoyetina (TPO) a 10-100 ng/ml, e interleucina-11 (IL-11) a 10-100 ng/ml, al menos un inhibidor de ROCK, y/o heparina a 2,5-25 Unidades/ml, o (2) el cultivo en la etapa (b) es en un medio que comprende uno o más de: TPO a 10-100 ng/ml, SCF a 0,5-100 ng/ml, IL-6 a 5-25 ng/ml, IL-9 a 5-25 ng/ml, al menos un inhibidor de ROCK, y/o heparina a 2,5-25 unidades/ml, opcionalmente en el que el al menos un inhibidor de ROCK comprende Y27632, opcionalmente en una concentración de 2-20 μM, alrededor de 3-10 μM, alrededor de 4-6 μM, o alrededor de 5 μM.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además someter los megacariocitos a una fuerza de cizallamiento.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que:

se producen al menos 2 plaquetas por megacariocito; y/o

las plaquetas se producen en ausencia de células xenogénicas; y/o

las plaquetas son plaquetas humanas.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los megacariocitos se cultivan en presencia de un inhibidor de proteasa añadido exógenamente, un inhibidor de MMP añadido exógenamente, un inhibidor de MMP8 añadido exógenamente, o un inhibidor específico de MMP8 añadido exógenamente y un inhibidor de pan-MMP, opcionalmente en el que los megacariocitos se cultivan a una temperatura de alrededor de 39ºC,

en el que dicho inhibidor de MMP se selecciona de GM6001, N-Dansil-D-fenilalanina, 4-epi-clortetraciclina, Hidrocloruro de piridoxatina, ARP 100, ARP 101, Batimastat, Clorhexidina, Dihidrocloruro, cis-ACCP, CL 82198 hidrocloruro, Minociclina, Hidrocloruro, Alendronato, sal de sodio, GM 1489, TAPI-1, TAPI-2, Marimastat, Inhibidor II de MMP, Inhibidor III de MMP, EGTA, Inhibidor V de MMP, Inhibidor de MMP-13, Inhibidor I de MMP-2, Inhibidor II de MMP-2, CP 471474, Inhibidor I de MMP-2/MMP-3, Inhibidor II de MMP-2/MMP-3, Inhibidor I de MMP-2/MMP-9, Inhibidor II de MMP-2/MMP-9, Inhibidor V de MMP-2/MMP-9, Ecotina, E. coli, Inhibidor de MMP-3, Inhibidor III de MMP-3, Inhibidor IV de MMP-3, Actinonina, Inhibidor V de MMP-3, Inhibidor VIII de MMP-3, Oligonucleótido Antisentido de MMP-7, Sal de sodio, Inhibidor I de MMP-8, Inhibidor I de MMP-9, Inhibidor I de MMP-9/MMP-13, Inhibidor II de MMP-9/MMP-13, NNGH, NSC 23766, PD166793, Pro-Leu-Gly hidroxamato hidrocloruro, Ro 32-3555, PF-356231, SB-3CT, Phosphoramidon, WAY 170523, UK 370106, UK 356618, cloruro de bario deshidratado, luteolina, isobavacalcona, hiclato de doxiciclina, inhibidor I de colagenasa, o-fenantrolina, TAPI-0, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, metilprednisolona, prinomastat, BAY 12-9566, MMI270(B), BMS-275291, metastat, BB-94, BB-1101, BB-2516, SE205, CT1746, CGS 27023A, AG3340, D2163, D1927, PNU-142372, CMT-1, o un inhibidor de MMP-1 a MMP-26.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que los megacariocitos se generan mediante etapas que comprenden:

(a) cultivar células madre pluripotentes para formar células endoteliales hemogénicas (PVE-HE), opcionalmente en el que las células PVE-HE derivan sin formación de cuerpos embrioides;

(b) cultivar las células endoteliales hemogénicas para formar progenitores específicos del linaje de megacariocitos (MLP), opcionalmente en presencia de inhibidor de BET añadido exógenamente, y en el que dicho inhibidor de BET se selecciona de RVX-208, PFI-1, OTX015, BzT-7, GSK525762A, BRD1, BRD2, BRD3, BRD4, BRD7, BRDT,

JQIS, JQIR, JQ20, JQ8, JQ6, JQ13, JQ19, JQ18, JQ11, JQ21, JQ24B, KS1, GSK1210151A, IBET151 y IBET762; y

(c) cultivar los MLP para formar megacariocitos, opcionalmente en el que las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes humanas, opcionalmente células madre pluripotentes inducidas humanas.

7. El método de la reivindicación 6, en el que las células endoteliales hemogénicas se diferencian de las células madre pluripotentes en condiciones de bajo contenido en oxígeno que comprenden 1% a 10% de oxígeno, y/o en el que dichos MLP se cultivan para formar megacariocitos a una temperatura entre 38-40ºC.

8. Un método para producir plaquetas a partir de megacariocitos o progenitores específicos del linaje de megacariocitos (MLP), que comprende cultivar una población no adherente y sin células alimentadoras de megacariocitos o MLP en presencia de TPO o un agonista de TPO para provocar la formación de pro-plaquetas, en el que las pro-plaquetas liberan plaquetas, y en el que los megacariocitos o MLP se cultivan:

(i) en condiciones de fuerza de cizallamiento, opcionalmente condiciones de fuerza de cizallamiento constante, en presencia de un inhibidor de proteasa, opcionalmente añadido en un momento de producción máxima de plaquetas dentro del cultivo, o

(ii) a una temperatura mayor que 37ºC e igual o menor que 40ºC, opcionalmente a una temperatura de alrededor de 39ºC, y

recolectar y opcionalmente aislar plaquetas del cultivo,

en el que dicho agonista de TPO comprende uno o más de: ADP, epinefrina, trombina, colágeno, romiplostim, eltrombopag (SB497115, Promacta), trombopoyetina humana recombinante (TPO), factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos humanos recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF), Fab 59, AMG 531, Peg-TPOmp, AKR-501, anticuerpos monoclonales agonistas de TPO, anticuerpos policlonales agonistas de TPO, minicuerpos de TPO, VB22B sc(Fv)2, anticuerpos agonistas de TPO con conversión de subclases de dominio, MA01G4G344, trombopoyetinas humanas recombinantes, o proteínas de fusión de TPO recombinantes,

en el que el inhibidor de proteasa es un inhibidor de MMP seleccionado de GM6001, N-Dansil-D-fenilalanina, 4-epi-Clortetraciclina, Hidrocloruro de Piridoxatina, ARP 100, ARP 101, Batimastat, Clorhexidina, Dihidrocloruro, cis-ACCP, CL 82198 hidrocloruro, Minociclina, Hidrocloruro, Alendronato, Sal sódica, GM 1489, TAPI-1, TAPI-2, Marimastat, Inhibidor II de MMP, Inhibidor III de MMP, EGTA, Inhibidor V de MMP, Inhibidor de MMP-13, Inhibidor I de MMP-2, Inhibidor II de MMP-2, CP 471474, Inhibidor I de MMP-2/MMP-3, Inhibidor II de MMP-2/MMP-3, Inhibidor I de MMP-2/MMP-9, Inhibidor II de MMP-2/MMP-9, Inhibidor V de MMP-2/MMP-9, Ecotina, E. coli, Inhibidor de MMP-3, Inhibidor III de MMP-3, Inhibidor IV de MMP-3, Actinonina, Inhibidor V de MMP-3, Inhibidor VIII de MMP-3, Oligonucleótido Antisentido de MMP-7, Sal de sodio, Inhibidor I de MMP-8, Inhibidor I de MMP-9, Inhibidor I de MMP-9/MMP-13, Inhibidor II de MMP-9/MMP-13, NNGH, NSC 23766, PD166793, Pro-Leu-Gly hidroxamato hidrocloruro, Ro 32-3555, PF-356231, SB-3CT, Phosphoramidon, WAY 170523, UK 370106, UK 356618, cloruro de bario deshidratado, luteolina, isobavacalcona, hiclato de doxiciclina, inhibidor I de colagenasa, o-fenantrolina, TAPI-0, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, metilprednisolona, prinomastat, BAY 12-9566, MMI270(B), BMS-275291, metastat, BB-94, BB-1101, BB-2516, SE205, CT1746, CGS 27023A, AG3340, D2163, D1927, PNU-142372, CMT-1, o un inhibidor de MMP-1 a MMP-26, opcionalmente GM6001 o un inhibidor específico de MMP8, opcionalmente en el que el inhibidor específico de MMP8 es MMP8-I ((3R)-(+)-[2-(4-metoxibencenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-hidroxamato]),

opcionalmente en el que las condiciones de fuerza de cizallamiento comprenden una fuerza de cizallamiento de 1-4,1 dinas/cm2, opcionalmente en el que los megacariocitos o MLP derivan de células iPS, células ES, o células $CD34^+$ de origen natural, opcionalmente células CD34+ de médula ósea o sangre de cordón umbilical, y opcionalmente en el que los megacariocitos o MLP se cultivan en un dispositivo microfluídico.

9. El método de la reivindicación 8, en el que los megacariocitos o MLP se cultivan en medio de expansión hematopoyético y en

(1) TPO o un agonista de TPO, SCF, IL-6 e IL-9, o

(2) TPO o un agonista de TPO, SCF e IL-11

para provocar la formación de pro-plaquetas en cultivo, en el que las pro-plaquetas liberan plaquetas.

10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que los megacariocitos o MLP se cultivan a una temperatura mayor que 37ºC e igual o menor que 40ºC, opcionalmente en el que los megacariocitos o MLP se cultivan a una temperatura de alrededor de 39ºC.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que los progenitores específicos del linaje de megacariocitos (MPL) se producen a partir de células endoteliales hemogénicas (PVE-HE), comprendiendo el método cultivar una población de células PVE-HE derivadas de células iPS o células ES en presencia de un inhibidor de BET, en el que dicho inhibidor de BET se selecciona de RVX-208, PFI-1, OTX015, BzT-7, GSK525762A, BRD1, BRD2,

BRD3, BRD4, BRD7, BRDT, JQIS, JQIR, JQ20, JQ8, JQ6, JQ13, JQ19, JQ18, JQ1 1, JQ21, JQ24B, KS1, GSK1210151A, IBET151 e IBET762, y recolectar y opcionalmente aislar los MLP del cultivo.

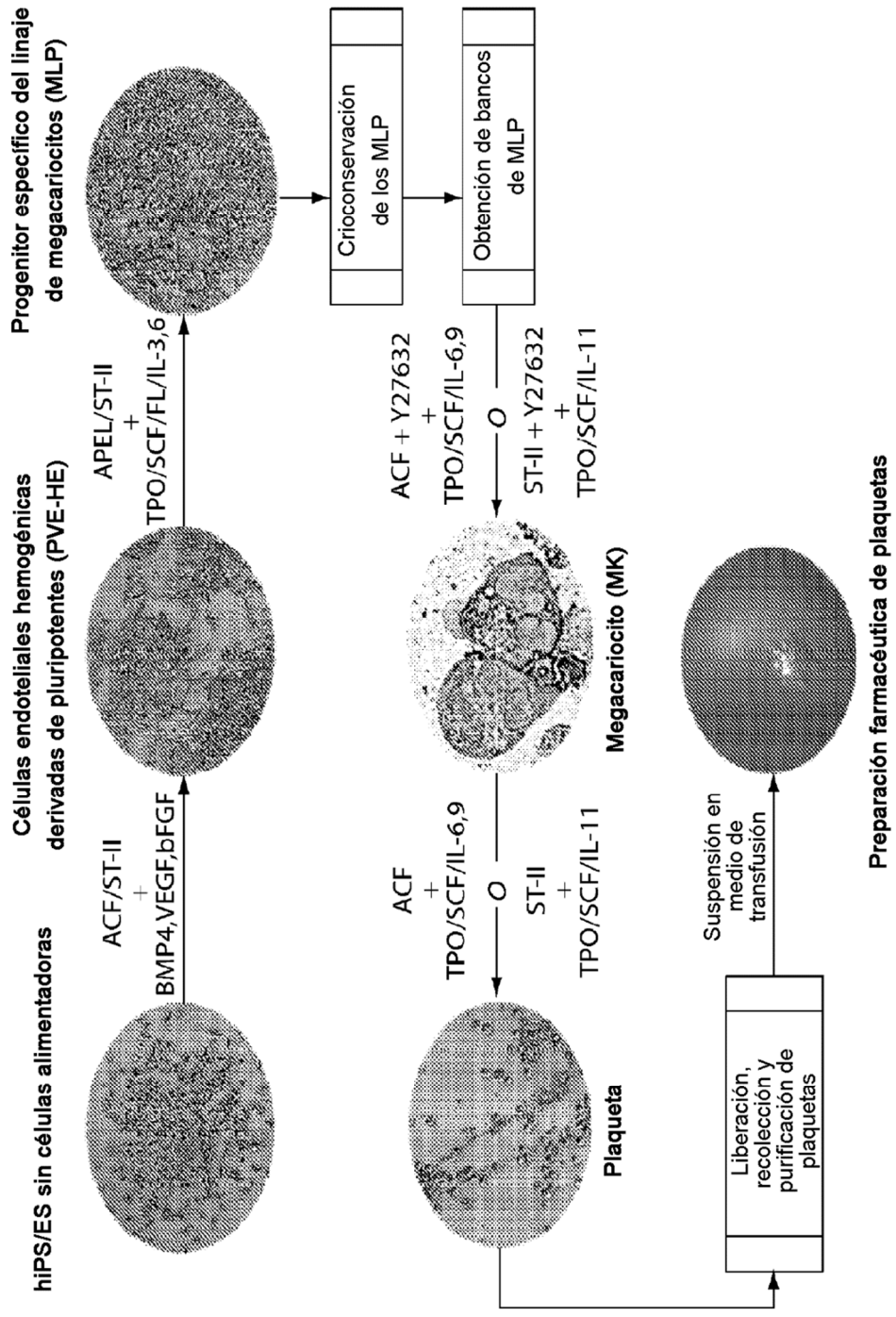

hiPS/ES sin células alimentadoras
ACF/ST-II
+
BMP4,VEGF,bFGF
Células endoteliales hemogénicas derivadas de pluripotentes (PVE-HE)
APEL/ST-II
+
TPO/SCF/FL/IL-3,6
Progenitor específico del linaje de megacariocitos (MLP)
Crioconservación de los MLP
Obtención de bancos de MLP
ACF + Y27632
+
TPO/SCF/IL-6,9
O
ST-II + Y27632
+
TPO/SCF/IL-11
Megacariocito (MK)
ACF
+
TPO/SCF/IL-6,9
O
ST-II
+
TPO/SCF/IL-11
Plaqueta
Suspensión en medio de transfusión
Liberación, recolección y purificación de plaquetas
Preparación farmacéutica de plaquetas

Fig. 1

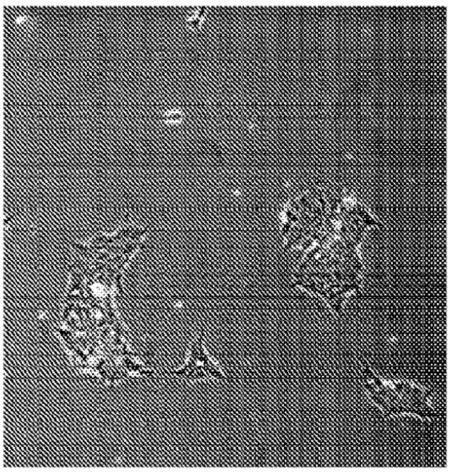


Fig. 2A

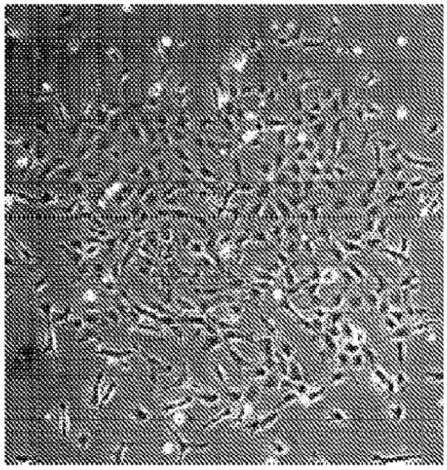


Fig. 2B

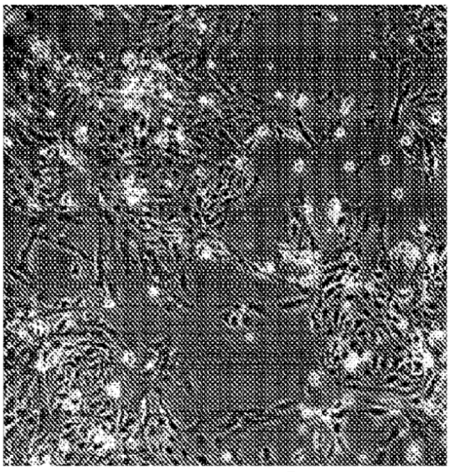


Fig. 2C

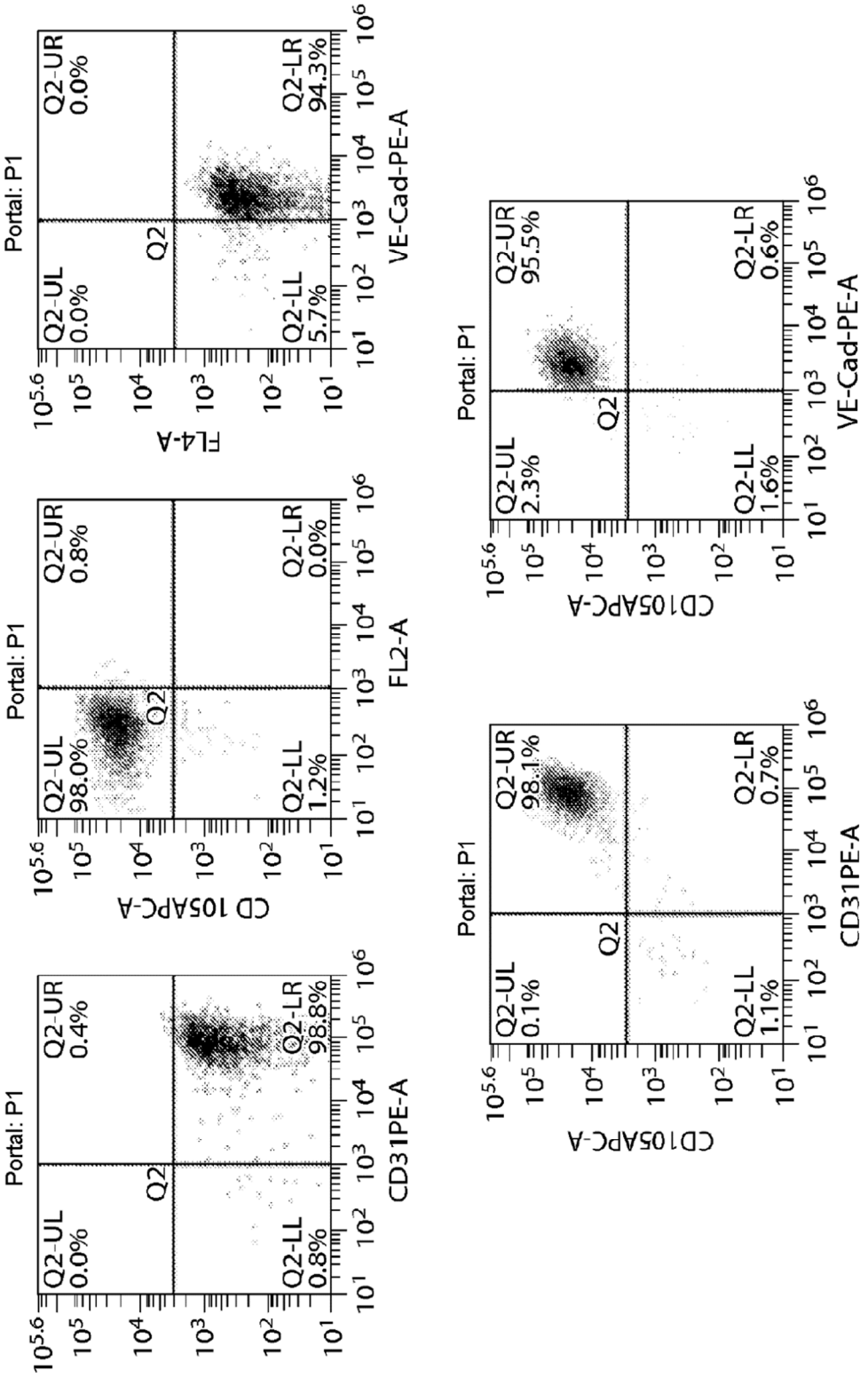

Portal: P1
Q2-UL 0.0%
Q2-UR 0.4%
Q2-LL 0.8%
Q2-LR 98.8%
Q2
CD105APC-A
CD31PE-A
Portal: P1
Q2-UL 98.0%
Q2-UR 0.8%
Q2-LL 1.2%
Q2-LR 0.0%
Q2
CD105APC-A
FL2-A
Portal: P1
Q2-UL 0.0%
Q2-UR 0.0%
Q2-LL 5.7%
Q2-LR 94.3%
Q2
FL4-A
VE-Cad-PE-A
Portal: P1
Q2-UL 0.1%
Q2-UR 98.1%
Q2-LL 1.1%
Q2-LR 0.7%
Q2
CD105APC-A
CD31PE-A
Portal: P1
Q2-UL 2.3%
Q2-UR 95.5%
Q2-LL 1.6%
Q2-LR 0.6%
Q2
CD105APC-A
VE-Cad-PE-A

Fig. 3A

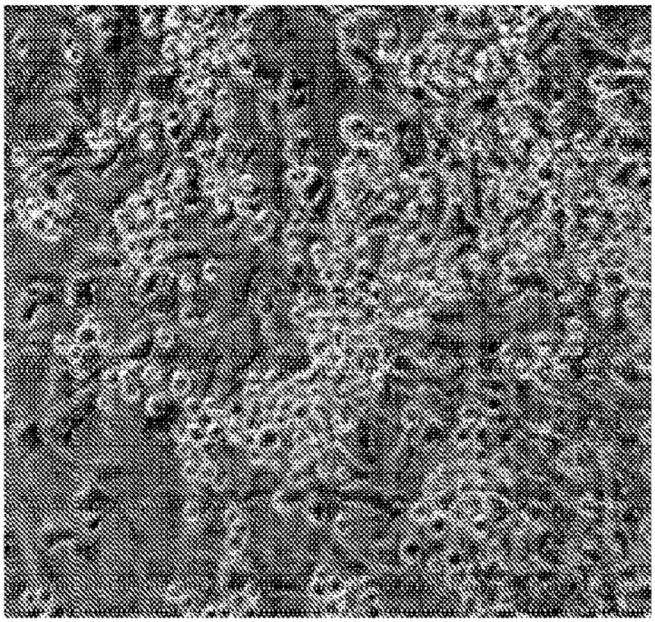


Fig. 3B

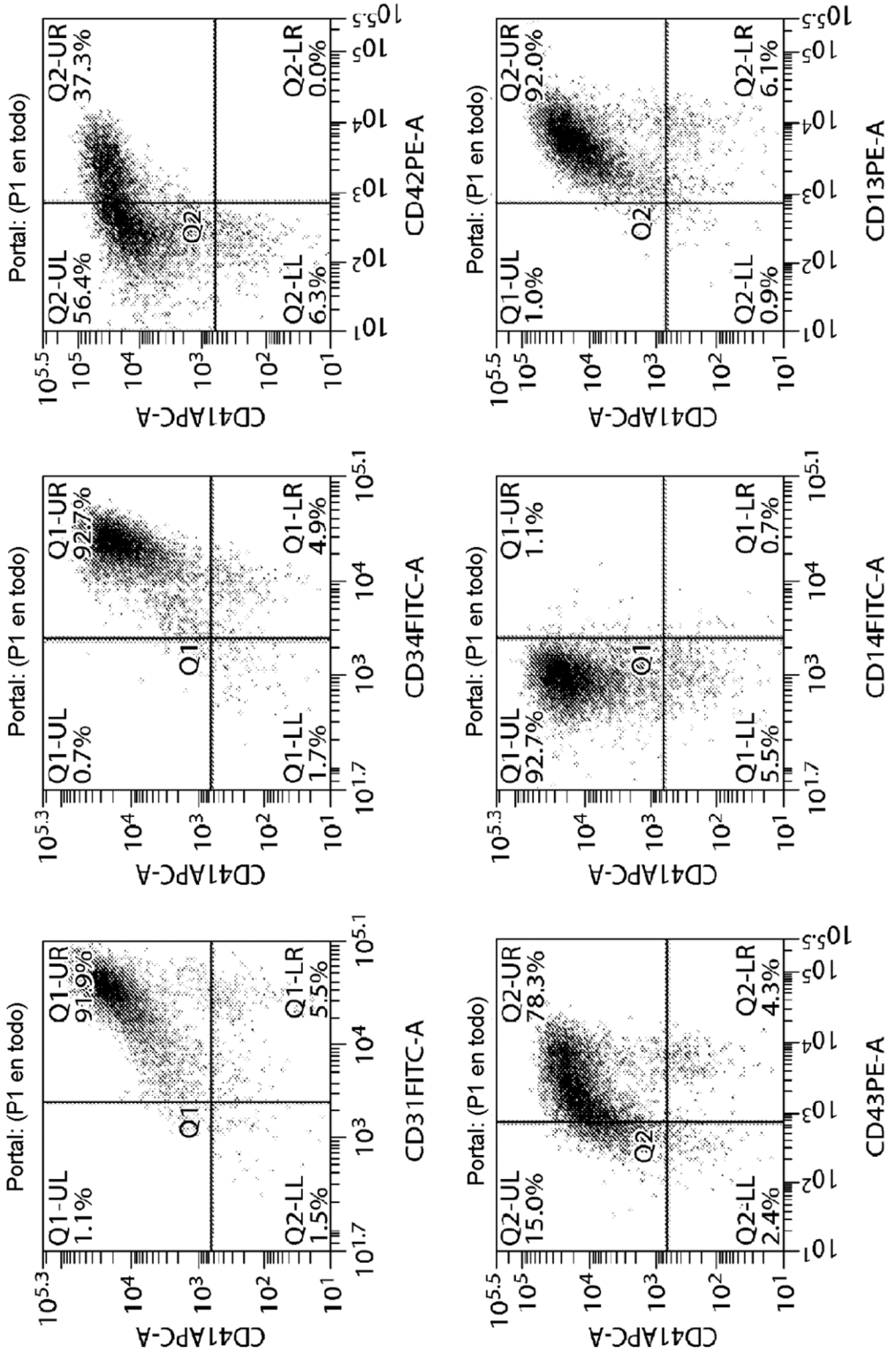

Portal: (P1 en todo)
Q1-UL 1.1%
Q1-UR 91.9%
Q2-LL 1.5%
Q1-LR 5.5%
CD41APC-A
CD31FITC-A
Portal: (P1 en todo)
Q1-UL 0.7%
Q1-UR 92.7%
Q1-LL 1.7%
Q1-LR 4.9%
CD41APC-A
CD34FITC-A
Portal: (P1 en todo)
Q2-UL 56.4%
Q2-UR 37.3%
Q2-LL 6.3%
Q2-LR 0.0%
CD41APC-A
CD42PE-A
Portal: (P1 en todo)
Q2-UL 15.0%
Q2-UR 78.3%
Q2-LL 2.4%
Q2-LR 4.3%
CD41APC-A
CD43PE-A
Portal: (P1 en todo)
Q1-UL 92.7%
Q1-UR 1.1%
Q1-LL 5.5%
Q1-LR 0.7%
CD41APC-A
CD14FITC-A
Portal: (P1 en todo)
Q1-UL 1.0%
Q2-UR 92.0%
Q2-LL 0.9%
Q2-LR 6.1%
CD41APC-A
CD13PE-A

Fig. 4

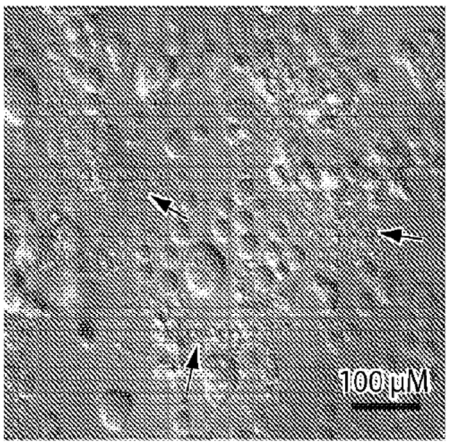


Fig. 5A

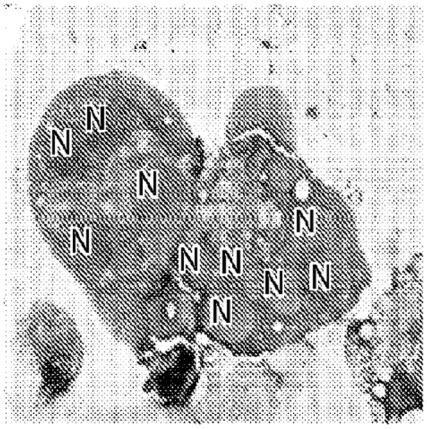


Fig. 5B

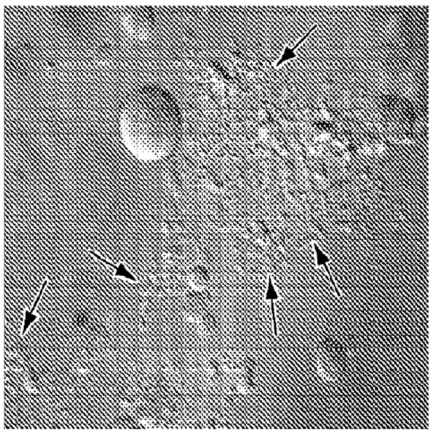


Fig. 5C

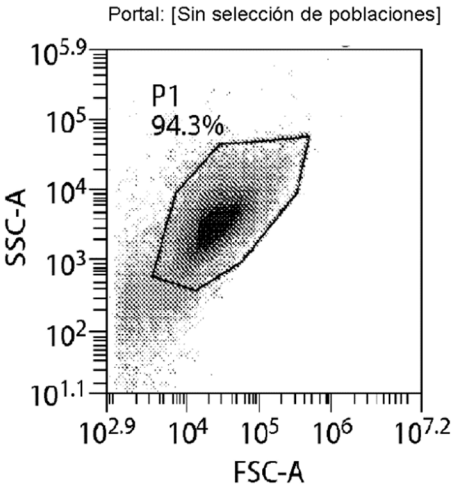


Fig. 6A

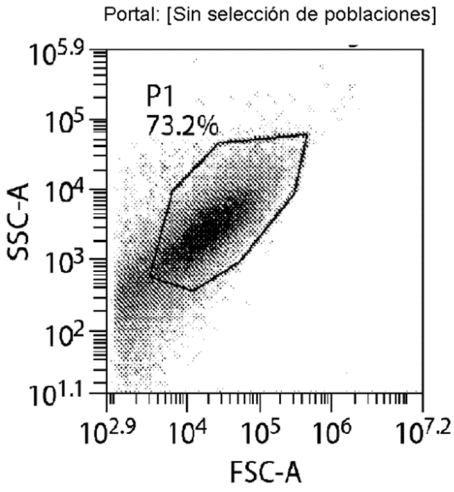


Fig. 6B

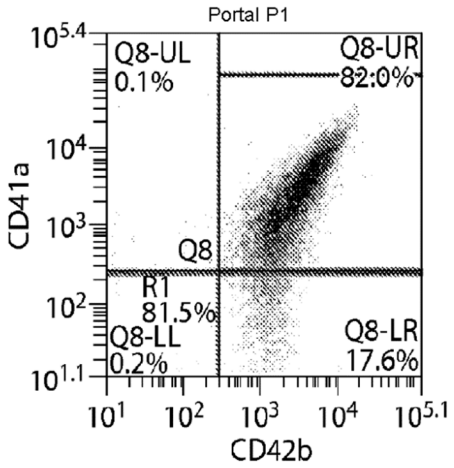


Fig. 6C

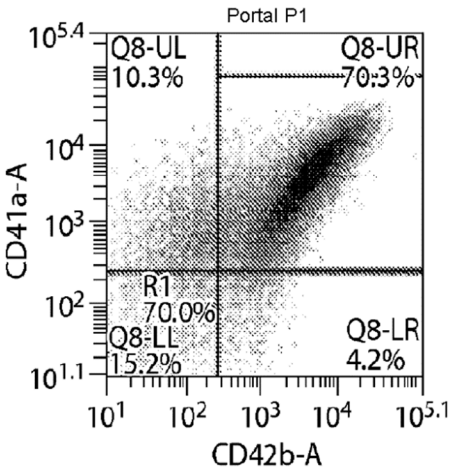


Fig. 6D

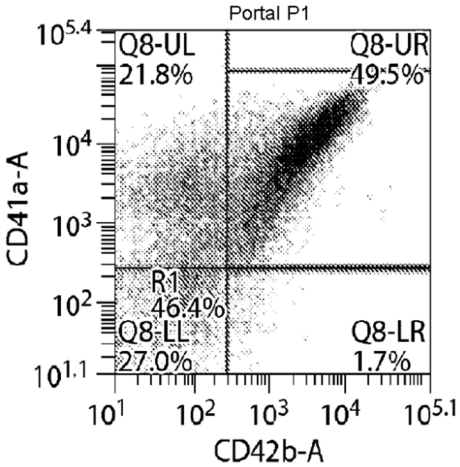
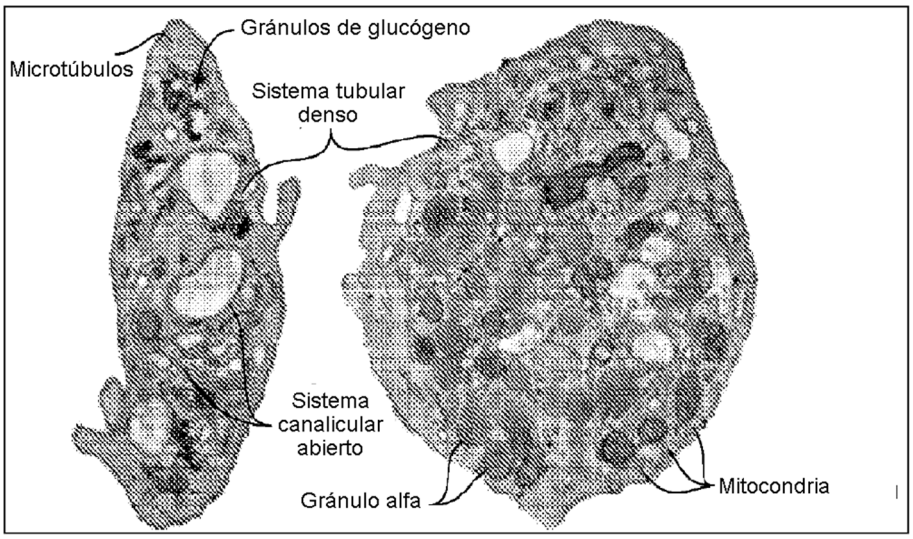


Fig. 6E

PLT de sangre humana



PLT de hiPSC - Ultraestructura

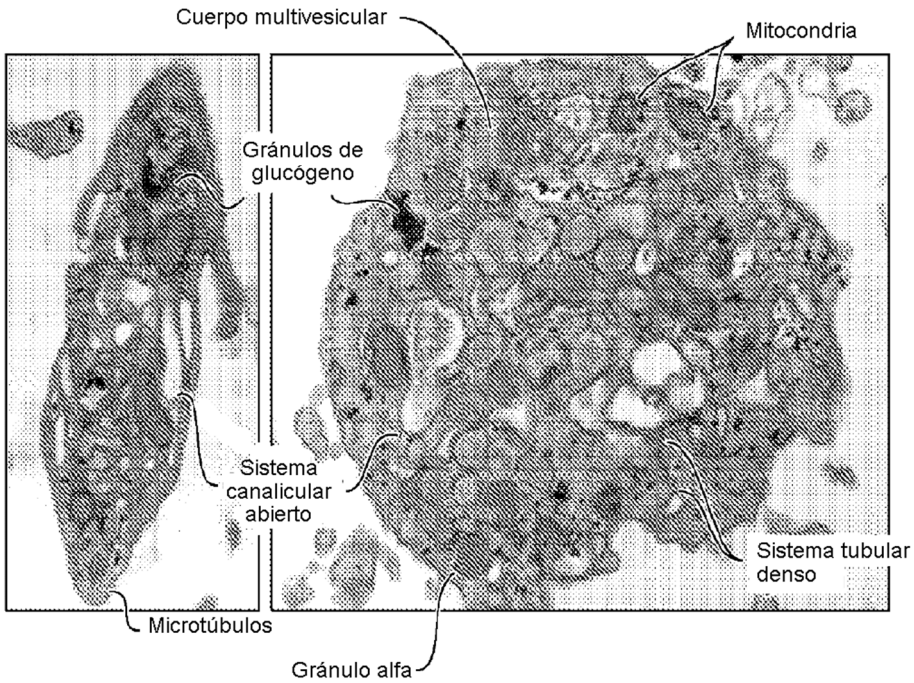
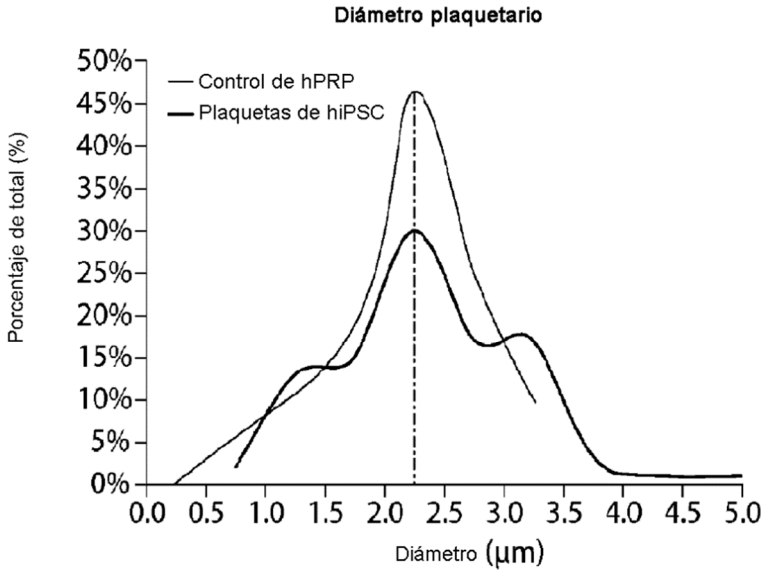


Fig. 7


Diámetro plaquetario
Control de hPRP
Plaquetas de hiPSC
Porcentaje de total (%)
50%
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0
Diámetro (µm)

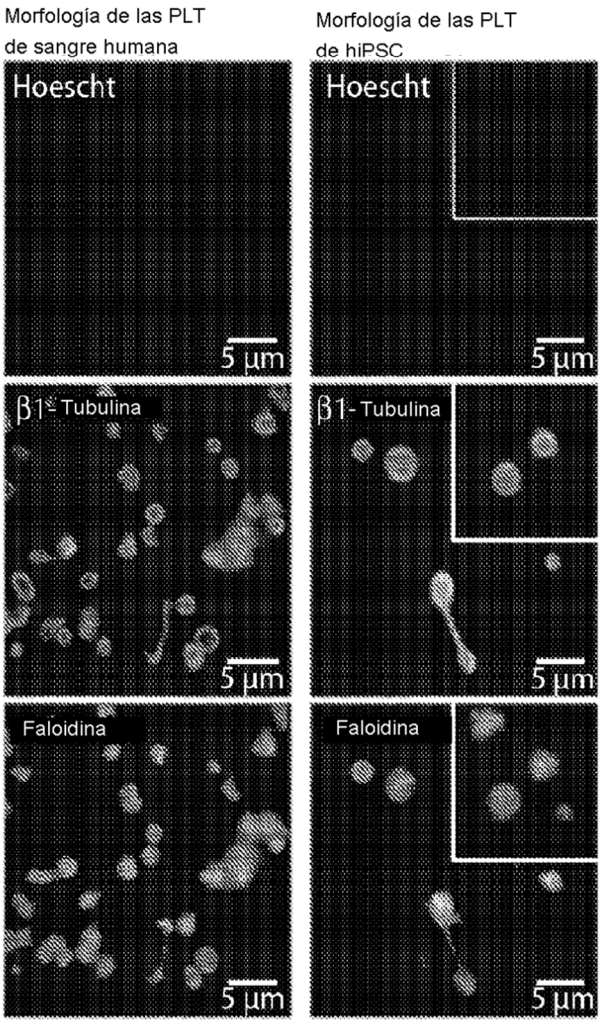

Morfología de las PLT de sangre humana
Morfología de las PLT de hiPSC
Hoescht
Hoescht
5 µm
5 µm
β1- Tubulina
β1- Tubulina
5 µm
5 µm
Faloidina
Faloidina
5 µm
5 µm

Fig. 8

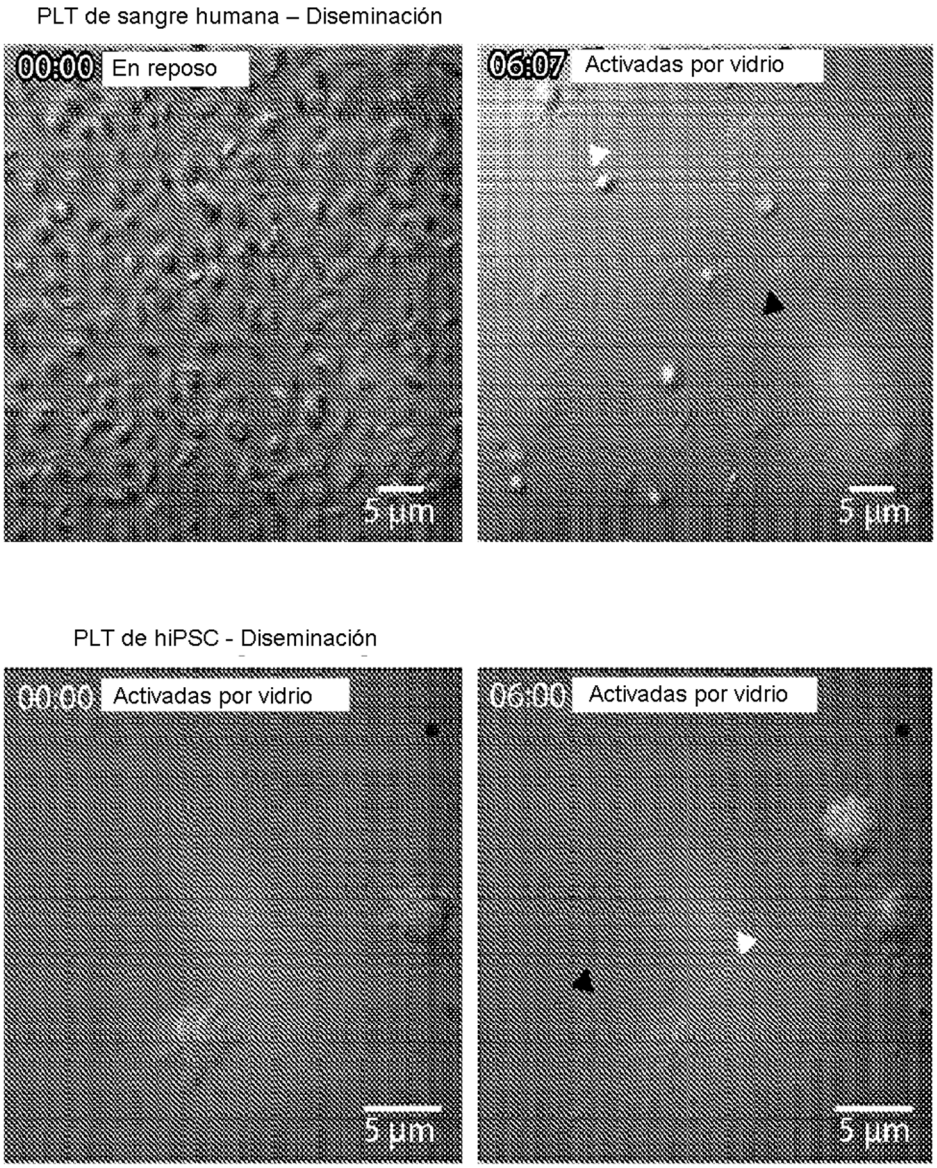

PLT de sangre humana – Diseminación
00:00
En reposo
5 µm
06:07
Activadas por vidrio
5 µm
PLT de hiPSC - Diseminación
00:00
Activadas por vidrio
5 µm
06:00
Activadas por vidrio
5 µm

Fig. 9

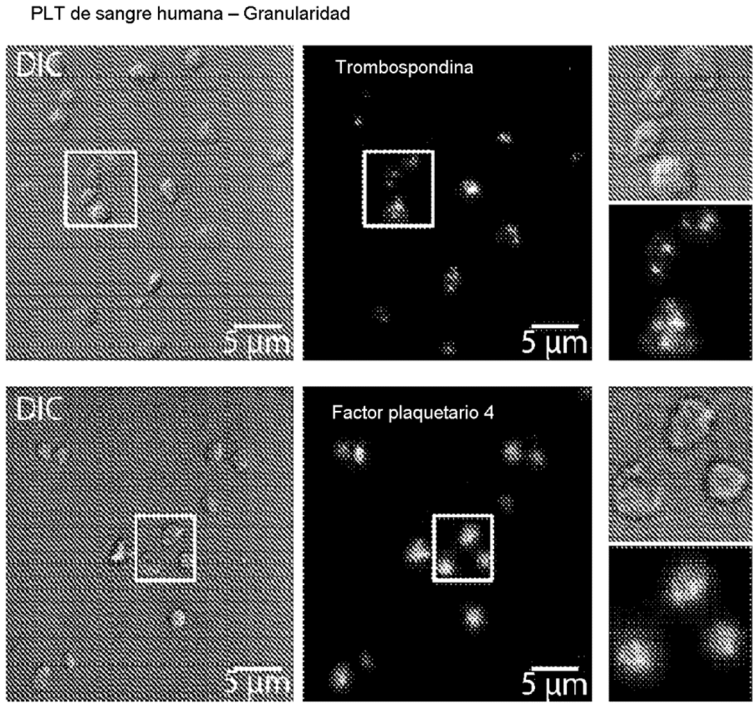


Fig. 10A

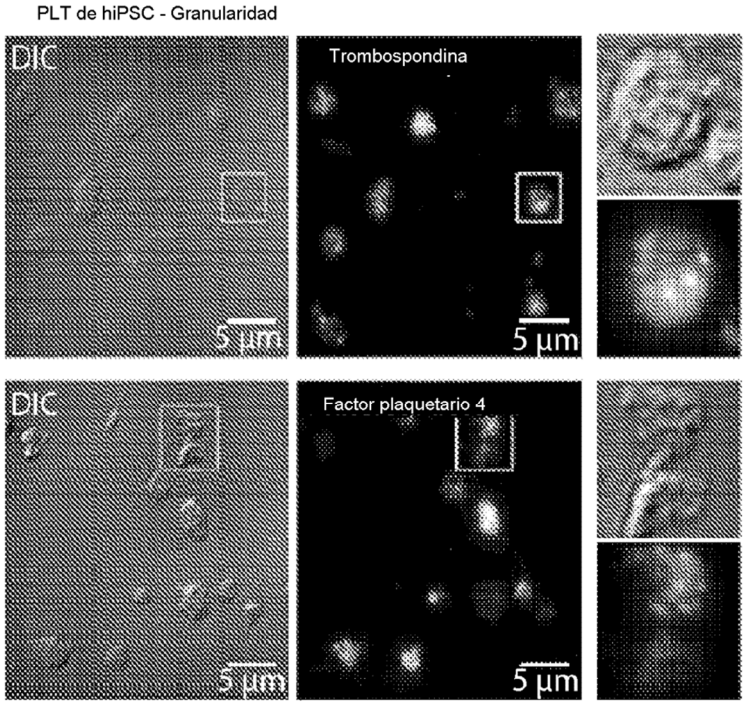


Fig. 10B

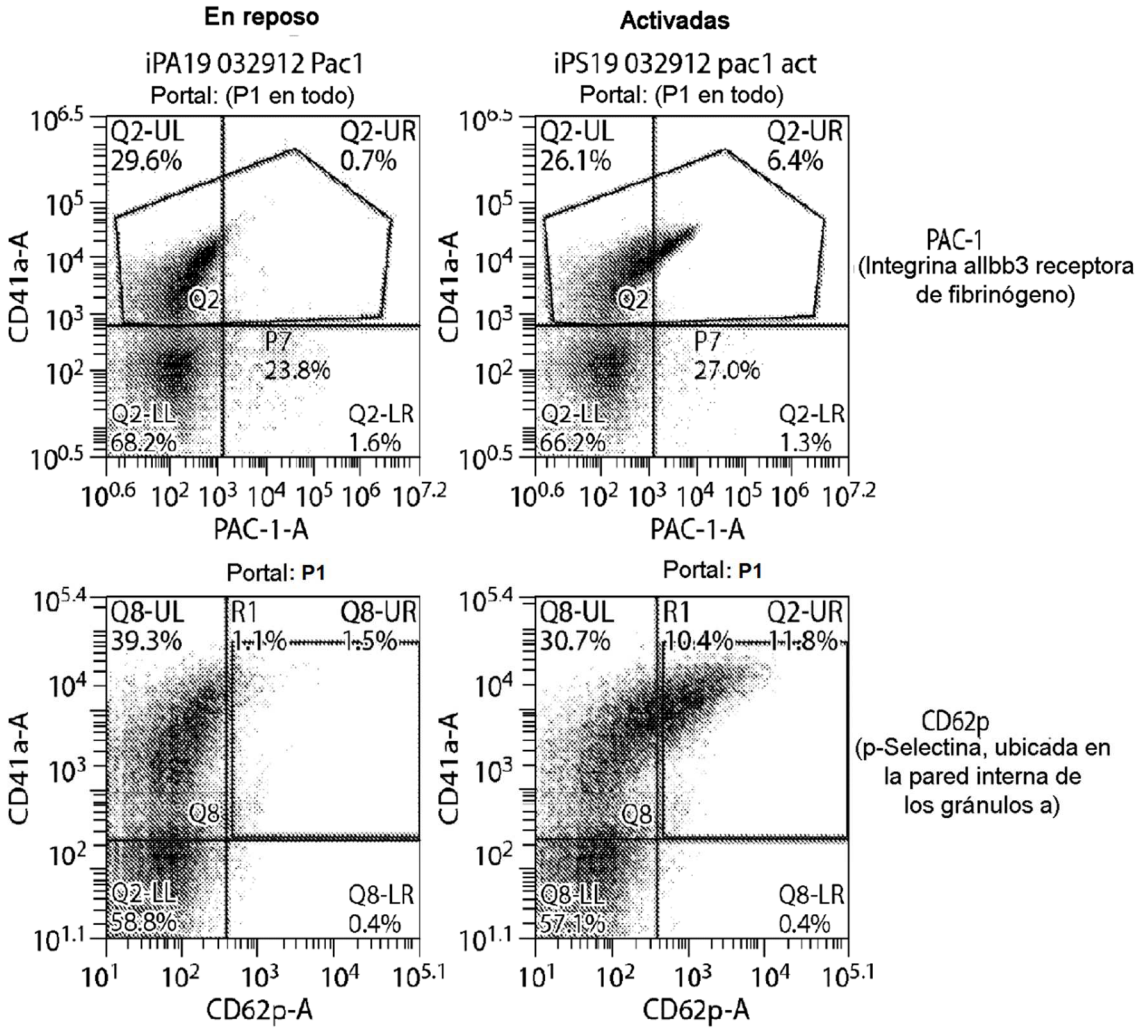

En reposo
Activadas
iPA19 032912 Pac1
Portal: (P1 en todo)
iPS19 032912 pac1 act
Portal: (P1 en todo)
Q2-UL
29.6%
Q2-UR
0.7%
Q2
P7
23.8%
Q2-LL
68.2%
Q2-LR
1.6%
Q2-UL
26.1%
Q2-UR
6.4%
Q2
P7
27.0%
Q2-LL
66.2%
Q2-LR
1.3%
CD41a-A
PAC-1-A
PAC-1
(Integrina allbb3 receptora de fibrinógeno)
Portal: P1
Portal: P1
Q8-UL
39.3%
R1
1.1%
Q8-UR
1.5%
Q8
Q2-LL
58.8%
Q8-LR
0.4%
Q8-UL
30.7%
R1
10.4%
Q2-UR
11.8%
Q8
Q8-LL
57.1%
Q8-LR
0.4%
CD62p-A
CD62p
(p-Selectina, ubicada en la pared interna de los gránulos a)

Fig. 11

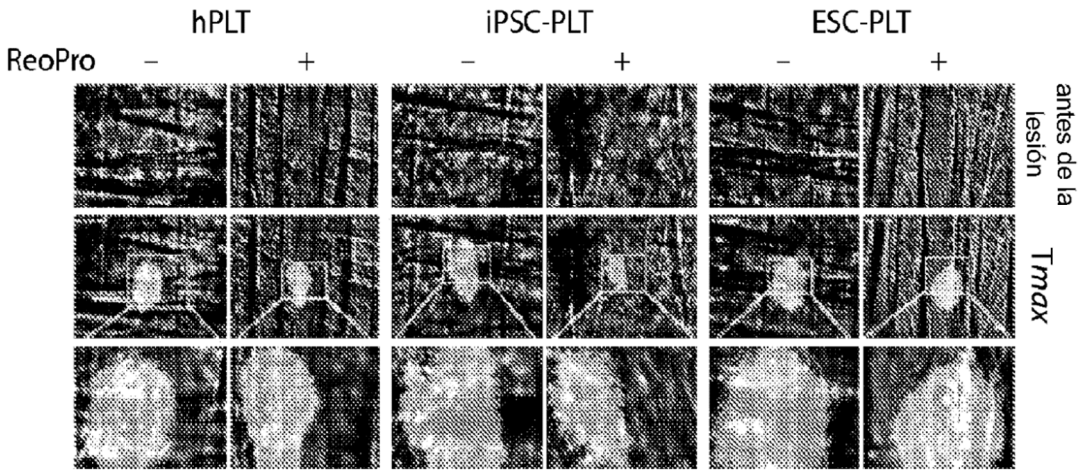


Fig. 12A

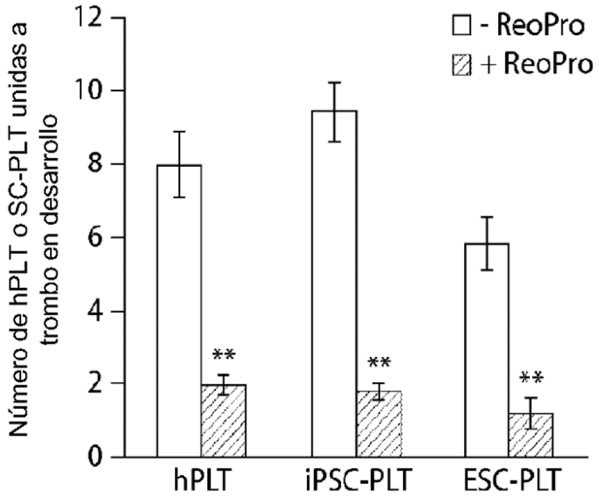


Fig. 12B

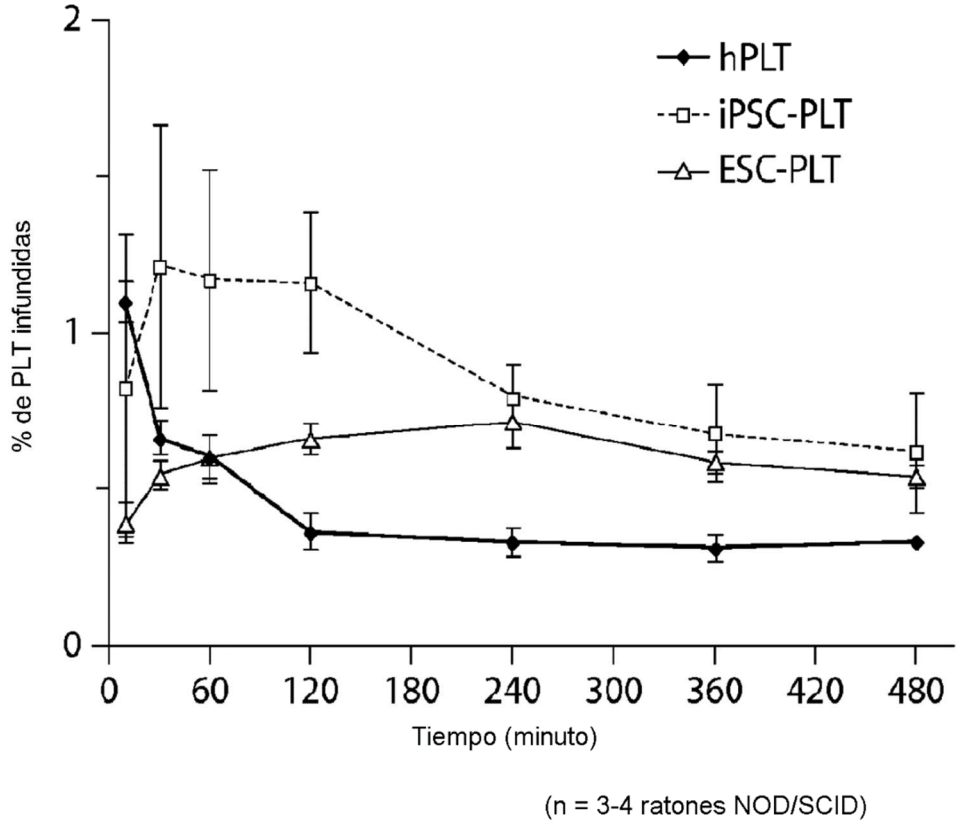

hPLT
iPSC-PLT
ESC-PLT
% de PLT infundidas
2
1
0
0
60
120
180
240
300
360
420
480
Tiempo (minuto)
(n = 3-4 ratones NOD/SCID)

Fig. 13

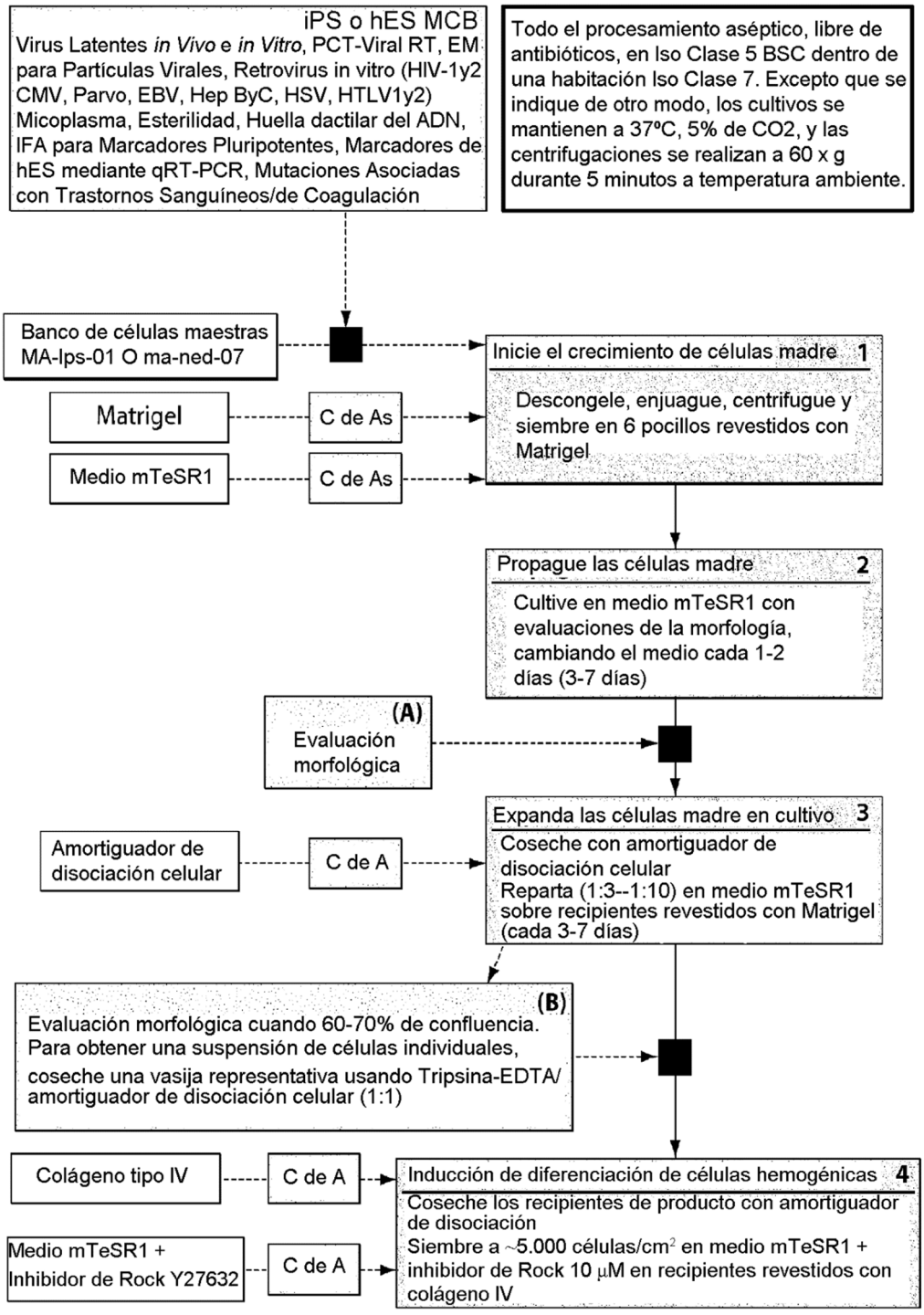

iPS o hES MCB
Virus Latentes *in Vivo* e *in Vitro*, PCT-Viral RT, EM para Partículas Virales, Retrovirus in vitro (HIV-1y2 CMV, Parvo, EBV, Hep ByC, HSV, HTLV1y2) Micoplasma, Esterilidad, Huella dactilar del ADN, IFA para Marcadores Pluripotentes, Marcadores de hES mediante qRT-PCR, Mutaciones Asociadas con Trastornos Sanguíneos/de Coagulación
Todo el procesamiento aséptico, libre de antibióticos, en Iso Clase 5 BSC dentro de una habitación Iso Clase 7. Excepto que se indique de otro modo, los cultivos se mantienen a 37ºC, 5% de CO2, y las centrifugaciones se realizan a 60 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
Banco de células maestras MA-Ips-01 O ma-ned-07
Matrigel
C de As
Medio mTeSR1
C de As
Inicie el crecimiento de células madre 1
Descongele, enjuague, centrifugue y siembre en 6 pocillos revestidos con Matrigel
Propague las células madre 2
Cultive en medio mTeSR1 con evaluaciones de la morfología, cambiando el medio cada 1-2 días (3-7 días)
(A)
Evaluación morfológica
Amortiguador de disociación celular
C de A
Expanda las células madre en cultivo 3
Coseche con amortiguador de disociación celular
Reparta (1:3--1:10) en medio mTeSR1 sobre recipientes revestidos con Matrigel (cada 3-7 días)
(B)
Evaluación morfológica cuando 60-70% de confluencia. Para obtener una suspensión de células individuales, coseche una vasija representativa usando Tripsina-EDTA/ amortiguador de disociación celular (1:1)
Colágeno tipo IV
C de A
Medio mTeSR1 + Inhibidor de Rock Y27632
C de A
Inducción de diferenciación de células hemogénicas 4
Coseche los recipientes de producto con amortiguador de disociación
Siembre a ~5.000 células/cm² en medio mTeSR1 + inhibidor de Rock 10 μM en recipientes revestidos con colágeno IV

Fig. 14A

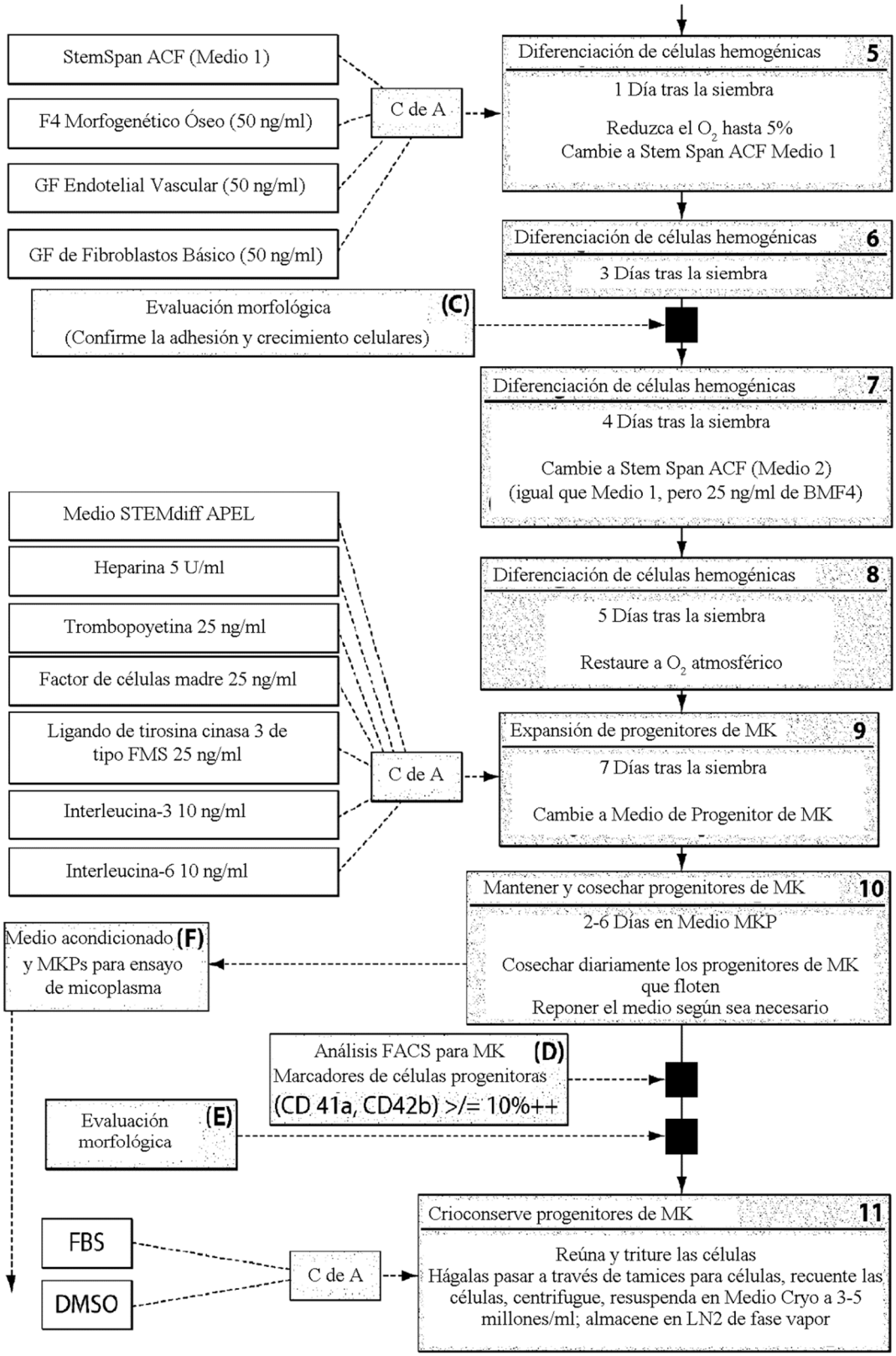

StemSpan ACF (Medio 1)
F4 Morfogenético Óseo (50 ng/ml)
GF Endotelial Vascular (50 ng/ml)
GF de Fibroblastos Básico (50 ng/ml)
C de A
Diferenciación de células hemogénicas 5
1 Día tras la siembra
Reduzca el O2 hasta 5%
Cambie a Stem Span ACF Medio 1
Diferenciación de células hemogénicas 6
3 Días tras la siembra
Evaluación morfológica (C)
(Confirme la adhesión y crecimiento celulares)
Diferenciación de células hemogénicas 7
4 Días tras la siembra
Cambie a Stem Span ACF (Medio 2)
(igual que Medio 1, pero 25 ng/ml de BMF4)
Medio STEMdiff APEL
Heparina 5 U/ml
Trombopoyetina 25 ng/ml
Factor de células madre 25 ng/ml
Ligando de tirosina cinasa 3 de tipo FMS 25 ng/ml
Interleucina-3 10 ng/ml
Interleucina-6 10 ng/ml
C de A
Diferenciación de células hemogénicas 8
5 Días tras la siembra
Restaure a O2 atmosférico
Expansión de progenitores de MK 9
7 Días tras la siembra
Cambie a Medio de Progenitor de MK
Mantener y cosechar progenitores de MK 10
2-6 Días en Medio MKP
Cosechar diariamente los progenitores de MK que floten
Reponer el medio según sea necesario
Medio acondicionado (F) y MKPs para ensayo de micoplasma
Análisis FACS para MK (D)
Marcadores de células progenitoras
(CD 41a, CD42b) >/= 10%++
Evaluación morfológica (E)
FBS
DMSO
C de A
Crioconserve progenitores de MK 11
Reúna y triture las células
Hágalas pasar a través de tamices para células, recuente las células, centrifugue, resuspenda en Medio Cryo a 3-5 millones/ml; almacene en LN2 de fase vapor

Fig. 14B

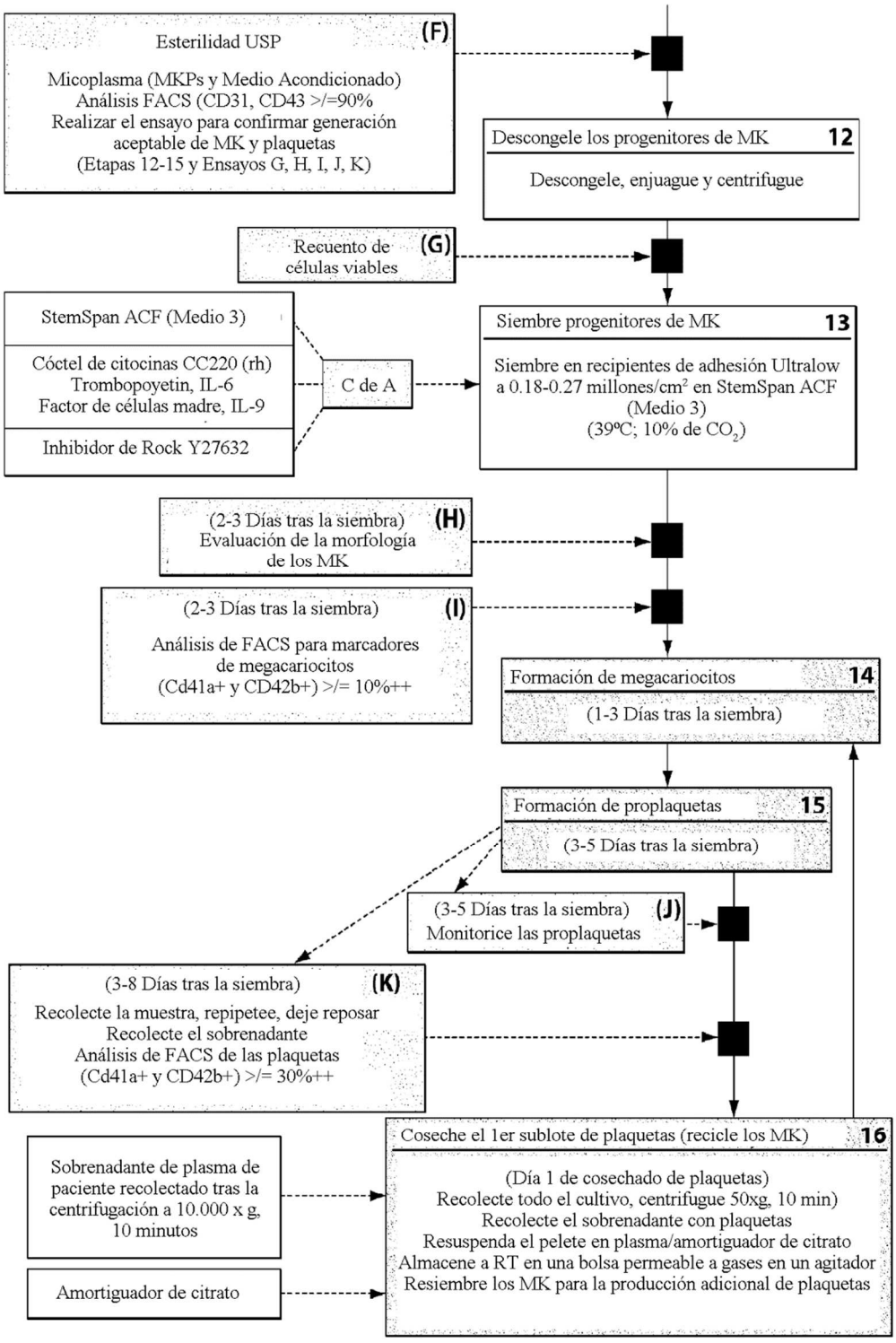

Esterilidad USP
(F)
Micoplasma (MKPs y Medio Acondicionado)
Análisis FACS (CD31, CD43 >/=90%
Realizar el ensayo para confirmar generación aceptable de MK y plaquetas
(Etapas 12-15 y Ensayos G, H, I, J, K)
Descongele los progenitores de MK
12
Descongele, enjuague y centrifugue
Recuento de células viables
(G)
StemSpan ACF (Medio 3)
Cóctel de citocinas CC220 (rh)
Trombopoyetin, IL-6
Factor de células madre, IL-9
Inhibidor de Rock Y27632
C de A
Siembre progenitores de MK
13
Siembre en recipientes de adhesión Ultralow a 0.18-0.27 millones/cm2 en StemSpan ACF (Medio 3)
(39ºC; 10% de CO2)
(2-3 Días tras la siembra)
Evaluación de la morfología de los MK
(H)
(2-3 Días tras la siembra)
Análisis de FACS para marcadores de megacariocitos
(Cd41a+ y CD42b+) >/= 10%++
(I)
Formación de megacariocitos
14
(1-3 Días tras la siembra)
Formación de proplaquetas
15
(3-5 Días tras la siembra)
(3-5 Días tras la siembra)
Monitorice las proplaquetas
(J)
(3-8 Días tras la siembra)
Recolecte la muestra, repipetee, deje reposar
Recolecte el sobrenadante
Análisis de FACS de las plaquetas
(Cd41a+ y CD42b+) >/= 30%++
(K)
Coseche el 1er sublote de plaquetas (recicle los MK)
16
(Día 1 de cosechado de plaquetas)
Recolecte todo el cultivo, centrifugue 50xg, 10 min)
Recolecte el sobrenadante con plaquetas
Resuspenda el pelete en plasma/amortiguador de citrato
Almacene a RT en una bolsa permeable a gases en un agitador
Resiembre los MK para la producción adicional de plaquetas
Sobrenadante de plasma de paciente recolectado tras la centrifugación a 10.000 x g, 10 minutos
Amortiguador de citrato

Fig 14C

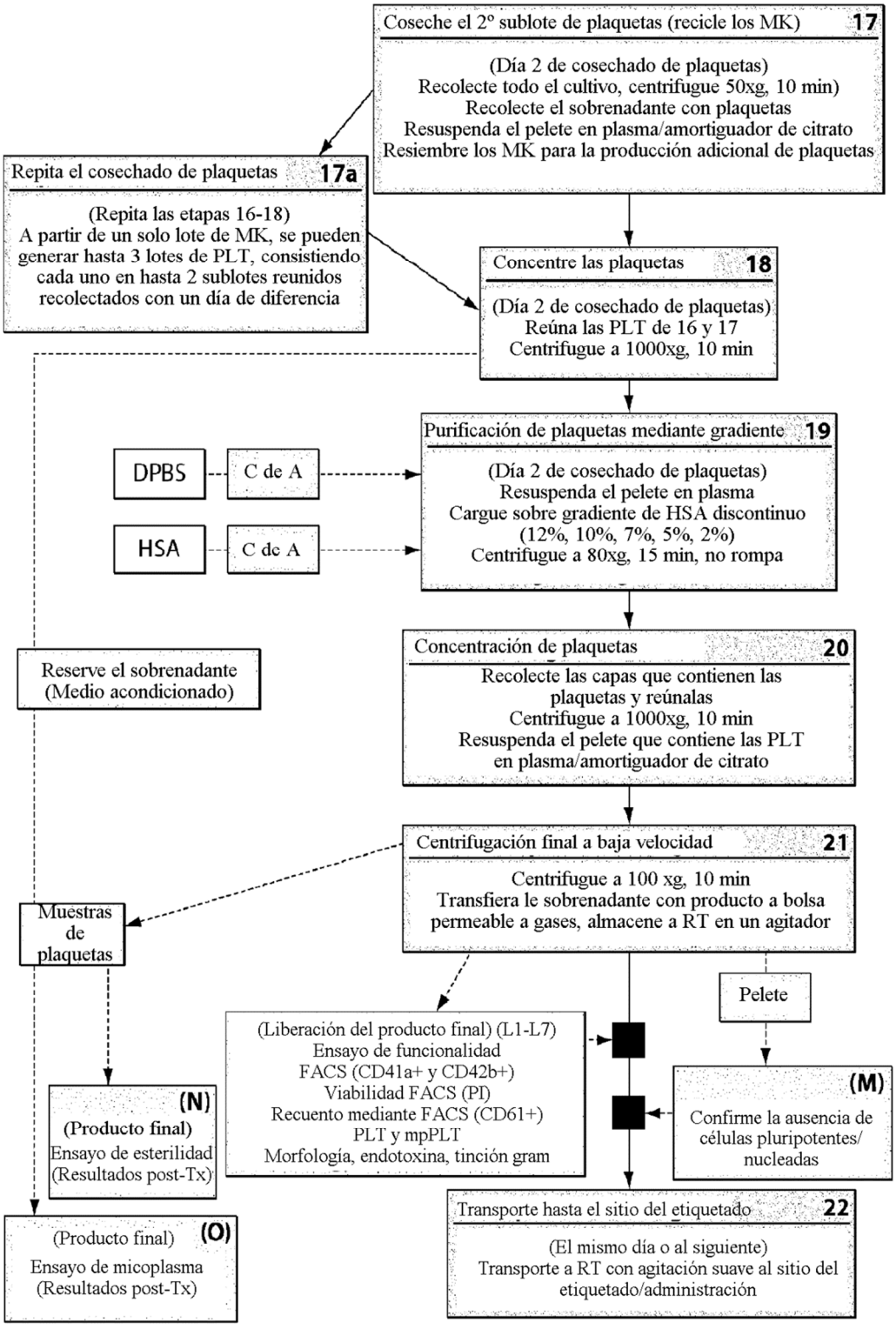

Coseche el 2º sublote de plaquetas (recicle los MK) 17
(Día 2 de cosechado de plaquetas)
Recolecte todo el cultivo, centrifugue 50xg, 10 min)
Recolecte el sobrenadante con plaquetas
Resuspenda el pelete en plasma/amortiguador de citrato
Resiembre los MK para la producción adicional de plaquetas
Repita el cosechado de plaquetas 17a
(Repita las etapas 16-18)
A partir de un solo lote de MK, se pueden generar hasta 3 lotes de PLT, consistiendo cada uno en hasta 2 sublotes reunidos recolectados con un día de diferencia
Concentre las plaquetas 18
(Día 2 de cosechado de plaquetas)
Reúna las PLT de 16 y 17
Centrifugue a 1000xg, 10 min
Purificación de plaquetas mediante gradiente 19
(Día 2 de cosechado de plaquetas)
Resuspenda el pelete en plasma
Cargue sobre gradiente de HSA discontinuo
(12%, 10%, 7%, 5%, 2%)
Centrifugue a 80xg, 15 min, no rompa
DPBS
C de A
HSA
C de A
Reserve el sobrenadante
(Medio acondicionado)
Concentración de plaquetas 20
Recolecte las capas que contienen las plaquetas y reúnalas
Centrifugue a 1000xg, 10 min
Resuspenda el pelete que contiene las PLT en plasma/amortiguador de citrato
Centrifugación final a baja velocidad 21
Centrifugue a 100 xg, 10 min
Transfiera le sobrenadante con producto a bolsa permeable a gases, almacene a RT en un agitador
Muestras de plaquetas
Pelete
(Liberación del producto final) (L1-L7)
Ensayo de funcionalidad
FACS (CD41a+ y CD42b+)
Viabilidad FACS (PI)
Recuento mediante FACS (CD61+)
PLT y mpPLT
Morfología, endotoxina, tinción gram
(N)
(Producto final)
Ensayo de esterilidad
(Resultados post-Tx)
(M)
Confirme la ausencia de células pluripotentes/ nucleadas
Transporte hasta el sitio del etiquetado 22
(El mismo día o al siguiente)
Transporte a RT con agitación suave al sitio del etiquetado/administración
(Producto final) (O)
Ensayo de micoplasma
(Resultados post-Tx)

Fig 14D

¿10 placas de MKP (~100 millones MKP) generan ~ 5 placas de MK que producen ~ 50-75 millones de MK durante tres días?

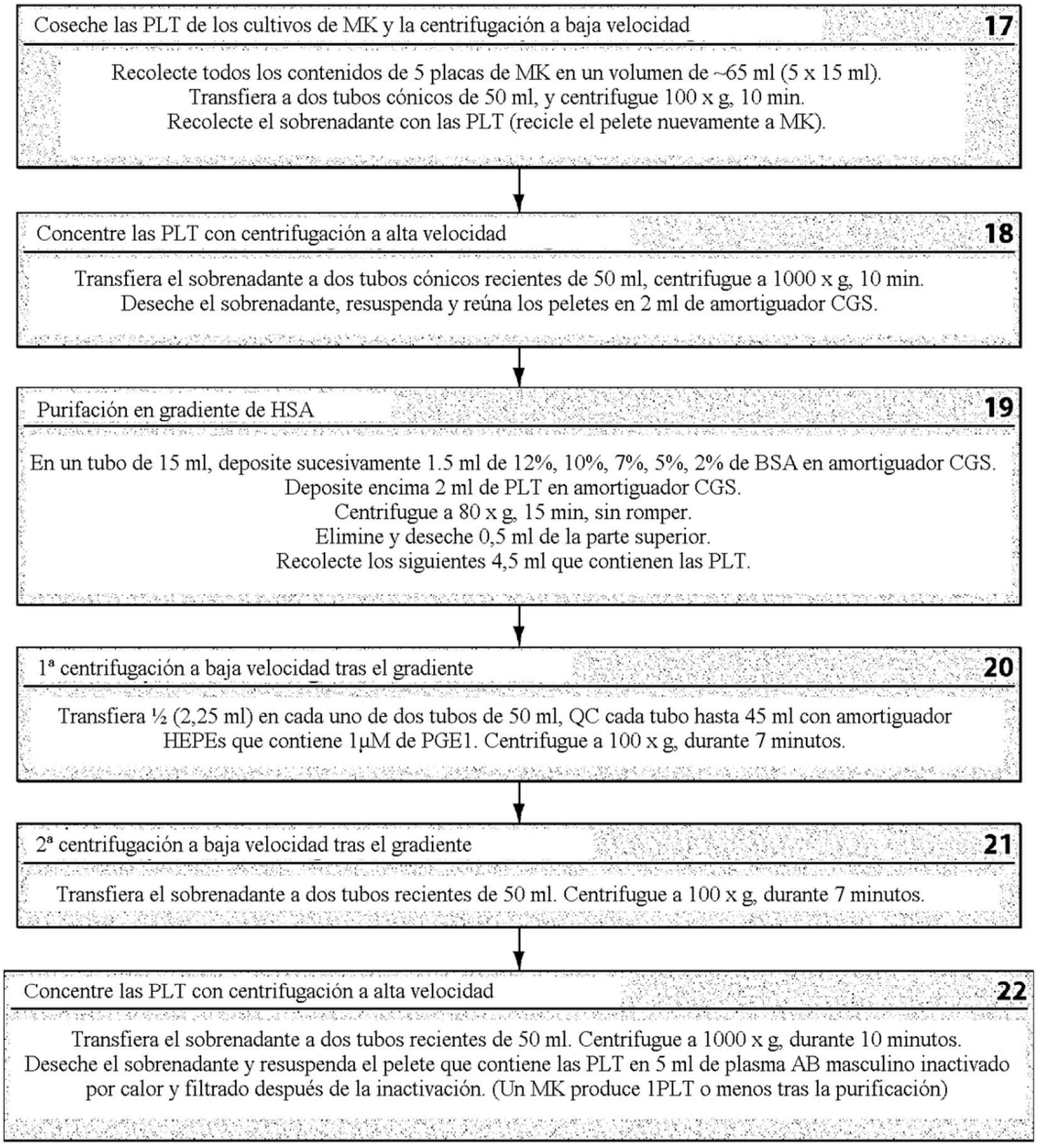


Fig. 14E

Análisis de FACS, CD41a, CD42b – MKP derivados de hiPSC

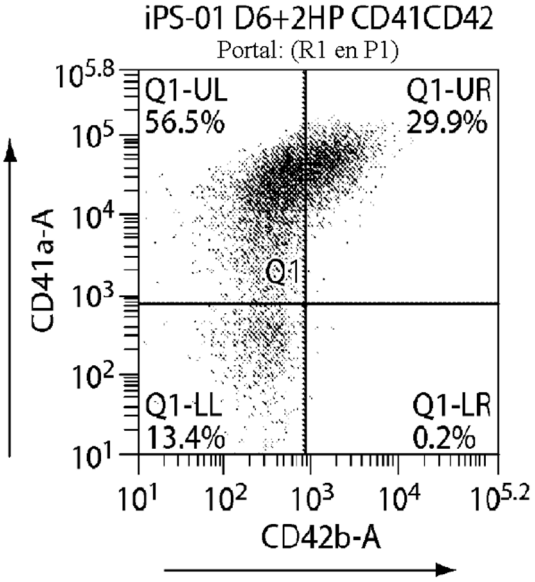


Fig. 15

MKP representativos derivados de hiPSC

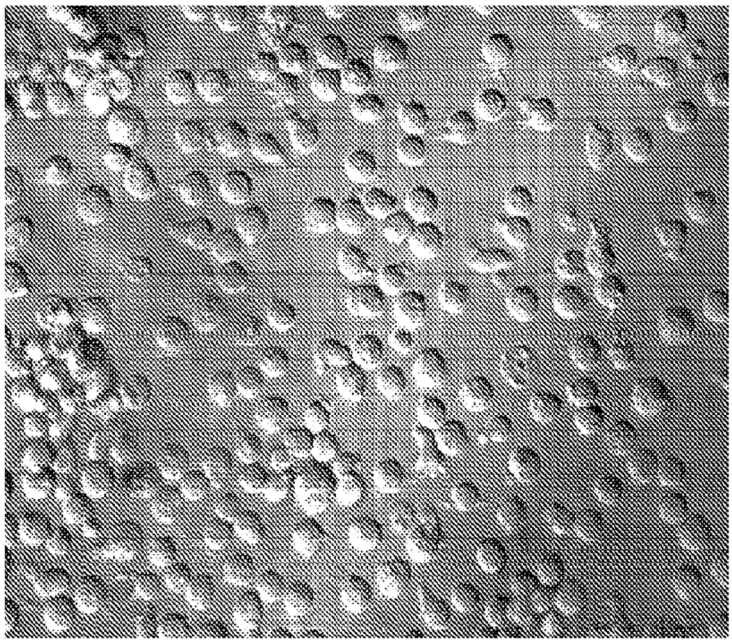


Fig. 16

Análisis de FACS, CD31+, CD43+ – MKP derivados de hiPSC

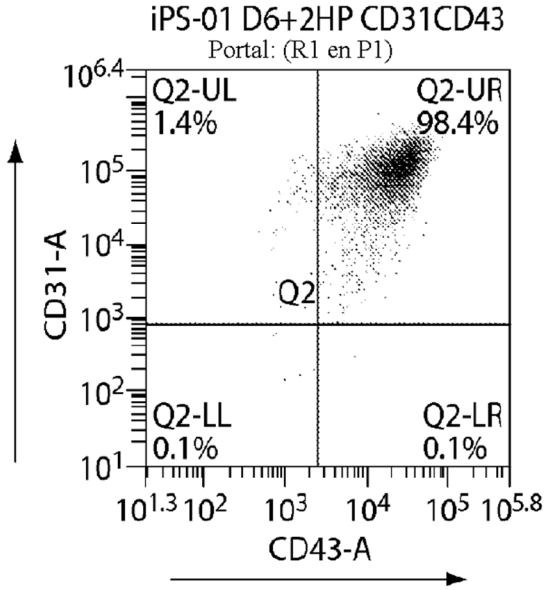


Fig. 17

MKP representativos derivados de hESC

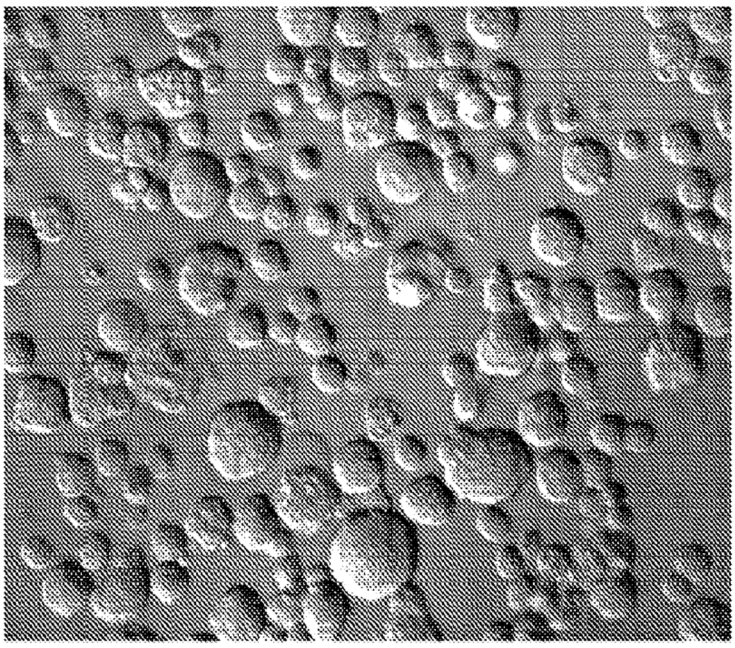


Fig. 18

Formación de proplaquetas a partir de MK

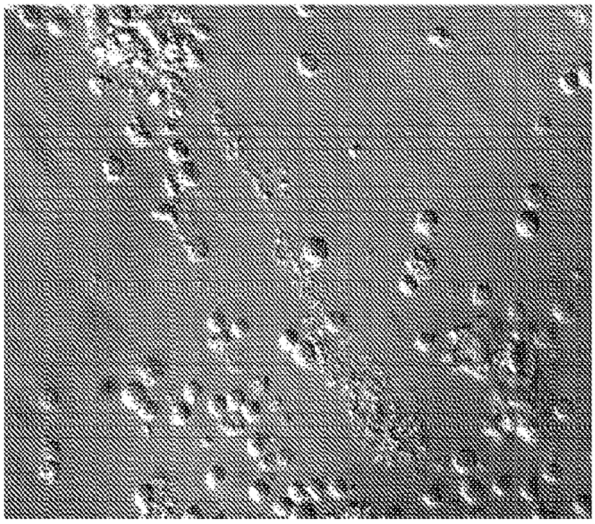


Fig. 19

Análisis de FACS, CD41a, CD42b

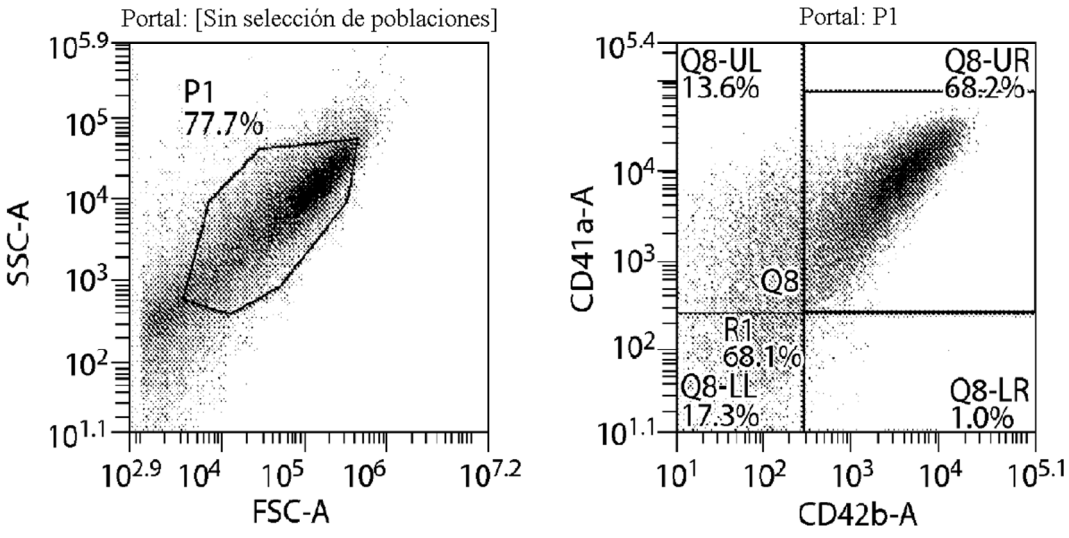


Fig. 20

Microscopía DIC con tinción con β1-tubulina, PLT de donante humano (arriba) hESC-PLT (abajo)

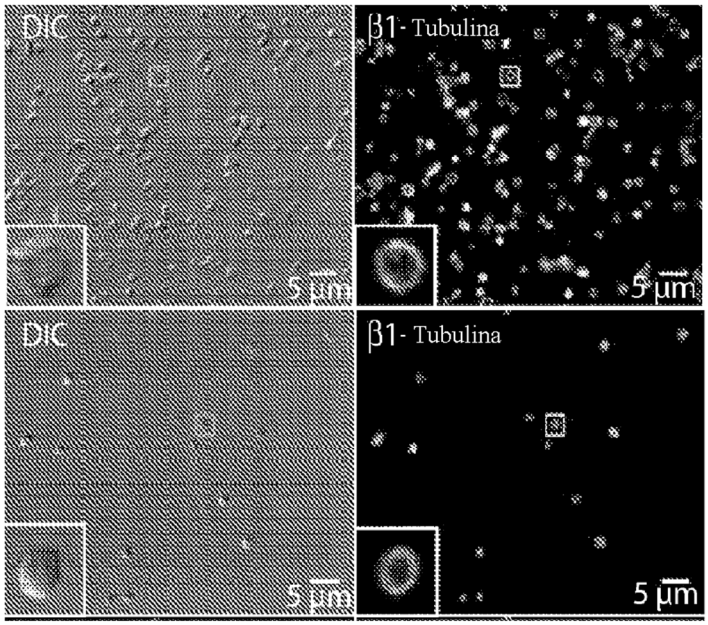


Fig. 21

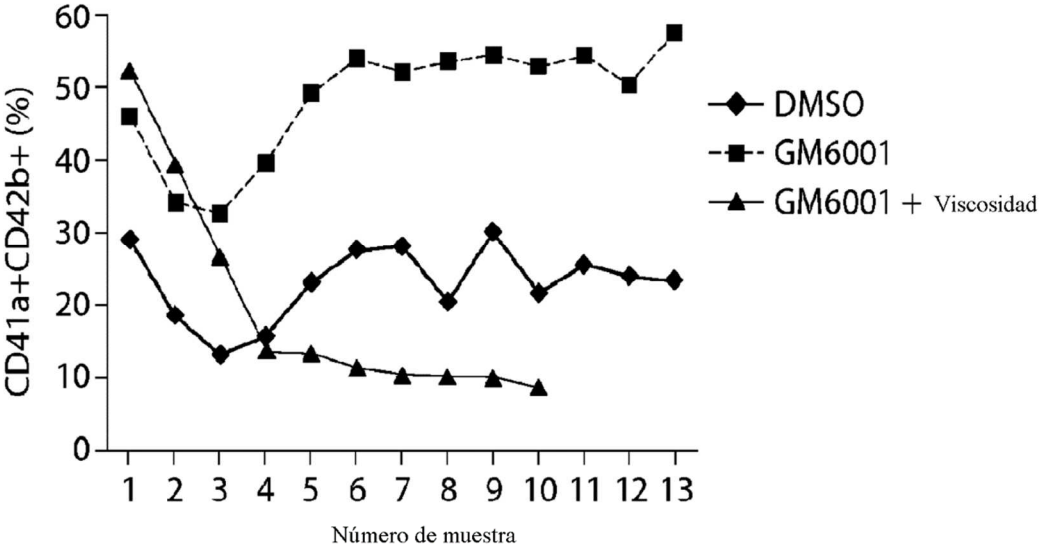

CD41a+CD42b+ (%)
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Número de muestra
DMSO
GM6001
GM6001 + Viscosidad

Fig. 22

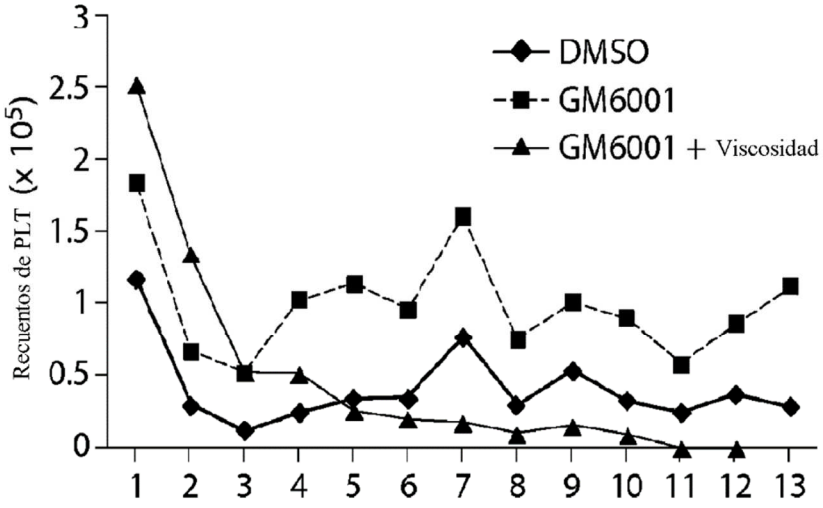

Recuentos de PLT (x 10⁵)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
DMSO
GM6001
GM6001 + Viscosidad

Fig. 23

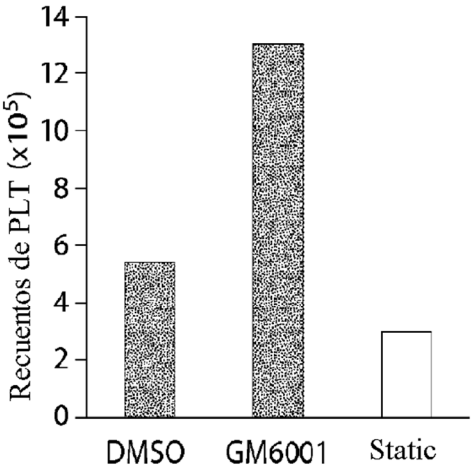


Fig. 24

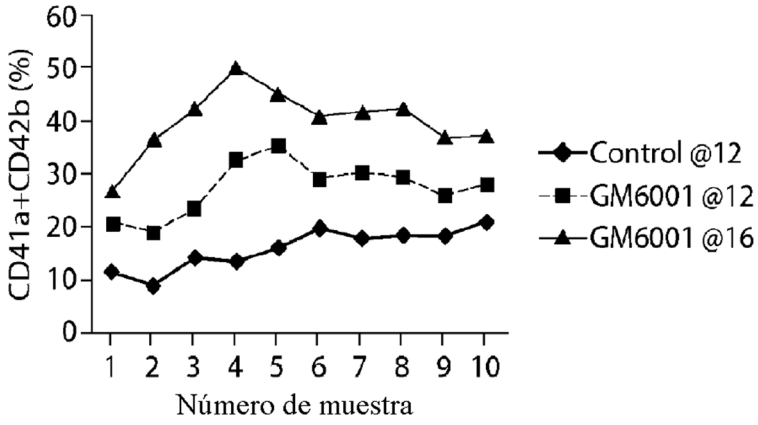


Fig. 25

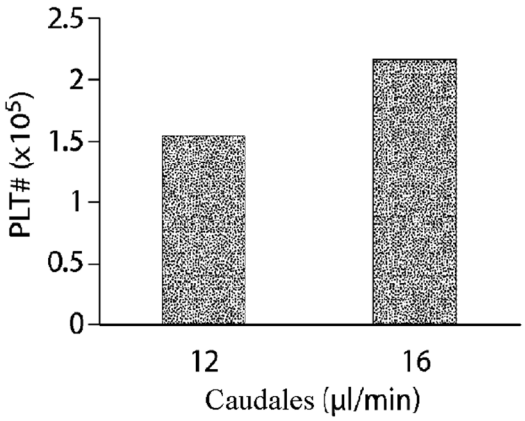


Fig. 26

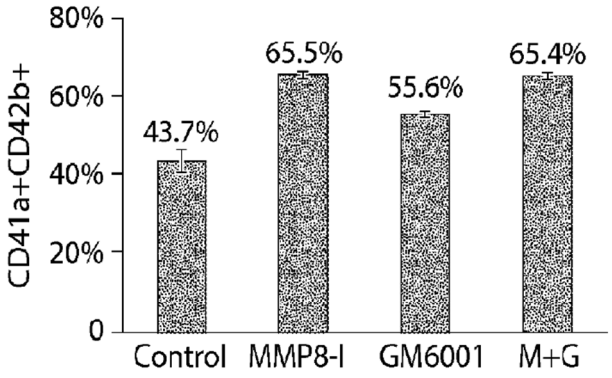


Fig. 27

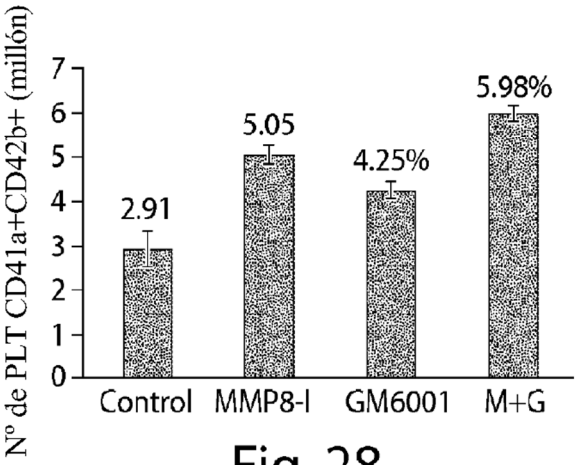


Fig. 28

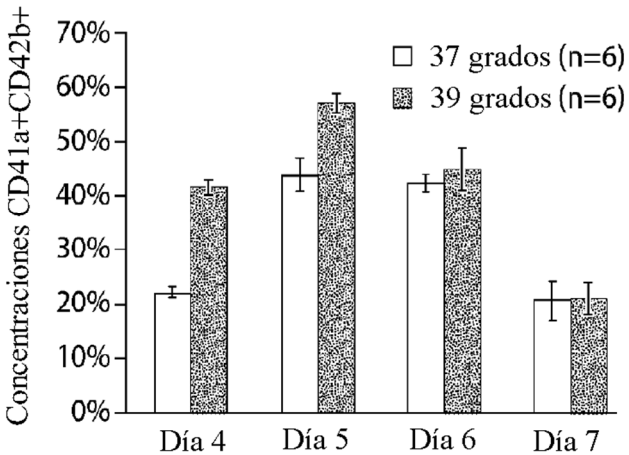


Fig. 29

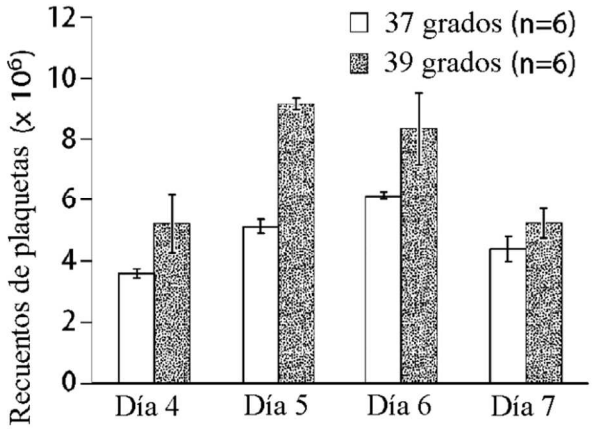


Fig. 30

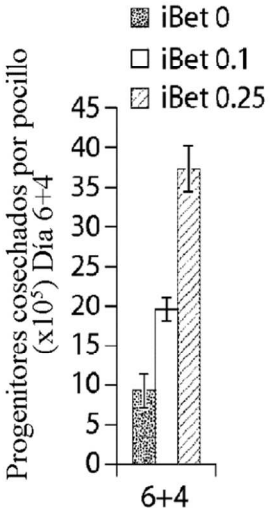


Fig. 31

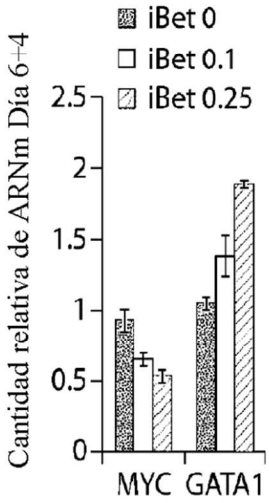


Fig. 32

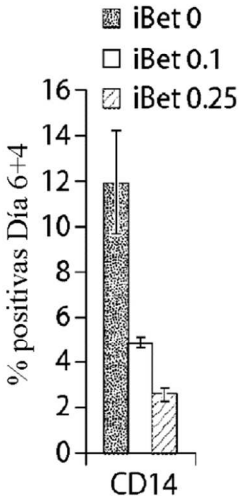


Fig. 33