

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 183**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/407 (2015.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013 PCT/KR2013/009946**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15064802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013 E 13896838 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3064575**

54 Título: **Método para diferenciar, células madre pluripotentes inducidas a partir de células madre mesenquimatosas, en hepatocitos**

30 Prioridad:

01.11.2013 KR 20130132058

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

29.07.2020

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:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 776 183 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 diferenciar, células madre pluripotentes inducidas a partir de células madre mesenquimatosas, en hepatocitos

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un método que comprende: producir células madre pluripotentes inducidas, usando una composición de medio para inducir células madre pluripotentes a partir de células madre mesenquimatosas; y diferenciar, las células madre pluripotentes inducidas, en hepatocitos.

[Antecedentes de la técnica]

Generalmente, las células madre se refieren a células indiferenciadas que, antes de la diferenciación, pueden obtenerse a partir de diversos tejidos. Las células madre tienen propiedades con capacidad de producir, de manera continua, células idénticas a sí mismas durante una cantidad de tiempo determinada en un estado indiferenciado, y también tienen propiedades con capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células, que, en condiciones adecuadas, constituyen tejidos biológicos.

Por lo general, las células madre pueden clasificarse en células madre embrionarias y en células madre adultas, según su potencial de diferenciación y tiempo de creación. Además, según su potencial de diferenciación, las células madre pueden clasificarse en células madre pluripotentes, multipotentes y unipotentes.

Las células madre adultas pueden clasificarse como células madre multipotentes o unipotentes. Las células madre adultas representativas incluyen células madre mesenquimatosas (CMM) y células madre hematopoyéticas (CMH). Se sabe que las células madre mesenquimatosas se diferencian en condrocitos, osteoblastos, adipocitos, miocitos y neuronas, y que las células madre hematopoyéticas se diferencian principalmente en la sangre en células sanguíneas, tales como eritrocitos, leucocitos o plaquetas.

Por otra parte, las células madre pluripotentes se refieren a las células madre que tienen multipotencia para diferenciarse en las tres capas germinales que constituyen el organismo y, por tanto, son capaces de diferenciarse en todas las células, tejidos u órganos del cuerpo humano. En general, las células madre embrionarias se encuentran en esta categoría. Las células madre embrionarias humanas plantean muchas inquietudes éticas, porque se crean a partir de embriones que pueden convertirse en seres humanos. Sin embargo, se sabe que las células madre embrionarias tienen una excelente capacidad para proliferar y diferenciarse, en comparación con las células madre adultas. Las células madre adultas causan preocupaciones menos éticas, ya que pueden obtenerse a partir de médula ósea, sangre, cerebro, piel, y demás. Sin embargo, las células madre adultas tienen una capacidad limitada para diferenciarse, en comparación con las células madre embrionarias.

Como solución para superar estos problemas, se han intentado diversas técnicas para desdiferenciar células derivadas de células madre adultas para producir así células madre pluripotentes personalizadas similares a las células madre embrionarias. Las técnicas representativas incluyen fusión con células ME (madre embrionarias), transferencia nuclear de células somáticas, reprogramación por factores genéticos, y demás. De acuerdo con la técnica de fusión con células ME, las células inducidas tienen además dos pares de genes, y esto causa un problema en términos de estabilidad de las células. La transferencia nuclear de células somáticas tiene problemas ya que requiere una gran cantidad de cigotos y tiene una eficiencia muy baja. La reprogramación por factores genéticos es una técnica de uso de virus que contienen oncogenes para insertar genes específicos para inducir así la desdiferenciación, y esta técnica plantea un alto riesgo de aparición de cáncer y es desventajosa en términos de posibilidad de desarrollo de productos de terapia celular debido a la baja eficiencia y dificultad en términos de métodos.

Para obtener células madre pluripotentes de manera satisfactoria y en abundancia, las composiciones de medio en la fase de cultivo de células mononucleares aisladas de cordón umbilical, son muy importantes. Por tanto, se requieren estudios para producir una mayor cantidad de células madre pluripotentes mediante un método de inducción muy eficaz.

Los asuntos proporcionados en los antecedentes de la técnica anterior solo pretenden ayudar a comprender mejor los antecedentes de la presente invención. Sin embargo, no debe entenderse, que estos asuntos se encuentran dentro de la técnica anterior ya conocida por una persona que tiene conocimientos habituales en la técnica.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Los presentes inventores han hecho esfuerzos para encontrar un método para inducir de manera muy eficaz células madre pluripotentes que en la práctica proporcione productos de terapia celular con alta inocuidad y eficacia de producción. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que, cuando a un medio de cultivo celular se

le añade un extracto de *Ecklonia cava*, que es un extracto natural inocuo, utilizando la composición de medio, pueden producirse células madre pluripotentes inducidas a partir de células madre mesenquimatosas y las células madre pluripotentes inducidas producidas, pueden diferenciarse además en hepatocitos de una manera inocua y muy eficaz, completando de este modo la presente divulgación.

5 Por lo tanto, es un aspecto de la presente divulgación, proporcionar una composición de medio que contiene un extracto de *Ecklonia cava*, para desdiferenciar células madre mesenquimatosas en células madre pluripotentes inducidas.

10 Otro aspecto de la presente divulgación es proporcionar un método que comprende: desdiferenciar células madre mesenquimatosas en células madre pluripotentes inducidas en un medio que contenga un extracto de *Ecklonia cava*: y diferenciar, las células madre pluripotentes inducidas, en hepatocitos.

15 Otro aspecto más de la presente divulgación es proporcionar hepatocitos producidos por el método.

Otro aspecto adicional de la presente divulgación es proporcionar una composición de terapia celular que comprenda los hepatocitos.

20 La siguiente descripción detallada de la divulgación, las reivindicaciones adjuntas y los dibujos acompañantes, harán que se entiendan con mayor claridad otros aspectos y ventajas de la presente divulgación.

[Solución técnica]

25 De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición del medio para desdiferenciar células madre mesenquimatosas en células madre pluripotentes inducidas que son capaces de diferenciarse en hepatocitos, conteniendo la composición del medio un extracto de *Ecklonia cava*.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para diferenciar células madre mesenquimatosas en hepatocitos, que comprende las etapas de:

- 30
- (a) añadir un extracto de *Ecklonia cava* a un medio de cultivo celular;
 - (b) desdiferenciar células madre mesenquimatosas en células madre pluripotentes inducidas en el medio; y
 - (c) diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en hepatocitos.

35 Los presentes inventores han hecho esfuerzos para encontrar un método para inducir células madre pluripotentes que en la práctica proporcione productos de terapia celular con alta inocuidad y eficacia de producción sin plantear inquietudes éticas sobre la destrucción de embriones. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que, cuando a un medio de cultivo celular se le añade un extracto de *Ecklonia cava*, que es un extracto natural inocuo, se pueden producir células madre pluripotentes inducidas con una eficacia sorprendentemente alta, y las células madre pluripotentes inducidas se pueden diferenciar en hepatocitos.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "células madre embrionarias" se refiere a células que tienen pluripotencia, que pueden aislarse y cultivarse a partir de la masa celular interna de un blastocito, la primera fase de desarrollo después de la fecundación. Como se usa en el presente documento, la expresión "células madre pluripotentes" se refiere a células madre que tienen pluripotencia, que son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) que constituyen el organismo.

45 Como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" se refiere a un proceso por el cual las células se vuelven más especializadas en cuanto a estructura o función durante el crecimiento celular a través de la división y la proliferación, es decir, un proceso por el cual las células, los tejidos, y demás, de un organismo vivo, cambian de forma o función para realizar la tarea dada.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "producto de terapia celular", que es un producto farmacéutico utilizado con fines de tratamiento, diagnóstico y prevención con células y tejidos producidos a partir de seres humanos por aislamiento, cultivo y manipulación específicos, se refiere a un producto farmacéutico que se usa con fines de tratamiento, diagnóstico y prevención a través de una serie de acciones, tales como cambiar las propiedades biológicas de las células mediante la proliferación o selección de células alogénicas o xenogénicas *in vitro*, o por otros medios, para restablecer las funciones de células o tejidos. Los productos de terapia celular se clasifican por lo general en un producto de terapia de células somáticas y en un producto de terapia de células madre, según el grado de diferenciación de las células. La presente divulgación se refiere particularmente al producto de terapia de células madre.

55 Las células madre mesenquimatosas que se usan en la presente divulgación son células aisladas de células madre embrionarias o células madre adultas derivadas de mamíferos. Las células madre mesenquimatosas son, preferentemente, células madre mesenquimatosas de cordón umbilical, y más preferentemente, células madre mesenquimatosas de cordón umbilical humano. Las células madre se pueden recoger del cordón umbilical que

conecta el feto y la placenta en el cuerpo humano. La recogida de las células madre mesenquimatosas del cordón umbilical se puede realizar utilizando diversos métodos. Por ejemplo, se puede obtener una solución que contenga células mononucleares recogiendo el cordón umbilical del cuerpo humano, lavando con PBS el cordón umbilical recogido hasta que ya no salga sangre, cortando el cordón umbilical lavado usando una cuchilla quirúrgica e incubando a 37° C el cordón umbilical cortado.

En lo sucesivo en el presente documento, cada etapa del método de acuerdo con la presente divulgación se describirá en detalle.

Etapas a) de adición de extracto de *Ecklonia cava* al medio de cultivo celular

Ecklonia cava, un principio activo incluido en la composición del medio de la presente divulgación, es un alga marina parda perenne de la familia *Lessoniaceae* perteneciente al orden *Laminariales*, que aparece principalmente en la costa meridional y en el mar de las islas Jejudo y Ulleungdo, Corea. Se alimenta principalmente de abulones, caracolas, y demás, y se utiliza como materia prima principal para preparar ácido algínico, yodo, o potasio, o como alimentos.

El extracto de *Ecklonia cava* incluido en la composición del medio de la presente divulgación puede prepararse mediante extracción con agua o un disolvente orgánico, tal como (a) un alcohol inferior anhidro o hidratado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (metanol, etanol, propanol, butanol, n-propanol, isopropanol y n-butanol, o similares), (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, o similares. Preferentemente se puede preparar mediante extracción con un disolvente mixto de metanol o etanol con agua. Cuando se prepara mediante extracción con el disolvente mixto, el contenido de metanol o etanol en el disolvente mixto es preferentemente del 50 al 80 % v/v.

Recientemente, han aumentado los ejemplos de aplicación del extracto de *Ecklonia cava* en composiciones para la piel, tales como cosméticos (véanse las solicitudes de patente coreana abiertas a inspección pública N.º 2013-0017159, 2012-0040488 y 2010-0097293, etc.). Sin embargo, todavía no se ha comunicado ningún un ejemplo de aplicación del extracto de *Ecklonia cava* en un medio para inducir células madre pluripotentes.

Como se usa en el presente documento, el término "medio" se refiere a una mezcla para el cultivo o la diferenciación *in vitro* de células, tales como células madre, que contiene componentes esenciales para el crecimiento y la proliferación de las células, tales como azúcar, aminoácidos, diversos nutrientes, suero, factores de crecimiento, minerales, y demás.

En la técnica se comercializan diversos medios que pueden utilizarse y que se preparan de manera artificial. Entre los medios comercializados se incluyen Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Medio Esencial mínimo (MEM, *Minimal Essential Medium*), Medio Basal de Eagle (BME, *Basal Medium Eagle*), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM F-12, Medio Esencial Mínimo α (α -MEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM, *Glasgow's Minimal Essential Medium*), Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMPM, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), Medio completo AmnioMax, Medio completo AminoMax II (Gibco, Nueva York, Estados Unidos), Medio de Chang, Medio MesemCult-XF (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá), y demás. Estos medios, así como los medios que pueden producirse de manera artificial, pueden utilizarse como un medio basal que está incluido en la composición de medio de la presente divulgación.

Al medio basal se le puede añadir un componente sérico (p. ej., Suero Bovino Fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*)), un antibiótico (p. ej., penicilina, estreptomycin), y demás, que son componentes que normalmente se añaden. La concentración del componente sérico o componente antibiótico en el medio basal, puede variar dentro del intervalo que puede conseguir el efecto de la presente divulgación. Preferentemente, el medio basal puede contener FBS al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 50 μ g/ml, y demás.

Además, el medio de la presente divulgación también puede contener una mezcla de nutrientes. La mezcla de nutrientes es una mezcla que comprende diversos aminoácidos, vitaminas, sales minerales, y demás, que generalmente se usan en cultivo celular. La mezcla de nutrientes se puede preparar mezclando los aminoácidos, las proteínas, las sales minerales, y demás, o una mezcla de nutrientes preparada comercialmente. Como ejemplos de mezclas de nutrientes preparadas comercialmente se incluyen, aunque sin limitación, M199, MCDB110, MCDB202, MCDB302, y demás.

Además, el medio de la presente divulgación también puede contener agua *Energy* para la inducción y estabilización de células madre pluripotentes. El agua *Energy* puede estar incluida, preferentemente, en una cantidad que varía del 0,01 a 10 % v/v, más preferentemente del 0,05 al 0,5 % v/v.

La composición de medio de la presente divulgación es un medio específico para la inducción de células madre pluripotentes, y puede prepararse añadiendo el extracto de *Ecklonia cava* al medio basal. Preferentemente, la composición de medio puede contener el extracto de *Ecklonia cava* a una concentración que varía de 1 a 1 000 μ g/ml., más preferentemente de 100 a 400 μ g/ml., basándose en la composición de medio total.

Etapas b) de desdiferenciación de células madre mesenquimatosas en células madre pluripotentes inducidas

A continuación, utilizando el medio descrito anteriormente, las células madre mesenquimatosas se diferenciaron en células madre pluripotentes inducidas.

En un ejemplo de la presente divulgación, pudo observarse que, cuando se utilizaba la composición de medio que contenía el extracto de *Ecklonia cava* de acuerdo con la presente divulgación, los días 8 a 10 (figuras 2 y 3), se formaban colonias de células madre pluripotentes, a diferencia de cuando se utilizaba solo medio DMEM F-12.

Las células madre pluripotentes inducidas producidas en la presente divulgación tienen el mismo potencial de diferenciación que el de las células madre embrionarias, y también tienen sustancialmente la misma forma que la de las células madre embrionarias. En un ejemplo de la presente divulgación, se examinó si se expresaban los genes (Nanog, Oct4, Sox-2 y Klf) y la proteína (SSEA4), característicos de las células madre embrionarias, y como resultado, se demostró que los genes y la proteína se expresaban en las células madre pluripotentes inducidas de la presente divulgación de la misma manera que en las células madre embrionarias (figura 4).

Etapas c) de diferenciación de células madre pluripotentes inducidas en hepatocitos

A continuación, las células madre pluripotentes inducidas, producidas como se ha descrito anteriormente, se diferenciaron en hepatocitos.

La diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas en hepatocitos, puede realizarse utilizando diversos medios de diferenciación conocidos en la técnica. Preferentemente, la diferenciación se realiza utilizando un medio de diferenciación que contiene dexametasona, transferrina, selenito de sodio, insulina y factor de crecimiento. Preferentemente, el medio de diferenciación contiene 1-100 nM de dexametasona, 1-10 µg/ml de transferrina, 1-50 ng/ml de selenito de sodio, 1-50 µg/ml de insulina y 10-500 ng/ml de HGF o FGF.

Como medio basal para el medio de diferenciación, puede utilizarse DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco), MEM (Medio Esencial Mínimo), BME (Medio Basal de Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM F-12, α-MEM (Medio Esencial Mínimo α), G-MEM (Medio Esencial Mínimo de Glasgow), IMPM (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove). Medio completo AmnioMax, Medio completo AminoMax II (Gibco, Nueva York, Estados Unidos), Medio de Chang, Medio MesemCult-XF (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá) o similares.

Las células madre pluripotentes inducidas producidas en la presente divulgación tienen la misma pluripotencia que las células madre embrionarias. En un ejemplo de la presente divulgación, pudo observarse que las células madre pluripotentes inducidas, producidas en la presente divulgación, tenían pluripotencia para diferenciarse en ectodermo, mesodermo y endodermo (figura 5).

Por tanto, las células madre pluripotentes inducidas producidas en la presente divulgación pueden diferenciarse de manera eficaz en hepatocitos.

En un ejemplo de la presente divulgación, pudo observarse que las células consideradas como células madre pluripotentes podrían diferenciarse en hepatocitos (figura 6).

Según otro aspecto de esta divulgación, se proporciona una composición de terapia celular que comprende los hepatocitos diferenciados.

La composición de terapia celular de la presente divulgación puede administrarse mediante cualquier vía, particularmente, por vía intraperitoneal o intratorácica, por vía subcutánea, intravenosa o intraarterial, por vía intramuscular, por vía tópica, mediante inyección, o por vías similares.

En la presente divulgación, la composición de terapia celular puede administrarse en forma de solución inyectable, suspensión, emulsión, y formas similares, según un método convencional. En caso necesario, la composición puede suspenderse en un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund, o también puede administrarse junto con una sustancia que tenga actividad adyuvante, tal como BCG (bacilo de Calmette y Guérin). La composición puede esterilizarse o puede contener un adyuvante, tal como un estabilizador, un agente hidratante, un acelerador de la emulsificación, o una sal o tampón para controlar la presión osmótica, y otras sustancias terapéuticamente útiles. La composición puede prepararse usando un método convencional de mezclado, granulación o recubrimiento. La composición de terapia celular de acuerdo con la presente divulgación, puede contener un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, puede contener, además del principio activo, un diluyente (p. ej., dextrosa, sorbitol, celulosa, glicina, lactosa, sacarosa, manitol), un aglutinante (p. ej., silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, tragacanto, carboximetilcelulosa de sodio), un disgregante (p. ej., almidón, agar, ácido alginico o su sal de sodio), una mezcla en ebullición y/o un absorbente, un edulcorante, un saporífero y un colorante.

La composición de terapia celular de acuerdo con la presente divulgación puede aplicarse a diversas enfermedades y, basándose en los resultados de ensayos clínicos realizados en seres humanos, también puede utilizarse en los

misimos como un producto de terapia celular alogénica.

[Efectos ventajosos]

5 A continuación se resumen las características y ventajas de la presente divulgación.

(i) La presente divulgación proporciona una composición de medio para desdiferenciar células madre pluripotentes inducidas, que contiene un extracto de *Ecklonia cava*.

10 (ii) La presente divulgación también proporciona un método para diferenciar células madre pluripotentes inducidas, producidas utilizando la composición de medio, en hepatocitos.

(iii) El uso de la composición de medio de acuerdo con la presente divulgación, permite que las células madre pluripotentes inducidas se produzcan de manera eficaz a partir de células madre mesenquimatosas, y la célula madre pluripotente producida, puede diferenciarse en hepatocitos y, por lo tanto, es útil como un producto de terapia celular.

15 [Descripción de los dibujos]

La figura 1 es una vista que ilustra que las células madre pluripotentes, que son sustancialmente iguales a las células madre embrionarias, se inducen cuando se cultivan células madre mesenquimatosas utilizando un medio que contiene un extracto de *Ecklonia cava*.

La figura 2 muestra la expresión de proteínas específicas, que confirma que las células madre pluripotentes inducidas por el método de la presente divulgación son células madre pluripotentes.

25 La figura 3 ilustra la formación de colonias pluripotentes de células madre inducidas utilizando diversas concentraciones de un extracto de *Ecklonia cava* de acuerdo con el método de la presente divulgación.

La figura 4 muestra la expresión génica en células madre pluripotentes inducidas por el método de la presente divulgación.

30 La figura 5 muestra los resultados de ensayos del potencial de diferenciación *in vivo* de células madre pluripotentes inducidas por el método de la presente divulgación.

La figura 6 muestra los resultados de diferenciación de células madre pluripotentes, inducidas por el método de la presente divulgación, en hepatocitos, utilizando un medio de diferenciación de hepatocitos.

35 [Mejor modo]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos solo pretenden describir la presente divulgación con más detalle.

Ejemplos

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

Una muestra de hierbas usada en el experimento se adquirió en Jeju y se utilizó en el experimento después de una decisión a conciencia. A 1 l de metanol al 70 % se añadieron 100 g de una muestra de hierbas deshidratada, se extrajo a reflujo durante 16 horas y se filtró a través de un papel de filtro. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio a presión reducida y después se liofilizó inmediatamente.

50 Ejemplo 2: Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimatosas del cordón umbilical humano

Ejemplo 2-1: Recogida de cordón umbilical humano

55 Inmediatamente después de un parto se recogió tejido de cordón umbilical. Antes de transferir la muestra de tejido al laboratorio, está se lavó mediante aclarado e inmediatamente después se transfirió a un frasco de vidrio esterilizado de 500 ml que contenía medio F-12 y un medio de transporte (penicilina 50 UI/ml, estreptomycin 50 µg/ml (adquirida en Invitrogen)). En el laboratorio, la extracción de células madre se realizó en una campana de flujo (Clase 100) en condiciones estériles. La muestra se transfirió primero a un recipiente de acero inoxidable estéril. La muestra de tejido del cordón umbilical se lavó varias veces con PBS y después se cortó en trozos de 2 cm de longitud y se transfirió a una placa de cultivo celular que tenía un diámetro de 10 cm. En este momento, la muestra volvió a lavarse y se sometió a tratamiento antiinfeccioso con etanol al 70 %, y se lavó varias veces con PBS que contenía una mezcla de antibióticos (penicilina 50 UI/ml, estreptomycin 50 µg/ml (adquirida en Invitrogen)) hasta que la solución quedó transparente.

65 Ejemplo 2-2: Aislamiento de células madre de cordón umbilical humano y cultivo de las mismas

Para aislar la gelatina de Wharton (base del cordón umbilical) de los vasos sanguíneos y de otros elementos internos del cordón umbilical, primero se hizo una incisión del cordón umbilical. Después de retirar los vasos sanguíneos, la gelatina de Wharton aislada se cortó en trozos pequeños (0,5 cm x 0,5 cm) para extraer células.

El explante se realizó colocando los trozos de gelatina de Wharton del cordón umbilical en diferentes discos de cultivo tisular que estaban en condiciones de cultivo celular adecuadas para la extracción de células madre epiteliales o células madre mesenquimatosas.

Para aislar y cultivar células madre mesenquimatosas, el tejido explantado se añadió a 5 ml de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) F-12 (Gibco) complementado con suero bovino fetal (FBS, Hyclone) al 10 %, FBS al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin, y se mantuvo en una incubadora con CO₂ a 37° C. El medio se reemplazó cada tres o cuatro días. El crecimiento de las células se comprobó con un microscopio óptico. Las células en crecimiento se trataron con tripsina (tripsina al 0,125 %/EDTA al 0,05 %) para mayor expansión y se conservaron congeladas (usando DMEM/FBS al 10 %).

El medio se reemplazó cada tres o cuatro días. El crecimiento de las células del tejido explantado se comprobó con un microscopio óptico.

Para extraer células madre mesenquimatosas, los sedimentos de las células se resuspendieron en medio DMEM F-12 (Gibco), FBS al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin y se realizó un recuento. Después, las células se inocularon en discos de cultivo tisular de 10 cm a una densidad de 1 x 10⁶ células/disco. El medio se reemplazó cada tres o cuatro días. El crecimiento de las células y la formación de clones se comprobaron con un microscopio óptico. A una confluencia de aproximadamente 90 %, las células se subcultivaron como se ha descrito anteriormente.

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

Ejemplo experimental 1-1: Producción de células madre pluripotentes a partir de células madre mesenquimatosas humanas utilizando diversas concentraciones de extracto de *Ecklonia cava*.

Se realizó un experimento para inducir células madre pluripotentes a partir de células madre de cordón umbilical humano utilizando diversas concentraciones del extracto de *Ecklonia cava* procedente de Jeju. Para un grupo de control, el medio de cultivo de CMM, DMEM F-12 (Gibco) (que contenía FBS al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin) se utilizó como un medio basal. Para un grupo experimental, a medios con células madre mesenquimatosas de cordón umbilical humano subcultivadas tres veces (figura 1) se añadieron 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml y 1 000 µg/ml del extracto de *Ecklonia cava* de Jeju y 0,1 % v/v de agua *Energy* (agua desionizada purificada que contenía SiO₂, Al₂O₃, TiO₃, Fe₂O₃, CaO, Na₂O, K₂O y LiO; STC Nara Co., Ltd., Corea). Se aislaron y lavaron células madre mesenquimatosas de cordón umbilical humano, y las células mononucleares resultantes se inocularon en placas (discos) de 6 pocillos a una densidad de 1 x 10⁴ células y se cultivaron a 37° C y con CO₂ al 5 %.

Para las células madre pluripotentes inducidas mediante el método de la presente divulgación, las expresiones de OCT4, de SOX2 y de antígeno embrionario específico de fase 4 (SSEA4, *stage-specific embryonic antigen4*), que son proteínas específicas para células madre embrionarias, se analizaron mediante tinción inmunoquímica utilizando anticuerpos contra las proteínas. Para la tinción, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se lavaron con PBS y se bloquearon con solución de ASB (albúmina de suero bovino) al 1 %. Después, las células se trataron con anticuerpos primarios contra OCT4, SOX3 y SSEA4 y se incubaron a 4° C durante 18 horas. Después, las células se lavaron con PBS y se trataron con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia (FITC, siglas de inglés *Fluorescein IsoThioCyanate*, isotiocianato de fluoresceína) contra los anticuerpos primarios y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, la expresión de las proteínas se analizó usando un microscopio confocal, y los resultados del análisis se muestran en la figura 2. En la figura 2, CB indica campo brillante, la segunda figura indica los resultados de la tinción para la expresión de cada proteína, y la tercera figura indica la combinación de las dos figuras (figura 2).

Como resultado, en el grupo experimental, se observó que, después de 10 días (figura 3), solo se formaban colonias cuando la concentración del extracto de *Ecklonia cava* de Jeju estaba entre 100 y 400 µg/ml. Además, OCT4, SOX2 y SSEA4, que son marcadores específicos para células madre pluripotentes, solo se tiñeron en colonias, lo que sugiere que las células inducidas por el método de la presente divulgación son células madre pluripotentes.

Ejemplo experimental 1-2: Análisis y comparación de genes de células madre pluripotentes

Usando una pipeta de 200 µl las colonias se separaron de las células madre pluripotentes (producidas en el Ejemplo 2-1 anterior) y éstas últimas se observaron con un microscopio y después se aisló ARN total usando reactivo TRIzol (fabricado por Invitrogen). Usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR, *reverse transcription-polymerase chain reaction*) se sintetizó ADNc y a continuación se realizó la PCR usando cebadores

específicos para los genes OCT4, Sox-2, Nanog, c-Myc y para el gen de control de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los genes Nanog, OCT4 y Sox-2 son genes característicos que aparecen en células madre embrionarias, y el gen c-Myc es un gen inespecífico que puede ser positivo tanto en células madre embrionarias como en células madre adultas. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar la expresión de estos genes, y los resultados del análisis se muestran en la figura 4. Con referencia a la figura 4, el nivel de expresión de OCT4, que es un gen característico de células madre pluripotentes, era bajo en células madre mesenquimatosas que no se sometieron al proceso de inducción, mientras que los niveles de expresión de los genes característicos fueron significativamente altos en las células madre pluripotentes (STC2013-F002) inducidas por el método de la presente divulgación. SOX2 y Nanog, que son genes de células madre, se expresaron a niveles similares, y el nivel de expresión de c-Myc, un gen inespecífico, fue menor en las células (STC2013-F002) que se sometieron al proceso de inducción, que en las células que no se sometieron al proceso de inducción.

Ejemplo experimental 2: Identificación de células madre pluripotentes mediante ensayo de teratoma

Para analizar el potencial de diferenciación *in vivo* de las células madre pluripotentes inducidas por el método de la presente divulgación, colonias de células madre pluripotentes indiferenciadas cultivadas en células de soporte, se separaron mediante tratamiento con tripsina-EDTA el día 5 de cultivo, y después, se añadieron a Colagenasa y se mantuvieron en una incubadora durante 30 minutos. Las células madre pluripotentes indiferenciadas se recuperaron y, por vía subcutánea, se inyectaron 1×10^6 células en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, siglas del inglés *severe combined immunodeficiency*). Después de 4 semanas, los teratomas formados se recogieron, se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina según un método convencional. El tejido se seccionó a un grosor de 10 μm y se tiñó con hematoxilina y eosina.

Con referencia a la figura 5, puede observarse que, en la zona en la que se inyectaron las células madre pluripotentes inducidas, producidas por el método de la presente divulgación, el teratoma estaba visiblemente formado. Específicamente, los análisis histológicos demostraron que los teratomas que se formaron tenían la capacidad de diferenciarse en tejido nervioso derivado de ectodermo (figura 5a), tejido muscular derivado de mesodermo (figura 5b) y tejido estomacal derivado de endodermo (epitelio cilíndrico, figura 5c). A lo largo del experimento, se pudo confirmar que las células inducidas por el método de la presente divulgación, tenían sustancialmente el mismo potencial de diferenciación *in vivo* que el de las células madre embrionarias, es decir, pluripotencia para diferenciarse en ectodermo, mesodermo y endodermo.

Ejemplo experimental 3: Desdiferenciación en hepatocitos

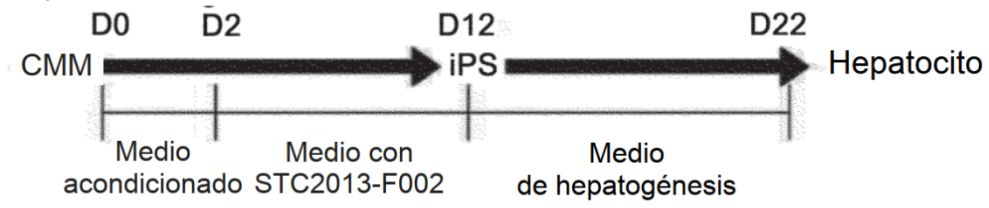
Para inducir la diferenciación en hepatocitos, en una incubadora, se cultivaron células madre mesenquimatosas en condiciones de humedad del 95 % a una temperatura de 37° C y con CO₂ al 5 %, usando un medio que contenía una mezcla de extracto de *Ecklonia cava* y agua *Energy*, induciendo así las células madre pluripotentes a partir de células madre mesenquimatosas. Después, durante 2 semanas, las células se cultivaron en el medio de diferenciación de hepatocitos DMEM F-12 (que contenía dexametasona 20 nM, 5,5 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina, 7 ng/ml de selenito de sodio, 100 ng/ml de HGF, 50 ng/ml de FGF, 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina). Para verificar la diferenciación en hepatocitos, se realizó tinción inmunohistoquímica con α -fetoproteína. Como resultado, como se muestra en la figura 6, las células eran negativas para α -fetoproteína antes del tratamiento con el medio de diferenciación (figuras 6A y 6B) y positivas para α -fetoproteína después del tratamiento con el medio de diferenciación (figuras 6C y 6D), sugiriendo que las células consideradas como células madre pluripotentes podrían diferenciarse en hepatocitos.

REIVINDICACIONES

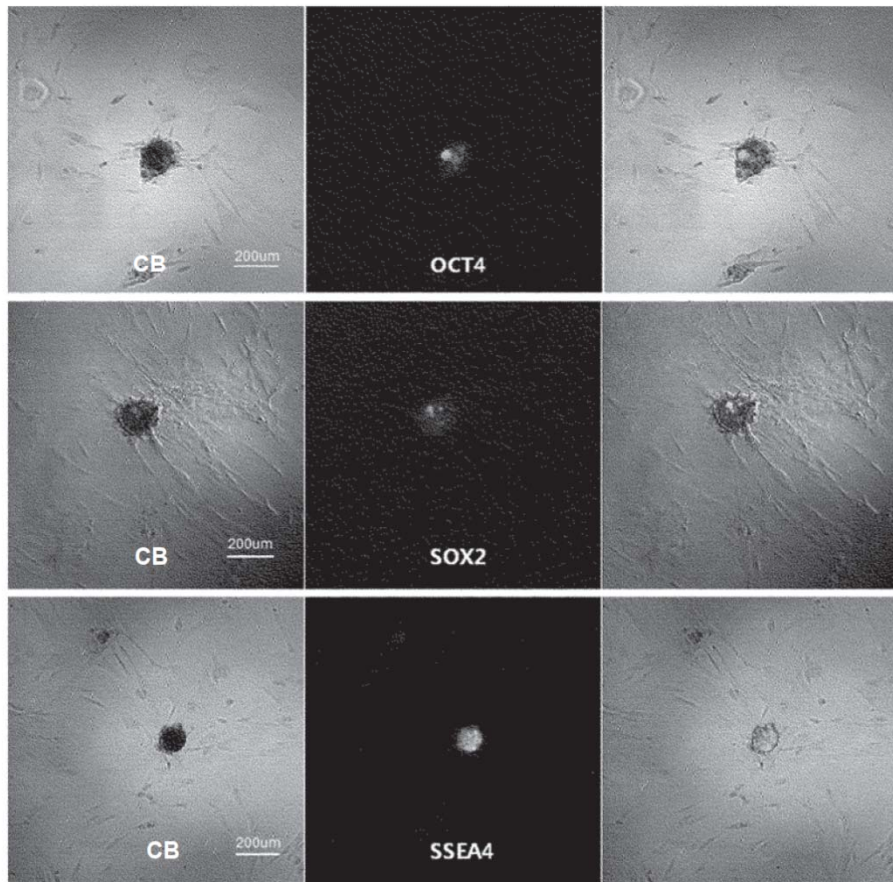
1. Un método para diferenciar células madre mesenquimatosas en hepatocitos, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) añadir un extracto de *Ecklonia cava* a un medio de cultivo celular;
 - (b) desdiferenciar células madre mesenquimatosas en células madre pluripotentes inducidas en el medio; y
 - (c) diferenciar las células madre pluripotentes inducidas en hepatocitos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el extracto de *Ecklonia cava* se añade a un medio seleccionado del grupo que consiste en DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), MEM (Medio Esencial Mínimo), BME (Medio Basal de Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α -MEM (Medio Esencial Mínimo α), G-MEM (Medio Esencial Mínimo de Glasgow), IMDM (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove), medio 5A de MacCoy, Medio completo AmnioMax, Medio completo AminoMax II, Medio de Chang y medio MesemCult-XF.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde el extracto de *Ecklonia cava* se añade al medio en una cantidad de 100-400 $\mu\text{g/ml}$.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde el medio contiene adicionalmente del 0,01 al 10 % v/v de agua desionizada purificada que contiene SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_3 , Fe_2O_3 , CaO , Na_2O , K_2O y LiO .
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa c) se realiza usando un medio que contiene dexametasona, transferrina, selenito de sodio, insulina y factor de crecimiento.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el medio contiene 3-isobutil-1-metilxantina, hidrocortisona e indometacina en un medio seleccionado del grupo que consiste en DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), MEM (Medio Esencial Mínimo), BME (Medio Basal de Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α -MEM (Medio Esencial Mínimo α), G-MEM (Medio Esencial Mínimo de Glasgow), IMDM (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove), medio 5A de MacCoy, Medio completo AmnioMax, Medio completo AminoMax II, Medio de Chang y medio MesemCult-XF.
- 30 7. Uso de una composición de medio que comprende un extracto de *Ecklonia cava* para desdiferenciar células madre mesenquimatosas en células madre pluripotentes inducidas, en donde las células madre pluripotentes inducidas son capaces de diferenciarse en hepatocitos.

【Figura 1】

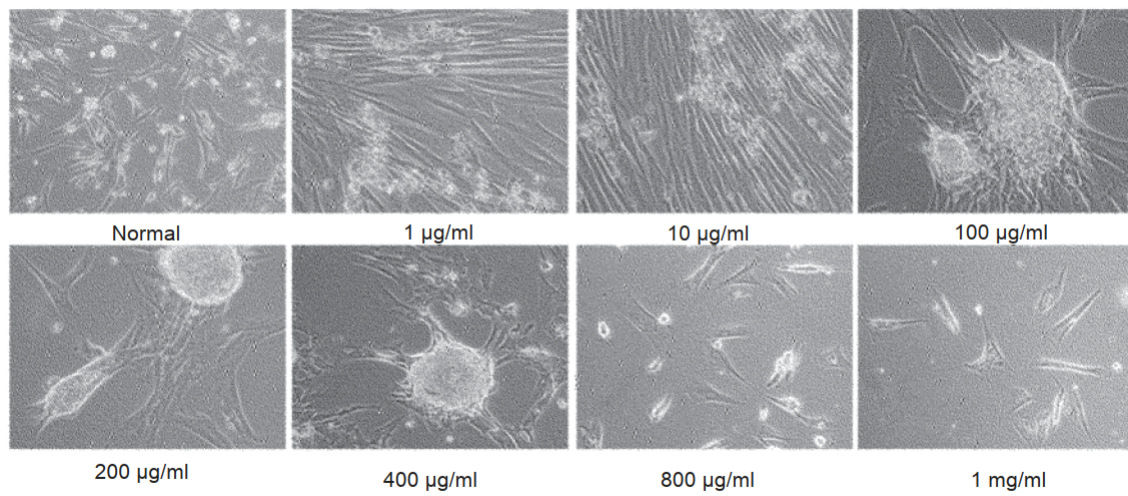
(Siembra de células



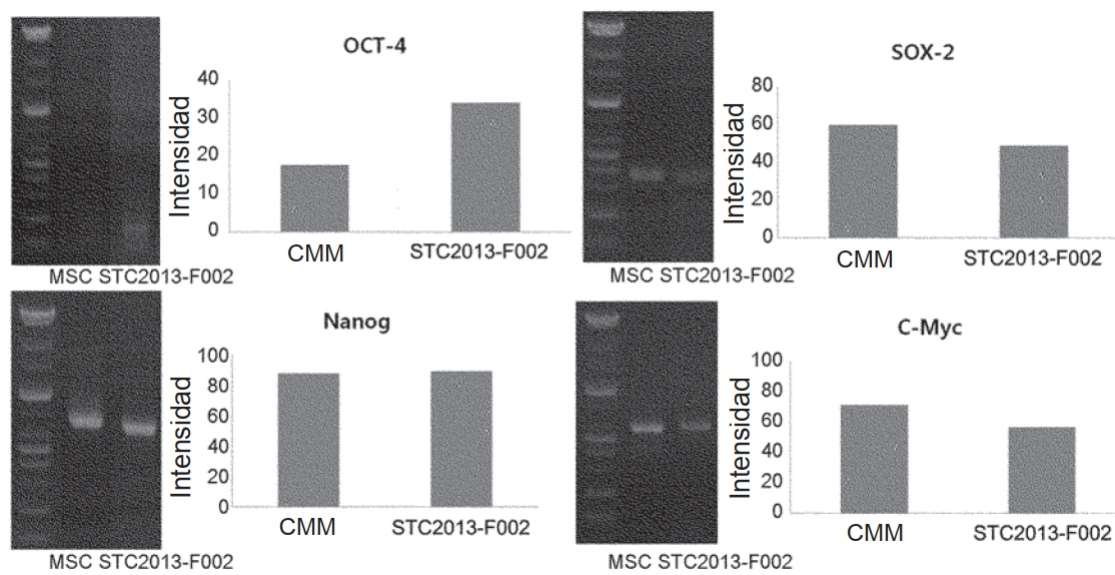
【Figura 2】



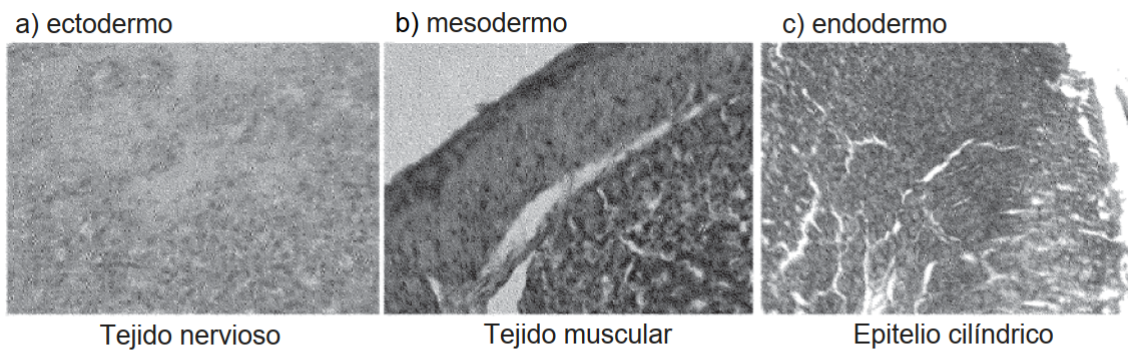
【Figura 3】



【Figura 4】



【Figura 5】



【Figura 6】

