



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 261 054**

② Número de solicitud: 200403171

⑤ Int. Cl.:

C12N 5/06 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **31.12.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2006**

Fecha de la concesión: **16.10.2007**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.11.2007**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

⑦ Titular/es: **Universidad de Almería
Ctra. de Sacramento, s/n
04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES**

⑧ Inventor/es: **García Camacho, Francisco;
Belarbi, El Hassan;
Chileh, Tarik;
Molina Grima, Emilio;
Sánchez Mirón, Asterio;
Cerón García, M. del Carmen y
Contreras Gómez, Antonio**

⑨ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑩ Título: **Procedimiento para obtener un extracto de pulpo, el producto obtenido y su aplicación como suplemento para el cultivo y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos.**

⑪ Resumen:

Procedimiento para obtener un extracto de pulpo, el producto obtenido y su aplicación como suplemento para el cultivo y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos.

Extracto de pulpo como suplemento para el cultivo y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos. La presente invención se refiere a un procedimiento para obtención de un suplemento para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos a base de extracto acuoso de pulpo homogeneizado y la utilización de dicho suplemento preparación de medios para la criopreservación de células en suspensión y de tejidos de organismos invertebrados marinos.

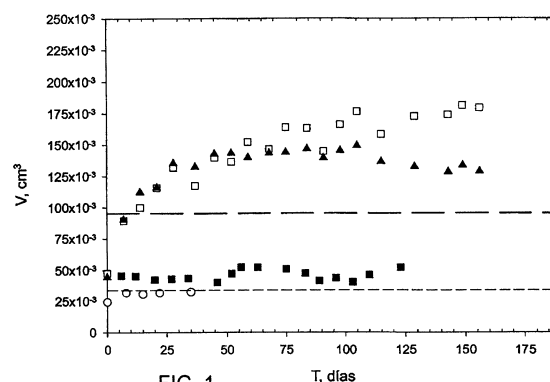


FIG. 1

ES 2 261 054 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener un extracto de pulpo, el producto obtenido y su aplicación como suplemento para el cultivo y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtención de un extracto acuoso de pulpo homogeneizado y la utilización de dicho extracto acuoso de pulpo homogeneizado como suplemento del medio para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos, preferentemente esponjas marinas.

10

Estado de la técnica

En los últimos 20 años, la Química de Productos Naturales ha experimentado un notable crecimiento. Entre los invertebrados marinos, las esponjas son el filo más prolífico de nuevos compuestos bioactivos con interés farmacológico, especialmente anticancerígenos y antivirales [Belarbi, E. H., Contreras Gómez, A., Chisti, Y, García Camacho, F. Y Molina Grima, E. (2003). *Producing drugs from marine sponges. Biotechnology Advances* 21: 585-598; Donia, M y Hamman, M (2003) *Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. Lancet Infect Dis* 3: 338-48.; Mayer, A. M. S. Y Gustafson, K R. (2003). *Marine Pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. Int. J. Cancer.* :291-299.; Jha, R. K Y Zi-rong, Xu (2004) *Biochemical compounds from marine organisms. Mar. Drugs* 2: 123-146.; Thakur, N.L. y Müller, W.E.G. (2004) *Biotechnological potential of marine sponges. Current Science.* 86(11): 1506-1512].

15

20

Desafortunadamente, el desarrollo de nuevos fármacos a partir de estas moléculas está ralentizado, e incluso estancado, debido a la escasez de biomasa o a las lógicas restricciones medioambientales en relación con la explotación de sus hábitats naturales [Osinga R, Tramper J, Wijffels RH. *Cultivation of marine sponges. Marine Biotechnology* 1999;1:509-32].

25

Actualmente se están haciendo numerosos intentos dentro del campo de la síntesis química, sin embargo, debido a la complejidad de las moléculas, resultan inviables económicamente. Por esta razón, es evidente que se necesitan rutas alternativas para producir masivamente estos compuestos. Una de ellas, objetivamente factible, es el cultivo *in vitro* de células y tejido de esponja (fragmentos o explantes).

30

Sin embargo, el conocimiento de los requerimientos nutricionales de las esponjas marinas para llevar a cabo el cultivo *in vitro* es escaso y muy poco preciso. Los alimentos comerciales (bacterias o fitoplancton, suplementos nutricionales desconocidos, etc.) solo consiguen, en el mejor de los casos, mantener viables a los especímenes en acuarios durante cortos periodos de tiempo.

35

También, se han realizado múltiples intentos utilizando medios de cultivo comerciales dedicados al cultivo de células animales, especialmente células de insecto y de mamífero. Entre ellos se encuentran medios tan conocidos como el de Eagle, DMEM, RPMI, M199, L-15, etc., utilizados ampliamente en el cultivo *in vitro* de tejido y células de invertebrados marinos [Mothersill, C. y Austin, B. (2000). *Aquatic Invertebrate cell culture. Ed. Springer-Praxis Books in Aquatic and Fisheries, Chichester, UK*].

40

En general, es muy difícil definir todos los requerimientos nutricionales de las células y/o tejido animal, especialmente el de los invertebrados marinos. Por esta razón, se utilizan adicionalmente sueros y promotores del crecimiento de origen animal, procedentes de mamíferos terrestres, en conjunción con los medios comerciales para soportar y promover el crecimiento celular.

45

Sin embargo, la extrapolación de experimentos realizados con células y tejido de organismos terrestres a células y tejido de invertebrado marino no han tenido éxito alguno. Entre las causas del fracaso está la utilización de promotores del crecimiento provenientes de sueros de animales terrestres. Por ejemplo, la utilización de factores de crecimiento epitelial, ácido retinoico, extracto de embrión de pollo, entre otros, en el cultivo de células de los invertebrados del subfilo *Urochordata* [Rinkevich, B., Frank, U, Gateño, D., and Rabinowitz, C. (1994) *The establishment of various cell Zines from colonial marine invertebrates. In: Müller, W. E. G. (eds), Use of Aquatic Invertebrates as Tools for Monitoring of Enviromental Hazards, pp. 253-263. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany; Rinkevich, B., Shlemberg, Z. and L. Fishelson (1995) Whole body protochordate regeneration from totipotent blood cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 7695-7699; Rinkevich, B. (1999) *Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. Journal of Biotechnology* 90:133-153], que lógicamente no guardan paralelismo alguno con los animales de origen marino. Una alternativa a estos suplementos de origen terrestre es la utilización de extractos y/o sueros isoalotéricos o alotéricos provenientes de animales marinos, ya que podrían contener nutrientes necesarios para el crecimiento de invertebrados marinos. Sin embargo, tales extractos son difíciles de estandarizar y tienen composiciones aún desconocidas. Se han hecho algunos intentos en el cultivo de explantes y células de crustáceos. Por ejemplo, (i) extracto de músculo y plasma sanguíneo del boga-vante (*Homarus gammarus*) para el cultivo de tejido de ovario de *Penaeus monodom*; extracto de gamba para el cultivo de tejido y células procedentes de *Penaeus stylirostris*. El tiempo máximo de cultivo fue de 4 semanas [Mothersill y Austin, 2000].

50

55

60

65

Con esta filosofía, se ha patentado recientemente la utilización de sueros procedentes de gastrópodos marinos [US6054317. *System for the cell culture and cryopreservation of marine invertebrates*], en los que se piensa existen lípidos adicionales, metales traza, factores de crecimiento y nutrientes específicos para la promover la proliferación celular de invertebrados marinos, entre lo que se encuentran las esponjas marinas. Los resultados aportados parecen ser interesantes pero la producción a gran escala de estos sueros a partir de gastrópodos sería totalmente hipotética dadas las dificultades de la extracción y preparación de los sueros, así como, la producción a gran escala de estos gastrópodos.

La preservación de células y tejidos de invertebrados marinos para su posterior utilización en procedimientos de cultivo *in vitro* manteniendo niveles aceptables de viabilidad podría tener importantes repercusiones económicas y medioambientales ya que se reducirían, e incluso se eliminarían, las recolecciones de especies en su hábitat natural. La utilización de dimetil sulfóxido (DMSO) en conjunción con sueros parece mejorar ostensiblemente la preservación de células y tejido de invertebrados marinos.

15 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para el crecimiento *in vitro* y criopreservación de tejido y suspensiones celulares precedentes de invertebrados marinos.

Por un lado, el procedimiento de cultivo comprende la utilización de un extracto acuoso procedente del pulpo (especie *Octopus vulgaris*, filo *arthopoda*, subfilo *crustacea*), suministrado al medio de cultivo base en un amplio rango de concentraciones. Al tratarse de un filo próximo al de otros invertebrados marinos como al de las esponjas marinas (porifera), el extracto puede proporcionar nutrientes, promotores del crecimiento y factores de adhesión específicos muy similares a los existentes en la biomasa de esponjas y otros filo próximos. Como mínimo, el extracto puede proporcionar algunos de los siguientes grupos de metabolitos:

- (i) **Aminoácidos:** Recientemente, Rosa *et al.* [Rosa, R., Costa, P.R. y Numes, M.L. (2004) *Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of Octopus vulgaris and O. defilippi (Mollusca: Cephalopoda)*. *Marine Biology* 145: 563-574] publicaron un exhaustivo análisis sobre la composición aminoacídica del *Octopus vulgaris*. También, la prestigiosa base de datos americana “USDA Nacional Nutrient Database for standard Reference, Realase 17” (2004) publica en su página WEB un análisis nutricional detallado del *Octopus vulgaris*, en el que detectaron y cuantificaron la presencia en cantidades variables de los siguientes aminoácidos: treonina, metionina, isoleucina, leucina, valina, fenilalanina, tirosina, lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, cistina, prolina, serina y triptofano. Los mayoritarios son leucina, lisina y arginina, ácido glutámico, ácido aspártico y alanina.
- (ii) **Lípidos y ácidos grasos:** El perfil de ácidos grasos de la biomasa de *Octopus vulgaris* también está cuantificado con precisión en la literatura científica [Rosa, R., Costa, P.R. y Numes, M.L. (2004) *Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of Octopus vulgaris and O. defilippi (Mollusca: Cephalopoda)*. *Marine Biology* 145: 563-574. Navarro, J. C. Y Villanueva, R. (2003) *The fatty acid composition of Octopus vulgaris paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile*. *Aquaculture* 219: 613-631; USDA Nacional Nutrient Database for Standard Reference, Realase 17, 2004]. Los ácidos grasos mayoritarios de la biomasa son el C16:00, C18:00, C18:1, C20:1, araquidónico (20:4n6; ARA), eicosapentaenoico (C20:5n3) y docosahexaenoico (C20:5n3). El colesterol también se encuentra en cantidades significativas.
- (iii) **Vitaminas:** Dentro de este grupo se han detectado en la biomasa de *Octopus vulgaris* Vitamina C (ácido ascórbico total), tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, vitamina B6, ácido fólico, vitamina B 12, vitamina A, retinol, vitamina E y vitamina K [USDA Nacional Nutrient Database for Standard Reference, Realase 17, 2004].
- (iv) **Oligoelementos:** Entre otros destacan el hierro, zinc, cobre y selenio [USDA Nacional Nutrient Database for standard Reference, Realase 17, 2004].
- (v) **Hormonas y factores de crecimiento:** D’Aniello *et al* (1996) [D’Aniello A., Cosmo, A.D., Cristo, C. D., Assini, L., Botte, V. Y Fiore, M.D. (1996) *Ocurrence of sex steroid hormones and their binding proteins in Octopus vulgaris Lam. Biochemical and Biophysical Research communications* 227: 782-788] detectaron y cuantificaron la existencia en *Octopus vulgaris* de hormonas tales como progesterona, testosterona y 17 β -estradiol (y sus correspondientes proteínas de enlace).
- (vi) **Moléculas de adhesión celular:** Las diferentes familias de moléculas de adhesión encontradas en invertebrados (Ej. colágenos y lamininas), responsables de la formación de la matriz extracelular, tienen un elevado índice de especificidad. De hecho, la ausencia de esta especificidad en otros suplementos justifica el elevado índice de fracaso en experimentos de adhesión celular (superficie-célula, célula-célula) [Fernández-Busquets, X Y Burger, MM (1999) *Cell adhesion and histocompatibility in sponges. Microsc. Res. Techna* 44: 204-218]. Esto es más notorio cuando los invertebrados marinos utilizados son esponjas marina Dado que el pulpo (filo artrópodo) y las esponjas marinas (porifera) pertenecen a filos muy próximos, es de prever que moléculas de adhesión del *Octopus vulgaris* puedan ser reconocidas por las células de esponjas

ES 2 261 054 B1

marinas. Recientemente, en una publicación [Mizuta, S., Tanaka, T. Y Yoshinka, R. (2003) *Comparison of collagen types of arm and mantle muscles of the common octopus (Octopus vulgaris)*. *Food Chemistry* 81: 527-532] extrajeron del pulpo diferentes tipos de colágeno.

5 La cantidad en el extracto de pulpo de cada uno de los metabolitos citados anteriormente dependerá de la solubilidad en agua de éstos en las diferentes formas químicas que se puedan presentar.

La presente invención comprende un extracto acuoso preparado a partir de pulpo homogeneizado como suplemento en el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos, preferentemente de esponjas marinas que presenta las siguientes ventajas:

- Es un extracto fácil de obtener, ya que se trata de un extracto acuoso sencillo, a diferencia de los extractos procedentes de sueros sanguíneos de invertebrados marinos, que pueden considerarse más complejos de obtener.

- Este extracto presenta la posibilidad de ser utilizado a gran escala sin dañar el medio ambiente, ya que procede de la especie *Octopus* cultivable en cautividad en piscifactorías.

La diferencia fundamental que presenta la presente invención respecto de la solicitud de patente US6054317 es que en ésta última, se suplementa el medio de cultivo base con un suero (o plasma) procedente de arterias de gastrópodos mediante un costoso procedimiento, en la presente invención, la suplementación del cultivo base se realiza con extracto acuoso de pulpo, mucho más fácil de obtener.

El medio de cultivo base sobre el que se adiciona el extracto puede ser cualquier medio base para el cultivo de células animales, en general, suplementado con sales marinas comerciales o sales inorgánicas para confeccionar agua de mar artificial, hasta alcanzar osmolalidades próximas a 1000 mosmol.

Otro aspecto importante de la invención consiste en utilizar medio base de cultivo en conjunción con DMSO (dimetil sulfóxido) y extracto acuoso de pulpo homogeneizado en diferentes proporciones para criopreservar células y tejido de esponja marina. La capacidad para almacenar muestras biológicas de campo y muestras procedentes de cultivo es otra aportación de esta invención, ya que la recolección masiva de esponjas marinas es totalmente prohibitiva por el irreversible impacto ambiental que ocasionaría. Las esponjas no tienen sistema circulatorio, pero sí un extraordinario sistema acuífero. Esta característica estructural del tejido facilita la llegada de DSMO a las células más internas del tejido, manteniendo su estructura.

En este sentido, muestras de tejido y suspensiones celulares de esponja marina se sumergieron en el medio base enriquecido según Tabla 1 y 2, y suplementado con hasta un 20% v/v de extracto acuoso de pulpo y un 10% v/v de DSMO. Seguidamente se congelaron a -20°C y -150°C. El DSMO protege a las células de la formación de cristales de hielo durante la etapa de congelación, y el medio base enriquecido con el extracto acuoso de pulpo protege a las membranas celulares durante la descongelación.

Al igual que con los sueros comerciales, las subfracciones del extracto acuoso, y los componentes que las constituyen, podrían obtenerse por métodos bien establecidos, tales como cromatografía, filtración, diálisis o extracción con solventes, entre otros. En el caso de los sueros comerciales, tales subfracciones y sus componentes han resultado ser beneficiosas en el crecimiento de multitud de líneas celulares y tejido animal.

TABLA 1

Compuesto	Concentración (g/L)
NaCl	19.430
KCl	0.340
MgSO ₄ .7H ₂ O	6.981
MgCl ₂ .6H ₂ O	5.070
CaCl ₂	1.100
NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	0.712
NaBr	0.016
Na ₂ F ₆ Si	2.28 10 ⁻³

ES 2 261 054 B1

TABLA 2

	Aminoácido	Concentración (g/L)
5	L-asparagina	1.322
	Ácido L-aspártico	1.330
10	Ácido L-glutámico	1.470
	Glucina	0.750
	L-prolina	1.150
15	L-serina	1.050
	Taurina	0.122
20	Ácido ascórbico	0.500

Ensayos de realización

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan aquí sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

30 Ensayo 1

Preparación del extracto acuoso de pulpo homogeneizado

La preparación del extracto acuoso de pulpo homogeneizado consiste en trocear pulpo y homogeneizar a T^a ambiente (22 ± 6°C), utilizando una cortadora convencional, con una relación en peso equivalente de pulpo y agua de mar.

La mezcla obtenida posteriormente se centrifuga y el sobrenadante se somete a un proceso de filtración en gradiente hasta 0.22 µm.

Finalmente el producto obtenido tras la filtración se conserva congelado a -150°C hasta su utilización como suplemento del medio basal.

El porcentaje de pulpo homogeneizado está definido en un intervalo entre el 15% y el 20% del total de la mezcla.

Ensayo 2

Crecimiento in vitro de tejido

En los siguientes ensayos se ha utilizado como suplemento del medio basal, enriquecido según Tablas 1 y 2, un extracto acuoso preparado a partir de pulpo homogeneizado.

Estos ensayos se han centrado en el crecimiento *in vitro* de explantes de dos especies de esponjas marinas *Axinella damicornis* y *Crambe crambe*. Las esponjas del género *Axinella* contienen una familia de compuestos llamada halicondrinas altamente citotóxicos [Pettit G. R., Schimidt J. M., Cerny R. L., Hooper J. N A. y Rützler K (1991) Isolation and structure of the cell growth inhibitory constituents from the Western Pacific marine sponge *Axinella* sp. *Journal of Medical Chemistry* 34: 3339-3340]. La esponja *Crambe crambe* es importante porque sintetiza biomoléculas pertenecientes a una familia de compuestos llamados crambescidinas con elevada citotoxicidad y exhiben propiedades antivíricas, entre otras [Rinehart, K. L. y Jares-Erijman, E. A. (1999) Antiviral and cytotoxic compounds from the the sponge *Crambe crambe*. *Patente USA 5,952,332*].

Especímenes de las esponjas marinas *Crambe crambe* y *Axinella damicornis* fueron cortados en trozos pequeños con volúmenes comprendidos aproximadamente entre 0.025 cm³ y 0.075 cm³. Seguidamente fueron mantenidos en agua de mar con hipoclorito sódico al 1% durante un tiempo no superior a 5 minutos. A continuación, se mantuvieron durante un periodo no superior a 5 días en agua de mar con un cóctel de antibióticos: gentamicina (≈0.5 mg/ml), nistatina (≈1.25 µg/ml) y penicilina (≈0.5 mg/ml). La temperatura en todo momento no superó los 20°C.

ES 2 261 054 B1

Finalmente los trozos de tejido de esponjas eran situados en diferentes formulaciones del medio de cultivo. Se han hecho experimentos utilizando los siguientes elementos:

- a) Agua de mar suplementada con extracto de pulpo homogeneizado en el rango desde 5% a 20% v/v.
- b) Agua de mar sin extracto de pulpo.
- c) Medio basal RPMI 1640 enriquecido con sales inorgánicas constitutivas del agua de mar, aminoácidos y suplementado con extracto de pulpo en el rango desde 5% a 20% v/v. En la Tabla 1 se detallan las concentraciones finales de las sales inorgánicas adicionadas al medio base de cultivo (RPMI 1640 comercial); los valores pueden oscilar en un $\pm 10\%$. En la Tabla 2 se detallan las concentraciones finales de los aminoácidos suplementados al medio base comercial RPMI 1640.
- d) Medio base RPMI 1640 enriquecido con sales inorgánicas constitutivas del agua de mar y aminoácidos según Tablas 1 y 2.
- e) Medio base RPMI 1640 enriquecido con sales inorgánicas constitutivas del agua de mar.

Los ensayos se han realizado a la temperatura media del hábitat donde fueron recolectadas, $17 \pm 3^\circ\text{C}$. Los experimentos se realizaron en incubador bajo atmósfera de CO_2 del $4 \pm 0.5\%$ y $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$.

En las figuras 1 y 2 se han representado algunos de los resultados más ilustrativos de la evolución del crecimiento en volumen de diferentes trozos de tejido de la esponja *Crambe crambe* en diferentes formulaciones del medio de cultivo. Como se puede apreciar en las figuras el símbolo \circ representa el blanco o solo agua de mar, el símbolo \blacksquare representa el medio base RPMI 1640 enriquecido sin extracto, el símbolo \square representa el medio base RPMI 1640 enriquecido con un 20% de extracto de pulpo y el símbolo \blacktriangle representa medio RPMI 1640 enriquecido con un 10% de extracto de pulpo.

Los resultados obtenidos revelan que la utilización del extracto de pulpo homogeneizado en el medio base enriquecido favorece notablemente el crecimiento de los explantes de esponjas marinas en relación con los experimentos llevados a cabo sin extracto acuoso de pulpo. Además la viabilidad de los explantes fue claramente más longeva utilizando extracto acuoso de pulpo.

Las Figuras 1 y 2 muestran la evolución del crecimiento de trozos de tejido de la esponja *Crambe crambe* cultivada en diferentes formulaciones del medio base RPMI 1640 según la descripción de la invención y en agua de mar. En la Figura 1 se observa la evolución del volumen absoluto y en la Figura 2 se observa la evolución del volumen relativo (referido al volumen inicial del explante).

Ensayo 3

Criopreservación de tejido y de células en suspensión

Especímenes de la esponja marina *Axinella damicornis* fueron cortados en trozos pequeños con volúmenes comprendidos aproximadamente entre 0.025 cm^3 y 0.100 cm^3 . Seguidamente fueron mantenidos en agua de mar con hipoclorito sódico al 1% durante un tiempo no superior a 5 minutos. A continuación, se mantuvieron durante un periodo no superior a 1 hora en agua de mar con un cóctel de antibióticos: gentamicina ($\approx 0.5 \text{ mg/ml}$), nistatina ($\approx 1.25 \mu\text{g/ml}$) y penicilina ($\approx 0.5 \text{ mg/ml}$). La temperatura en todo momento no superó los 20°C . A continuación, los trozos de tejido de esponja fueron sumergidos en diferentes disoluciones: (i) agua de mar, (ii) medio basal suplementado con sales y aminoácidos según tablas 1 y 2, (iii) medio basal suplementado con sales y aminoácidos según tablas 1 y 2 y con extracto acuoso de pulpo en el rango del 5 al 20% y (iv) medio basal suplementado con sales y aminoácidos según tablas 1 y 2 con extracto acuoso de pulpo en el rango del 5 al 20% v/v y DSMO al 10% v/v aproximadamente. Los explantes fueron congelados a -20°C y -150°C con una velocidad de congelación comprendida entre 1°C/min y 3°C/min . Antes de la criopreservación, trozos de tejido fueron disgregados en agua de mar artificial libre de Ca^{++} y Mg^{++} . Las células en suspensión fueron recuperadas por centrifugación y su viabilidad fue cuantificada mediante citometría de flujo según protocolo publicado recientemente [García Camacho, F., Belarbi, E.H., Cerón García, M C., Sánchez Mirón, A., Chile, T., Chisti, Y, Molina Grima, E. (2004). *Shear effects on suspended marine sponge cells. Biochem. Eng. J. (Aceptado)*]. Transcurridas varias semanas, los tejidos preservados con extracto acuoso de pulpo y DSMO presentaban claramente el mayor índice de viabilidad. Y la temperatura de -150°C preservó durante más tiempo los explantes.

Por otro lado, especímenes de la esponja marina *Axinella damicornis* fueron cortados en trozos pequeños con volúmenes comprendidos aproximadamente entre 0.025 cm^3 y 0.100 cm^3 . Seguidamente fueron mantenidos en agua de mar con hipoclorito sódico en el rango del 1% al 10% v/v durante un tiempo no superior a 10 minutos. A continuación, se mantuvieron durante un periodo no superior a 1 hora en agua de mar con un cóctel de antibióticos: gentamicina ($\approx 0.5 \text{ mg/ml}$), anfotericina B ($\approx 1.25 \mu\text{g/ml}$) y penicilina ($\approx 0.5 \text{ mg/ml}$). Los trozos de tejido fueron colocados en tubos cónicos de centrífuga de 50 cm^3 junto con agua de mar artificial libre de Ca^{++} y Mg^{++} y con agente protector Pluronic F68 en una proporción dentro del rango 0.01% a 0.5% en peso. La mezcla se mantuvo en agitación en un agitador orbital operado a una velocidad inferior a 100 rpm durante un periodo no superior a 7 horas y a la temperatura de $18 \pm$

ES 2 261 054 B1

2°C. Las células fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en las mismas disoluciones que las utilizadas en los ensayos de criopreservación de tejido. Del mismo modo, fueron congeladas y criopreservadas. Igualmente, transcurridas varias semanas, las células preservadas con extracto acuoso de pulpo y DMSO presentaban claramente el mayor índice de viabilidad. Y la temperatura de -150°C consiguió preservar mejor las suspensiones celulares.

5

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, ésta se refiere procedimiento para obtención de un extracto para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos que comprende las siguientes etapas:

10

a) Troceado de pulpo;

b) homogeneización del pulpo con agua de mar a T^a ambiente;

15

c) centrifugación de la mezcla;

d) esterilización del sobrenadante o extracto acuoso por filtración en gradiente hasta un tamaño de poro de 0.22 μm ;

20

e) congelación del extracto acuoso filtrado.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, ésta se refiere a un extracto para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos que contiene una cantidad de pulpo homogeneizado entre 15-20% en volumen.

25

De acuerdo con otro aspecto importante de la invención, ésta se refiere a un extracto para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos que tiene un valor de carbón orgánico disuelto comprendido entre 0.3 y 0.5% en peso.

30

De acuerdo con otro aspecto importante de la invención, ésta se refiere al uso del extracto como suplemento para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos donde los invertebrados marinos son de forma preferida esponjas marinas y se utiliza preferentemente en una cantidad entre 5-20% en volumen.

35

Según otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del un extracto en la preparación de medios para la criopreservación de células en suspensión y de tejidos de organismos invertebrados marinos.

40

45

50

55

60

65

ES 2 261 054 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para obtención de un extracto de pulpo para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) troceado de pulpo;
- b) homogeneización del pulpo con agua de mar a T^a ambiente;
- 10 c) centrifugación de la mezcla;
- d) esterilización del sobrenadante o extracto acuoso por filtración en gradiente hasta un tamaño de poro de 0.22 μm ;
- 15 e) congelación del extracto acuoso filtrado.

20 2. Extracto de pulpo para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos obtenido por el procedimiento de la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende una cantidad de pulpo entre 15-20% en volumen.

25 3. Extracto de pulpo para el cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos obtenido por el procedimiento de la reivindicación 1, **caracterizado** porque tiene un valor de carbón orgánico disuelto comprendido entre 0.3 y 0.5% en peso.

4. Uso del extracto de pulpo de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, como suplemento para cultivo *in vitro* y criopreservación de tejido y de células en suspensión de invertebrados marinos preferentemente esponjas marinas.

5. Uso del extracto de pulpo según reivindicación 4 en una cantidad entre 5-20% en volumen.

30 6. Uso del extracto de pulpo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para la preparación de medios para la criopreservación de células en suspensión y de tejidos de organismos invertebrados marinos.

35 7. Uso del extracto de pulpo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 para la preparación de medios de cultivo de células en suspensión y de tejidos de organismos invertebrados marinos.

40

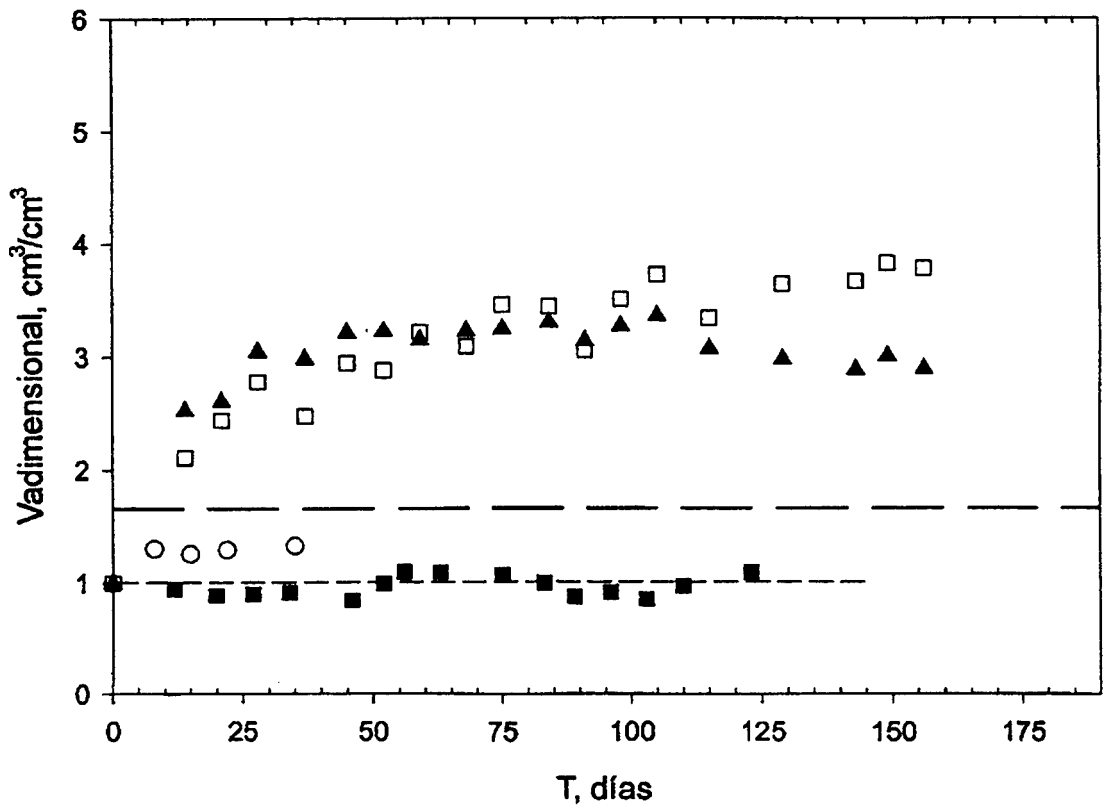
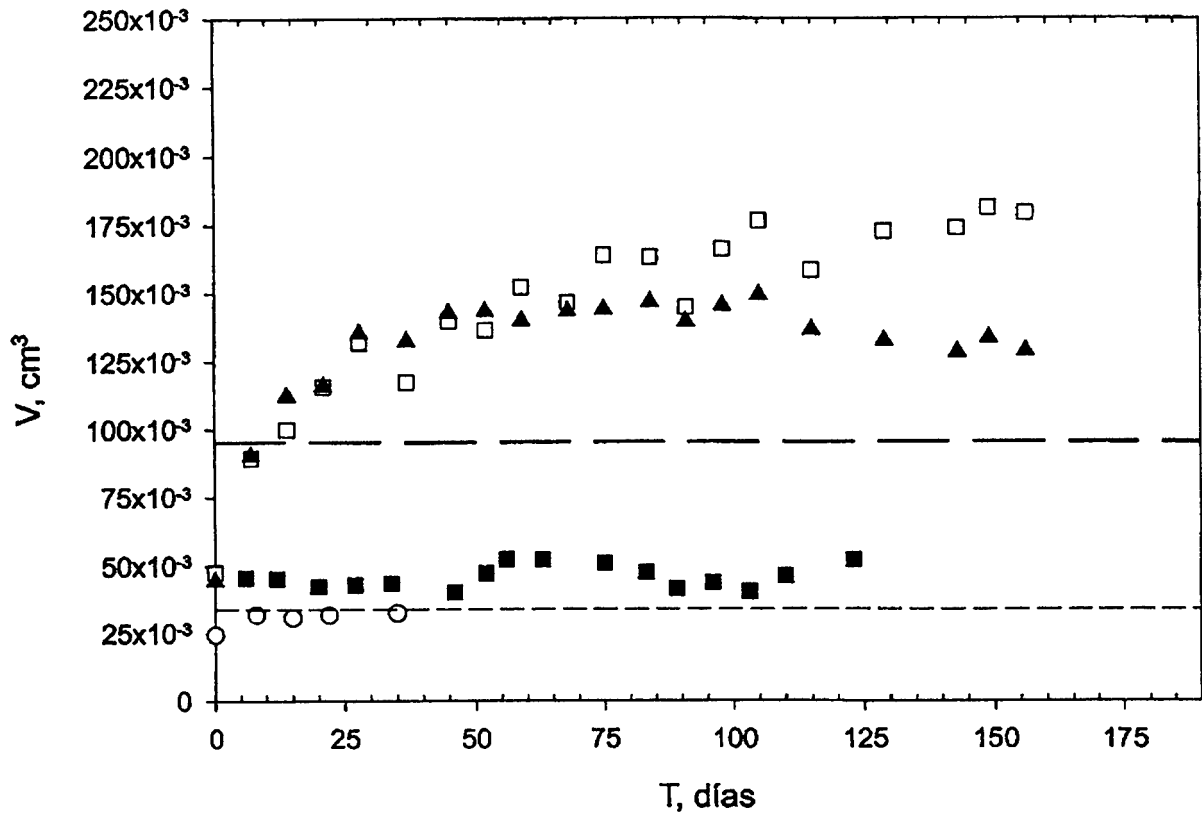
45

50

55

60

65





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 261 054

② Nº de solicitud: 200403171

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.12.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 5/06** (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6054317 A (MCMAHON) 25.04.2000	
A	US 6664106 B1 (MÜLLER) 16.12.2003	
A	OWENS, L. y SMITH, J. Early attempts at production of prawn cell lines. En: Methods in Cell Science, 1999, Vol. 21, páginas 207-211.	
A	KASORNCHANDRA, J. et al. Progress in the development of shrimp cell cultures in Thailand. En: Methods in Cell Science, 1999, Vol. 21, páginas 231-235.	
A	FRASER, C.A. y HALL, M.R. Studies on primary cell cultures derived from ovarian tissue of Penaeus monodon. En: Methods in Cell Science, 1999, Vol. 21, páginas 213-218.	

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 nº:

Fecha de realización del informe

03.10.2006

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/1