

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 902**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2014 PCT/KR2014/005618**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15190636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2014 E 14894643 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3156481**

54 Título: **Método para fabricar células madre pluripotentes inducidas a partir de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo y las células madre pluripotentes inducidas fabricadas mediante dicho método**

30 Prioridad:

13.06.2014 KR 20140072427

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

23.09.2024

73 Titular/es:

**BBHC CO. LTD. (100.0%)
72 UN village-gil, Yongsan-gu
Seoul 140-884, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SANG YEON;
JUNG, WON JU;
KIM, HO BIN;
OH, MIN SUN y
LEE, KYE HO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 978 902 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para fabricar células madre pluripotentes inducidas a partir de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo y las células madre pluripotentes inducidas fabricadas mediante dicho método

Campo técnico

- 5 La presente descripción se refiere a una composición de medio de inducción de células madre pluripotentes de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano, y a un método para fabricar células madre pluripotentes inducidas personalizadas para el paciente mediante el uso de la misma.

Antecedentes

- 10 Las células madre se denominan en conjunto células indiferenciadas antes de la diferenciación que se puede obtener a partir de cada tejido. Las células madre tienen la propiedad de ser capaces de producir continuamente las mismas células durante un período predeterminado en un estado indiferenciado, y la propiedad de ser capaces de transformarse en diversas células que configuran un tejido biológico en condiciones adecuadas.

- 15 Las células madre pueden clasificarse en gran medida en células madre embrionarias y células madre adultas, dependiendo de la potencia y el momento de creación. Como otra clasificación, las células madre pueden dividirse en células madre pluripotentes, multipotentes y unipotentes dependiendo de la potencia de las células madre.

Las células madre adultas pueden clasificarse en células madre multipotentes o unipotentes. Las células madre adultas representativas incluyen las células madre mesenquimatosas (MSC) y las células madre hematopoyéticas (HSC). Las MSC se diferencian en condrocitos, osteoblastos, adipocitos, miocitos y neuronas, y las HSC se diferencian en glóbulos sanguíneos de la sangre que incluyen glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y similares.

- 20 Por otro lado, las células madre pluripotentes se denominan células madre que tienen múltiples funciones, que pueden diferenciarse en las tres capas germinales que configuran un cuerpo vivo que para diferenciarse en todas las células o tejidos de los órganos del cuerpo humano y, generalmente, las células madre embrionarias corresponden a las células madre pluripotentes. Se sabe que las células madre embrionarias humanas se preparan a partir de embriones que pueden transformarse en un organismo humano, lo cual plantea muchos problemas éticos, pero tienen una excelente proliferación y potencia celular en comparación con las células madre adultas. Las células madre adultas pueden obtenerse a partir de médula ósea, sangre, cerebro, piel, etc. y plantean menos problemas éticos, pero tienen una potencia limitada en comparación con las células madre embrionarias.

- 30 Como alternativa para superar los problemas, se han intentado diversos métodos para fabricar células madre pluripotentes personalizadas similares a las células madre embrionarias reprogramando células derivadas del adulto. Como método representativo, hay un método de fusión con células ES, un método de transferencia nuclear a células somáticas, un método de reprogramación mediante factores genéticos, y similares. El método de fusión con células ES tiene un problema en términos de estabilidad celular, porque las células inducidas tienen dos pares adicionales de genes, y el método de transferencia nuclear a células somáticas tiene el problema de que se requieren muchos óvulos y la eficacia es demasiado baja. Además, el método de reprogramación mediante factores genéticos es un método que usa virus que contienen oncogenes para inducir la reprogramación insertando un gen específico, y tiene problemas con respecto a la posibilidad del desarrollo de agentes terapéuticos celulares debido a un alto riesgo de aparición de cáncer, una baja eficacia y la dificultad en el aspecto metodológico.

- 40 Con el fin de obtener con éxito una gran cantidad de células madre pluripotentes, la composición del cultivo es muy importante en la etapa de cultivo de monocitos derivados de tejido adiposo aislados y, por lo tanto, se requieren investigaciones para fabricar una mayor cantidad de células madre pluripotentes mediante un método de inducción con una alta eficacia.

- 45 Mientras tanto, en algunos casos, se usa *Ecklonia cava* para una composición para tratar o prevenir una enfermedad atópica (publicación de solicitud de patente coreana n.º 2009-0043115), una composición de tinte para el cabello para el tinte por oxidación (publicación de solicitud de patente coreana n.º 2012-0126148) o para estimular el crecimiento del cabello mediante la proliferación de DPC y/o la inhibición de la actividad de la 5 α -reductasa (Kang et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13: 6407-6423), pero nunca se ha usado para reprogramar células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas.

- 50 Los detalles descritos en los antecedentes anteriores son solo para mejorar la comprensión de los antecedentes de la presente descripción y, por lo tanto, pueden contener información que no forma la técnica anterior que ya se conoce en este país por parte de un experto en la técnica.

Sumario

Los inventores hicieron un esfuerzo por encontrar un método para inducir células madre pluripotentes con alta eficacia para la aplicación de agentes terapéuticos de células en desarrollo que tengan seguridad y una alta eficacia de producción. Como resultado, los inventores verificaron que cuando se añadió un extracto de *Ecklonia cava* como

extracto natural y seguro a un medio de cultivo celular, se pudieron fabricar células madre pluripotentes inducidas con seguridad y una alta eficacia mediante el uso de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo.

5 Por lo tanto, la presente descripción se ha realizado en un esfuerzo por proporcionar una composición de medio para reprogramar células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas, que contiene un extracto de *Ecklonia cava*.

Además, la presente descripción también se ha realizado en un esfuerzo por proporcionar un método para fabricar células madre pluripotentes inducidas que incluye una etapa de reprogramación de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas en un medio que contiene extracto de *Ecklonia cava*.

10 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para fabricar células madre pluripotentes inducidas, que comprende: añadir un extracto de *Ecklonia cava* en una cantidad de 10 a 400 µg/ml en un medio de cultivo celular; y reprogramar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas en el medio.

15 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición de medio que contiene extracto de *Ecklonia cava* en una cantidad de 10 a 400 µg/ml para reprogramar células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas. En una realización, el extracto de *Ecklonia cava* se incluye en un medio seleccionado de un grupo que consiste en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), un medio esencial mínimo (MEM), un medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM F-12, un medio esencial mínimo α (α-MEM), un medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), un medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), un medio 5A de MacCoy, AmnioMax, un medio completo AmnioMax II, un medio de Chang y un medio MesenCult-XF.
20 En otra realización, el extracto de *Ecklonia cava* se extrae con agua y se incluye en 20 a 50 µg/ml respecto de la composición del medio. En una realización adicional, la composición del medio comprende además del 0,01 al 10% (v/v) de agua desionizada purificada que contiene SiO₂, Al₂O₃, TiO₃, Fe₂O₃, CaO, Na₂O, K₂O, y LiO.

En la presente memoria se describen además células madre pluripotentes inducidas fabricadas mediante el método de fabricación.

25 En la presente memoria se describe además una composición terapéutica celular personalizada para el paciente que incluye células madre pluripotentes inducidas fabricadas mediante el método de fabricación aislando células madre del tejido adiposo de un paciente.

Otros objetivos y ventajas de la presente descripción serán más evidentes mediante la descripción detallada de la descripción, las reivindicaciones y los dibujos a continuación.

30 Los inventores hicieron un esfuerzo por encontrar un método para inducir células madre pluripotentes con una alta eficacia para la aplicación de agentes terapéuticos de células en desarrollo que no implicasen problemas éticos por la destrucción del embrión, sin riesgo de formación de células cancerosas al no usar virus, y una alta seguridad y eficacia de producción. Como resultado, se verifica que cuando se añade extracto de *Ecklonia cava* como extracto natural seguro en el medio de cultivo celular, pueden fabricarse células madre pluripotentes inducidas con una eficacia significativamente alta.
35

La *Ecklonia cava*, que es un ingrediente activo incluido en la composición del medio de la presente descripción, es una alga marina parda perenne de la familia *Lessoniaceae* perteneciente al orden *Laminariales* que vive principalmente en la costa meridional de Corea, en la costa de la isla de Jeju, y en la costa de la isla de Ulleungdo, se convierte principalmente en alimento para abulones, caracoles de turbante y similares, y se usa como materia prima principal para preparar ácido alginico o yoduro de potasio, o para alimentos.
40

El extracto de *Ecklonia cava* incluido en la presente descripción puede extraerse usando agua y disolventes orgánicos que incluyen (a) alcohol inferior anhidro o hidratado que tiene de 1 a 4 carbonos (metanol, etanol, propanol, butanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, etc.), (b) un disolvente mixto del alcohol inferior y agua, (c) acetona, (d) acetato de etilo, (e) cloroformo, (f) 1,3-butilenglicol, (g) hexano, (h) éter dietílico, y similares, y, preferiblemente, puede extraerse mediante el uso de un disolvente mixto de metanol o etanol y agua, o usándolos respectivamente. En el caso de la extracción del extracto de *Ecklonia cava* usando el disolvente mixto, el contenido de metanol o etanol puede ser preferiblemente del 50 al 80% (v/v).
45

Actualmente, los casos de aplicación del extracto de *Ecklonia cava* en composiciones para la piel, tales como los cosméticos, se ha incrementado (véanse las publicaciones de solicitudes de patentes coreanas n.º 2013-0017159, 50 2012-0040488 y 2010-0097293, etc.), pero no hay argumentos para desarrollar el extracto de *Ecklonia cava* para medios de inducción de células madre pluripotentes

La expresión "células madre embrionarias" usada en la presente descripción se refiere a células que tienen pluripotencia, como las células que se aíslan y se cultivan a partir de una masa celular interna del blastocisto en los primeros días de su desarrollo después de la fertilización. La expresión "células madre pluripotentes" usada en la presente descripción se refiere a células madre que tienen pluripotencia, que pueden diferenciarse en las tres capas germinales que configuran el cuerpo vivo, es decir, un endodermo, un mesodermo y un ectodermo.
55

El término "diferenciación" usado en la presente descripción significa que mientras las células se dividen, proliferan y crecen, las estructuras o funciones de las mismas se especializan, es decir, las formas o funciones cambian para realizar las tareas propias de las células, tejidos y similares de un organismo.

5 La expresión "agente terapéutico celular" de la presente descripción, como un fármaco utilizado para el tratamiento, el diagnóstico y la prevención mediante el uso de células y tejidos fabricados a través del aislamiento a partir del ser humano, el cultivo y una manipulación específica, se menciona como un fármaco utilizado para el tratamiento, el diagnóstico y la prevención a través de una serie de acciones tales como la proliferación y el cribado de células homogéneas o heterogéneas para restaurar las funciones de las células o los tejidos, cambiar una característica biológica de las células mediante otro método, y similares. Los agentes terapéuticos celulares se clasifican en gran medida en agentes terapéuticos de células somáticas y agentes terapéuticos de células madre según el grado de diferenciación de las células, y la presente descripción se refiere a los agentes terapéuticos de células madre.

15 Las "células madre mesenquimatosas" de la presente descripción son células aisladas a partir de células madre embrionarias o células madre adultas derivadas de mamíferos, preferentemente células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, y más preferentemente células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano. Las células madre derivadas de tejido adiposo pueden extraerse y obtenerse del tejido adiposo del cuerpo humano. La extracción de las células madre mesenquimatosas del tejido adiposo puede realizarse mediante el uso de diversos métodos y, por ejemplo, para aislar monocitos del tejido adiposo, el tejido adiposo se extrae del cuerpo humano y se lava con una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) hasta que la sangre no fluye, y el tejido adiposo lavado se corta con una cuchilla quirúrgica y se incuba a 37 °C para obtener una disolución que contiene monocitos.

El término "medio" usado en la presente descripción significa una mezcla para cultivar o diferenciar células tales como células madre *in vitro*, que contiene elementos esenciales para el crecimiento y la proliferación de las células que incluyen azúcares, aminoácidos, diversos nutrientes, suero, factores de crecimiento, minerales y similares.

25 En particular, el medio de la presente descripción es un medio para cultivar las células madre mesenquimatosas. En este caso, las células madre mesenquimatosas son células aisladas de células madre embrionarias o células madre adultas derivadas de mamíferos y células que tienen una capacidad de proliferación ilimitada y una diferenciación hasta diversas formas celulares (por ejemplo, adipocitos, condrocitos, miocitos, osteocitos, etc.). Además, en la presente descripción, se usan células madre mesenquimatosas multipotentes que tienen fenotipos inmunitarios que representan una reacción positiva para anticuerpos contra CD44, CD73 y CD90 y una reacción negativa para anticuerpos contra CD34 y CD45.

35 Se comercializan diversos medios en la técnica, y pueden fabricarse y usarse artificialmente. Por ejemplo, como medio comercializado, se incluye un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), un medio esencial mínimo (MEM), un medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM F-12, un medio esencial mínimo α (α -MEM), un medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), un medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMPM), AmnioMax, un medio completo AmnioMax II (Gibco, Nueva York, EE.UU.), un medio de Chang y un medio MesenCult-XF (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá) y similares, y puede usarse como un medio básico incluido en la composición del medio de la presente descripción, además de un medio que puede fabricarse artificialmente.

40 En el medio básico, generalmente se pueden añadir ingredientes séricos añadidos (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS)), antibióticos (por ejemplo, penicilina y estreptomina), y similares. La concentración del ingrediente sérico o el ingrediente antibiótico que se añade en el medio básico puede modificarse dentro de un intervalo que pueda lograr el efecto de la presente descripción, y preferiblemente, puede añadirse FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomina y similares.

45 Además, el medio de la presente descripción puede incluir adicionalmente una mezcla de nutrientes. La mezcla de nutrientes es una mezcla que contiene diversos aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y similares que se usan generalmente en un cultivo celular, y puede usar una mezcla de nutrientes que se fabrica mezclando los aminoácidos, las vitaminas, las sales inorgánicas y similares, o se fabrica comercialmente. La mezcla de nutrientes fabricada comercialmente puede incluir M199, MCDB110, MCDB202, MCDB302 y similares, como ejemplo, pero no se limita a los mismos.

50 Además, el medio de la presente descripción puede incluir adicionalmente Energy Water™ para la inducción y estabilización de las células madre pluripotentes. El Energy Water™ se añade preferiblemente al 0,01 a 10% (v/v), y más preferiblemente al 0,05 a 0,5% (v/v).

La composición de medio de la presente descripción es un medio específico de inducción de células madre pluripotentes, y puede lograrse añadiendo el extracto de *Ecklonia cava* al medio básico, y puede incluir el extracto de *Ecklonia cava* a una concentración de preferentemente 10 a 400 μ g/ml con respecto a la composición total del medio.

55 Según otro aspecto de la presente descripción, la presente descripción proporciona un método para fabricar células madre pluripotentes inducidas que incluye: añadir el extracto de *Ecklonia cava* en una cantidad de 10 a 400 μ g/ml en un medio de cultivo celular; y reprogramar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas en el medio.

- Según una realización ejemplar de la presente descripción, en el caso de usar una composición de medio que incluye el extracto de *Ecklonia cava* de la presente descripción como grupo experimental (medio que contiene el extracto de *Ecklonia cava* y Energy Water™ en un medio DMEM F-12), contrariamente a un caso en donde se utiliza solamente el medio DMEM F-12 como grupo testigo, se comprueba que a los 8-10 días se forman colonias de células madre pluripotentes (véanse las Figuras 2 y 3).
- También se describen en la presente memoria células madre pluripotentes inducidas fabricadas mediante el método de fabricación.
- Las células madre pluripotentes inducidas de la presente descripción tienen la misma potencia que las células madre embrionarias, y son casi iguales que las células madre embrionarias incluso en las formas de las células (véanse las Figuras 2 y 3). Según una realización ejemplar de la presente descripción, como resultado de examinar si se expresan los genes específicos Oct4 y Sox-2 y la proteína SSEA-4 en las células madre embrionarias, se verifica que los genes y las proteínas se expresan en las células madre pluripotentes inducidas de la presente descripción (véanse las Figuras 4 y 5) como en las células madre embrionarias.
- Según otra realización ejemplar, en las células madre mesenquimatosas (MSC) sin inducción, el nivel de expresión de los genes específicos OCT4, SOX2 y Nanog de las células madre pluripotentes es bajo, mientras que en las células madre pluripotentes inducidas mediante el método de la presente descripción (Ejemplo experimental 1-1: EtOH EPN, Ejemplo experimental 1-2: Sonic EPN), estos genes específicos se expresan a niveles significativamente más altos (véanse las Figuras 6 y 7).
- En la presente memoria se describe además una composición terapéutica celular que contiene las células madre pluripotentes inducidas fabricadas mediante el método de fabricación.
- La composición puede administrarse por cualquier vía de administración, particularmente, un método tal como administración en la cavidad peritoneal o torácica, administración subcutánea, administración intravenosa o endovascular, administración intramuscular, administración local mediante inyección, o similares.
- La composición puede administrarse en una forma tal como inyecciones, suspensiones y emulsiones basándose en un método general y, si es necesario, puede suspenderse en un adyuvante tal como un adyuvante completo de Freund o administrarse junto con un material que tiene una actividad adyuvante tal como BCG. La composición puede esterilizarse o contener adyuvantes que incluyen estabilizantes, aceleradores humectantes o emulsionantes, sales o tampones para ajustar la presión osmótica, y similares, y otros materiales terapéuticamente disponibles.
- La composición terapéutica celular descrita en la presente memoria puede aplicarse a la artritis, los trastornos neurológicos, los trastornos endocrinos, las enfermedades hepáticas y similares, y tiene la posibilidad de ser un agente terapéutico alogénico para el ser humano según los resultados de los ensayos clínicos en humanos.
- Las características y ventajas de la presente descripción son las siguientes.
- (i) La presente descripción proporciona una composición de medio para reprogramar las células madre pluripotentes inducidas que contiene un extracto de *Ecklonia cava*. El uso de una composición de medio que contiene un extracto de *Ecklonia cava* en una cantidad de 10 a 400 µg/ml para reprogramar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas es un aspecto de la invención.
 - (ii) Además, la presente descripción proporciona un método para fabricar células madre pluripotentes inducidas mediante el uso de la composición de medio. Un método para fabricar células madre pluripotentes inducidas, que comprende: añadir un extracto de *Ecklonia cava* en una cantidad de 10 a 400 µg/ml en un medio de cultivo celular; y la reprogramación de las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas en el medio.
 - (iii) Las células madre pluripotentes inducidas pueden fabricarse eficazmente usando células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo usando la composición de medio según la presente descripción, y las células madre pluripotentes fabricadas pueden diferenciarse hasta diversas células para ser útiles como agente terapéutico celular.
 - (iv) En la presente descripción, se fabrican células madre pluripotentes que tienen la misma potencia que las células madre embrionarias y, por lo tanto, se pueden fabricar células madre pluripotentes seguras que no implican problemas éticos por la destrucción del embrión, sin usar células madre embrionarias y sin el riesgo de formar células cancerosas al no usar virus que puedan provocar cáncer.
 - (v) Además, las células madre pluripotentes pueden fabricarse muy fácilmente y con una eficacia significativamente alta en comparación con el método existente usando un extracto natural, y se espera que acelere la aplicación de agentes terapéuticos de células madre personalizados para el paciente usando las células madre mesenquimatosas aisladas de los adipocitos del paciente. Se considera que la presente descripción contribuye en gran medida al tratamiento de diversas enfermedades intratables, tales como enfermedades neurológicas y enfermedades inmunitarias.

Además de los aspectos ilustrativos, las realizaciones y las características descritas anteriormente, otros aspectos, realizaciones y características resultarán evidentes mediante referencia a los dibujos y la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es un diagrama que ilustra que se inducen unas células madre pluripotentes que son sustancialmente iguales que las células madre embrionarias con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo mediante la inyección y el cultivo en un medio con extracto de *Ecklonia cava*.

La Figura 2 ilustra la formación de colonias de células madre pluripotentes inducidas según una concentración de un extracto de *Ecklonia cava* (un extracto en etanol) mediante un método (Ejemplo 1-1) de la presente descripción.

10 La Figura 3 ilustra la formación de colonias de células madre pluripotentes inducidas según una concentración de un extracto de *Ecklonia cava* (un extracto acuoso) mediante un método (Ejemplo 1-2) de la presente descripción.

La Figura 4 verifica que las células madre pluripotentes inducidas mediante un método (Ejemplo experimental 1-1) de la presente descripción son células madre pluripotentes usando la expresión de proteínas específicas.

15 La Figura 5 verifica que las células madre pluripotentes inducidas mediante un método (Ejemplo experimental 1-2) de la presente descripción son células madre pluripotentes usando la expresión de proteínas específicas.

La Figura 6 ilustra la expresión génica de células madre pluripotentes inducidas mediante el método (Ejemplo experimental 1-1) de la presente descripción mediante un gráfico.

La Figura 7 ilustra la expresión génica de células madre pluripotentes inducidas mediante el método (Ejemplo experimental 1-2) de la presente descripción mediante un gráfico.

20 **Parte experimental**

En la siguiente sección, se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte de la presente memoria. Las realizaciones descritas en la presente memoria ilustran adicionalmente la invención.

Se describen las siguientes realizaciones ejemplares para permitir a los expertos en la técnica realizar y poner en práctica la descripción.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Preparación de un extracto de *Ecklonia cava*

Ejemplo 1-1: Preparación de un extracto de *Ecklonia cava* mediante el uso de etanol como disolvente

30 Las muestras de medicina herbaria usadas en el experimento se adquirieron en la isla de Jeju, se evaluaron exactamente por el experto, y se usaron en el experimento. Se añadieron 100 g de una muestra de medicina herbaria seca en 1 l de etanol al 70%, se extrajo a reflujo durante 16 horas con etanol, y se filtró usando un filtro. El filtrado se concentró en un evaporador de descompresión rotatorio y se liofilizó inmediatamente.

Ejemplo 1-2: Preparación del extracto de *Ecklonia cava* mediante el uso de agua

35 Las muestras de medicina herbaria usadas en el experimento se adquirieron en la isla de Jeju, se evaluaron exactamente por el experto, y se usaron en el experimento. Se añadieron 100 g de una muestra de medicina herbaria seca en 1 l de agua, se extrajo durante 16 horas con agua aplicando un extractor ultrasónico, y se filtró usando un filtro. Se concentró un filtrado en un evaporador de descompresión rotatorio y se liofilizó inmediatamente.

Ejemplo 2: Aislamiento e incubación de células madre mesenquimatosas a partir de tejido adiposo humano

Ejemplo 2-1: Extracción del tejido adiposo humano

40 El tejido adiposo se recogió inmediatamente después de una liposucción. Antes de transferir la muestra a un laboratorio, se recogió el tejido adiposo aspirado en una botella de vidrio estéril de 500 ml. Tras ello, la botella de vidrio estéril se selló y después se transfirió al laboratorio. En el laboratorio, se extrajeron las células madre mesenquimatosas en una campana de flujo de clase 100 en condiciones estériles. La muestra se transfirió primero a un recipiente de acero inoxidable estéril. La muestra se lavó con PBS varias veces y después la muestra de tejido adiposo se cortó con una longitud de 2 cm y se transfirió a un tubo de 50 ml, y allí se lavó adicionalmente y se sometió a tratamiento antiinfeccioso con etanol al 70%, y después se lavó varias veces con PBS que contenía una mezcla antibiótica (50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (adquirida de Invitrogen)) hasta que la disolución quedó transparente.

45

Ejemplo 2-2: Aislamiento e incubación de células madre mesenquimatosas a partir de tejido adiposo humano

El tejido adiposo aislado se lavó con PBS y se cortó en fragmentos pequeños, se agitó una vez cada 10 min a 37 °C

usando un medio DMEM al que se añadió colagenasa tipo 1 (1 mg/ml) y se digirió durante 1 hora. A continuación, el tejido adiposo se lavó con PBS y se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm. Se succionó el sobrenadante y se lavó con PBS el sedimento que quedaba en el fondo, y se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm. Se filtró mediante un filtro que tenía un tamaño de malla de 100 µm y se lavó con PBS después de eliminar los residuos.

5 Para el aislamiento/incubación de las células madre mesenquimatosas, el tejido explantado se sumergió en 5 ml de un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) F-12 (Gibco) al que se añadió suero bovino fetal al 10% (FBS, Hyclone), FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina, y se mantuvo a 37 °C en una incubadora celular con nitrógeno al 95% y dióxido de carbono al 5%, y se destruyeron todas las células excepto las células madre mientras se mantenía un estado hipóxico para aumentar la pureza de las células madre mesenquimatosas. El medio se reemplazó cada 3 o 4 días. El crecimiento de las células se monitorizó mediante un microscopio óptico. Las células en crecimiento se trataron con tripsina (tripsina al 0,125%/EDTA al 0,05%) para una mayor expansión y se refrigeraron (usando DMEM/FBS al 10%).

15 Para la extracción de las células madre mesenquimatosas, se resuspendieron los sedimentos de las células y se contaron en el medio DMEM F-12 (Gibco), FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina, y se inocularon en una placa de cultivo tisular de 10 cm a una densidad de 1×10^6 células/placa. El medio se reemplazó cada 3 o 4 días. El crecimiento y la formación de clones de las células se controlaron mediante un microscopio óptico. A una confluencia de aproximadamente un 90%, las células se subcultivaron como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo experimental 1: Inducción de células madre pluripotentes a partir de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo

20 Ejemplo experimental 1-1: Fabricación de células madre pluripotentes a partir de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano según la concentración de extracto de *Ecklonia cava* del ejemplo 1-1

25 Como experimento para inducir células madre pluripotentes a partir de células madre derivadas de tejido adiposo humano según la concentración del extracto de *Ecklonia cava* de Jeju, en un grupo de control, se utilizó DMEM F-12 (Gibco) como medio dedicado de MSC, 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina como medio básico, y, en un grupo experimental, se utilizaron células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano que se sometieron a tres subcultivos, y, en el medio, se añadió el extracto de *Ecklonia cava* de Jeju que tenía concentraciones normales de 1 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml y 1 mg/ml, y un 0,1% (v/v) de Energy Water™ (agua desionizada purificada que contiene SiO₂, Al₂O₃, TiO₃, Fe₂O₃, CaO, Na₂O, K₂O y LiO, STC Nara) (véase la Figura 1). Las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano se aislaron y se lavaron, y los monocitos se inocularon en una placa de 6 pocillos con 1×10^4 las células y se mantuvieron y se incubaron a 37 °C y un 5% de CO₂.

Como resultado, en el grupo experimental, se observó que solo cuando la concentración del extracto de *Ecklonia cava* de Jeju era de 100 a 400 µg/ml, se formaron colonias después de 10 días (véase la Figura 2), y en este caso el aumento del microscopio fue de 200x.

35 Ejemplo experimental 1-2: Fabricación de células madre pluripotentes a partir de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano según la concentración de extracto de *Ecklonia cava* del Ejemplo 1-2

40 El Ejemplo experimental 1-2 llevó a cabo mediante el mismo método que el Ejemplo experimental 1-1, y se usó el extracto de *Ecklonia cava* de Jeju que se preparó en el Ejemplo 1-2. Como resultado, en el grupo experimental, se observó que se formaron colonias solo cuando la concentración del extracto de *Ecklonia cava* de Jeju era de 20 a 50 µg/ml después de 10 días (véase la Figura 3), y en este caso el aumento del microscopio fue de 200x.

Ejemplo experimental 1-3: Análisis mediante tinción inmunoquímica de células madre pluripotentes inducidas mediante el método de la presente descripción

45 Con respecto a las células madre pluripotentes inducidas mediante los métodos de los Ejemplos experimentales 1 y 2, se analizó si expresaron los genes específicos OCT4 y SOX2 y la proteína de antígeno embrionario específico de fase 4 (SSEA-4) respecto de las células madre embrionarias usando anticuerpos para las mismas, y la expresión de la proteína se analizó usando un método de tinción inmunoquímica.

50 En el proceso de tinción, las células se fijaron primero usando paraformaldehído al 4% y se lavaron con PBS y se bloquearon con una disolución de BSA al 1%. Las células se trataron con anticuerpos primarios para OCT4, SOX3 y SSEA-4 y se hicieron reaccionar a 4 °C durante 18 horas, y después se lavaron con PBS, se trataron con anticuerpos secundarios con un pigmento fluorescente (isotiocianato de fluoresceína, FITC) hacia los anticuerpos primarios, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Las células se lavaron con PBS y después se analizó la expresión usando un microscopio de fluorescencia, y el resultado de la misma se ilustra en las Figuras 4 y 5. BF indica el campo brillante, y el segundo diagrama indica el resultado de la tinción para cada expresión de proteína, y el tercer diagrama ilustra un núcleo celular teñido con DAPI.

55 Como resultado, tanto con el extracto de *Ecklonia cava* extraído usando etanol (Ejemplo experimental 1-1) como con

el extracto de *Ecklonia cava* extraído usando agua (Ejemplo experimental 1-2), se verificó que las células madre pluripotentes tenían una reacción positiva solo en la colonia de OCT4, SOX2 y SSEA-4 como marcadores específicos de células madre pluripotentes (véanse las Figuras 4 y 5).

Ejemplo experimental 1-4: Comparación del análisis génico de las células madre pluripotentes

5 Mientras que las células madre pluripotentes fabricadas en los Ejemplos experimentales 1-1 y 1-2 se observaron con un microscopio, solo se recogió una colonia usando una pipeta de 200 µl, y luego se aisló el ARN total usando un reactivo TRIzol (fabricado por Invitrogen Corporation). Se sintetizó el ADNc usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y se realizó la PCR usando un cebador específico para los genes OCT4, Sox-2 y Nanog y el gen de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de control. Nanog, OCT4 y Sox-2 son genes específicos de las células madre embrionarias. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y los resultados de la verificación de la expresión de estos genes se ilustraron en las Figuras 6 y 7.

15 Como resultado, como se ilustra en las Figuras 6 y 7, en las células madre mesenquimatosas (MSC, grupo de control) sin un proceso de inducción, el nivel de expresión de OCT4, SOX2 y Nanog como genes específicos de las células madre pluripotentes es bajo, mientras que en las células madre pluripotentes fabricadas a partir de las células madre pluripotentes (Ejemplo experimental 1-1 (ilustrado mediante EtOH EPN) y Ejemplo experimental 1-2 (ilustrado mediante Sonic EPN) inducidas mediante el método de la presente descripción, estos genes específicos se expresaron a un nivel significativamente alto. El nivel de expresión de OCT4, SOX2 y Nanog como genes de células madre puede verificarse claramente a través de los gráficos de las Figuras 6 y 7.

20 A partir de lo anterior, se apreciará que en la presente memoria se han descrito diversas realizaciones de la presente descripción con fines ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una composición de medio que contiene un extracto de *Ecklonia cava* en una cantidad de 10 a 400 µg/ml para reprogramar células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el extracto de *Ecklonia cava* se incluye en un medio seleccionado de un grupo que consiste en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), un medio esencial mínimo (MEM), un medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM F-12, un medio esencial mínimo α (α-MEM), un medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), un medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), un medio 5A de MacCoy, AmnioMax, un medio completo AmnioMax II, un medio de Chang y un medio MesenCult-XF.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1, en donde el extracto de *Ecklonia cava* se extrae con agua y se incluye en una cantidad de 20 a 50 µg/ml respecto de la composición del medio.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición del medio comprende además del 0,01 al 10% (v/v) de agua desionizada purificada que contiene SiO₂, Al₂O₃, TiO₃, Fe₂O₃, CaO, Na₂O, K₂O, y LiO.
- 15 5. Un método para fabricar células madre pluripotentes inducidas, que comprende: añadir un extracto de *Ecklonia cava* en una cantidad de 10 a 400 µg/ml a un medio de cultivo celular y reprogramar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo hasta células madre pluripotentes inducidas en el medio.

Fig. 1

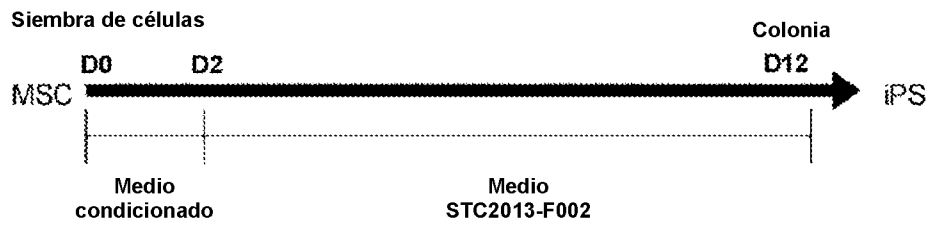


Fig. 2

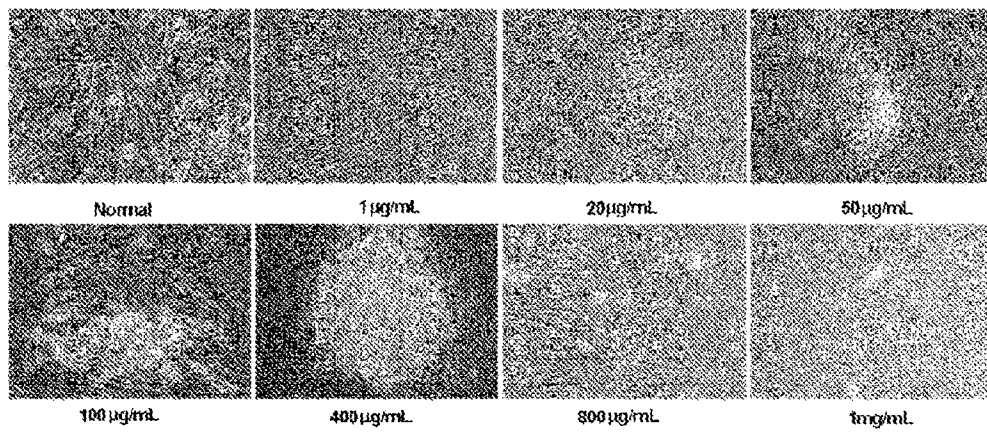


Fig. 3

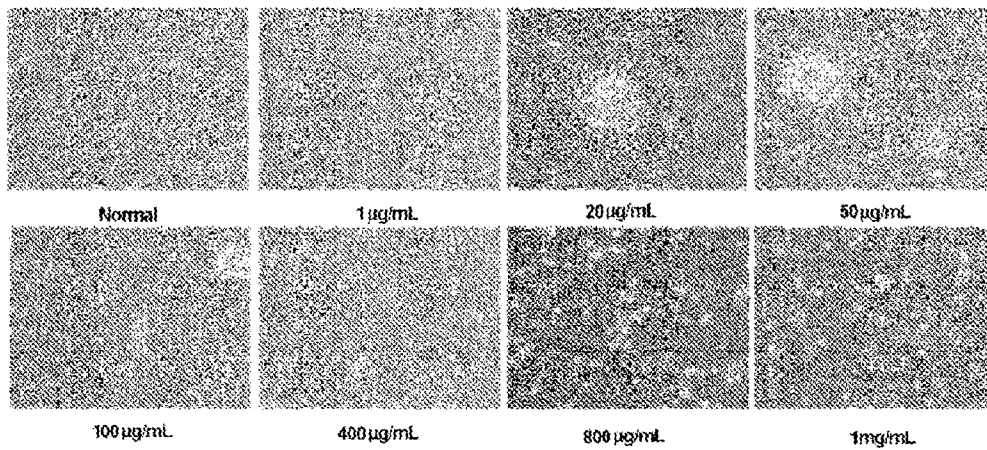


Fig. 4

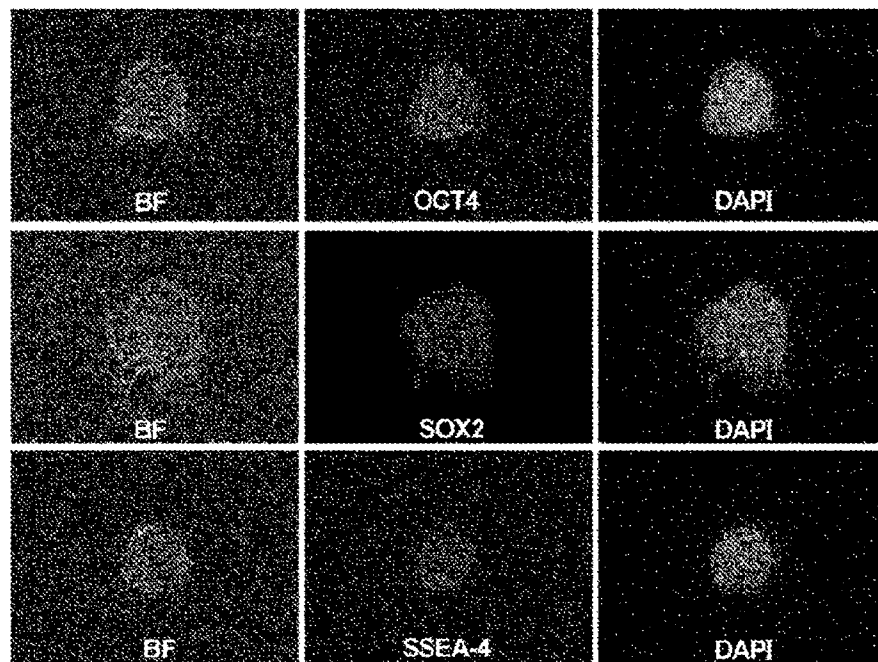


Fig. 5

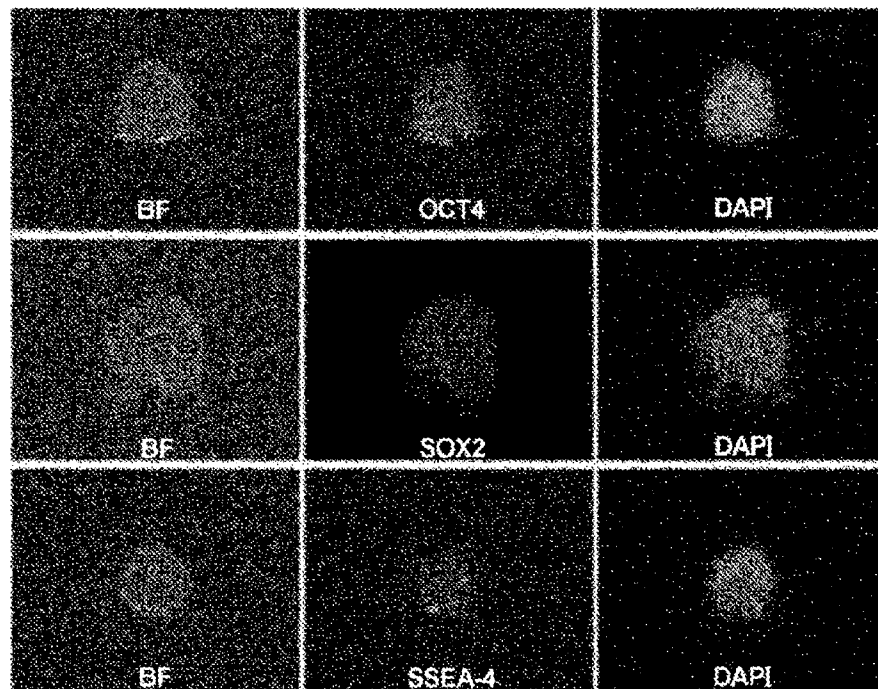


Fig. 6

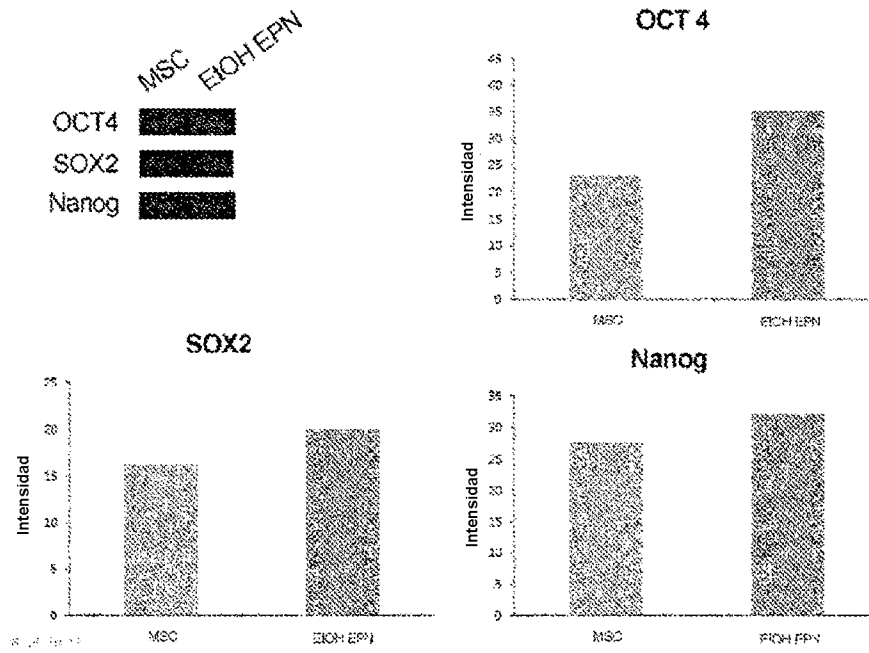


Fig. 7

