



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112012005710-3 B1**



**(22) Data do Depósito:** 15/09/2010

**(45) Data de Concessão:** 09/06/2020

**(54) Título:** MÉTODO PARA PRODUZIR CÉLULAS MEGACARIOTÍCAS MADURAS, MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE PLAQUETA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO SANGUÍNEO, POPULAÇÃO CELULAR, COMPOSIÇÃO CELULAR CONGELADA E KIT

**(51) Int.Cl.:** C12N 5/0789; A61K 35/14; A61P 7/00; C12N 5/10; C12N 15/09.

**(30) Prioridade Unionista:** 15/09/2009 JP 2009-213645.

**(73) Titular(es):** THE UNIVERSITY OF TOKYO.

**(72) Inventor(es):** KOJI ETO; NAOYA TAKAYAMA; SOU NAKAMURA; HIROMITSU NAKAUCHI.

**(86) Pedido PCT:** PCT JP2010065903 de 15/09/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/034073 de 24/03/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 14/03/2012

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA PRODUZIR CÉLULAS MEGACARIOTÍCAS MADURAS, MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE PLAQUETAS E MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO SANGUÍNEO A presente invenção tem um objetivo de fornecer um método para produzir células específicas através da amplificação de células em um estágio de diferenciação desejado. A presente invenção fornece um método para produzir células específicas através da indução da diferenciação de células, em que um oncogene é expresso de modo forçado em células em um estágio de diferenciação desejado para amplificar as células no estágio de diferenciação desejado. A presente invenção também fornece um método para produzir células específicas, em que a senescência induzida por oncogene (OIS) que é induzida pelo oncogene expresso nas células no estágio de diferenciação desejado é suprimida.

**“MÉTODO PARA PRODUZIR CÉLULAS MEGACARIOCÍTICAS MADURAS, MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE PLAQUETAS E MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO SANGUÍNEO”.**

**Campo da Técnica**

[001] A presente invenção refere-se a um método para produzir células diferenciadas específicas, e a uma célula produzida através do método. A presente invenção refere-se, em particular, a um método para produzir células sanguíneas diferenciadas, e a uma célula sanguínea produzida através do método.

**Antecedentes da Técnica**

[002] Quando células específicas são necessárias para o tratamento de doenças, uma quantidade suficiente de células para atingir os objetivos do tratamento precisa ser obtida. No entanto, é difícil obter uma quantidade suficiente de células usadas para o tratamento de organismos vivos. Portanto, métodos como um método para preparar células alvo mediante a indução de diferenciação das células progenitoras das mesmas ou similares *ex vivo* estão sendo experimentados.

[003] No caso do tratamento de doenças relacionadas ao sangue ou da execução de tratamento cirúrgico, as células sanguíneas usadas para o tratamento são necessárias. De células sanguíneas, plaquetas essenciais para a coagulação do sangue (hemostase) e células megacariocíticas responsáveis pela produção de pró-plaquetas e, ainda, pela produção de plaquetas são células que são especialmente necessárias. Em particular, as plaquetas estão em grande demanda no tratamento de leucemia, transplante de medula óssea, terapia anticâncer, e similares, e existe uma necessidade significativa de um suprimento estável de plaquetas. Os métodos usados para obter plaquetas incluem não apenas um método de coletar sangue de doadores, mas também um método de administração de produtos TPO miméticos, um método para diferenciar células megacariocíticas de células mieloides ou sangue de cordão umbilical, e assim por diante. Ademais, métodos como um método para

preparar células sanguíneas a partir de células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras hematopoiéticas após a amplificação dessas células progenitoras *ex vivo* estão sendo experimentados. Exemplos de métodos relatados incluem um método para estabelecer uma linhagem de célula-tronco hematopoiética a partir de células ES de camundongo (Documento de Patente 1), um método para diferenciar células-tronco embrionárias de animais primatas em células hematopoiéticas (Documento de Patente 2), e um método para amplificar de maneira fácil e estável células CD34 positivas/CD38 negativas que sustentam a indiferenciação de células-tronco hematopoiéticas *ex vivo* (Documento de Patente 3).

[004] Ao induzir a diferenciação de células, células-tronco pluripotentes são extremamente úteis. Células-tronco pluripotentes como células ES e células iPS podem ser usadas como uma fonte para produzir artificialmente células sanguíneas como plaquetas. Nos últimos anos, o estabelecimento de células iPS tem contribuído para aumentar a atenção à utilidade de células-tronco pluripotentes como uma fonte importante para a terapia celular na medicina regenerativa. Por exemplo, Takayama *et al.* tiveram êxito na indução da diferenciação de células ES humanas em células megacariocíticas e plaquetas, o que cria uma possibilidade de usar plaquetas diferenciadas de células ES como uma fonte de transfusão de plaquetas (Documento de Patente 4 e Documento não Patente 1). Os inventores estabeleceram ainda um método de preparar células megacariocíticas e plaquetas a partir de células iPS, tornando possível resolver um problema de correspondência de antígeno de leucócito humano (HLA) inevitável na transfusão de plaquetas derivadas de célula ES. Embora o suprimento estável de uma quantidade suficiente de plaquetas através de doação de sangue tenha sido convencionalmente difícil devido a fatores como uma escassez crônica de doadores, esse problema parece ser solucionável mediante a indução de diferenciação de plaquetas a partir de células ES ou células iPS. De acordo com os métodos propostos até este ponto, no entanto, apenas uma quantidade pequena de plaquetas pode

ser preparada a partir de células iPS ou células ES, e também uma série de operações para a produção precisa ser executada cada vez. É necessário, portanto, fornecer um método eficiente e melhorado para garantir uma estabilidade quantitativa de plaquetas.

[005] Tal problema que precisa ser solucionado com a finalidade de suprir de maneira estável uma quantidade suficiente de células sanguíneas, como células megacariocíticas e plaquetas também, pode ser encontrado no suprimento de outros tipos de células.

[006] Assim, até mesmo no caso de preparar células desejadas mediante a indução de diferenciação de células, ainda não é fácil preparar células progenitoras de células desejadas em grande quantidade, de modo que no presente existe dificuldade para obter uma quantidade suficiente de células desejadas diferenciadas pelo terminal.

Documentos da Técnica Anterior

Documentos de Patente

[007] Documento de Patente 1: Pedido de Patente japonesa publicada Nº 2006-141356

[008] Documento de Patente 2: Pedido de Patente japonesa publicada Nº 2004-350601

[009] Documento de Patente 3: Pedido de Patente japonesa publicada Nº 2006-61106

[0010] Documento de Patente 4: WO2008/041370

Documentos não Patentes

[0011] Documento não Patente 1: Takayama *et al.*, *Blood*, 111: 5298-5306, 2008

Sumário da Invenção

Problemas a serem solucionados pela invenção

[0012] Em relação às células sanguíneas, os presentes inventores estabeleceram o método para obter megacariocíticas e plaquetas a partir de células iPS. Mediante a aplicação clínica desse método, no entanto, o método

precisa ser melhorado de modo que as megacariocíticas e as plaquetas possam ser produzidas em grande quantidade. Também é importante permitir que as plaquetas sejam supridas rápida e estavelmente de acordo com a necessidade, para realizar futuras aplicações clínicas.

[0013] Tendo em vista as circunstâncias acima mencionadas, a presente invenção fornece um método para produzir células alvo através da indução de diferenciação de células, pelo aumento da habilidade de proliferação de células em um estágio de diferenciação desejado e amplificação das células para produzir as células alvo a partir das células.

[0014] A presente invenção também fornece a célula sanguínea diferenciada desejada pelo uso desse método. Em particular, a presente invenção fornece uma célula progenitora megacariocítica com habilidade elevada de proliferação que é uma célula sanguínea que serve como uma fonte de células megacariocíticas e plaquetas adultas, e um método para produzir tais células megacariocíticas progenitoras.

[0015] Ademais, a presente invenção tem um objetivo de fornecer um método para produzir células megacariocíticas e plaquetas adultas a partir das células megacariocíticas progenitoras estavelmente e em grande quantidade, e uma célula megacariocítica adulta produzida por esse método e uma plaqueta induzida por diferenciação a partir da célula megacariocítica adulta.

[0016] A presente invenção também tem um objetivo de fornecer um método para produzir células eritroides e uma célula eritroide produzida por esse método, dado que o suprimento estável de células eritroides é igualmente requerido como com plaquetas.

[0017] A presente invenção tem um objetivo adicional de fornecer um método de preservação a longo prazo de células megacariocíticas progenitoras, isto é, células em um estado imaturo de células megacariocíticas adultas que são células progenitoras de plaquetas.

#### Meios para Resolver os Problemas

[0018] Como um resultado da comparação a produtividade de

megacariocíticas e plaquetas de células iPS estabelecida pelo uso de quatro genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) e células iPS estabelecidas pelo uso de três genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4) outro que c-MYC, os presentes inventores tem encontrado que as células iPS pelo uso de quatro genes produzem megacariocíticas e plaquetas significativamente de modo mais eficiente. Os presentes inventores também têm encontrado que, através da expressão dos quatro genes introduzidos mediante o estabelecimento é suprimido em células iPS, a reativação do gene c-MYC é induzida com diferenciação megacariocítica, que é relacionado a um aumento na quantidade de produção de megacariocíticas. Os presentes inventores encontraram adicionalmente que as células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização em que o gene c-MYC é forçosamente expresso, adquire capacidade elevada de proliferação.

[0019] Tipicamente, no caso em que um oncogene tal como c-MYC é superexpresso em células, a progressão de ciclo de célula ocorre e a proliferação é ativada. Sabe-se que as células percebem essa proliferação como estresse, e induzem uma resposta de defesa (senescência induzida por oncogene: OIS) para suprimir o estresse, e deste modo suprime a proliferação excessiva de célula. Os presentes inventores notaram que esse fenômeno, e descobriam adicionalmente um método para produzir células diferenciadas específicas em grande quantidade mediante a regulação de OIS de células em um estágio de diferenciação.

[0020] A presente invenção foi terminada com base nas revelações acima mencionadas.

[0021] Isto é, a presente invenção refere-se ao seguinte de (1) a (30).

[0022] (1) Um método para produzir células específicas mediante a indução de diferenciação de células, em que um oncogene é forçosamente expresso em células em um estágio de diferenciação desejado para amplificar as células no estágio de diferenciação desejado.

[0023] (2) O método para produzir células específicas de acordo com o

acima mencionado (1), em que a senescência induzida por oncogene que é induzida pela expressão forçada do oncogene nas células no estágio de diferenciação desejado é suprimido.

[0024](3) O método para produzir células específicas de acordo com o acima mencionado (1) ou (2), em que a supressão da senescência induzida por oncogene é atingida mediante a expressão de um gene polycomb.

[0025](4) O método para produzir células específicas de acordo com qualquer dentre o acima mencionado de (1) a (3), em que as células no estágio de diferenciação desejado são células induzidas por diferenciação a partir de células ES ou células iPS.

[0026](5) O método para produzir células específicas de acordo com qualquer do acima mencionado de (1) a (4), em que um oncogene exógeno é introduzido ou um oncogene e um gene polycomb são introduzidos nas células no estágio de diferenciação desejado, e o oncogene introduzido ou o oncogene introduzido e o gene polycomb são forçosamente expressos.

[0027](6) O método para produzir células específicas de acordo com o acima mencionado (5), em que o oncogene exógeno ou o gene polycomb é introduzido em células progenitoras das células no estágio de diferenciação desejado, e o oncogene introduzido ou o oncogene introduzido e o gene polycomb são forçosamente expressos.

[0028](7) O método para produzir células específicas de acordo com o acima mencionado (5) ou (6), em que o oncogene e/ou o gene polycomb são cada um ligados de maneira operacional a um lado à jusante de um promotor induzível, e o oncogene ligado ou o oncogene ligado e o gene polycomb são forçosamente expressos de maneira induzível.

[0029](8) O método para produzir células específicas de acordo com qualquer do acima mencionado de (5) a (7), em que a expressão do oncogene ou a expressão do oncogene e o gene polycomb nas células no estágio de diferenciação desejado é suprimido para promover a diferenciação das células no estágio de diferenciação desejado.

[0030](9) O método para produzir células específicas de acordo com o acima mencionado (8), em que a supressão da expressão do oncogene ou a expressão do oncogene e o gene polycomb é atingida mediante a ligação de maneira operacional do oncogene ou do oncogene e do gene polycomb cada um a um lado à jusante de um promotor superexpressivo para desse modo suprimir a expressão do oncogene ou a expressão do oncogene e do gene polycomb.

[0031](10) O método para produzir células específicas de acordo com qualquer do acima mencionado de (1) a (9), em que o oncogene é um gene da família MYC.

[0032](11) O método para produzir células específicas de acordo com qualquer do acima mencionado de (3) a (10), em que o gene polycomb é BMI1.

[0033](12) O método para produzir células específicas de acordo com qualquer do acima mencionado de (6) a (11), em que as células progenitoras das células no estágio de diferenciação desejado são células progenitoras hematopoiéticas, as células no estágio de diferenciação desejado são células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização, e as células específicas são células megacariocíticas adultas.

[0034](13) O método para produzir células específicas de acordo com qualquer do acima mencionado de (6) a (11), em que as células progenitoras das células no estágio de diferenciação desejado são células progenitoras hematopoiéticas, as células no estágio de diferenciação desejado são células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização, e as células específicas são plaquetas.

[0035](14) O método para produzir células específicas de acordo com o acima mencionado (12) ou (13), em que as células progenitoras hematopoiéticas estão localizadas em uma estrutura do tipo rede preparada a partir de células ES ou células iPS.

[0036](15) Uma célula megacariocítica adulta que é uma célula específica produzida através do método de acordo com o acima mencionado



(12) ou (14).

[0037](16) Uma plaqueta que é uma célula específica produzida através do método de acordo com o acima mencionado (13) ou (14).

[0038](17) Um produto de sangue que compreende, como um ingrediente ativo, a plaqueta de acordo com o acima mencionado (16).

[0039](18) Um kit para produzir a célula megacariocítica adulta de acordo com o acima mencionado (15) ou a plaqueta de acordo com o acima mencionado (16).

[0040](19) Uma célula sanguínea em um estágio de diferenciação desejado, em que um oncogene é forçosamente expresso.

[0041](20) A célula sanguínea de acordo com o acima mencionado (19), em que um gene polycomb também é forçosamente expresso.

[0042](21) A célula sanguínea de acordo com o acima mencionado (19) ou (20), em que a célula sanguínea no estágio de diferenciação desejado é uma célula induzida por diferenciação de uma célula ES ou uma célula iPS.

[0043](22) A célula sanguínea de acordo com qualquer do acima mencionado de (19) a (21), em que um oncogene exógeno é introduzido ou um oncogene e um gene polycomb são introduzidos na célula sanguínea no estágio de diferenciação desejado, e o oncogene introduzido ou o oncogene introduzido e o gene polycomb são forçosamente expressos.

[0044](23) A célula sanguínea de acordo com o acima mencionado (22), em que o oncogene exógeno ou o gene polycomb é introduzido em uma célula progenitora da célula sanguínea no estágio de diferenciação desejado, e o oncogene introduzido ou o oncogene introduzido e o gene polycomb são forçosamente expressos.

[0045](24) A célula sanguínea de acordo com o acima mencionado (22) ou (23), em que o oncogene e/ou o gene polycomb são, cada um, ligado de maneira operacional a um lado à jusante de um promotor induzível, e o oncogene ligado ou o oncogene ligado e o gene polycomb são forçosamente expressos de maneira induzível.

[0046](25) A célula sanguínea de acordo com qualquer do acima mencionado de (19) a (24), em que o oncogene é um gene da família MYC.

[0047](26) A célula sanguínea de acordo com qualquer do acima mencionado de (20) a (25), em que o gene polycomb é BMI1.

[0048](27) A célula sanguínea de acordo com qualquer do acima mencionado de (23) a (26), em que a célula progenitora da célula sanguínea no estágio de diferenciação desejado é uma célula progenitora hematopoiética, e a célula sanguínea no estágio de diferenciação desejado é uma célula progenitora megacariocítica de pré-multinucleação.

[0049](28) A célula sanguínea de acordo com o acima mencionado (27), em que a célula progenitora hematopoiética está localizada em uma estrutura do tipo rede preparada a partir de uma célula ES ou uma célula iPS.

[0050](29) Uma composição celular congelada que compreende a célula sanguínea de acordo com qualquer do acima mencionado de (19) a (28).

[0051](30) Um kit para produzir a célula progenitora megacariocítica pré-multinucleação que é a célula sanguínea de acordo com o acima mencionado (27) ou (28).

#### Efeito Vantajoso da Invenção

[0052] De acordo com a presente invenção, é possível amplificar as células em um estágio de diferenciação desejado, e também produzir células específicas diferenciadas das células amplificadas em grande quantidade.

[0053] Adicionalmente, no caso do uso de presente invenção para a produção de células sanguíneas diferenciadas, é possível produzir células sanguíneas tal como células megacariocíticas e plaquetas a partir de células-tronco pluripotentes estáveis e em grande quantidade.

[0054] Ademais, as células sanguíneas produzidas de acordo com a presente invenção podem ser criopreservadas. Por exemplo, quando as células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização são produzidas como células sanguíneas, as células podem ser criopreservadas. Portanto, é possível suprir células megacariocíticas e plaquetas adultas

derivadas da mesma fonte de células megacariocíticas progenitoras.

[0055] Em particular, no método de acordo com a presente invenção, as células megacariocíticas progenitoras sem multiploidização (células progenitoras de células megacariocíticas adultas) que podem ser criopreservadas podem ser preparadas a partir de células iPS em grande quantidade. Pelo uso dessas células megacariocíticas progenitoras sem multiploidização como uma fonte, é possível produzir e suprir uma quantidade suficiente de plaquetas para repetidas transfusões de sangue enquanto é evitado o problema de compatibilidade de HLA.

[0056] Ademais, de acordo com a presente invenção, um método para suprir estavelmente células eritroides *in vitro* é fornecido.

#### Breve Descrição dos Desenhos

[0057] A Figura 1 é um gráfico para a comparação das quantidades de células megacariocíticas produzidas a partir das células iPS com quatro fatores e das células iPS com três fatores. O eixo geométrico vertical representa a quantidade de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de cada célula, em que a quantidade de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de célula ES no 22º dia de cultura é ajustado para 1. O eixo geométrico horizontal representa o número de dias após o início da cultura de células iPS e células ES. “3-f” indica uma linhagem de célula derivada de célula iPS com três fatores, “4-f” indica uma linhagem de célula derivada de célula iPS com quatro fatores, e “ES” indica células ES.

[0058] A Figura 2 é uma vista para confirmar a reativação de transgenes em células megacariocíticas derivadas de célula iPS humana. A expressão de cada transgene (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) em células iPS com quatro fatores (TkDA3-2, TkDA3-4, e TkDA3-5) e células iPS com três fatores (TkDN4-M) foi examinada para células iPS indiferenciadas e células megacariocíticas diferenciadas. A expressão de cada gene introduzido em fibroblasto dérmico humano (HDF) como um controle de introdução de gene também foi examinado. “endo” indica um gene endógeno, e “Tg” indica um transgene. A

expressão de REX1 e NANOG também foi examinada para células iPS indiferenciadas.

[0059]A Figura 3 mostra um aumento na quantidade de células megacariocíticas mediante a expressão forçada de c-MYC em células progenitoras hematopoiéticas derivadas de célula ES. As células progenitoras do sangue foram extraídas de uma estrutura do tipo rede no 15º dia da cultura de células ES humanas, os genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) foram, cada um, introduzido separadamente nas células progenitoras do sangue, e a quantidade de células megacariocíticas subsequentemente produzidas foi contada ao longo do tempo. O eixo geométrico vertical representa a quantidade de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de cada célula, em que a quantidade de células megacariocíticas CD42b positivas derivadas de células progenitoras hematopoiéticas (mock) em que apenas um vetor viral foi introduzido é ajustado para 1. O eixo geométrico horizontal representa o número de dias após o início da cultura de células ES.

[0060]A Figura 4 é um gráfico para a comparação das quantidades de plaquetas produzidas a partir de células iPS com quatro fatores e células iPS com três fatores. O eixo geométrico vertical representa a quantidade de plaquetas derivadas de cada célula, em que a quantidade de plaquetas derivadas de célula ES no 21º dia da cultura é ajustado para 1. O eixo geométrico horizontal representa o número de dias após o início da cultura de células iPS e células ES. “3-f” indica uma linhagem de célula derivada de célula iPS com três fatores, “4-f” indica uma linhagem de célula derivada de célula iPS com quatro fatores, e “ES” indica células ES.

[0061]A Figura 5 mostra um experimento de transfusão em um modelo de camundongo pelo uso de plaquetas derivadas de célula iPS. Os camundongos com imunidade deficiente de um modelo de trombocitopenia foram fornecidos mediante irradiação de antemão (A). As plaquetas produzidas de uma linhagem de célula TkDA3-4 foram transfundidas através da veia da cauda dos camundongos com deficiência de imunidade. B mostra mudanças

dependentes de tempo após a transfusão (30 minutos, 2 horas, 24 horas). “PB” indica sangue periférico humano.

[0062] A Figura 6 é uma vista para confirmar habilidade de formação de trombo de plaquetas humanas derivadas de célula iPS *in vivo*. As plaquetas humanas derivadas de célula iPS foram manchadas com éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE: pigmento vermelho), misturado com hematoporfirina, e injetadas através da veia da cauda de camundongos. Um estado de formação de trombo no vaso sanguíneo 0 segundos, 6 segundos, 13 segundos, e 20 segundos após a irradiação da artéria mesentérica com laser foi observado mediante microscopia confocal por lapso de tempo. “fluxo de sangue” indica fluxo sanguíneo.

[0063] A Figura 7 mostra esquematicamente um protocolo de introdução de genes nas células progenitoras hematopoiéticas preparadas a partir de células ES.

[0064] A Figura 8 mostra resultados da análise FACS no 9º dia após a introdução do gene c-MYC nas células progenitoras hematopoiéticas preparadas a partir de células ES. A mostra resultados da análise FACS, e B mostra fotomicrografias das células no 9º dia após a introdução de c-MYC. As células nas quais apenas um vetor viral MYC foi introduzido foram usadas como um controle.

[0065] A Figura 9 mostra a habilidade de proliferação de células megacariocíticas progenitoras que expressam o gene c-MYC. O eixo geométrico vertical representa a quantidade de células CD42b positivas. O eixo geométrico horizontal representa o número de dias após a introdução do gene c-MYC em células. ■ indica os resultados de um controle em que apenas um vetor viral foi introduzido ao invés de c-MYC.

[0066] A Figura 10 mostra os resultados da análise FACS de células megacariocíticas progenitoras em que o gene c-MYC e o gene BMI1 foram introduzidos. c-MYC/BMI1 (vista superior) mostra os resultados da análise FACS de células em que tanto o gene c-MYC quanto o gene BMI1 foram

introduzidos, em que c-MYC apenas (vista inferior) mostra os resultados da análise FACS de células em que apenas o gene c-MYC foi introduzido.

[0067] A Figura 11 mostra os resultados da análise FACS de células no 35º dia da cultura, em que o gene c-MYC e o gene BMI1 foram introduzidos. A mostra esquematicamente moléculas funcionais específicas de megacariocíticas, e B mostra os resultados da análise FACS.

[0068] A Figura 12 mostra os resultados do exame da habilidade de proliferação de células que expressam MYC/BMI1. O eixo geométrico vertical representa a quantidade de células. O eixo geométrico horizontal representa o número de dias após a introdução dos genes em células.

[0069] A Figura 13 mostra uma imagem de plaquetas liberadas a partir de células megacariocíticas progenitoras derivadas de células que expressam c-MYC/BMI1, conforme observado através de um microscópio de elétrons.

[0070] A Figura 14 mostra os resultados da análise FACS de células no 105º dia após a introdução do gene c-MYC e do gene HOXA2 nas células progenitoras hematopoiéticas derivadas de célula ES (KhES), e no 27º dia após a introdução do gene c-MYC e do gene BCLXL nas células progenitoras hematopoiéticas derivadas de célula ES (KhES).

[0071] A Figura 15 é uma vista para confirmar um sistema de regulação de expressão de gene por um vetor pMX de tet-off. Um construto em que c-MYC e BMI1 foram ligados ao vetor pMX de tet-off com 2A entre e foi expresso em células 293GPG para estudar se a regulação da expressão de gene funciona ou não. A mostra o construto e o mecanismo do vetor, e B mostra os resultados do exame da expressão c-MYC em células em um estado em que tetraciclina e  $\beta$ -estradiol são adicionados ou não são adicionados, pelo uso de um citômetro de fluxo. O eixo geométrico horizontal em B representa um nível de expressão c-MYC. “293gpg” indica os resultados das células 293GPG de um controle.

[0072] A Figura 16 mostra os resultados do estudo da habilidade de proliferação e da habilidade de diferenciação das linhagens de células que

expressam vetor de regulação de gene. A mostra os resultados do exame habilidade de proliferação de células que expressam c-MYC e BMI1 através de vários vetores. O eixo geométrico vertical representa a quantidade de células, e o eixo geométrico horizontal representa o número de dias após a introdução dos genes em células. B mostra os resultados da análise das células manchadas com um anticorpo anti-CD42b (GPIb-alfa) e um anticorpo anti-CD41a (complexo de Integrina  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3) (vista superior) e um anticorpo anti-Glicoforina-a e um anticorpo anti-CD41a (vista inferior), pelo uso de um citômetro de fluxo. Tanto na vista superior quanto na vista inferior de B, os resultados de células que expressam forçosamente pMX c-MYC e Dsam BMI1 separadamente são mostrados no lado esquerdo, e os resultados de células que expressam pMX de tet-off c-MYC 2A BMI1 são mostrados no lado direito.

[0073] A Figura 17 mostra um estudo do grau de multinucleação de uma linhagem de célula megacariocítica que expressa pMX de tet-off c-MYC 2A BMI1 na presença de  $\beta$ -estradiol. A mostra os resultados de células de um controle com apenas um vetor (uma linhagem de célula que não expressa genes), e B mostra os resultados de células que expressa c-MYC e BMI1.

[0074] A Figura 18 mostra os resultados da execução ensaios de ligação de fibrinogênio em plaquetas derivadas de megacariocíticas que expressam forçosamente c-MYC e BMI1. A vista superior (plaqueta humana) mostra os resultados de plaquetas derivadas de sangue periférico humano, a vista mediana (pMX de tet-off c-MYC 2A BMI1) mostra os resultados de plaquetas derivadas de uma linhagem de célula pMX de tet-off c-MYC 2A BMI1 na presença de  $\beta$ -estradiol, e a vista inferior (pMx Myc Dsam Bmi1) mostra os resultados das plaquetas derivadas de uma linhagem de célula que expressa forçosamente c-MYC e BMI1 por pMX c-MYC e Dsam BMI1.

[0075] A Figura 19 mostra os resultados do exame de habilidade de ativação de integrina de plaquetas produzidas a partir de uma linhagem de célula megacariocítica em que a expressão de c-MYC e BMI1 foi suprimida. A vista esquerda mostra a análise de habilidade de ativação de integrina na

ausência de ADP pelo uso de um citômetro de fluxo, em que a vista direita mostra a análise de habilidade de ativação de integrina na presença de ADP (50  $\mu$ M) pelo uso de um citômetro de fluxo.

[0076] A Figura 20 mostra a trajetória de diferenciação a partir de células ES para uma linhagem de célula megacariocítica.

#### Modo para a execução da invenção

[0077] Uma modalidade da presente invenção é um método para produzir células específicas mediante a indução da diferenciação de células que servem como uma fonte, em que um oncogene é forçosamente expresso em células em um estágio de diferenciação desejado dentro de um processo de diferenciação a partir das células que servem como a fonte nas células específicas, com a finalidade de amplificar (ou proliferar) as células no estágio de diferenciação desejado.

[0078] Na presente invenção, “células que servem como uma fonte” corresponde a células progenitoras de células alvo (células específicas) obtidas mediante a indução de diferenciação, e podem ser quaisquer células que retêm a habilidade de diferenciação outra que células diferenciadas terminalmente. Por exemplo, “células que servem como uma fonte” podem ser células-tronco pluripotentes completamente indiferenciadas, ou células que são diferenciadas até certo ponto, mas que ainda retêm a habilidade de diferenciação (por exemplo, células progenitoras hematopoiéticas de células sanguíneas). Ademais, as “células específicas” produzidas nessa modalidade são células outras que as células completamente indiferenciadas (por exemplo, células-tronco pluripotentes), e podem ser células que têm um estado indiferenciado até certo ponto. Isto é, “células específicas” são células que emergem entre um estágio indiferenciado completo e um estágio diferenciado terminal, exceto as células completamente indiferenciadas. Quando as células sanguíneas são tomadas como exemplo, as “células específicas” nessa modalidade são células megacariocíticas adultas, plaquetas, células eritroides, ou similares.

[0079] Nesta modalidade, as “células em um estágio de diferenciação” a



serem amplificadas (ou proliferadas) são células que emergem entre o estágio indiferenciado completo para o estágio diferenciado terminal, isto é, células outras que as células no estágio indiferenciado completo (por exemplo, células-tronco pluripotentes, etc.) e células no estágio diferenciado terminal. Quando as células sanguíneas são tomadas como um exemplo, as “células em um estágio de diferenciação”, nessa modalidade, são células progenitoras hematopoiéticas ou células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização, que são células progenitoras de células megacariocíticas adultas. Por exemplo, células induzida a partir de células-tronco pluripotentes tal como células ES ou células iPS podem ser usadas como “células em um estágio de diferenciação”.

[0080] As células ES usadas na presente invenção não são particularmente limitadas. Tipicamente, os ovos fertilizados em estágio de blástula são cocultivados com células alimentadoras, as células derivadas de massa de célula interna proliferada são separadas, e a subcultura é adicionalmente repetida, o que permite eventualmente o estabelecimento de uma linhagem de célula ES. Assim, as células ES são geralmente obtidas a partir de ovos fertilizados. Alternativamente, as células similares à célula ES que são obtidas de, por exemplo, tecidos adiposos, vilosidades coriônicas, fluídos amnióticos, placentas, células testiculares, e outros similares além de ovos fertilizados, têm características similares às células ES, e que exibem pluripotência podem ser usados.

[0081] As células iPS usadas na presente invenção podem ser células de qualquer origem, enquanto as mesmas sejam células que adquirem pluripotência equivalente a aquela de células ES como um resultado da introdução de diversos tipos de genes de fator de transcrição (doravante chamado como “fator de pluripotência”) para fornecer pluripotência em células somáticas (por exemplo, células de fibroblasto, células sanguíneas, etc.). Muitos fatores já haviam sido relatados como fatores de pluripotência. Exemplos dos fatores incluem a família Oct (por exemplo, Oct3/4), família SOX (por exemplo, SOX2, SOX1, SOX3, SOX15, SOX 17, etc.), família Klf (por

exemplo, Klf4, Klf2, etc.), família MYC (por exemplo, c-MYC, N-MYC, L-MYC, etc.), NANOG, LIN28, e similares, embora a presente invenção não seja limitada por isso. Os métodos de estabelecimento de célula iPS são descritos em muitos documentos que podem ser tomados como referência (consulte, por exemplo, Takahashi *et al.*, *Cell* 2006, 126: 663 a 676; Okita *et al.*, *Nature* 2007, 448: 313 a 317; Wernig *et al.*, *Nature* 2007, 448: 318 a 324; Maherali *et al.*, *Cell Stem Cell* 2007, 1: 55 a 70; Park *et al.*, *Nature* 2007, 451: 141 a 146; Nakagawa *et al.*, *Nat Biotechnol* 2008, 26: 101-106; Wernig *et al.*, *Cell Stem Cell* 2008, 10: 10 a 12; Yu *et al.*, *Science* 2007, 318: 1917 a 1920; Takahashi *et al.*, *Cell* 2007, 131: 861-872; Stadtfeld *et al.*, *Science* 2008, 322: 945 a 949, etc.).

[0082] Um oncogene usado na presente invenção é um gene que induz a cancerização de uma célula em que o gene reside. Exemplos do gene incluem genes da família MYC, genes da família SRC, genes da família RAS, genes da família RAF, genes da família de proteína quinases tal como c-Kit, PDGFR, e Abl, e similares, embora a presente invenção não seja limitada por isso.

[0083] Na presente invenção, a expressão forçada do oncogene ou do gene polycomb mencionado abaixo nas células no estágio de diferenciação desejado pode ser atingida de uma maneira que introduza o oncogene ou o gene polycomb nas células no estágio de diferenciação desejado e forçosamente expresse o gene, de uma maneira que introduza o gene em células progenitoras das células no estágio de diferenciação desejado, forçosamente expresse o gene, e procede com a diferenciação enquanto sustenta a expressão de modo que o estado de expressão forçada do gene é mantido nas células no estágio de diferenciação desejado, ou de uma maneira que introduza o gene em células progenitoras das células no estágio de diferenciação desejado e, quando as células progenitoras são diferenciadas nas células no estágio de diferenciação desejado, induz a expressão forçada do gene. Por exemplo, no caso da amplificação de células megacariocíticas progenitoras sem multiploidização como as células no estágio de

diferenciação desejado, o oncogene ou o gene polycomb podem ser introduzidos nas células progenitoras hematopoiéticas (descrito a seguir) que estão em um estágio progenitor das células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização, e forçosamente expressas. No caso da expressão forçosa tanto do oncogene quanto do gene polycomb nas células no estágio de diferenciação desejado, o oncogene e o gene polycomb podem ser introduzidos nas células simultaneamente ou em momentos diferentes.

[0084]A modalidade da presente invenção também inclui um método para amplificação (ou proliferação) as células no estágio de diferenciação desejado, em que a senescência induzida por oncogene que é induzida pela expressão forçada de oncogene nas células no estágio de diferenciação desejado é suprimida.

[0085]A senescência induzida por oncogene (OIS) é a senescência induzida por estresse induzida pelo estímulo de proliferação anormal e similares por um oncogene tal como RAS ou MYC. Quando um produto de oncogene é excessivamente expresso em células, a expressão de um produto de gene supressor de tumor tal como p16 ou p19 codificado em um *locus* CDKN2a (INK4a/ARF) é induzida. Isso induz a senescência de células e apoptose, o que causa uma diminuição na atividade de proliferação da célula. É, portanto, esperado que a habilidade elevada de proliferação da célula possa ser mantida evitando OIS induzida pelo oncogene.

[0086]Por exemplo, a senescência induzida por oncogene pode ser suprimida mediante a expressão do gene polycomb nas células em que o oncogene é expresso. O gene polycomb (grupo polycomb: PcG) regula negativamente o *locus* CDKN2a (INK4a/ARF), e funciona para evitar a senescência (consulte, por exemplo, Oguro *et al.*, “*Regulation of stem cell senescence by polycomb group protein complex*”, *Regenerative Medicine*, vol. 6, Nº 4, páginas de 26 a 32; Jseus *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, páginas de 667 a 677, 2006; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 100, páginas de 211 a 216, 2003). Consequentemente, mediante a expressão

do gene polycomb nas células em adição ao oncogene tal como um gene da família MYC, a senescência induzida por oncogene pode ser evitada e o efeito de proliferação da célula do produto de oncogene pode ser adicionalmente aprimorado.

[0087] Exemplos do gene de grupo polycomb usado na presente invenção incluem BMI1, Mel18, Ring1a/b, Phc1/2/3, Cbx2/4/6/7/8, Ezh2, Eed, Suz12, HADC, Dnmt1/3a/3b, e similares. Um gene de grupo polycomb especialmente preferencial é o gene BMI1.

[0088] A senescência induzida por oncogene também pode ser suprimida mediante a expressão do gene HOXA2 ou o gene BCLXL.

[0089] Com a finalidade de expressar forçosamente o oncogene e o gene polycomb nas células, qualquer método bem conhecido para a pessoa versada na técnica pode ser empregado. Por exemplo, um oncogene exógeno ou um gene polycomb exógeno pode ser introduzido nas células através do uso de um sistema de introdução de gene tal como um lentivírus ou a retrovírus, e expresso. No caso da expressão do gene por um vetor de introdução de gene viral, o gene pode ser ligado de maneira operacional a um lado à jusante de um promotor apropriado, que é assim inserido no vetor de introdução de gene e introduzido nas células para expressar o gene alvo. Neste, a ligação “operável” significa que o promotor e o gene alvo são ligados de modo que o gene alvo é dominado por cis pelo promotor e a expressão desejada do gene alvo é realizada. Na modalidade da presente invenção, por exemplo, o gene alvo pode ser expresso constitutivamente pelo uso de um promotor CMV, um promotor EF1, ou similares. Como uma alternativa, um promotor apropriado (promotor induzível) pode ser colocado sob controle de um elemento cuja atividade é regulada por um fator trans, por exemplo, um elemento de resposta a fármaco tal como elemento de resposta à tetraciclina, em que o gene alvo é expresso de maneira induzível mediante a regulação através da adição de fármaco ou similares. Como tal sistema de expressão de gene com base em fármaco, um sistema apropriado pode ser facilmente selecionado por uma

pessoa versada na técnica com a finalidade de realizar a regulação da expressão desejada do oncogene ou do gene polycomb. Um kit comercialmente disponível para tal sistema de expressão pode ser comprado e colocado em uso. Embora o oncogene e o gene polycomb, que são os genes alvo na regulação de expressão, podem ser inseridos em vetores separados, é mais preferencial inserir o oncogene e o gene polycomb no mesmo vetor.

[0090] Esta modalidade também inclui um método para produzir as células específicas alvo, ao induzir mais a diferenciação das células no estágio de diferenciação desejado no qual o oncogene ou o oncogene e o gene polycomb são expressos. Para induzir mais a diferenciação das células no estágio de diferenciação desejado, as células no estágio de diferenciação podem ser cultivadas sob condições de cultura (condições tal como um meio de cultura e uma temperatura de cultura) adequadas para a indução de diferenciação, e também a expressão do oncogene ou do gene polycomb nas células no estágio de diferenciação pode ser regulada, de forma suprimida, de acordo com necessidade. Neste caso, a expressão do oncogene ou do gene polycomb pode ser suprimida, por exemplo, ao clarear a indução da expressão de gene induzido pelo sistema de expressão induzível supracitado, através de remoção de fármaco ou similares. Alternativamente, o oncogene ou o gene polycomb podem ser ligados, de forma operacional, a um promotor supressivo que executa regulação de expressão constitutiva na ausência de um fármaco ou similares e executa regulação de expressão supressiva na presença do fármaco ou similares, para regular, de forma supressiva, a expressão do gene. Além disso, o gene polycomb ou oncogene introduzido pode ser removido com o uso de um sistema Cre/Lox ou similares, sendo que, através disso, regula, de forma supressiva, a expressão do gene. Um kit disponível comercialmente e similares pode ser usado como apropriado, de forma a regular, de forma supressiva, a expressão do oncogene ou do gene polycomb.

[0091] Esta modalidade também inclui um método para amplificar (proliferação) células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização

como as células no estágio de diferenciação desejado e produzir, como as células específicas, células megacariocíticas maduras das células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização. No presente contexto, no caso de expressar, de forma forçada, o oncogene ou o oncogene e o gene polycomb nas células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização, é preferível expressar o oncogene ou o oncogene e o gene polycomb em células de progenitor hematopoiético em um estágio de progenitor das células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização.

[0092] Nesta descrição, “células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização” são marcadores específicos de megacariócito de células binucleares ou mononucleares CD41a-positiva/CD42a-positiva/CD42b-positiva que não foram submetidas à poliploidização nuclear. Por outro lado, “células de progenitor hematopoiético” são células hematopoiéticas caracterizadas como células CD34+ (células CD34-positiva), as quais podem ser células derivadas de célula ES ou célula iPS como um exemplo, e preferencialmente células obtidas de uma estrutura similar a rede (também referida como saco ES ou saco iPS) preparada de células ES ou células iPS (em particular, células imediatamente após separação da estrutura similar a rede). No presente contexto, “estrutura similar a rede” preparada a partir de células ES ou células iPS é uma estrutura similar a saco derivada de célula iPS ou célula ES (que contém um espaço nisto) que é formada por uma população de célula endotelial ou similar e contém células de progenitor hematopoiético dentro. Para detalhes sobre estrutura similar a redes, veja, por exemplo, Takayama *et al.*, Blood 2008, 111: 5298 a 5306.

[0093] As condições de cultura de célula adequadas para preparar a estrutura similar a rede a partir de células ES humanas ou células iPS humanas diferem dependendo do tipo de células ES ou células iPS usadas. Entretanto, como um exemplo, um meio de cultura pode ser IMDM para o qual FBS em uma concentração final de 15% é adicionado. Outro meio livre de soro também pode ser usado com fatores de proliferação, complementos, e sendo que

similares são adicionado conforme apropriado. Além disso, preferencialmente 0 a 100 ng/ml e com mais preferência aproximadamente 20 ng/ml de VEGF é adicionado para formar eficientemente a estrutura similar à rede. Um ambiente de cultura difere dependendo do tipo de células ES ou células iPS usadas. Entretanto, como um exemplo, condições de 5% de CO<sub>2</sub> e 36 a 38°C e preferencialmente 37°C podem ser usadas. Embora um período de cultura até que a estrutura similar a rede seja formada seja diferente dependendo do tipo de células ES ou células iPS, a presença da estrutura similar a rede pode ser reconhecida em aproximadamente 14 a 16 dias após semeadura em células alimentadoras.

[0094] A estrutura similar à rede formada tem uma estrutura folicular, e contém células de progenitor hematopoiético em estado concentrado. As células de progenitor hematopoiético dentro da estrutura similar a rede podem ser separadas por meio físico, tal como ao passar através de um instrumento de peneira esterilizado (por exemplo, um filtro de célula, etc.). As células de progenitor hematopoiético obtidas de tal maneira podem ser usadas na presente invenção.

[0095] Embora o oncogene expressado, de forma forçada, nas células de progenitor hematopoiético possa ser quaisquer dos oncogenes supracitados, um gene de família MYC é especialmente preferencial. Exemplos do gene de família MYC incluem c-MYC, N-MYC, L-MYC, e similares. Desses genes, c-MYC é especialmente preferencial. Embora o gene polycomb expressado, de forma forçada, nas células de progenitor hematopoiético possa ser quaisquer dos genes polycomb supracitados, o gene BMI1 é especialmente preferencial.

[0096] As células de progenitor hematopoiético que expressam o oncogene tal como o gene de família MYC e o gene polycomb tal como o gene BMI1 são cultivadas sob condições que qualquer um ou uma combinação dos pelo menos dois de SCF (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 100 ng/ml), TPO (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 40 ng/ml), FL (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 100 ng/ml), VEGF (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 40 ng/ml), e similares são

adicionados, e se tornam células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização que adquiriram capacidade de proliferação alta em, por exemplo, aproximadamente 4 a 7 dias após introdução de gene. As células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização obtidas deste modo suportam sua proliferação celular pelo menos por aproximadamente 30 a 50 dias, de preferência por aproximadamente 50 a 60 dias ou mais, e mais preferencialmente por 60 dias ou mais, e amplificam no número de células para aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  vezes ou mais, de preferência aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  vezes ou mais, e com mais preferência, aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  vezes ou mais o número de células ao introduzir o gene c-MYC e o gene BMI1 (vide, por exemplo, FIGURA 12).

[0097] A presente invenção também inclui um método para produzir células megacariocíticas maduras e produz, adicionalmente, plaquetas por cultura, sob condições adequadas para indução de diferenciação de células sanguíneas, as células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização produzidas pelo método, de acordo com a presente invenção. As condições adequadas para indução de diferenciação de células sanguíneas são, por exemplo, aquelas que qualquer uma ou uma combinação de pelo menos dois de TPO, IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, ligante Flt3, heparina, e similares é adicionada. No caso de indução de diferenciação das células megacariocíticas maduras e as plaquetas, por exemplo, a cultura pode ser executada por aproximadamente 7 a 15 dias na presença de TPO (10 a 200 ng/ml, de preferência, aproximadamente 100 ng/ml) ou na presença de TPO (10 a 200 ng/ml, de preferência, aproximadamente 100 ng/ml), SCF (10 a 200 ng/ml, de preferência, aproximadamente 50 ng/ml), e heparina (10 a 100 U/ml, de preferência, aproximadamente 25 U/ml). Qualquer ambiente de cultura adequado para indução de diferenciação de células sanguíneas *in vitro* é aplicável. Como um exemplo, a cultura é executada sob condições de 5% CO<sub>2</sub> e 36 a 38°C e preferencialmente 37°C.



[0098] No caso de indução de diferenciação das células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização, as quais adquiriram capacidade de proliferação alta como um resultado de introdução do oncogene e do gene polycomb, no interior de células megacariocíticas maduras, plaquetas, e similares, a expressão do oncogene e do gene polycomb pode ser regulada, de forma suprimida, de acordo com necessidade, conforme mencionado anteriormente.

[0099] Outra modalidade da presente invenção é um método para produzir células eritroides, em que as células eritroides são produzidas ao expressar, de forma forçada, um oncogene e o gene HOXA2 ou o gene BCLXL em células de progenitor hematopoiético para amplificar células de progenitor eritroide. Em mais detalhes, essa modalidade se refere a um método através do qual um oncogene, tal como um gene de família MYC, é expresso, de forma forçada, em células de progenitor eritroide as quais são células e um estágio de diferenciação desejado, e senescência induzida por oncogene como um resultado é suprimido por expressão do gene HOXA2 ou do gene BCLXL para amplificar as células de progenitor eritroide, sendo que através disso produz células eritroides como células específicas. Essa modalidade é baseada nas observações que, como um resultado de introdução de tipos de fatores de transcrição hematopoiética e genes associados a antiapoptose no interior de células de progenitor hematopoiético juntas com MYC como um oncogene e executar uma triagem, HOXA2 ou BCLXL induzem proliferação de células de progenitor eritroide.

[00100] Embora qualquer oncogene possa ser usado como o oncogene expresso, de forma forçada, nas células de progenitor hematopoiético conforme mencionado anteriormente, um gene de família MYC é preferencial, e o gene c-MYC é especialmente preferencial.

[00101] Nesta descrição, “células de progenitor eritroide” são células de pré-enucleação A-positiva de glicoforina de molécula específica de eritrócito.

[00102] As células de progenitor hematopoiético que expressam o oncogene tal como o gene de família MYC e o gene HOXA2 ou gene BCLXL são cultivadas sob condições que qualquer um ou uma combinação dos, pelo menos, dois de SCF (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 100 ng/ml), TPO (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 40 ng/ml), FL (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 100 ng/ml), VEGF (10 a 200 ng/ml, por exemplo, 40 ng/ml), e similares são adicionados, e se tornam células de pré-enucleação de progenitor eritroide que adquiriram capacidade de proliferação alta em, por exemplo, aproximadamente 4 a 7 dias após introdução de gene.

[00103] As condições adequadas para indução de diferenciação de células eritroides maduras por meio das células de progenitor eritroide obtidas das células de progenitor hematopoiético que expressam o gene de família MYC e o gene BCLXL ou o gene HOXA2 são, por exemplo, que qualquer um de ou uma combinação de pelo menos dois de TPO, IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, ligante Flt3, heparina, e similares são adicionados. Em particular, as células eritroides podem ser cultivadas por aproximadamente 7 a 15 dias na presença de EPO (2 a 100 U/ml, de preferência, aproximadamente 10 U/ml) ou na presença de EPO (2 a 100 U/ml, de preferência, aproximadamente 10 U/ml) e SCF (10 a 200 ng/ml, de preferência, aproximadamente 50 ng/ml). Qualquer ambiente de cultura adequado para indução de diferenciação de células sanguíneas *in vitro* é aplicável. Como um exemplo, a cultura é executada sob condições de 5% CO<sub>2</sub> e 36 a 38°C e preferencialmente 37°C.

[00104] Outra modalidade da presente invenção inclui células sanguíneas e um estágio de diferenciação desejado no qual um oncogene é expresso, de forma forçada. No presente contexto, o oncogene pode ser qualquer dos oncogenes supracitados. Por exemplo, um gene de família MYC ou similares é aplicável, e o gene c-MYC especialmente preferencial. Além disso, “células sanguíneas e um estágio de diferenciação” são células sanguíneas que emergem entre um estágio não diferenciado completo para

estágio diferenciado terminal, isto é, células sanguíneas exceto células no estágio não diferenciado completo e células no estágio diferenciado terminal. Por exemplo, “células sanguíneas em um estágio de diferenciação” nessa modalidade são células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização ou similares. Como tais células sanguíneas no estágio de diferenciação, células induzidas de células ES ou células iPS podem ser usadas, como um exemplo. Especialmente, células sanguíneas obtidas de uma estrutura similar a rede (também referida como saco ES ou saco iPS) preparada de células ES ou células iPS (em particular, células imediatamente após a separação da estrutura similar à rede) são preferenciais. Essa modalidade também inclui células sanguíneas em um estágio de diferenciação no qual tanto o oncogene quanto o gene polycomb supracitado são expressos, de forma forçada. A expressão forçada do oncogene e o gene polycomb podem ser induzidos com o uso de um promotor induzível ou similar, conforme mencionado acima.

[00105] A expressão forçada do oncogene ou do gene polycomb nas células no estágio de diferenciação desejado pode ser alcançada em uma maneira que introduz o oncogene ou o gene polycomb no interior das células sanguíneas no estágio de diferenciação desejado e expressa, de forma forçada, o gene, em uma maneira que introduz o gene no interior das células progenitoras das células sanguíneas no estágio de diferenciação desejado, expressa, de forma forçada, o gene e prossegue com diferenciação enquanto suporta a expressão de modo que a expressão forçada do gene seja mantida nas células sanguíneas no estágio de diferenciação desejado, ou em uma maneira que introduza o gene no interior de células progenitoras das células sanguíneas no estágio de diferenciação desejado e, quando as células progenitoras são diferenciadas no interior das células sanguíneas no estágio de diferenciação desejado, induz a expressão forçada do gene. Por exemplo, no caso de amplificação de células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização como as células sanguíneas no estágio de diferenciação desejado, o oncogene ou o gene polycomb podem ser introduzidos no interior

de células de progenitor hematopoiético, as quais estão em um estágio de progenitor das células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização, e expresso, de forma forçada.

[00106] As células sanguíneas como as células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização nessa modalidade têm uma resistência a gelo-degelo e retêm a capacidade de proliferação celular e a capacidade de diferenciação mesmo quando criopreservada e então descongelada. Isto permite que as células sanguíneas sejam congeladas e descongeladas de acordo com a necessidade, sendo que através disso produz células sanguíneas induzidas por diferenciação. O uso dessas células elimina a necessidade de executar uma série de operações para produzir células sanguíneas tal como plaquetas de células ES ou células iPS do início. Isto é, ao preparar, como materiais brutos, uma grande quantidade de células sanguíneas nas quais o oncogene ou o oncogene e o gene polycomb são expressos, de forma forçada, de acordo com a presente invenção e criopreservar as células sanguíneas de acordo com a necessidade, o processo de fabricação pode ser racionalizado e aperfeiçoado em eficiência. Por isso, um mecanismo capaz de abastecer rapidamente diversas células sanguíneas, tal como plaquetas, pode ser estabelecido.

[00107] No caso de produção de uma composição celular congelada com o uso das células sanguíneas, tal como as células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização, de acordo com a presente invenção, a composição celular congelada pode compreender as células sanguíneas tal como as células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização e uma solução de criopreservação. Um aditivo e similares também podem ser compreendidos na composição conforme necessário.

[00108] Por exemplo, uma solução de congelamento que contém DMSO pode ser usada como a solução de criopreservação. Exemplos específicos incluem Cell Banker (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.), Bambanker (Nippon Genetics Co., Ltd.), TC-Protector (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.), e

CP-1 complementado por albumina (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.).

[00109] O gene da família MYC, o gene polycomb (por exemplo, o gene BMI1), o gene HOXA2, e o gene BCLXL usados na presente invenção incluem tanto genes, os quais sequências de cDNA já foram publicados, quanto homólogos identificados por tecnologias convencionais baseadas em homologia dessas sequências de cDNA bem conhecidas. Um homólogo do gene c-MYC entre o gene de família MYCs é um gene o qual sequência de cDNA consiste em, por exemplo, uma sequência substancialmente idêntica para uma sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 1. No presente contexto, cDNA consiste em uma sequência substancialmente idêntica para uma sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 1 é DNA que consiste em uma sequência que tem identidade de aproximadamente 60% ou mais, de preferência, aproximadamente 70% ou mais, com mais preferência, aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98%, e com máxima preferência, aproximadamente 99% com DNA que consiste na sequência apresentada em SEQ ID NO: 1, ou DNA que pode hibridizar para DNA que consiste em uma sequência complementar da sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 1 sob condições estridentes, em que a proteína codificada por tal DNA contribui para amplificação das células no estágio de diferenciação tal como as células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização.

[00110] Um homólogo do gene BMI1 usado na presente invenção é um gene cuja sequência de cDNA consiste em, por exemplo, uma sequência substancialmente idêntica para uma sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 2. No presente contexto, cDNA consiste em sequência substancialmente idêntica para uma sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 2 é DNA que consistem em uma sequência que tem identidade de aproximadamente 60% ou mais, de preferência, aproximadamente 70% ou

mais, com mais preferência, aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98%, e com máxima preferência, aproximadamente 99% com DNA que consiste na sequência apresentada em SEQ ID NO: 2, ou DNA que pode hibridizar para DNA que consistem em uma sequência complementar da sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 2 sob condições estridentes, em que a proteína codificada por tal DNA suprime senescência induzida por oncogene induzida nas células nas quais o oncogene tal como o gene de família MYC é expresso, sendo que através disso facilita a amplificação das células.

[00111] O gene HOXA2 ou o gene BCXL usado na presente invenção é um gene cuja sequência de cDNA consiste em, por exemplo, uma sequência substancialmente idêntica a uma sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 3 ou 4. No presente contexto, o cDNA consiste em uma sequência substancialmente idêntica a uma sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 3 ou 4 é DNA que consistem em uma sequência que tem identidade de aproximadamente 60% ou mais, de preferência, aproximadamente 70% ou mais, com mais preferência, aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, ou 98%, e com máxima preferência, aproximadamente 99% com DNA que consiste na sequência apresentada em SEQ ID NO: 3 ou 4, ou DNA que pode hibridizar para DNA que consiste em uma sequência complementar da sequência de ácido nucleico apresentada em SEQ ID NO: 2 sob condições estridentes, em que a proteína codificada por tal DNA tem um efeito de fazer com que as células de progenitor eritroide cresçam.

[00112] As condições estridentes mencionadas no presente contexto são condições de hibridização facilmente determinadas por uma pessoa versada na técnica, e são condições experimentais empíricas que tipicamente dependem de um comprimento de sonda, um temperatura de

lavagem, e uma concentração de sal. Geralmente, uma temperatura para anelamento é superior quando uma sonda maior é usada, e inferior quando uma sonda mais curta é usada. A formação de híbrido depende da capacidade de reanelamento em um ambiente em que um filamento complementar é levemente inferior em temperatura do que seu ponto de fusão.

[00113] Em detalhes, baixas condições estridentes são, por exemplo, condições que a lavagem é executada em uma solução de 0,1X SSC, 0,1% SDS sob condições de temperatura de 37°C a 42°C em um estágio de lavagem de filtro após hibridização. Altas condições estridentes são, por exemplo, condições que a lavagem é executada em uma solução de 5X SSC, 0,1% SDS a 65°C no estágio de lavagem. Polinucleotídeo de identidade superior pode ser obtido por intensificação adicional das condições estridentes.

[00114] A modalidade da presente invenção inclui, adicionalmente, um kit para produzir células em um estágio de diferenciação desejado (por exemplo, células de progenitor megacariocítico sem multipoliploidização ou células de progenitor eritroide) ou células específicas finalmente produzidas (por exemplo, células megacariocíticas, plaquetas, ou células eritroides). O kit compreende reagentes e vetores de expressão e similares necessário para expressar o oncogene, o gene polycomb, o gene BCLXL, o gene HOXA2, ou similares em células, e também compreende um meio de cultura para cultura de célula, soro, suplementos tal como fatores de proliferação (por exemplo, TPO, EPO, SCF, heparina, IL-6, IL-11, etc.), antibióticos, e etc. Adicionalmente, por exemplo, no caso de usar células derivadas de célula ES ou célula iPS, o kit compreende, adicionalmente, anticorpos para confirmação de marcadores a fim de identificar uma estrutura similar a rede preparada a partir dessas células (por exemplo, anticorpos contra Flk1, CD31, CD34, UEA-I lecitina, etc.). Os reagentes, os anticorpos, e similares compreendidos no kit são abastecidos em qualquer tipo de recipiente no qual, componentes suportam, de forma efetiva,

sua atividade ao longo de um longo período de tempo sem serem adsorvidos no ou degenerados pelo material do recipiente.

[00115] As plaquetas e as células eritroides produzidas de acordo com a presente invenção podem ser abastecidas, de forma estável em forma de produto de fármaco. As plaquetas produzidas pelo método de acordo com a presente invenção podem ser preparadas por recuperação de uma fração de uma solução de cultura na qual plaquetas liberadas das células megacariocíticas são abundantes, e remover componentes de célula sanguínea exceto plaquetas, tal como células megacariocíticas, através do uso de um filtro de remoção de leucócito (por exemplo, disponível comercialmente pela Terumo Corporation, Asahi Kasei Medical Co., Ltd., etc.) ou similares. Mediante preparação de um produto de sangue, outros componentes que contribuem para estabilização de plaquetas ou células eritroides podem ser compreendidos no produto de sangue. Para tais componentes contribuírem para estabilização, um método bem conhecido para uma pessoa versada na técnica pode ser selecionado.

[00116] Em mais detalhes, as plaquetas obtidas podem ser formuladas pelo método a seguir, como um exemplo.

[00117] Uma solução de ACD-A e FFP (plasma congelado fresco, o qual é preparado totalmente de sangue obtido através de doação de sangue e compreende todos componentes exceto componentes de sangue, tal como albumina e a fator de coagulação) é preparada em um proporção de 1:10, e preservada enquanto é agitada em 20 a 24°C após irradiação de 15 a 50 Gy. A solução de ACD-A é preparada pela mistura de 22 g de citrato de sódio, 8 g de ácido cítrico, e 22 g de glicose com água para injeção para uma quantidade total de 1 L.

[00118] No caso de uso do método supracitado, é desejável que a concentração de plaqueta seja aproximadamente  $1 \times 10^9$  plaquetas/ml, como um exemplo.



[00119] Além disso, a adição de GM6001 (um inibidor de metaloprotease baseado em ácido hidroxâmico de ampla faixa) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) habilita a prevenção de inativação causada por uma clivagem de uma molécula funcional de plaqueta GPIb-V-IX ou GPVI que ocorre durante criopreservação ou preservação em temperatura ambiente. Os presentes inventores confirmaram que a inativação pode ser evitada por plaquetas derivadas de célula ES de camundongo por esse método. Para informações sobre um mecanismo subjacente a essa inativação de plaqueta com o uso de plaquetas humanas, veja Bergmeier, W. *et al.*, *Cir Res* 95: 677 a 683, 2004, e Gardiner, EE. *et al.*, *J Thrombosis e Haemostasis*, 5: 1530 a 1537, 2007.

[00120] Como um material de um recipiente para conter um produto de fármaco que compreende plaquetas, é preferível não usar um material, tal como vidro, que ativa plaquetas.

[00121] Por outro lado, as células eritroides podem ser formuladas na maneira a seguir. Em mais detalhes, os eritrócitos obtidos podem ser formulados pelo método a seguir, como um exemplo.

[00122] Uma solução MAP (cuja composição é descrita abaixo) é adicionada a um concentrado de eritrócito obtido pela concentração de uma cultura sobrenadante após centrifugação e preparo e preservado em 2 a 6°C após irradiação de 15 a 50 Gy.

[00123] No caso de uso do método supracitado, é desejável que a concentração de eritrócito seja aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  eritrócitos/ml, como um exemplo. Para os eritrócitos obtidos, por exemplo, uma solução de carregamento para preservação de eritrócito (solução MAP) preparada ao dissolver D-manitol (14,57 g), adenina (0,14 g), cristal de fosfato de di-hidrogênio de sódio (0,94 g), citrato de sódio (1,50 g), ácido cítrico (0,20 g), glicose (7,21 g), e cloreto de sódio (4,97 g) com água para injeção para uma quantidade total de 1.000 ml pode ser usada.

[00124] Qualquer outro método bem conhecido adequado para formulação de eritrócito pode ser facilmente selecionado por uma pessoa versada na técnica como apropriado.

[00125] A presente invenção inclui adicionalmente uma composição congelada de células sanguíneas, de acordo com a presente invenção. A composição pode compreender tanto as células sanguíneas quanto também um meio de cultura necessário para preservar as células sanguíneas, uma solução de tampão, e DMSO, glicerol, e similares para proteger as células mediante congelamento. A composição pode compreender adicionalmente quaisquer outras substâncias normais necessárias para congelar as células. No caso em que um reagente de congelamento de célula disponível comercialmente ser usado, a composição pode compreender substâncias contidas no reagente.

[00126] A origem das “células” descritas nesta descrição pode ser de animais humanos ou não humanos (por exemplo, camundongos, ratos, vacas, cavalos, porcos, ovelha, macacos, cachorros, gatos, pássaros, etc.). Embora a origem não seja particularmente limitada, as células derivadas de humano são especialmente preferenciais.

[00127] A presente invenção é descrita em mais detalhes, a título de exemplo, abaixo, embora esses exemplos não sejam destinados a limitar o escopo da presente invenção.

#### Exemplos

1. Comparação de eficiência de produção de megacariócitos a partir de células iPS com quatro fatores e células iPS com três fatores

[00128] Os números de células megacariocíticas produzidas a partir de células iPS (TkDA3-2, TkDA3-4 e TkDA3-5) estabelecidas com o uso de quatro genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC), células iPS (253G1 (fornecidas pelo Prof. Shinya Yamanaka, Universidade de Kyoto) e TkDN4-M) estabelecidas com o uso dos três genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4) exceto c-MYC e células ES humanas (KhES-3 (fornecidas pelo Prof. Norio Nakatsuji,

Universidade de Kyoto)) foram comparadas (Figura 1). No 15º dia de cultura a partir das células iPS e as células ES, as células progenitoras hematopoiéticas extraídas de uma estrutura do tipo rede foram semeadas em células alimentadoras e cultivadas em IMDM ao qual FBS em uma concentração final de 15% foi adicionado, na presença de TPO (100 ng/ml), SCF (50 ng/ml) e heparina (25 U/ml). O número de células megacariocíticas CD42b positivas subsequentemente induzidas foi contado com o passar do tempo (Figura 1). Como resultado, o número de células megacariocíticas aumentou em todas as três linhas de células das células iPS com quatro fatores (com c-MYC), em comparação com as células iPS com três fatores (sem c-MYC) e as células ES humanas.

[00129] Em seguida, a ativação da expressão dos genes (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC), que foram introduzidos durante a produção das células iPS, em células iPS indiferenciadas foi examinada. O exame mostrou que a expressão de todos os genes foi suprimida por meio de um mecanismo de silenciamento (Figura 2A). Em células megacariocíticas induzidas à diferenciação no 25º dia de cultura, por outro lado, a reativação da expressão de cada transgene foi confirmada (Figura 2B).

[00130] Esses resultados sugerem uma possibilidade de que a reativação da expressão de qualquer um dos genes introduzidos durante a produção das células iPS esteja relacionada ao aumento no número de células megacariocíticas produzidas. Em vista disso, o gene causal relacionado ao aumento no número de células megacariocíticas foi investigado. Cada gene foi expresso de modo forçado separadamente por um retrovírus em células progenitoras hematopoiéticas derivadas de células ES humanas (nas quais OCT3/4, SOX2, KLF-4 e c-MYC não foram introduzidos de modo exógeno, diferente das células iPS) e o número de células megacariocíticas CD42b positivas produzidas foi contado. Como resultado, declarou-se que o número de células megacariocíticas CD42b positivas produzidas aumentou em aproximadamente 10 vezes no caso da introdução de c-MYC, em comparação

com o caso da introdução dos outros genes (Figura 3). Esses resultados indicam que a alta eficiência de indução de megacariócitos a partir das células iPS com quatro fatores pode ser atribuída à reativação da expressão do gene c-MYC.

[00131] Confirmou-se, também, que as células megacariocíticas induzidas a partir das células iPS com quatro fatores exibiram uma taxa de sobrevivência mais alta após gelo-degelo do que as células megacariocíticas induzidas a partir das células ES ou das células iPS com três fatores. Em detalhes, enquanto as taxas de sobrevivência após gelo-degelo das células megacariocíticas induzidas a partir das células ES humanas (KhES-3) e das células iPS humanas com três fatores (TkDN4-M) foram, respectivamente, 56,7% e 54,5%, isto é, apenas aproximadamente 1/2, a taxa de sobrevivência após gelo-degelo das células megacariocíticas induzidas a partir das células iPS humanas com quatro fatores (TkDA3-4) foi de 81,0%, alcançando aproximadamente 4/5. Isso indica que as células megacariocíticas progenitoras, nas quais a reativação do oncogene como o gene c-MYC ocorre, são mais adequadas para a criopreservação e são mais facilmente supridas após degelo.

[00132] O número de plaquetas produzidas foi estudado do mesmo modo que nas células megacariocíticas. No 15º dia de cultura a partir das células iPS e das células ES, células progenitoras hematopoiéticas extraídas a partir de uma estrutura do tipo rede foram semeadas, e o número de plaquetas subsequentemente induzidas foi contado com o passar do tempo. Como resultado, as plaquetas foram produzidas de modo eficiente a partir das células iPS com quatro fatores, conforme no caso das células megacariocíticas (Figura 4).

[00133] Em seguida, um experimento de transfusão de plaquetas produzidas *in vitro* foi conduzido com o uso da linhagem de célula TkDA3, que tem a maior capacidade de produzir plaquetas. Camundongos com deficiência de imunidade de um modelo de trombocitopenia foram fornecidos por meio de

irradiação antecipadamente, e as plaquetas derivadas de células iPS foram transfundidas através da veia da cauda (Figura 5A). Um quimerismo de plaquetas de aproximadamente 20% foi observado 30 minutos após a transfusão. Mesmo 2 horas após a transfusão, o quimerismo de plaquetas de aproximadamente 10% ainda foi observado. Assim, as mesmas características de plaquetas frescas derivadas de sangue periférico humano foram exibidas (Figura 5B).

[00134] Além disso, a capacidade de formação de trombos de plaquetas derivadas de células iPS humanas *in vivo* foi avaliada mediante microscopia confocal de lapso de tempo.

[00135] As plaquetas derivadas de células iPS foram manchadas com éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE: pigmento vermelho), misturadas com hematoporfirina e injetadas através da veia da cauda dos camundongos. Manchando-se a corrente sanguínea (exceto componentes celulares) com FITC-dextrano (verde), os componentes sanguíneos no vaso sanguíneo foram descoloridos, permitindo que componentes celulares do sangue fossem reconhecidos a partir do formato e tamanho dos mesmos. Quando a hematoporfirina reagiu a laser e dano endotelial vascular foi causado, as plaquetas formaram uma camada sólida e aderiram ao endotélio danificado ou ao ponto de desnudação endotelial, induzindo a formação de trombos.

[00136] A pequena artéria mesentérica dos camundongos foi irradiada com laser com um comprimento de onda de 488 nm a 30 mW. Após 13 segundos, as plaquetas derivadas de células iPS manchadas de vermelho aderiram ao endotélio danificado (a área indicada como “derivada de iPS” pelas setas na Figura 6). Após 20 segundos, as plaquetas induziram à formação de trombos em coordenação com outras plaquetas derivadas de hospedeiras (plaquetas de camundongo), levando à oclusão do vaso sanguíneo. Assim, provou-se que as plaquetas derivadas de células iPS eram capazes de formar trombos na corrente sanguínea *in vivo*.

[00137] Esses resultados demonstram que as plaquetas preparadas a partir de células iPS, que são estabelecidas mediante a introdução dos quatro genes, incluindo o gene c-MYC e em que o gene c-MYC é reativado, possuem as mesmas características fisiológicas das plaquetas derivadas de sangue periférico humano.

[00138] Conforme fica evidente a partir da análise acima, a fim de induzir de modo eficiente as células megacariocíticas e plaquetas a partir das células iPS, é importante induzir a expressão do gene c-MYC e manter o efeito do produto do gene c-MYC nas células. Espera-se, portanto, que um modo eficiente de induzir as células megacariocíticas e plaquetas a partir das células iPS seja expressar o gene c-MYC em células progenitoras megacariocíticas mononucleares, que são células progenitoras megacariocíticas indiferenciadas, e também suprimem senescência induzida por oncogenes (OIS) a fim de manter o efeito do produto do gene c-MYC. Em vista disso, o gene polycomb foi expresso simultaneamente com o gene c-MYC para a supressão de OIS e o efeito do mesmo foi examinado.

2. Eficiência de produção de células megacariocíticas maduras a partir de células progenitoras megacariocíticas que expressam o gene c-MYC e o gene BMI1

[00139] Como resultado da comparação da eficiência de produção megacariocítica entre a linhagem de célula iPS estabelecida com o uso dos quatro genes e a linhagem de célula iPS estabelecida com o uso dos três genes, constatou-se que a reativação do gene c-MYC nas células megacariocíticas progenitoras influencia o número de células megacariocíticas maduras subsequentemente induzidas. Por isso, estudou-se como a expressão do gene c-MYC em células progenitoras megacariocíticas derivadas de células ES, que são células-tronco pluripotentes, em que o gene c-MYC não é introduzido, influencia a indução subsequente de células megacariocíticas.

[00140] Uma estrutura do tipo rede foi preparada a partir da linhagem de célula ES humana (KhES-3) na presença de 20 ng/ml de VEGF.

As células progenitoras megacariocíticas (pré-multinucleação) extraídas dessa estrutura do tipo rede foram semeadas em 10T1/2 de células a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/cavidade e, após 0 hora, 12 horas e 24 horas a partir da semeadura, infectadas com um vetor retroviral com o gene c-MYC (SEQ ID NO: 1). Após 36 horas, o meio de cultura foi mudado para um meio que não continha o retrovírus e a cultura foi continuada. A introdução do gene pelo retrovírus foi executada mediante infecção por centrifugação com o uso de uma placa de 6 cavidades à qual 2 a 3 ml do meio de cultura foram adicionados, em condições de 900 rpm e 90 minutos. A cultura foi realizada com o uso do meio de cultura em que 100 ng/ml de SCF, 40 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de FL, 40 ng/ml de VEGF e protamina foram, ainda, adicionados a IMDM ao qual FBS em uma concentração final de 15% foi adicionado (Figura 7).

[00141] Como resultado da análise de FACS no 9º dia após a infecção retroviral, observou-se que células que têm CD41a e CD42b dominante aumentaram nas células em que o c-MYC foi introduzido, em comparação com um vetor de controle (Figura 8A). Ademais, durante a inspeção das células mediante uma citocentrifugação, as células multinucleadas foram observadas no controle, enquanto que células mononucleares pré-multinucleação foram observadas nas células com c-MYC introduzido (Figura 8B). Esses resultados sugerem que a expressão forçada de c-MYC faz com que células megacariocíticas imaturas mononucleares aumentem. Os resultados são semelhantes àqueles de camundongos transgênicos em que o c-MYC foi expresso de uma maneira megacariocítica específica (consulte Alexander *et al.*, Deregulated expression of c-MYC in megakaryocytes of transgenic mice increases megakaryopoiesis and decreases polyploidization, J. Biol. Chem., 20 de setembro de 1996; 271 (38): 22976 a 82).

[00142] Em seguida, a capacidade de crescimento celular no estado expresso do c-MYC foi inspecionada. Como resultado, observou-se que o crescimento diminuiu a partir do 14º dia após a infecção (Figura 9). Esse

fenômeno é um mecanismo para evitar a cancerização celular para efetuar uma parada do ciclo celular, senescência e apoptose em resposta a um sinal de crescimento anormal devido à expressão excessiva de um oncogene como c-MYC, e é chamado de senescência induzida por oncogenes (OIS) (descrito acima). Em vista disso, em uma tentativa de evitar a OIS, o BMI1 que é um dos genes polycomb para regular negativamente o gene Ink4a/Arf que codifica os produtos dos genes supressores de tumor p16 e p19 foram introduzidos nas células megacariocíticas progenitoras. O gene c-MYC e o gene BMI1 (SEQ ID NO: 2) foram introduzidos nas células por meio do método de introdução de gene retroviral mencionado acima e expressos, após isso a análise de FACS foi conduzida. Como resultado, uma colônia celular CD41a positiva/CD42b positiva (marcador megacariocítico) que cresce de modo estável e exponencial com o tempo após a introdução do gene foi obtida (Figura 10). Confirmou-se que, enquanto o número de células CD41a positivas/CD42b positivas diminuiu significativamente no 20º dia após a introdução do gene, no caso de se introduzir apenas o gene c-MYC nas células (resultado de análise mais baixo na Figura 10), o número de células CD41a positivas/CD42b positivas aumentou dia a dia no caso da introdução do gene c-MYC e do gene BMI1 (resultado de análise mais alto na Figura 10). Isso demonstra que as células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização em que, não apenas o gene c-MYC é introduzido, mas também o gene BMI1 como um dos genes polycomb é introduzido, são diferenciadas nas células progenitoras megacariocíticas durante a retenção de alta capacidade de crescimento evitando-se a OIS. Aqui, a fim de determinar as características das células megacariocíticas obtidas, a análise de FACS foi conduzida para verificar se CD9 e CD42a, que são outras moléculas funcionais específicas de megacariócitos, estão presentes nas superfícies celulares (vide Figura 11A) ou não. Como resultado, a presença de CD9 e CD42a na linhagem de célula em que o gene c-MYC e o gene BMI1 foram introduzidos foi capaz de ser confirmada (Figura 11B).



[00143] Em seguida, a capacidade de crescimento das células que expressam c-MYC/BMI1 foi examinada. As células progenitoras megacariocíticas sem multipoliploidização, em que o gene c-MYC e o gene BMI1 foram introduzidos, foram cultivadas em um meio de cultura em que 100 ng/ml de SCF, 40 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de FL e 40 ng/ml de VEGF foram, ainda, adicionados a IMDM, ao qual FBS em uma concentração final de 15% foi adicionado, e o número de células foi contado com o passar do tempo. Como resultado, aproximadamente  $4 \times 10^7$  de células CD41a positivas foram obtidas no 49º dia após a introdução do gene (Figura 12). Além disso, durante a observação das plaquetas liberadas pelas células megacariocíticas progenitoras derivadas das células que expressam c-MYC/BMI1, através de um microscópio eletrônico, estruturas microtubulares, sistemas canaliculares abertos e características de grânulos de plaquetas foram capazes de ser confirmados (Figura 13).

3. Indução de eritrócitos a partir do gene c-MYC introduzido em células progenitoras hematopoiéticas através de células progenitoras eritroides

[00144] Em seguida, tentou-se produzir eritrócitos a partir de células progenitoras eritroides obtidas a partir de células progenitoras hematopoiéticas, em que o gene c-MYC foi introduzido. Do mesmo modo que a introdução do gene c-MYC ou do gene BMI1 descrita na seção 2 acima, células que expressam c-MYC/HOXA2 (SEQ ID NO: 3) e células que expressam c-MYC/BCLXL (SEQ ID NO: 4) foram produzidas e a análise de FACS foi conduzida. Como resultado, a presença de um marcador eritroide de colônia celular CD71 positiva/GlyA positiva nas células que expressam c-MYC/HOXA2 foi confirmada no 105º dia após a introdução do gene (vista direita superior na Figura 14). Ademais, a presença de uma colônia celular GlyA positiva nas células que expressam c-MYC/BCLXL foi, também, confirmada (vista direita inferior na Figura 14). Isso demonstra que as células progenitoras hematopoiéticas, em que o gene c-MYC é introduzido, também podem ser diferenciadas nos eritrócitos mudando-se a combinação dos fatores

introduzidos.

4. Produção de plaqueta funcional com o uso de sistema de indução de expressão de gene

[00145] Conforme fica evidente a partir do exposto acima, um modo eficiente de preparar células megacariocíticas e plaquetas eficientemente em grande quantidade é aumentar o número de células progenitoras megacariocíticas. Para fazer isso, é necessário coexpressar o gene da família c-MYC e o gene polycomb, simultaneamente, em células progenitoras megacariocíticas sem multipoliploidização para, desse modo, acentuar a capacidade de crescimento das células megacariocíticas progenitoras sem multipoliploidização. A fim de facilitar a maturação da célula megacariocítica (multinucleação), entretanto, é desejável regular de modo supressivo a expressão do gene da família c-MYC e o gene polycomb de acordo com as circunstâncias.

[00146] Em vista disso, as plaquetas foram produzidas regulando-se de modo induzido a expressão do gene c-MYC e do gene BMI1, com o uso de um sistema de pMX tet-off, e a funcionalidade fisiológica das plaquetas foi examinada.

#### 4-1. Confirmação de funcionalidade de vetor de regulação de gene

[00147] Um vetor que contém todos os vetores em que c-MYC-2A-BMI1 foi incorporado em um vetor pMX tet-off (fornecido pelo Prof. Hiroyuki Mano, Jichi Medical University) foi preparado ("2A" é um peptídeo que tem atividade de autoclivagem derivada do vírus da febre aftosa, onde uma pluralidade de proteínas pode ser obtida de modo eficiente, a partir de um único promotor inserindo essa sequência entre uma pluralidade de proteínas (Hasegawa *et al.*, 2007 Stem Cells)). O vetor pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 induz a expressão do gene c-MYC e do gene BMI1 na presença de estradiol e suprime a expressão do gene c-MYC e do gene BMI1, na presença de tetraciclina e na ausência de estradiol.

[00148] O vetor pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 preparado foi expresso

em células 293GPG, e o estado de regulação de expressão do gene c-MYC e do gene BMI1 foi confirmado mediante FACS. A Figura 15 mostra os resultados da análise de FACS, onde a proteína c-MYC nas células foi manchada com um anticorpo de proteína anti-c-MYC e, então, manchada com um anticorpo secundário identificado como Alexa647. Conforme se pode entender a partir do desenho, nas células 293GPG em que o pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 foi incorporado, o nível de expressão do gene c-MYC foi semelhante àquele nas células 293GPG de um controle na presença de tetraciclina (indicado nos gráficos como 293gpg e +tetraciclina na Figura 15), mas a expressão do gene c-MYC foi estimulada na presença de estradiol (indicado no gráfico como + $\beta$ -estradiol na Figura 15).

[00149] Esses resultados demonstram que a expressão do gene alvo pode ser regulada pelo vetor pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 usado aqui.

4-2. Produção de linhagem de célula megacariocítica mediante vetor de regulação de gene

[00150] O vetor de regulação de gene descrito na seção 4-1 acima foi usado para expressar o gene c-MYC e o gene BMI1 em células progenitoras megacariocíticas derivadas da linhagem de célula ES humana (KhES-3), e a capacidade de crescimento e a capacidade de diferenciação das mesmas foram examinadas.

[00151] O exame foi conduzido em células em que apenas um vetor foi introduzido (Figura 16A(a)), uma linhagem de célula em que pMX c-MYC e Dsam BMI1 foram expressos de modo forçado separadamente (Figura 16A(b)), uma linhagem de célula em que pMX tet-off c-MYC e pMX tet-off BMI1 foram expressos separadamente (Figura 16A(c)), uma linhagem de célula em que pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 foi expresso (Figura 16A(d)) e uma linhagem de célula em que pMX tet-off BMI1 2A c-MYC foi expresso (Figura 16A(e)). Aqui, (d) e (e) are constructos que diferem em ordem de disposição do gene c-MYC e do gene BMI1 com a sequência 2A entre os mesmos.

[00152] A Figura 16A mostra curvas de crescimento celular

CD41a+ para essas linhas de células. Cada linhagem de célula foi manchada com um anticorpo anti-CD41a e um anticorpo anti-CD42b como marcadores megacariocíticos e analisada com o uso de um citômetro de fluxo. A linhagem de célula gerada com o uso de pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 (Figura 16A(d)) mostra o mesmo fenótipo da linhagem de célula que expressa de modo forçado pMX c-MYC e Dsam BMI1 separadamente (Figura 16A(b)), onde a maior parte das populações de células expressa o marcador megacariocítico (painel superior na Figura 16B). Ademais, a linhagem de célula gerada com o uso de pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 (Figura 16A(d)) exibiu capacidade de crescimento mais alta do que a linhagem de célula em que pMX tet-off c-MYC, e pMX tet-off BMI1 foram separadamente introduzidos (Figura 16A(c)), e a linhagem de célula gerada com o uso de pMX tet-off BMI1 2A c-MYC (Figura 16A(e)).

[00153] Quando manchado com um anticorpo anti-Glicoforina-a e um anticorpo anti-CD41a, uma população celular de marcador comum megacariócito/eritroblasto CD41a+/Gly-a+ estava presente na linhagem de célula que expressa de modo forçado pMX c-MYC e Dsam BMI1 separadamente (painel inferior na Figura 16B, esquerda), enquanto que Gly-a desapareceu na linhagem de célula gerada com o uso de pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 (painel inferior na Figura 16B, direita). Isso indica que a linhagem de célula gerada com o uso de pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 é uma linhagem de célula mais diferenciada em megacariócitos do que a linhagem de célula que expressa de modo forçado pMX c-MYC e Dsam BMI1 separadamente.

#### 4-3. Em relação à multinucleação de megacariócito

[00154] O grau de multinucleação da linhagem de célula que expressa de modo forçado o gene c-MYC e o gene BMI1 pelo vetor pMX tet-off c-MYC 2A BMI1, na presença de  $\beta$ -estradiol, foi examinado. Megacariócitos derivados de humanos tipicamente multinuclearam para aproximadamente 32 N (Figura 17A). Por outro lado, a linhagem de célula que expressa de modo forçado o gene c-MYC e o gene BMI1 pelo vetor pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 dificilmente multinuclearam, com o grau de multinucleação de 2N a 4N.

4-4. Análise funcional de plaquetas derivadas de linhagem de célula megacariocítica que expressa o gene c-MYC e o gene BMI1

[00155] Ensaios funcionais foram realizados em plaquetas derivadas da linhagem de célula megacariocítica que expressa o gene c-MYC e o gene BMI1

[00156] As plaquetas derivadas de sangue periférico humano de um controle se ligaram ao fibrinogênio na presença de ADP (difosfato de adenosina, um fator intracelular para a ativação de plaquetas), que exibe capacidade de ativação de integrina normal (sinal de dentro para fora) necessária para um estágio inicial de formação de trombos (vista direita superior na Figura 18). No entanto, nem a linhagem de célula pMX tet-off c-MYC 2A BMI1 (na presença de estradiol) nem a linhagem de célula que expressa de modo forçado pMX c-MYC e Dsam BMI1 se ligou ao fibrinogênio, mesmo quando ADP foi adicionado (vistas média e inferior na Figura 18). Assim, declarou-se que plaquetas que têm funcionalidade normal não são liberadas quando o gene c-MYC e o gene BMI1 permanecem expressos de modo forçado.

[00157] Em seguida, para a linhagem de célula que expressa de modo forçado o gene c-MYC e o gene BMI1 pelo vetor pMX tet-off c-MYC 2A BMI1, após desligar a expressão forçada em condições de +tetraciclina e - $\beta$ -estradiol, a capacidade de ativação de integrina das plaquetas CD41a+/CD42b+ no 4º dia de cultura foi analisada com o uso de um citômetro de fluxo (Figura 19). Como resultado, verificou-se que um anticorpo PAC1 (anticorpo ligado a integrina ativada  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) ligado na presença de ADP, exibiu capacidade de ativação de integrina normal (sinal de dentro para fora) (Figura 19B).

[00158] Esses resultados indicam que, embora as plaquetas produzidas a partir da linhagem de célula megacariocítica proliferada por meio de expressão forçada do gene c-MYC tenham desordem funcional, as plaquetas que têm funcionalidade normal podem ser produzidas desligando-se

a expressão forçada do gene c-MYC e similares na linhagem de célula megacariocítica.

[00159] A regulação de expressão do gene c-MYC e do gene BMI1 nas células megacariocíticas progenitoras descrita acima também é aplicável ao gene da família MYC, o gene BCLXL e o gene HOXA2 usados para estabelecer uma linhagem de célula progenitora eritroide, possibilita que os eritrócitos maduros sejam induzidos.

[00160] Declarou-se que MYC e BMI1 causam crescimento celular em um estágio de frações de MEP que são células progenitoras comuns a células megacariocíticas e células eritroides, ou em um estágio de células progenitoras megacariocíticas mais diferenciadas do que as frações de MEP (Figura 20). Já que as células progenitoras megacariocíticas sem multipoliploidização em que o gene c-MYC e o gene BMI são introduzidos podem ser criopreservadas, as células megacariocíticas e plaquetas podem ser preparadas a partir de estoques congelados quando necessário.

[00161] Do mesmo modo, uma linhagem de célula progenitora eritroide produzida introduzindo-se o gene MYC e o gene BCLXL ou HOXA2 pode ser criopreservada e degelada e preparada quando necessário.

[00162] Além disso, regulando-se para cima ou para baixo a expressão do gene MYC introduzido e do gene BMI1, as plaquetas ou células eritroides que retêm bioatividade podem ser preparadas em quantidade suficiente.

#### Aplicabilidade Industrial

[00163] A presente invenção fornece um método de amplificar células em um estágio de diferenciação para produzir mais células específicas diferenciadas. Aplicando-se o método de acordo com a presente invenção, por exemplo, a células sanguíneas, células em um estágio de diferenciação desejado podem ser supridas em grande quantidade. Por isso, a presente invenção constitui, especialmente, uma contribuição significativa ao desenvolvimento de tratamento no campo da medicina.

### REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir células megacariocíticas maduras caracterizado pelo fato de que compreende:

induzir artificialmente a expressão forçada do gene c-Myc ou um gene tendo a sequência de cDNA correspondente à sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 1 e o gene BMI1 ou um gene tendo a sequência cDNA correspondente à sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO. 2, em células progenitoras megacariocíticas sem multipoliploidização e cultura e crescimento das células; e

cultura e diferenciação das células crescidas de células megacariocíticas maduras.

2. Método para produzir células megacariocíticas maduras, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de diferenciação compreende:

cultivar as células crescidas suprimindo a expressão do gene c-Myc e o gene BMI1.

3. Método para produzir células megacariocíticas maduras, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a supressão da expressão do gene c-Myc e o gene BMI1 é atingida mediante a ligação de maneira operacional do gene c-Myc ou do gene BMI1 a um lado à jusante de um promotor de regulação de expressão induzível.

4. Método para produzir células megacariocíticas maduras, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o promotor de regulação de expressão induzível é vetor pMX tet-off.

5. Método para produzir células megacariocíticas maduras, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, criopreservar as células crescidas após a etapa de crescimento, em que a etapa de diferenciação é conduzida após as células serem degeladas.

6. Método para produzir um produto de plaquetas caracterizado pelo fato de que compreende:

produzir células megacariocíticas maduras através do método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5;

recuperar a partir da cultura das células megacariocíticas uma fração de uma solução de cultura em que as plaquetas liberadas das células megacariocíticas são abundantes; e

remover componentes de célula sanguínea que não sejam plaquetas da fração.

7. Método para produzir um produto sanguíneo caracterizado pelo fato de que compreende:

produzir um produto de plaqueta como definido através do método conforme definido na reivindicação 6; e

misturar o produto de plaqueta com outros componentes de um produto de sangue.



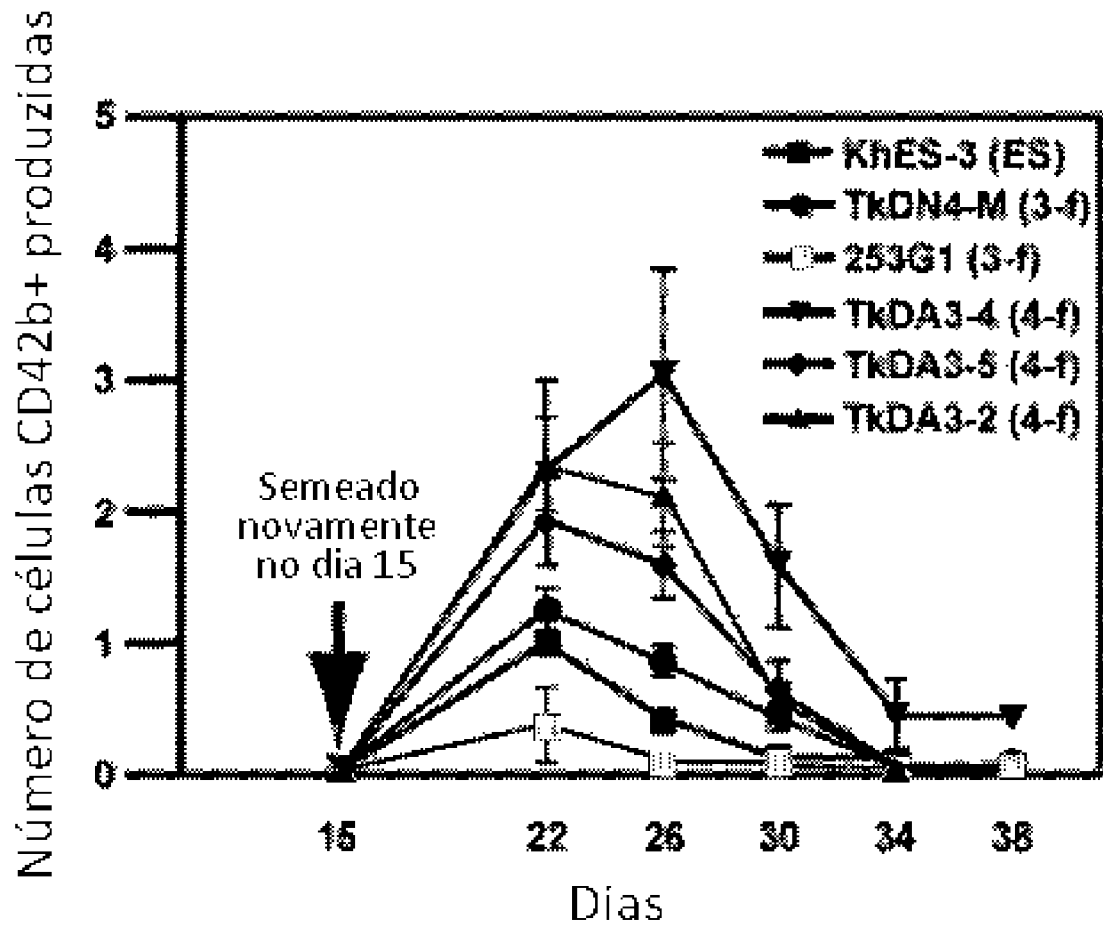
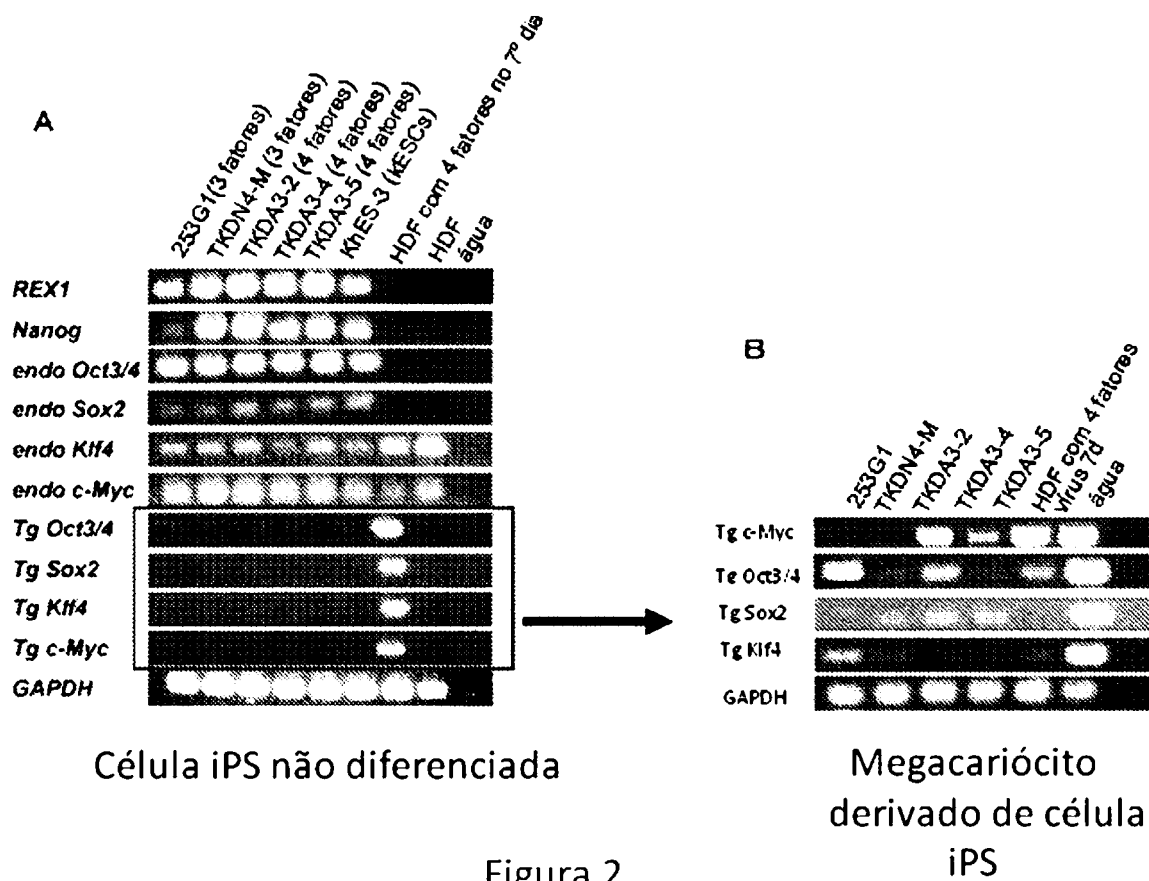


Figura 1



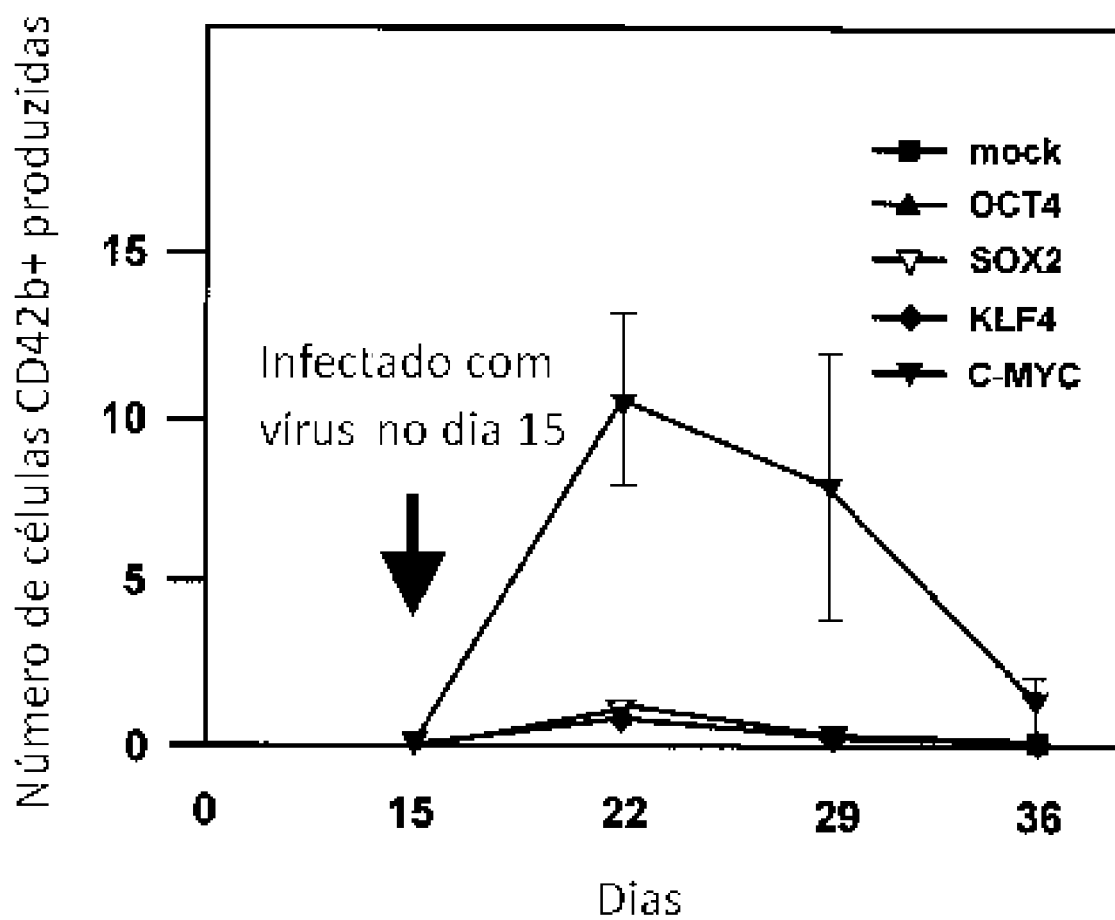


Figura 3

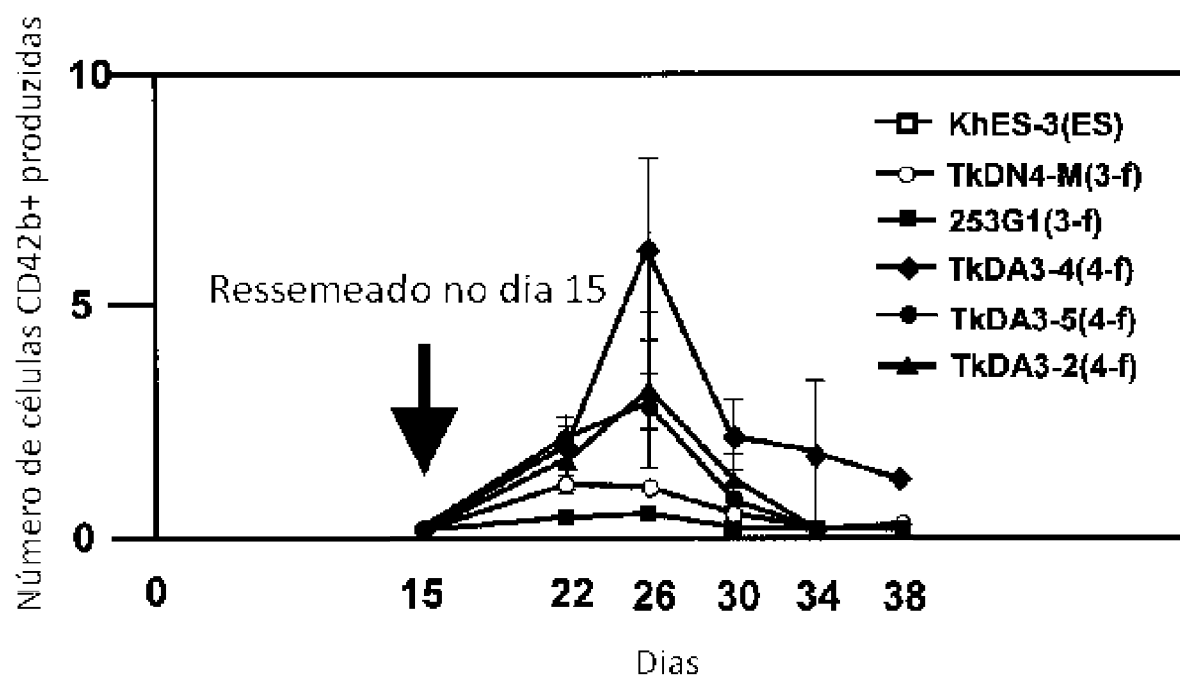


Figura 4

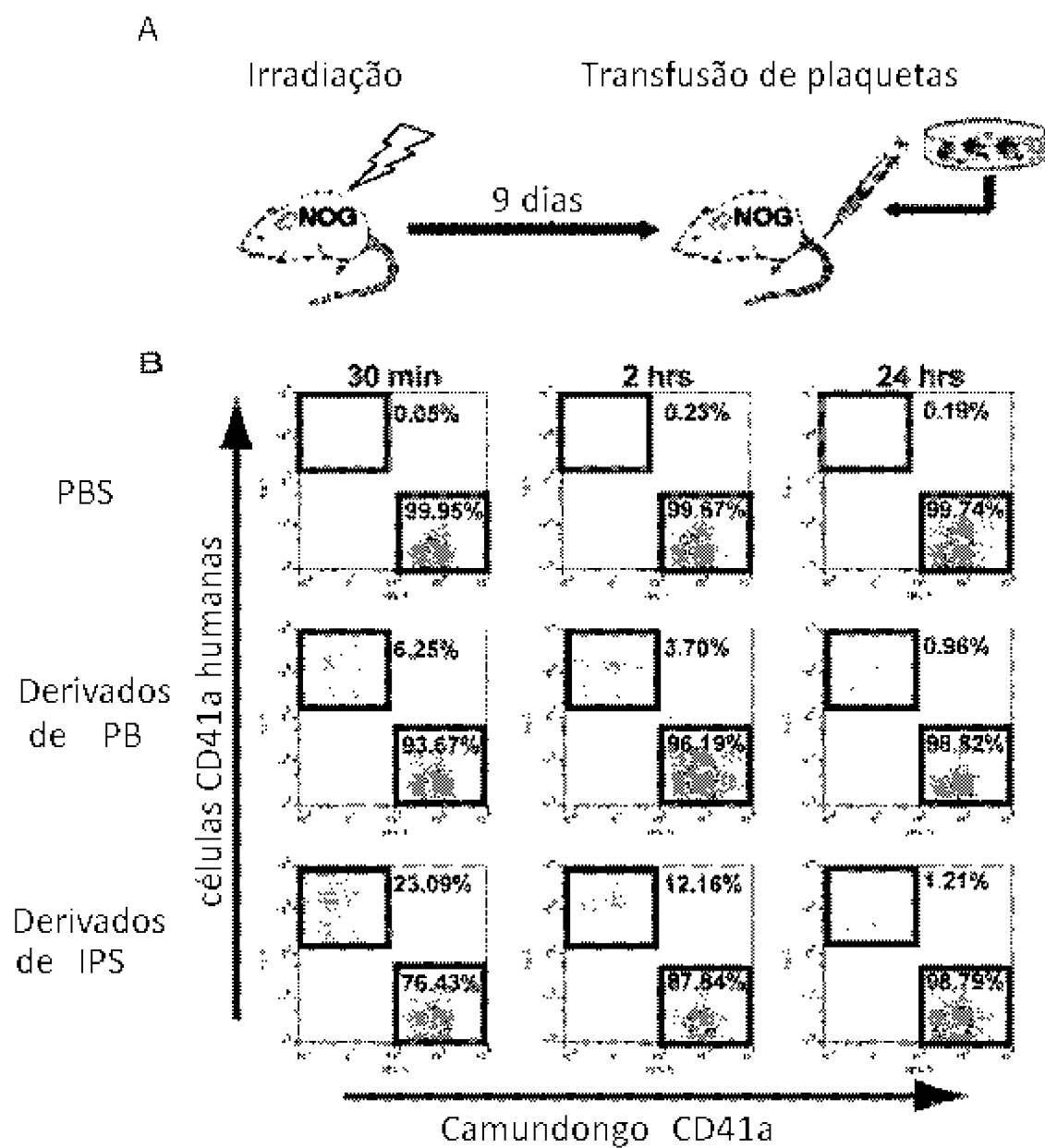


Figura 5

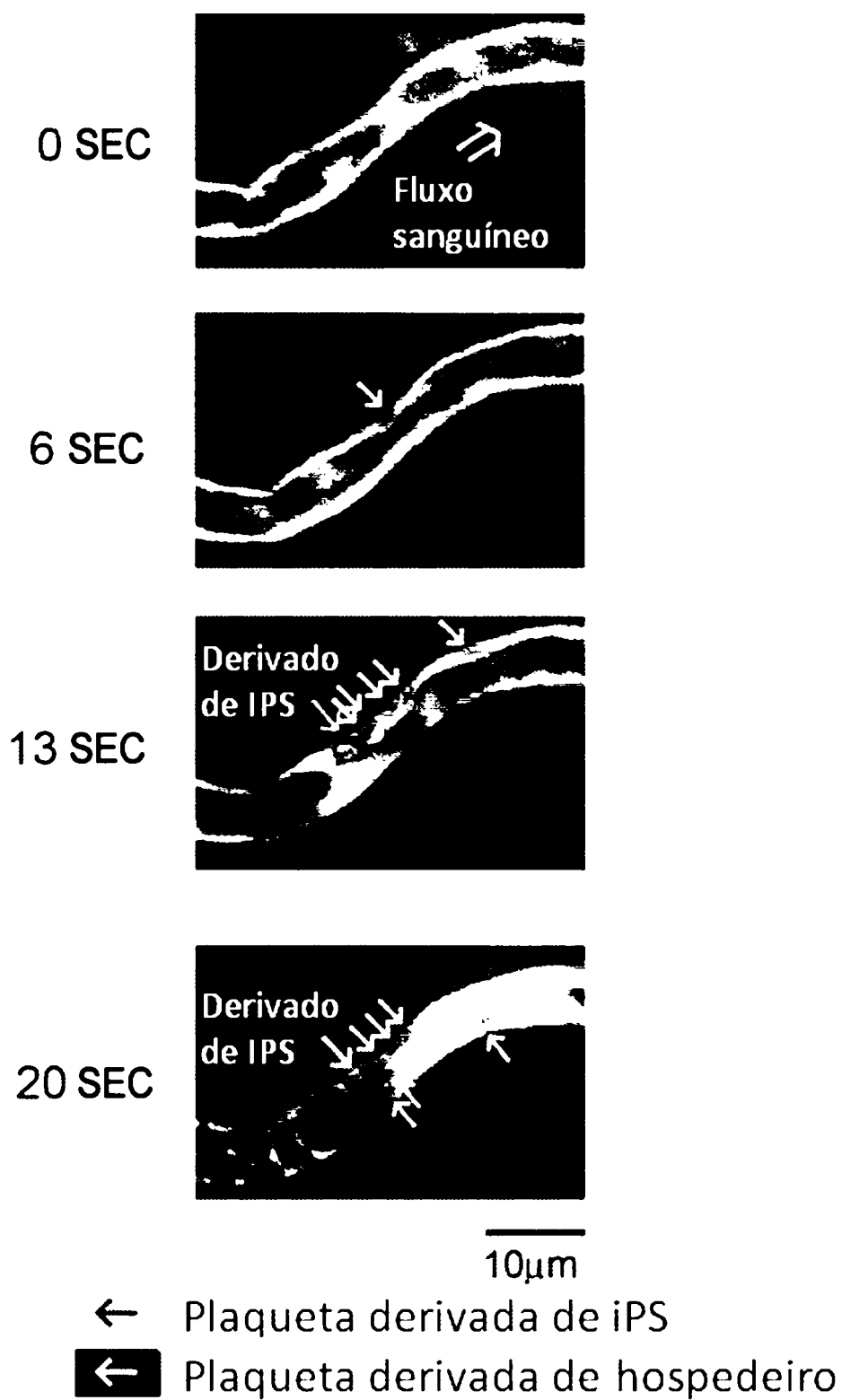


Figura 6

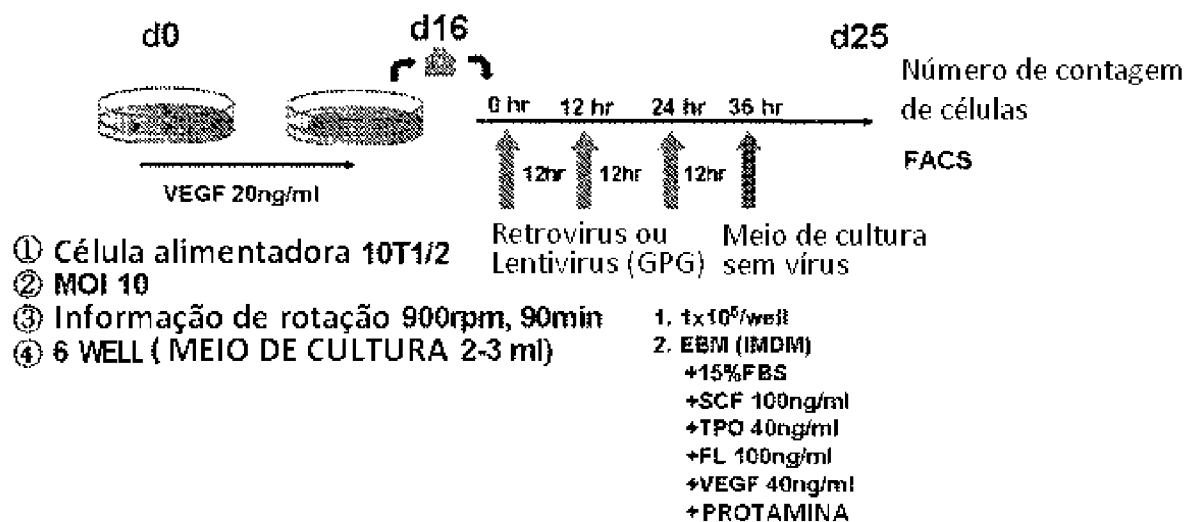


Figura 7

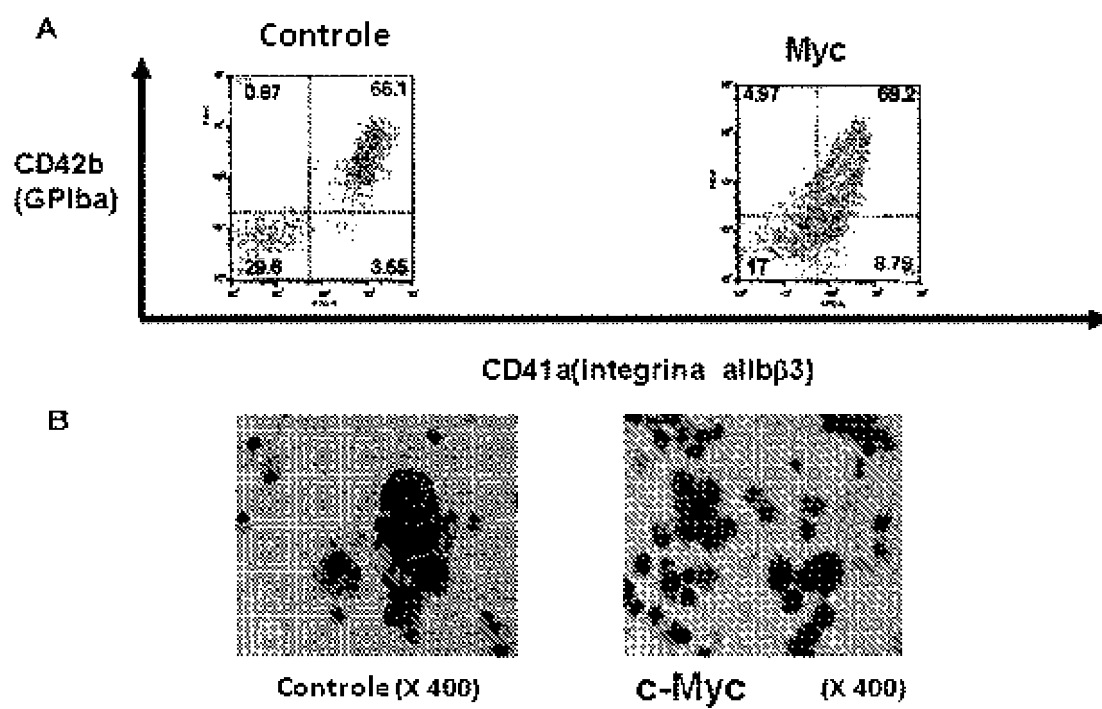


Figura 8



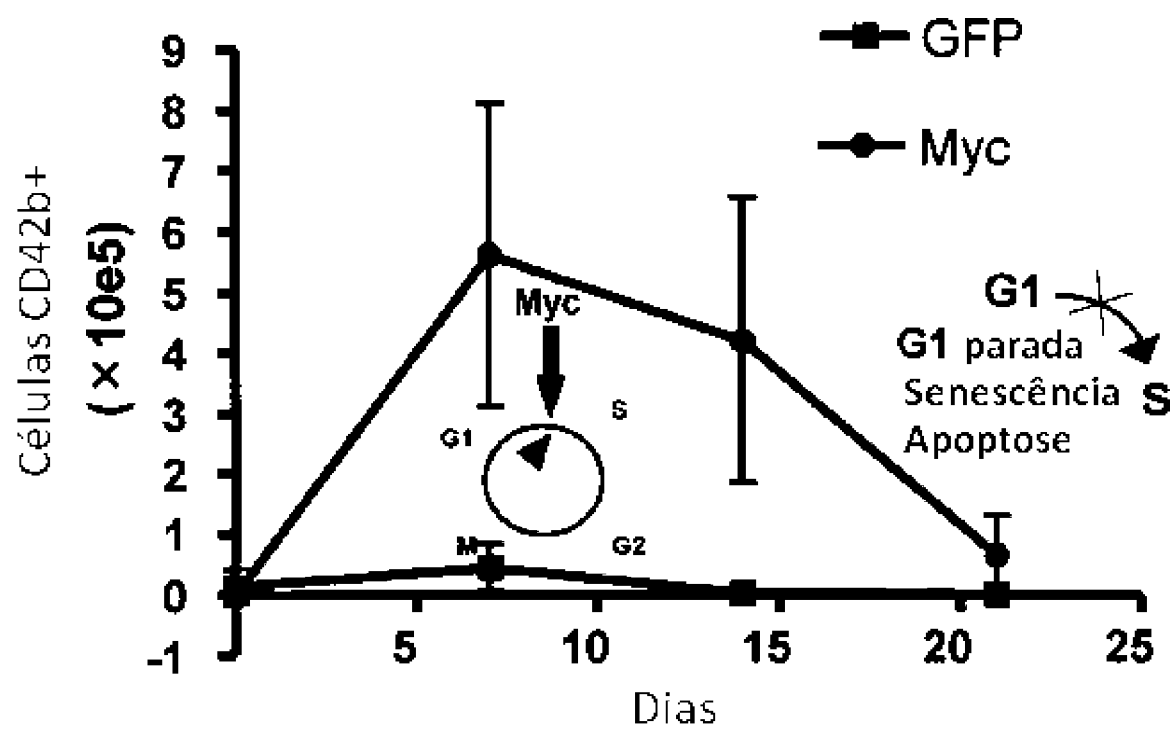


Figura 9

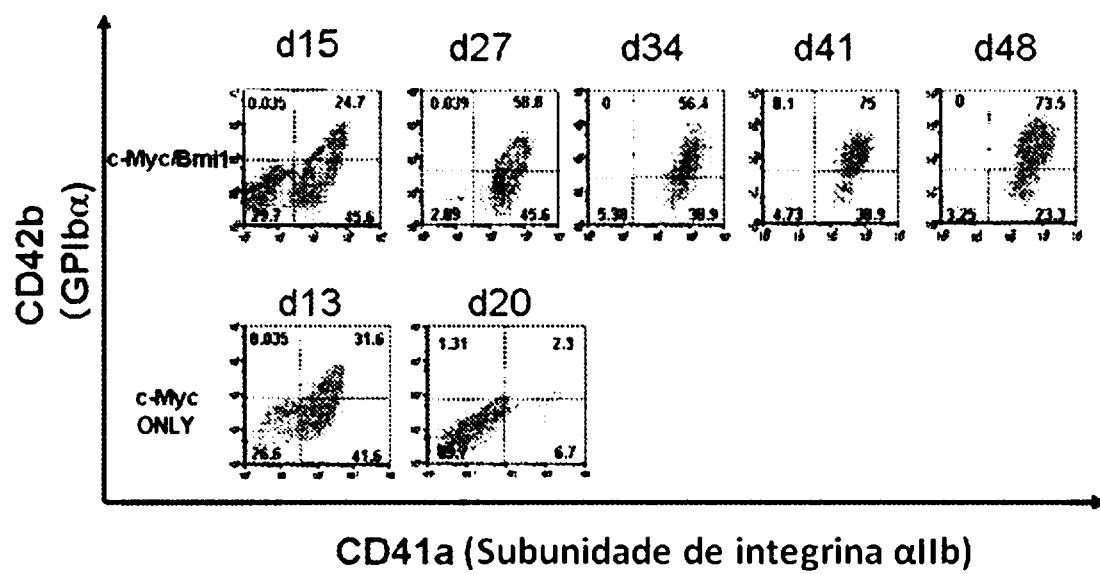


Figura 10

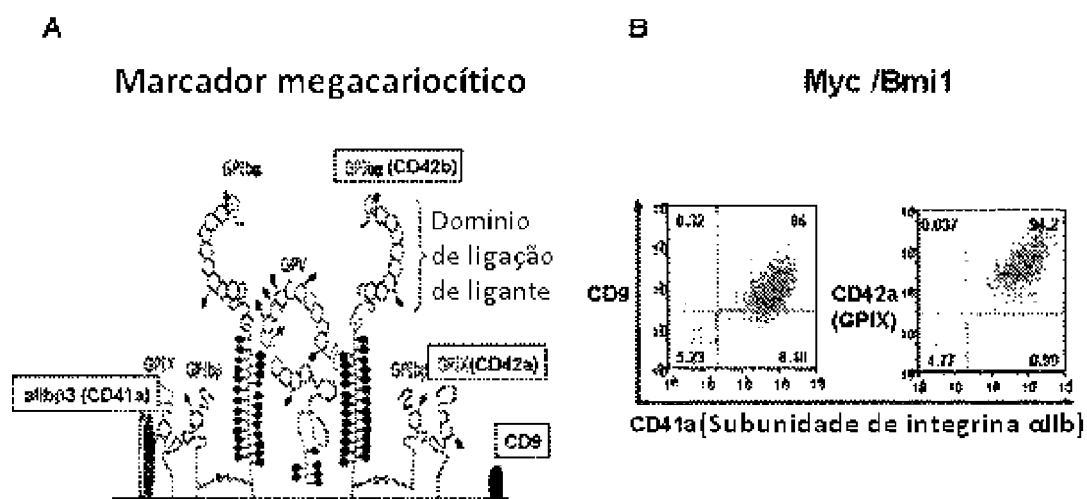


Figura 11

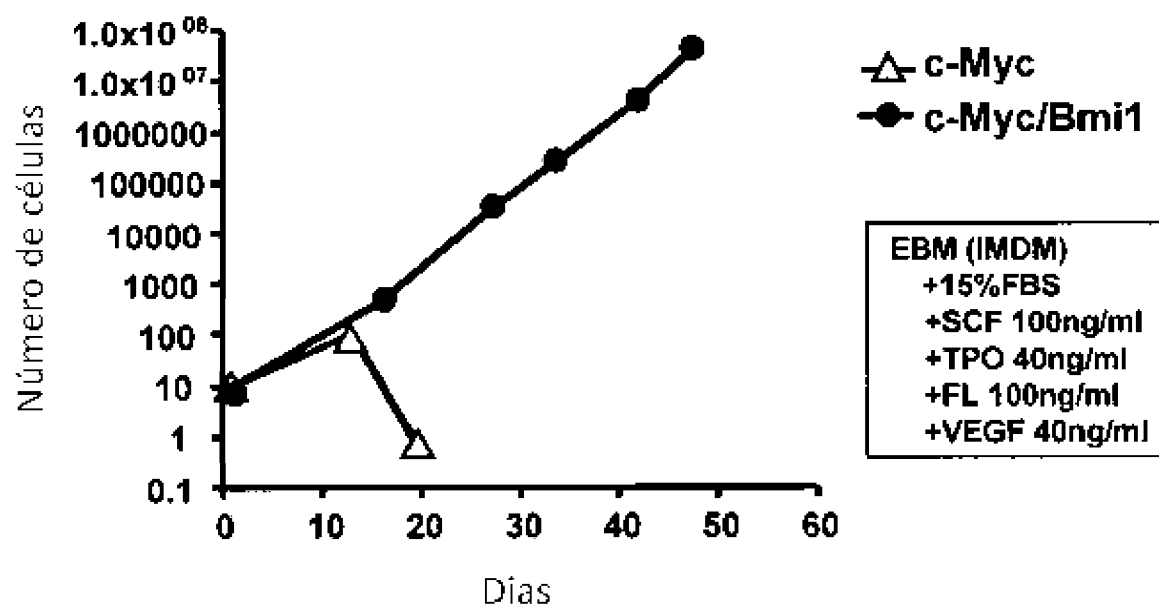


Figura 12

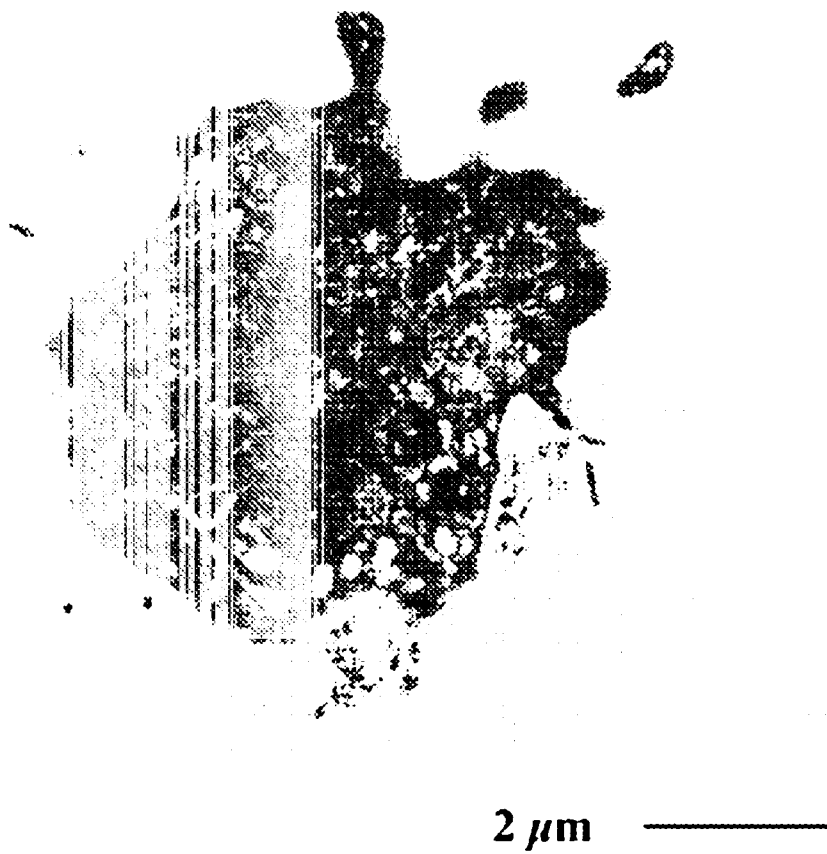


Figura 13

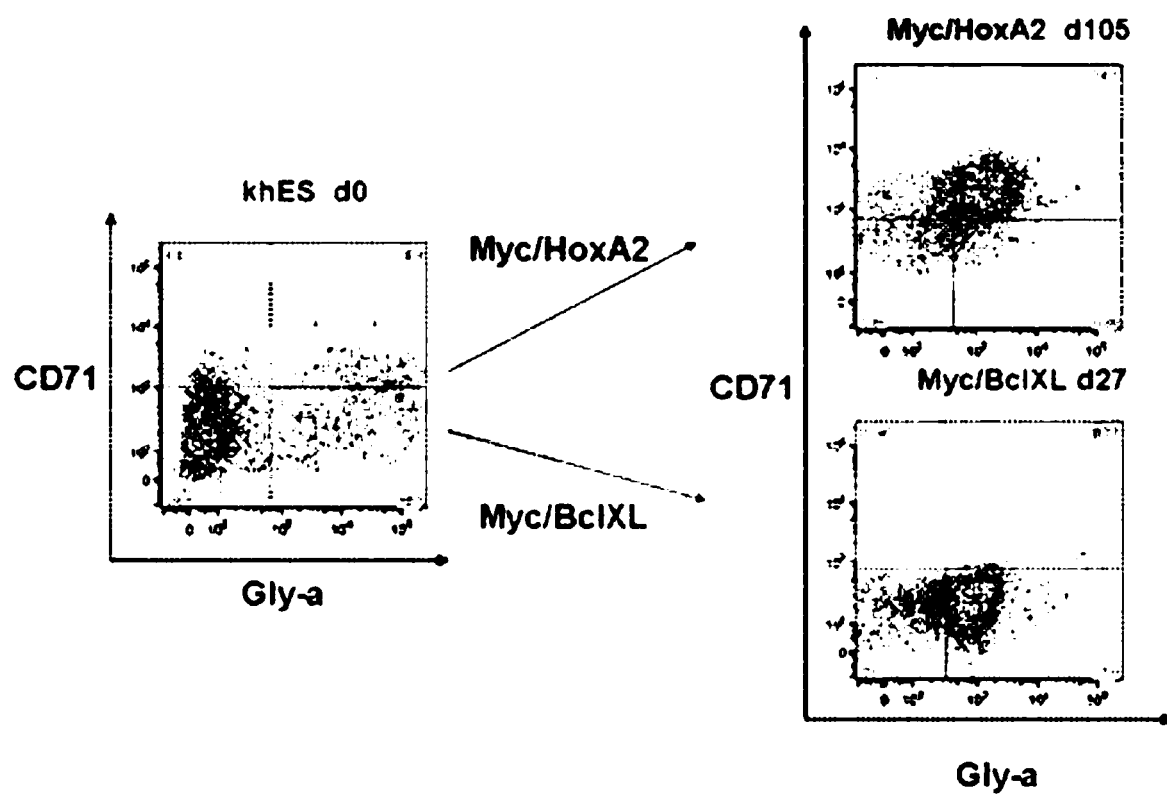


Figura 14

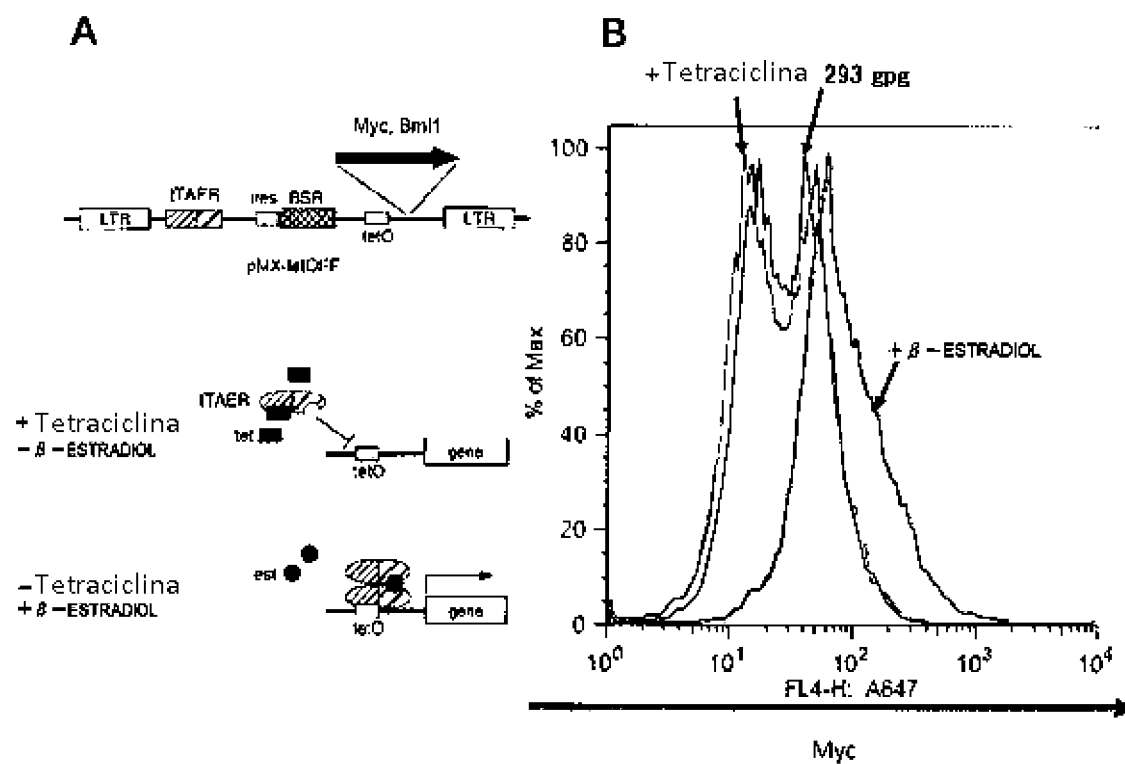


Figura 15

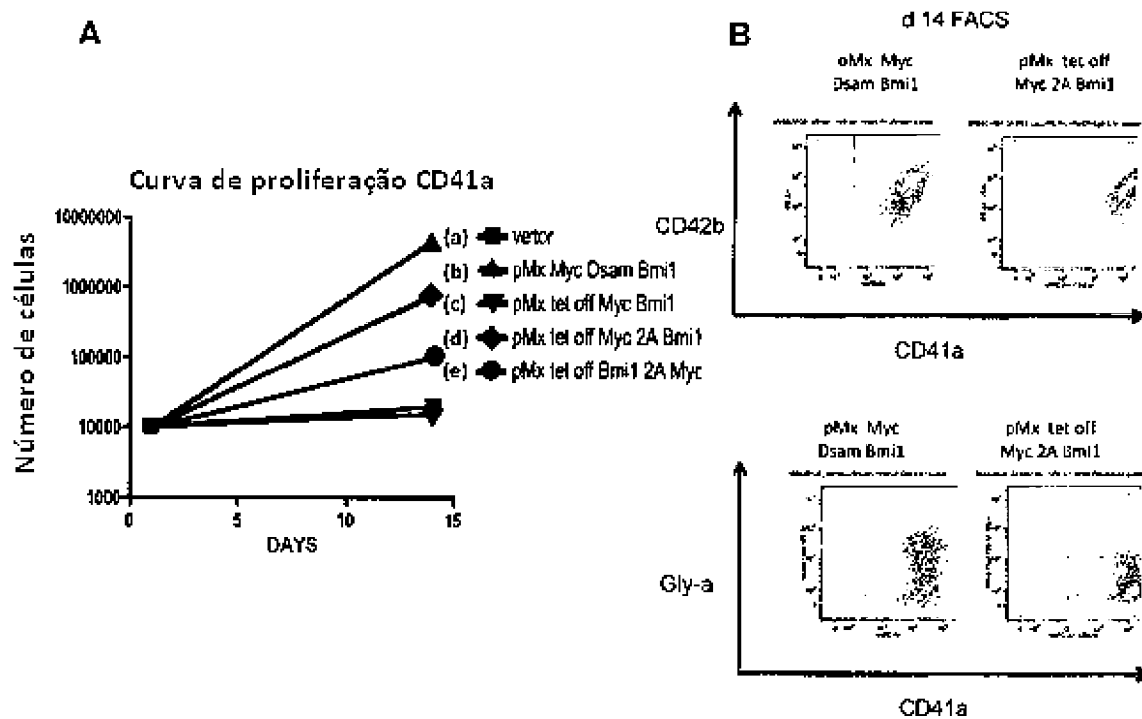


Figura 16



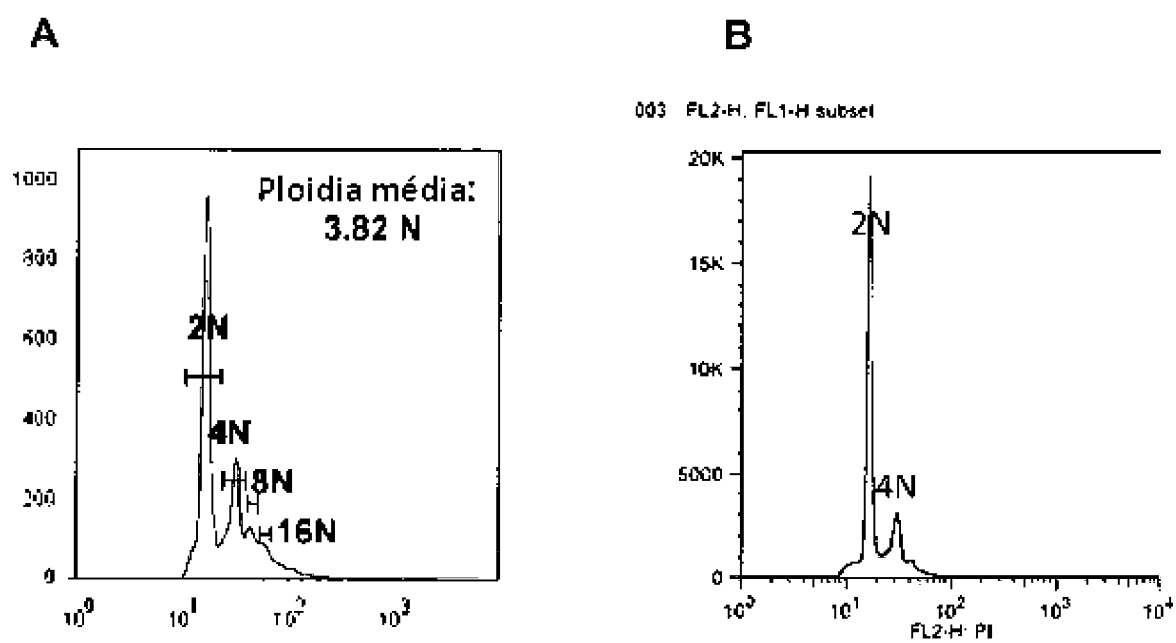


Figura 17

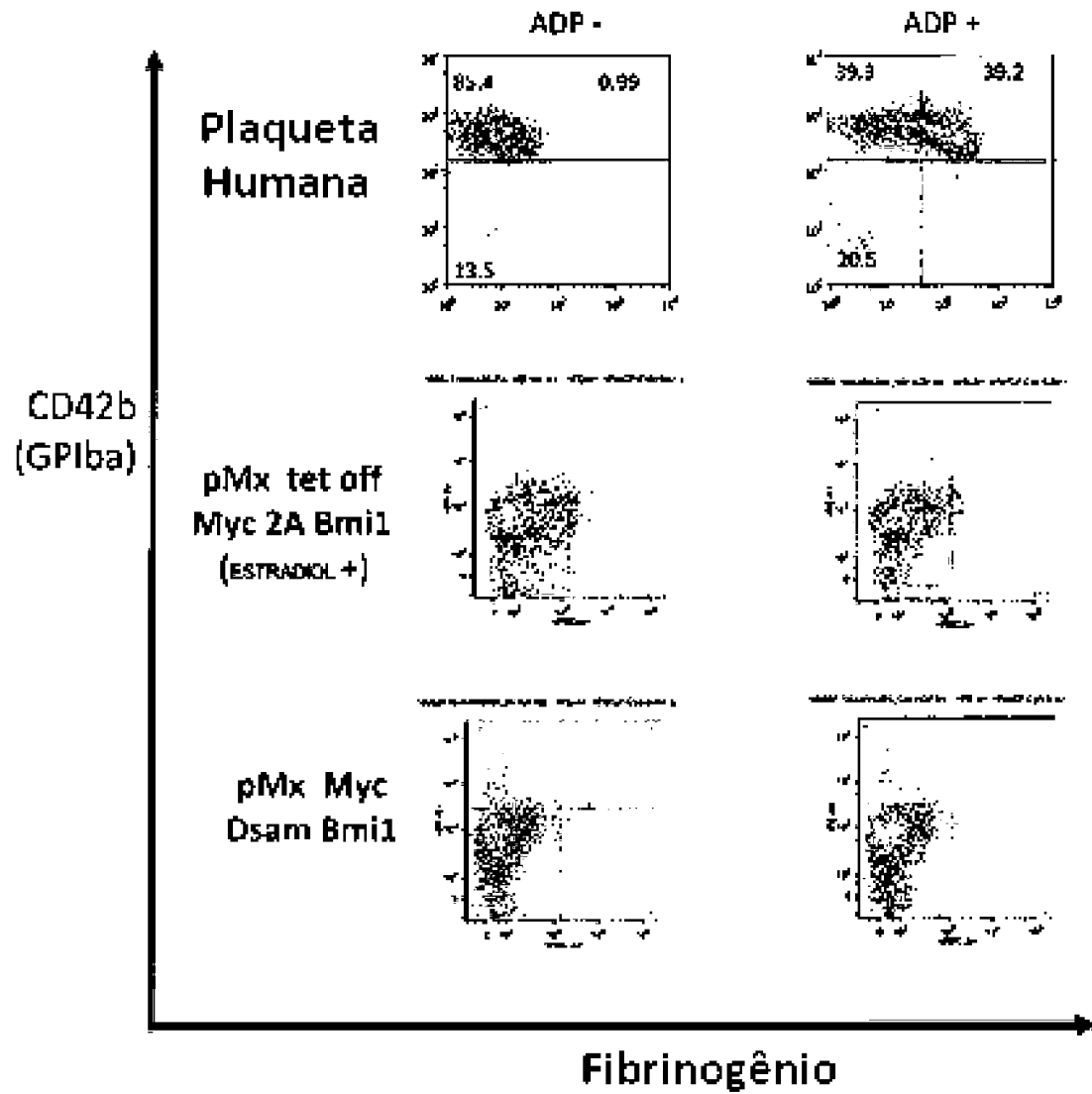


Figura 18

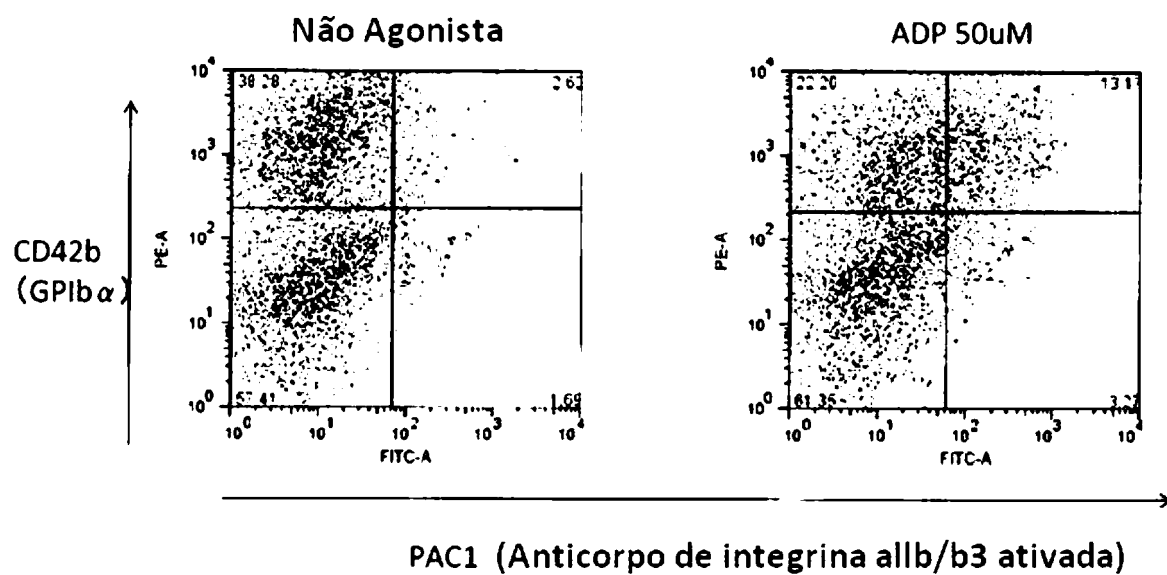


Figura 19

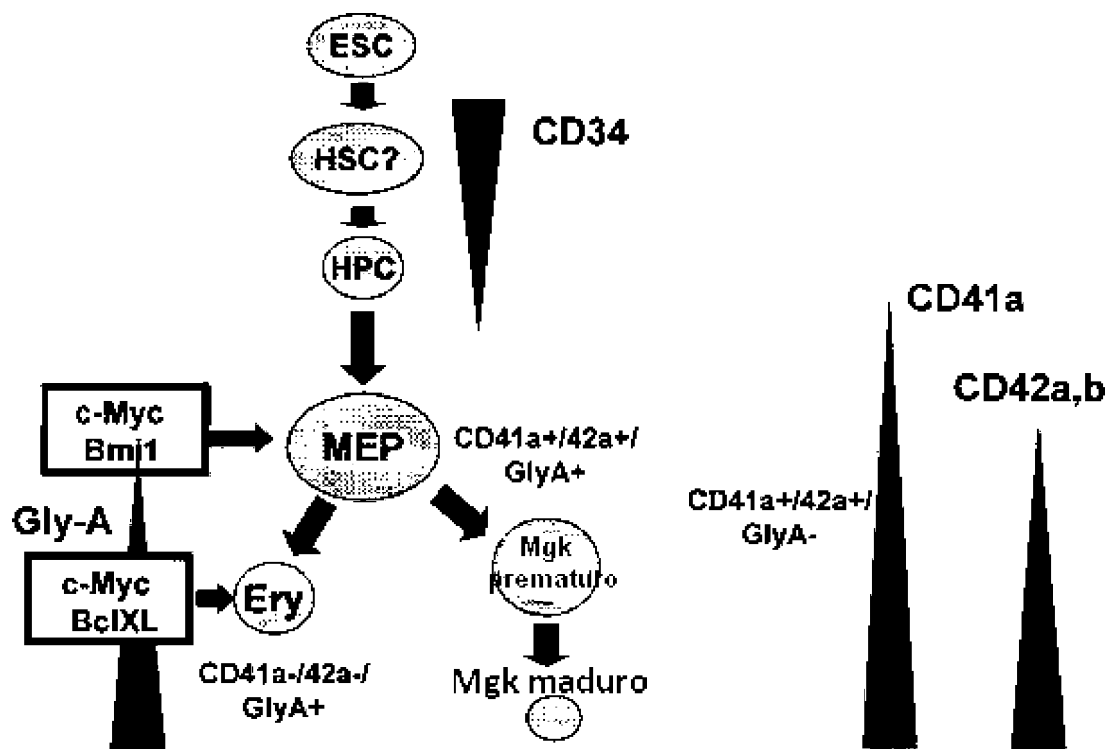


Figura 20