



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 155 379**

② Número de solicitud: 009900666

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 5/08

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **05.04.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2001**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2001

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Cantabria
Avda. de los Castros s/n
39005 Santander, Cantabria, ES**

⑦ Inventor/es: **León Serrano, Javier;
Lerga Flamarique, Ana y
Richard Espiga, Carlos**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo.

Se describe un procedimiento para obtener cantidades ilimitadas de plaquetas humanas a partir de las líneas celulares K562 y KU812, derivadas de leucemias mieloides. El procedimiento se basa en el tratamiento con estaurosporina a concentraciones 50 a 100 nM durante 3 a 6 días. Las células pueden crecerse en suspensión y las plaquetas pueden ser separadas de las células por métodos estándar. Las plaquetas son reconocibles morfológicamente y comparten características bioquímicas y ultraestructurales con las plaquetas aisladas de sangre. Se puede obtener así una preparación de plaquetas humanas a partir de precursores celulares genéticamente idénticos y libre de otros productos biológicos de origen humano. Pueden ser usadas para fines analíticos como servir de estándar en ensayos plaquetarios biológicos o bioquímicos.

ES 2 155 379 A1

DESCRIPCION

Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo.

El invento se refiere a un procedimiento para producir un preparado de plaquetas humanas a partir de células en cultivo, sin los riesgos biológicos que conlleva su purificación libre a partir de sangre humana. Las plaquetas proceden de líneas celulares inducidas a diferenciación megacariocítica, y por tanto son genéticamente idénticas. Tales plaquetas son generadas por células de la línea K562 o KU812 tratadas durante 3-6 días con estaurosporina a concentraciones de 50-100 nM.

Antecedentes

Las líneas derivadas de leucemia mieloide humana se han usado como modelos de diferenciación celular a los distintos tipos celulares de estirpe mieloide. Las células de estas líneas creciendo en cultivo pueden diferenciarse *in vitro* en respuesta a diversos productos, tanto de síntesis como naturales. La proteína quinasa C es una familia de enzimas que tiene un importante papel en el control de la diferenciación de células mieloides. Así, diferentes isoenzimas de proteína quinasa C se han visto implicadas en la diferenciación a estirpe monocítica o eritrocítica de células derivadas de leucemia mieloide (Aihara et al., 1992; Hocevar et al., 1992; Nishikawa and Shirakawa 1992; Tonetti et al., 1994). Las células K562 derivan de un paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica (Lozzio and Lozzio, 1975) y se ha descrito su capacidad para diferenciarse a línea eritroide con varios fármacos, como arabinósido de citosina (Rowley et al., 1981). En respuesta a ésteres de forbol (activadores de proteína quinasa C) como el 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate las células K562 se diferencian a un fenotipo con mezcla de marcadores típicos de línea megacariocítica y monocítica, aunque la morfología celular predominante es la monocítica-macrofágica (Leary et al., 1987; Alitalo 1990). Sin embargo, hasta el procedimiento descrito en la presente Patente no se conocía otro procedimiento capaz de diferenciar las células K562 de forma mayoritaria a línea megacariocítica.

Referencias

Aihara, H., Asaoka, Y., Yoshida, K., and Nishizuka, Y. Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 11062-11067, 1991.
 Alitalo, R. Induced differentiation of K562 leukemia cells: a model for studies of gene expression in early megakaryoblasts. *Leuk. Res.* **14**: 501-514, 1990.
 Hocevar B. A., Morrow D. M., Tykocinski M. L., and Fields A. P. Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia cell proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.* **101**: 671-679, 1992.
 Leary, J. F., Ohlsson-Wilhelm, B. M., Giuliano, R., LaBella, S., Farley, B., and Rowley, P. T. Multipotent human hematopoietic cell line K562: lineage-specific constitutive and inducible antigens. *Leuk. Res.* **11**: 807-815, 1987.
 Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Phi-

adelphia chromosome. *Blood* **45**: 321-324, 1975
 Nishikawa, M., and Shirakawa, S. The expression and possible roles of protein kinase C in haemopoietic cells. *Leuk. Lymph.* **8**: 201-211, 1992.

5 Rowley, P. T., Ohlsson-Wilhelm, B. M., Farley, B. A., and LaBella, S. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Exp. Hematol.* **9**: 32-37, 1981.

10 Tonetti D. A., Henning-Chubb, C., Yamanishi, D., and Huberman, E. Protein kinase C- β is required for macrophage, differentiation of human HL-60 leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 23230-23235, 1994.

15 Walker, D.H. (1998). Small-molecule inhibitors of cyclin-dependet kinases: molecular tools and potential therapeutics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **227**, 149-165, 1998.

20 La línea K562 y KU812 pueden obtenerse de la colección American Type Culture Collection (ATCC). Las células se crecen en medio RPMI suplementado con 8 % de suero bovino fetal. También se le puede suplementar con antibióticos antibacterianos y antifúngicos. A una concentración celular de 200.000 a 500.000 células por ml se añade estaurosporina a concentraciones comprendidas entre 50 y 100 nM, a partir de una solución stock en dimetilsulfóxido. Las condiciones típicas son 50 nM de estaurosporina durante 5 días partiendo de células a una concentración de 300.000 células por ml de medio de cultivo.

25 La estaurosporina es un inhibidor de serina-treonina proteína quinasas (Walker, 1996). La adición de estaurosporina provoca la detención del crecimiento celular y, a partir de 24 horas de tratamiento, diferenciación megacariocítica en las células. Al cabo de 4 días con 100 nM estaurosporina esta diferenciación ya es máxima, llegando al 90 % de las células presentes en el medio. Esta diferenciación se puede identificar por:

- 35 1. La morfología celular, que demuestra la presencia de células grandes con núcleo fuertemente polilobulado, detectable por tinción de Giemsa.
- 40 2. Dotación poliploide de DNA, detectable por determinación de DNA por citometría de flujo de células teñidas con yoduro de propidio
- 45 3. Membranas de demarcación, detectables por microscopía electrónica.
- 50 4. La expresión de marcadores megacariocíticos como CD61 y CD41, detectable por citometría de flujo de células incubadas con anticuerpos específicos.
- 55

Aunque las células K562 también tienen capacidad de diferenciación monocítica o eritroide con diversos agentes químicos o farmacológicos, la ausencia de diferenciación monocítica en células tratadas con estaurosporina se evidencia en la reacción negativa o débilmente positiva de las alfa-naftil esterases (a diferencia de células K562 con diferenciación monocítica) y disminución de la expresión de epsilon-globina y de la fracción de células positiva a la reacción de la bencidina (como las células K562 con diferenciación eritroide).

A partir de 3 días de incubación con estaurosporina aparecen muchas células con aspecto de megacariocitos que desprenden fragmentos celulares en un proceso morfológicamente idéntico a la producción de plaquetas por megacariocitos en médula ósea. También empiezan a aparecer en el medio de cultivo partículas celulares identificables como plaquetas. Esta identificación se hace en base a:

1. Morfología y tamaño tras la tinción de May-Grünwald-Giemsa
2. Reacción positiva con el ácido peryódico (PAS)

Las plaquetas pueden separarse de las células por métodos estándar: centrifugación diferencial o centrifugación sobre capa de ficoll. Las plaque-

tas así obtenidas presentan características morfológicas muy semejantes a las presentes en plasma humano.

Este procedimiento permite la obtención de plaquetas procedentes de un único individuo, por tanto de un origen genético idéntico. También permite obtener plaquetas humanas a partir de cultivos celulares, sin los riesgos biológicos que conlleva su purificación a partir de sangre humana.

La preparación de plaquetas derivadas de estas líneas celulares se puede usar por ejemplo para hacer suspensiones de plaquetas que sirvan de estándar en ensayos analíticos de fusión plaquetaria. También se puede usar como fuente de proteínas plaquetarias si, por razones de seguridad biológica, no se quiere partir de sangre humana.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo de las líneas celulares K562 o KU812, por tratamiento con inhibidores de proteína quinasas.

2. Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo, según la reivindicación primera, **caracterizado** porque las células K562 o KU812 se tratan con estaurosporina.

3. Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo, según la reivindicación primera, **caracterizado** porque las células al momento de añadir la estaurosporina están a una concentración de células K562 o KU812 es de 200.000 a 500.000 células por ml de medio.

4. Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo, según la reivindicación primera, **caracterizado** porque la concentración de estaurosporina es de 50 nM a 100 nM y el tratamiento antes de purificar las plaquetas es de 2 a 7 días.

5. Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo, según la reivindicación primera, **caracterizado** porque las células se han de crecer en medio RPMI suplementado con 8 a 10% de suero fetal bovino.

6. Procedimiento para producir plaquetas humanas a partir de células en cultivo, según la reivindicación primera, **caracterizado** porque el preparado de plaquetas obtenido no contiene otros componentes de origen humano que las propias plaquetas y las sustancias producidas por las mismas plaquetas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 5/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YEN A. et al. "12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate and staurosporine induce increased retinoblastoma tumor suppressor gene expression with megakaryocytic differentiation of leukemia cells". 1993. Cancer Res., Vol. 53 (13), páginas 3085-91.	1,2
A	MURGO A. et al. "K562 leukemia cells express P2T (adenosine diphosphate) purinergic receptors". 1992. J. Pharmacol. Exp. Ther., Vol. 261 (2), páginas 580-5.	1,2
A	ES 2136103 T3 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 29.12.1993, página 3, líneas 50-53; página 13, líneas 35-45.	1,2
A	ADACHI M. et al. "Induction of smg p21/rap1A p21/krev-1 p21 gen expression during phorbol ester-induced differentiation of a human megakaryocytic leukemia cell line". 1992. Oncogene. Vol. 7 (2), páginas 323-9.	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

05.04.2001

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1