



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0613170-0 B1

(22) Data do Depósito: 30/06/2006

(45) Data de Concessão: 09/10/2018



* B R P I 0 6 1 3 1 7 0 B 1 *

(54) Título: MEIOS DE ARMAZENAMENTO PARA CÉLULAS

(51) Int.Cl.: A01N 1/02

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2005 DE 10 2005 031 532.1

(73) Titular(es): PROMETHERA BIOSCIENCES SA

**(72) Inventor(es): LUBOMIR ARSENIIEV; KRASSIMIRA ALEXANDROVA; MARC BARTHOLD;
CARSTEN GRIESEL; HANS-GERD HEUFT; SABINE KAFERT-KASTING; CHRISTOPH PRIESNER**

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/01/2008

"MEIO DE ARMAZENAMENTO PARA CÉLULAS"

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um método para o armazenamento principalmente de células humanas, meio para o armazenamento de células, e o uso deste meio para o armazenamento de células, sendo que a vitalidade das células é mantida durante o armazenamento.

Antecedentes da Invenção

[002] A crioconservação é um método frequentemente usado para o armazenamento de células vivas durante períodos longos. As técnicas de crioconservação foram constantemente desenvolvidas e aperfeiçoadas no curso da última década. Existe uma necessidade de armazenar células também durante um curto período de tempo, por exemplo: imediatamente após o isolamento de um órgão, antes do congelamento ou depois ou durante o descongelamento das células após crioconservação. Muitas vezes é necessário que as células, depois deste armazenamento, sejam destinadas novamente para um organismo, em particular, um organismo humano. A administração das células pode ocorrer via intravenosa, por exemplo. A administração de células armazenadas em particular, por meio da crioconservação em um ser humano pode ser usada sobretudo como uma aplicação clínica, especialmente a terapêutica. Por exemplo: transplantes de células de fígado humano podem ser administrados de maneira intravenosa para uso terapêutico. Entretanto, o processo de congelamento e o processo de descongelamento e o armazenamento *in vitro* anterior a estes ou imediatamente posterior continua sendo um problema

quanto à vitalidade e o número de células vivas das células a serem armazenadas, principalmente no uso clínico.

[003] A presente invenção é relacionada ao problema técnico de fornecer UNI meio para o armazenamento de células de preparação simples e de custo baixo para o armazenamento de células animais, de preferência células humanas, especialmente células de fígado ou transplantes de células de fígado. As células devem ser armazenadas, no contexto da criopreservação, preferencialmente antes do congelamento e/ou após o descongelamento. Portanto, a presente invenção tem o objetivo técnico de também fornecer um meio que permita um armazenamento durante um curto espaço de tempo de células animais, de preferência células humanas, especialmente células de fígado ou transplantes de células de fígado, com a menor perda possível em vitalidade e número de células vivas das células totais, representando assim, uma alternativa de meio de armazenamento de células conhecido.

[004] No contexto da criopreservação, meios para o armazenamento de células e descongelamento das mesmas são conhecidos. Porém, eles contêm componentes como 5 a 20 % de soro de bezerro fetal (FCS) que legalmente não são permitidos, ou até inapropriados para administração em humanos, em particular, via injeção intravenosa. Logo, a presente invenção tem relaciona - se, também, ao problema técnico de fornecer um meio que possibilite uma administração de células livre de riscos para um animal, em particular um ser humano com uma perda pequena da vitalidade e do número de células vivas dos totais, de

preferência de células humanas, em particular de células de fígado ou transplantes de células de fígado.

[005] Assim sendo, Custodiol® pode ser usado com sucesso como meio, por exemplo, no armazenamento de células criopreservadas originariamente descongeladas, tais como células de fígado. Ele foi desenvolvido como solução de conservação para o transplante de órgãos inteiros. Porém, o Custodiol® é legalmente proibido na aplicação intravenosa em humanos.

Sumário da Invenção

[006] Portanto, a presente invenção ainda tem como objeto o problema técnico de fornecer um meio para o armazenamento temporário de células, especialmente com relação à criopreservação, que seja admitido na aplicação intravenosa no ser humano e onde as células possam ser aplicadas por via intravenosa com este meio para o armazenamento de células em um ser humano, por exemplo, depois do descongelamento, "sem passos de lavagem dispendiosos e redutores do número de células vivas.

[007] A presente invenção soluciona o problema técnico colocado, essencialmente, pelo fornecimento de um método para o armazenamento temporário de células animais ou humanas de acordo com as reivindicações. De preferência, coloca-se à disposição um método onde as células são armazenadas em um meio líquido que contendo uma solução salina, selecionada particularmente de uma solução salina com cloreto de sódio, gluconato de sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio e citrato de sódio, e/ou de uma solução salina contendo Ringer-Lactato

e/ou solução salina tamponada com fosfato [PBS] e/ou uma solução aquosa de açúcar de alto peso molecular, especialmente amido de hidroxietila, e glicose e, além disso, albumina de soro e/ou plasma sanguíneo.

[008] Em formas preferidas, as células animais são células de mamíferos. Podem ser, por exemplo, células de porcos, bovinos ou ratos (murinae). De modo especialmente preferido trata-se de células humanas. O termo células, de acordo com a presente invenção, também abrange suspensões e transplantes de células. As células podem ser constituídas por um tipo, mas também pode ser usada uma composição ou uma Co-cultura de diferentes tipos de células.

[009] De acordo com a presente invenção, as células animais são células para a administração terapêutica. Em uma outra forma preferida, as células animais são células para a cultura *in vitro*. As células animais podem ser, por exemplo, hepatócitos, ilhotas de Langerhans (ilhotas do pâncreas), condrócitos, células de cartilagem, células nervosas, queratinócitos ou linfócitos. As células mais preferidas para o armazenamento no meio de células são as células do fígado, especialmente hepatócitos.

[0010] No contexto da presente invenção, o termo "células do fígado" é entendido como uma mistura de células consistindo predominantemente de hepatócitos. Entretanto, elas também podem conter frações diferentes de linfócitos, células do endotélio e outros grupos de células não parenquimais.

[0011] A presente invenção não inclui

descongelamento e/ou armazenamento de trombócitos, também conhecidos como plaquetas sanguíneas. Plaquetas não são consideradas células animais, no sentido da presente invenção.

[0012] No contexto da presente invenção, armazenamento temporário significa um armazenamento in vitro em um meio, de acordo, com a presente invenção durante um período de até 24 horas, especialmente até dez horas, de preferência, de cinco horas, particularmente de até três horas.

[0013] Crioconservação significa um armazenamento de longaduração de células abaixo de 0 °C, em particular, em -20 °C a -200 °C. O congelamento via de regra, acontece a 1 °C/min.

[0014] No contexto da presente invenção, um meio para o armazenamento de células, também denominado de meio, meio de descongelamento ou meio de cultura, é particularmente uma solução líquida aquosa. O meio para o armazenamento de células serve para o armazenamento in vitro de células vivas sob fixação do maior número de células vivas possíveis, isto significa, uma menor taxa possível de mortalidade das células, e uma capacidade de Vida Maior possível, ou seja, vitalidade, para o técnico também conhecido como viability (viabilidade).

[0015] É preferível, de acordo com a presente invenção, que os componentes de um meio para o armazenamento de células usado de acordo com a esta invenção sejam legalmente permitidos para administração, especialmente injeção intravenosa, em um organismo animal,

de preferência, em um organismo humano. De acordo com esta invenção, após serem armazenadas no meio inventivo, as células podem ser usadas em uma aplicação clínica, especialmente para uma aplicação terapêutica, ou experimentos *in vitro*.

[0016] No contexto da presente invenção, uma solução salina significa uma solução aquosa de um ou vários sais. Uma solução salina preferida, de acordo com a presente invenção, contém cloreto de sódio, gluconato de sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio e citrato de sódio, sendo que os sais são dissolvidos em água. A água usada é água esterilizada, de preferência, deionizada para injeção Composol® e/ou uma solução correspondente à composição do Composol® é uma solução salina preferida de acordo com a presente invenção. Composol® é uma solução aquosa de cloreto de sódio, gluconato de sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, hexahidrato de cloreto de magnésio e citrato de sódio. Ela contém 173 mmol/l de sódio, 5 mmol/l de potássio, 1,5 mmol/l de magnésio, 98 mmol/l de cloreto, 10,9 mmol/l de citrato, 27 mmol/l de acetato e 23 mmol/l de gluconato, de preferência, consistindo disso.

[0017] De acordo com a presente invenção, a solução salina contém, de preferência, entre 0,45 % e 0,60 % em peso, de preferência especial, 0,53% em peso de cloreto de sódio; entre 0,45 % a 0,55 % em peso, de preferência especial, 0,50 % em peso de gluconato de sódio; entre 0,20 % a 0,25 % em peso, de preferência especial, 0,22 % em peso de acetato de sódio; entre 0,03% a 0,04 % em peso, de

preferência, especial, 0,037 % em peso de cloreto de potássio; entre 0,025% a 0,035 % em peso, de preferência especial, 0,031% em peso de hexahidrato de cloreto de magnésio e entre 0,31% a 0,33 % em peso, de preferência especial, 0,32% em peso de citrato de sódio, preferencialmente consistindo disso. A solução salina tem preferencialmente um pH de 7,0 a 7,4, de preferência especial de 7,2.

[0018] Em uma outra forma, a solução salina é o Ringer-Lactato. Aqueles que são técnicos na matéria conhecem a composição usual de Ringer-Lactato. O Ringer-Lactato é uma solução aquosa contendo cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio e lactato de sódio. O Ringer-Lactato usado de acordo com a presente invenção possui um pH de 7,0 a 7.4, de preferência, de 7.2.

[0019] Em uma outra forma, a solução salina é solução salina tamponada com fosfato (PBS). Aqueles que são técnicos na matéria conhecem a composição usual de PES. PBS usadas de acordo com a presente invenção possuem um pH de 7,0 a 7,4, de preferência, de 7,2.

[0020] Em uma outra forma, um ingrediente do meio é uma solução aquosa de pelo menos um açúcar de alto. Peso molecular. Açúcares de peso molecular elevado, de acordo com a presente invenção, são, por exemplo, dextrano, também soluções de dextrano como Perfadex, amido de hidroxietila (HES) e derivados de amido de hidroxietila. De acordo com a presente invenção, o amido de hidroxietila é o açúcar de alto peso molecular preferido.

[0021] De acordo com a presente invenção, a glicose

é adicionada ao meio para o armazenamento de células em forma sólida ou como uma solução aquosa.

[0022] De acordo com a presente invenção, a albumina de soro é adicionada dissolvida ou em forma líquida ao meio para o armazenamento de células. Albumina de soro pode ser, por exemplo, soro de bezerro fetal (FCS), albumina de soro bovina (BSA) ou albumina de soro humana (HSA). De acordo com a presente invenção prefereese albumina de soro humana, pois esta é permitida para a aplicação intravenosa no ser humano.

[0023] Em uma outra forma, a albumina de soro é substituída ou complementada por plasma sanguíneo. De acordo com a presente invenção, é preferido o plasma de sangue humano, especialmente, autólogo. Em particular usa-se plasma e/ou HSA como crioprotetor, de preferência, sozinho ou em combinação com outros crioprotetores conhecidos, especialmente, DMSO.

[0024] Em outras formas preferidas, o meio usado de acordo com a presente invenção compreende pelo menos um outro componente, selecionado entre aminoácidos, hormônios, vitaminas, provitaminas e substâncias de ação antiapoptose.

[0025] Aquele que é técnico no assunto irá escolher os ingredientes da composição de acordo com a área de uso do meio de acordo com os conhecimentos técnicos dele, depois de ter sido orientado pelos conhecimentos da presente invenção para escolher os mesmos de acordo com a presente invenção e nas concentrações de acordo com a presente invenção.

[0026] O método desta invenção é representado

preferentemente, como um meio para o armazenamento de células definido anteriormente em um valor de pH 6,4 a 8, de preferência, de 7,0 a 7,4, em particular de 7,2.

[0027] Após o descongelamento da crioconservação no meio para o armazenamento de células, as células são, de preferência, lavadas, separadas do meio de conservação e do meio de armazenamento de células de acordo com esta invenção e então colocadas em um meio para o armazenamento de células fresco, de acordo com esta invenção, para o armazenamento. As células são, preferencialmente, então, separadas por centrifugação.

[0028] Este método é realizado preferencialmente a uma temperatura entre 2 a 40 °C. O meio para o armazenamento de células tem preferencialmente uma temperatura de 2 a 40 °C. De preferência especial, o método é executado a 4 °C e/ou o meio usado tem uma temperatura de 4 °C. Em uma outra variação preferida, o processo é realizado a 10 °C e/ou o meio usado tem uma temperatura de 10 °C. Em uma outra variação especialmente preferida, o processo é executado a 25 °C e/ou o meio usado possui uma temperatura de 25 °C. Em uma outra variação especialmente preferida, o método é realizado a 37 °C e/ou o meio usado tem uma temperatura de 37 °C.

[0029] O objeto da presente invenção é, logicamente também, o meio para o armazenamento de células específico para o, armazenamento temporário de células animais ou humanas que tenham sido descongeladas depois da crioconservação, especialmente um meio para o armazenamento de células, líquido contendo cloreto de sódio, gluconato de

sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio e citrato de sódio bem como glicose e além disso, albumina de soro e/ou plasma sanguíneo, e onde os componentes mencionados são dissolvidos em água.

[0030] Um meio para o armazenamento de células preferido consiste de cloreto de sódio, gluconato de sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, hexahidrato de cloreto de magnésio e citrato de sódio, bem como glicose e, também, albumina de soro e/ou plasma sanguíneo, onde os componentes mencionados são dissolvidos em água. Um meio para o armazenamento de células particularmente preferido contém entre 0,45 % em peso a 0,60 % em peso de cloreto de sódio, entre 0,45 % a 0,55 % em peso de gluconato de sódio, entre 0,20 % a 0,25 % em peso de acetato de sódio, entre 0,03 % e 0,04 % em peso de cloreto de potássio, entre 0,025 % a 0,035 % em peso de hexahidrato de cloreto de magnésio e entre 0,31 % a 0,33 % em peso de citrato de sódio, mais glicose e também albumina de soro e/ou plasma sanguíneo, sendo que todos os componentes são dissolvidos em água.

[0031] De preferência o meio para o armazenamento de células contém 0,01 % a 0,5 % em peso de glicose, de preferência especial, de 0,1 % a 0,2 % em peso de glicose.

[0032] De acordo com a presente invenção, o meio para o armazenamento de células contém preferencialmente albumina de soro humano. A albumina de soro humano pode ser substituída, de acordo com a presente invenção, por plasma de sangue humano, especialmente plasma sanguíneo autólogo.

[0033] Em uma forma preferida, o meio contém entre 0,5 % a 0,50 % em peso de albumina de soro, de preferência

especial, entre 3 % a 5 % em peso de albumina de soro. Em uma outra forma preferida, o meio contém entre 0,5 % a 50 % em peso de plasma de sangue, de preferência especial, entre 3 % a 5 % em peso de plasma de sangue.

[0034] O meio para o armazenamento de células da invenção tem preferencialmente um valor de pH entre 6,4 e 8, de preferência, entre 7,0 a 7,4, especialmente de 7,2.

[0035] Os componentes do meio de armazenamento de células desta invenção são, de preferência, permitidos para a administração, especialmente a aplicação intravenosa em um organismo animal, de preferência, em um organismo humano.

[0036] Combinações das formas de: execução desta invenção do método descrito nesta invenção e/ou do meio para o, armazenamento de células também preferíveis, de acordo com esta invenção.

[0037] A presente invenção inclui também o uso do meio para o armazenamento de células de acordo com a presente invenção acima mencionado para o armazenamento temporário de células animais descongeladas depois da crioconservação, especialmente depois do processo desta invenção.

Breve Descrição Das Figuras

[0038] As figuras mostram:

[0039] A figura 1: Vitalidade das células armazenadas (depois da crioconservação) em função do tempo de armazenamento, do meio de armazenamento usado e da temperatura do armazenamento. Legenda: "HH142": Número do preparado de células individual (lote), "quente":

temperatura de armazenamento de 18 °C, "frio": temperatura de armazenamento de 4 °C, "HES" : meio 2 , "PBS" : meio 5, "Custodiol®" : meio 1, "Composol® " : meio 4 , "Ringer-Lactato": meio 3, "plasma humano": meio 6.

[0040] A Figura 2: Reencontro das células armazenadas (antes da criopreservação) em função do tempo de armazenamento, do meio de armazenamento usado e da temperatura de armazenamento, para a legenda veja a figura 1.

[0041] A Figura 3: Vitalidade das células armazenadas (após a criopreservação) em função do tempo de armazenamento, do meio de armazenamento usado e da temperatura de armazenamento, para a legenda veja a figura 1.

[0042] A Figura 4: Número de células vivas (LZZ) de células armazenadas (após a criopreservação) em função do tempo de armazenamento e do meio de armazenamento usado; para a legenda veja a figura 1.

[0043] A figura 5: Número de células vivas (LZZ) de células armazenadas (antes da criopreservação) em função do tempo de armazenamento e do meio de armazenamento usado, média sobre três preparados de células individuais (lotes); para a legenda veja a figura 1.

[0044] A figura 6: Número das células vivas (LZZ) de células armazenadas (antes da criopreservação) em função do tempo de armazenamento e do "mio de armazenamento usado, media sobre quatro preparados de células individuais (lotes), para a legenda veja a figura 1.

[0045] A Figuras 7A até C: Reencontro, número das

células vivas (LZZ) das células armazenadas (antes da criopreservação) em função do tempo de armazenamento e do: meio de armazenamento usado, média sobre três preparados de células individuais (lotes).

[0046] A Figura 7C: Comparação com Custodiol® (=100%), valor médio sobre quatro tempos de armazenamento, média sobre "três preparados de células individuais (lotes), para a legenda veja a figura 1.

Descrição Detalhada da Invenção

Exemplo

[0047] Foram usadas células de fígado criopreservadas de sacos / tubinhos específicos da criopreservação. Uma vez que o número de tubinhos de criopreservação disponíveis de um preparado de células individual não era suficiente para o escopo do presente estudo, eles apenas foram usados para fins de comparação dos resultados. Todos os passos de preparação foram executados sob condições assépticas. A suspensão de células estava completamente descongelada, antes da adição do meio para o armazenamento de células. O descongelamento dos tubinhos de criopreservação ocorreu independentemente do tempo de descongelamento dos sacos. O meio para o armazenamento de células foi lentamente adicionado às células apresentadas.

[0048] A fim de se obter uma comparação de resultados, os diversos ensaios foram executados paralelamente por pelo menos duas, eventualmente, três pessoas.

[0049] Os seguintes meios descongelamento foram

preparados:

- Meio 1: Custodiol® (exemplo de comparação)
- Meio 2: Amido de hidroxietila (HES) + 1 g/l de glicose + 4 % de albumina de soro humana (HSA) (de acordo com a presente invenção).
- Meio 3: Ringer-Lactato + 1 g/l de glicose + 4 % de albumina de soro humana (HSA) (de acordo com a presente invenção).
- Meio 4: Composol® + 1 g/l de glicose + 4 % de albumina de soro humana (HSA) (de acordo com a presente invenção).
- Meio 5: Solução salinas tamponada com fosfato (PBS) + 1 g/l de glicose + 4 % de albumina de soro humana (HSA) (de acordo com a a presente invenção).
- Meio 6: plasma de sangue humano (exemplo de comparação).

[0050] Aproximadamente 50 ml de meio de armazenamento para células foi necessário para cada passagem (um saco descongelado). Plasma de sangue humano foi descongelado em banho-maria de 37 °C.

[0051] Em três ensaios, os meios foram aquecidos em banho-maria a 37 °C durante pelo menos 15 minutos (= "quente"). Em dois ensaios os meios para o armazenamento de células foram resfriados por refrigeração durante pelo menos 15 minutos (= "frio").

[0052] Seis tubinhos de 50 ml identificados de acordo com as soluções foram preparados e guardados a temperatura ambiente.

[0053] Em ensaios "quentes" foi centrifugado durante 5 minutos a 18 °C e 50 g's, e em ensaios "frios" foi centrifugado durante 5 minutos a 4 °C e 50 g's.

[0054] Sacos de crioconservação foram cuidadosamente retirados do cassete de alumínio. A criosuspensão foi descongelada durante dois a cinco minutos sob agitação permanente até que não houvesse mais cristais de gelo. O processo todo não durou mais do que cinco minutos.

[0055] A tampa amarela foi retirada do saco e a parede intermediária foi perfurada com a agulha de perfuração de um Benjamix. Uma seringa de 60 mL foi conectada ao ao Benjamix do saco de crioconservação e 60 mL de suspensão de células foram retirados.

[0056] Porções de 10 ml da suspensão de células foram transferidos para os seis tubinhos preparados. A estes, lentamente foi se adicionando 40 ML do meio de armazenamento de células. Todo este processo não durou mais do que cinco minutos.

[0057] Depois da centrifugação, as células foram lavadas. O sobrenadante foi retirado através do uso de uma pipeta Pasteur. Os *pellets* de células foram completamente resuspendidos em 5 mL do meio de armazenamento de células correspondente através de agitação cuidadosa.

[0058] As células foram contadas de acordo com o número de células e Vitalidade e culturas de células do fígado foram preparadas após cada contagem de células.

[0059] Para um período de armazenamento total de três horas, os últimos dois passos foram repetidos foram

repetidos a cada 60 minutos.

[0060] Somente foram usadas células de fígado com uma vitalidade superior a 40% antes da crioconservação. O experimento foi repetido pelo menos três vezes com diferentes preparados de células individuais (lotes). Nisso, para cada lote foi descongelado pelo menos um saco. Os resultados dos criotubos descongelados dos respectivos lotes foram usados para comparação.

[0061] Foram testados quatro preparados individuais (lotes) quanto à influência da solução de descongelamento. Os resultados foram testados quanto aos parâmetros vitalidade e número de células vivas (LZZ) depois do descongelamento, vitalidade e número de células vivas conservadas durante o armazenamento em suspensão. A temperatura do meio e para a centrifugação foi fixada em 4 °C para transplantes de células de fígado. O ensaio com o lote HH142 foi realizado uma vez "quente" e depois repetido "frio" (veja a figura 1 e a figura 2). Para posterior análise foram tomados os valores médios de ambos os ensaios e denominados de HH142.

[0062] Os resultados individuais estão apresentados nas figuras 3 e 4.

[0063] A fim de garantir uma avaliação independente de lote, os parâmetros de reencontro e número de células vivas para, armazenamento nas soluções testadas foram definidos. Este foi relacionado a dois diferentes pontos de partida. Por um lado, o reencontro relacionado ao número de células vivas antes do congelamento (figura 5a). Por outro lado, o reencontro relacionado ao número de células vivas

depois da lavagem (hora 0 em meio de armazenamento específico) (figura 5b). Para a comparação das cinco soluções, valores médios para os parâmetros mencionados dos três lotes testados foram calculados e apresentados graficamente na figura 5.

[0064] As duas soluções escolhidas e Composol® e HES - foram adicionalmente avaliadas e mostradas graficamente na figura 6 com base nos valores médios de quatro lotes:

[0065] Para uma melhor análise dos resultados aqui apresentados, a seguinte aproximação foi realizada. O parâmetro de reencontro do número de células vivas (LZZ) congeladas foi fixado em 100 % com o Custodiol®. Para os cinco preparados testados (exemplos de comparação / exemplos de acordo com a presente invenção) foi calculado o desvio percentual deste parâmetro em comparação com o Custodiol® (veja a figura 7a e a figura 7b).

[0066] Imediatamente após a lavagem das células, três das soluções (PBS, Composol® e HES) mostraram uma concordância comparável (superior a 80%) Custodiol® no que se refere a parâmetro reencontro do número de células vivas (LZZ). No caso, o Composol® mostrou resultados melhores até do que o Custodiol® (reencontro superior 100 %). Após uma hora, PBS teve melhores resultados, mas após duas horas, o Composol® e o plasma humano apresentaram resultados médios 10% melhores do que o Custodiol®.

[0067] Para uma outra comparação foi feita uma outra avaliação. Para cada solução foi calculado o valor médio de todos os quatro tempos (hora 0 a 3, figura 7c).

[0068] Independentemente do avanço do tempo do ensaio, HED e Ringer-Lactato mostraram cerca de 20 % de perda do número de células vivas (LZZ) em comparação com o Custodiol®, porém PBS, Composol® e o plasma humano mostraram resultados comparáveis com aqueles obtidos com o Custodiol® (desvio inferior a 10 %).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para armazenamento temporário de células hepáticas humanas **caracterizado pelo** fato de que compreende colocar as referidas células em um meio celular líquido compreendendo:

a) uma solução salina selecionada de:

- uma solução salina que contém, em especial, cloreto de sódio, gluconato de sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio e citrato de sódio,

- Ringer-Lactato e

- solução salina tamponada com fosfato (PBS);

e / ou uma solução aquosa de um açúcar de alto peso molecular, particularmente, amido de hidroxietila;

b) glicose; e

c) albumina sérica humana e / ou plasma sanguíneo humano; e

são armazenadas neste meio para o armazenamento de células.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as células serem células criopreservadas e serem descongeladas e, então, depois de descongeladas, serem lavadas em um meio celular, separadas do meio celular e depois colocadas em um meio celular fresco para armazenamento.

3. Método, de acordo com qualquer uma das das reivindicações 1 a 2, **caracterizado pelo** fato de que o meio celular ter uma temperatura de 2 a 40 graus Celsius.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as células são hepatócitos.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que as células serem células para administração terapêutica.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as células serem para cultivo *in vitro*.

7. Uso do meio celular para armazenamento de células hepáticas conforme definido pela reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o armazenamento temporário das referidas células hepáticas para este método estar conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Meio celular para armazenamento temporário de células hepáticas humanas **caracterizado pelo** fato de que o meio celular compreende:

a) cloreto de sódio, gluconato de sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, cloretos de magnésio e citrato de sódio;

b) glicose; e

c) albumina sérica humana e / ou plasma sanguíneo humano;
dissolvido em água.

9. Meio celular, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que o meio celular compreender:

0,45 a 0,60% em peso de cloreto de sódio;

0,45 a 0,55% em peso de gluconato de sódio;

0,20 a 0,25% em peso de acetato de sódio;

0,03 a 0,04% em peso de cloreto de potássio;

0,025 a 0,035% em peso de cloreto de magnésio hexahidratado; e

0,31 a 0,33% em peso de citrato de sódio.

10. Meio celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 9, **caracterizado pelo** fato de que o meio celular conter 0,01 a 0,5% em peso, preferivelmente, 0,1 a 0,2% em peso de glicose.

11. Meio celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **caracterizado pelo** fato de que o meio celular conter 0,5 a 50% em peso, de preferência, 3 a 5% em peso de albumina sérica.

12. Meio celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, **caracterizado pelo** fato de que o meio celular conter 0,5 a 50% em peso, de preferência, 3 a 5% em peso de plasma sanguíneo.

13. Meio celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizado pelo** fato de que o meio celular ter um pH de 6,4 a 8, preferencialmente, de 7,0 a 7,4.

14. Meio celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, **caracterizado pelo** fato de que compreender pelo menos um ingrediente adicional selecionado de aminoácidos, hormônios, vitaminas, provitaminas e substância antiapoptótica.

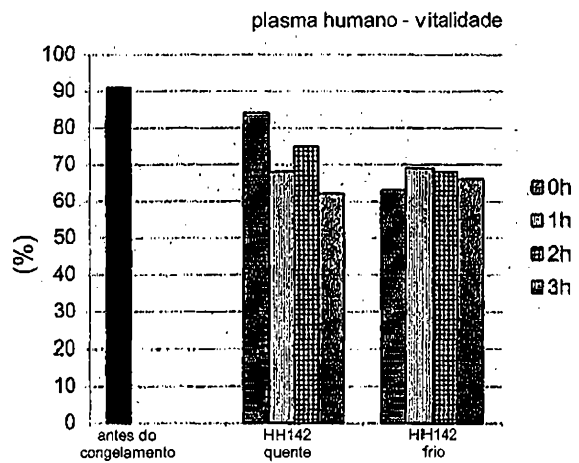
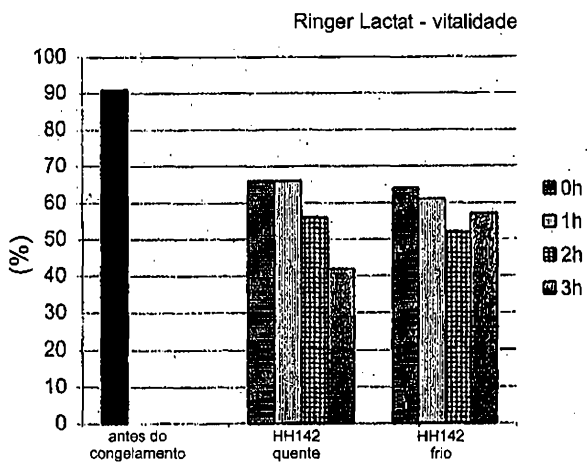
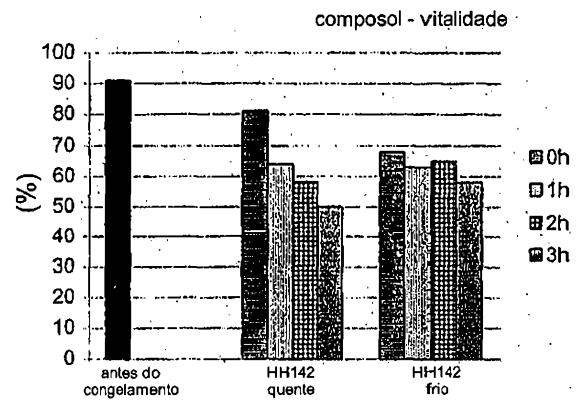
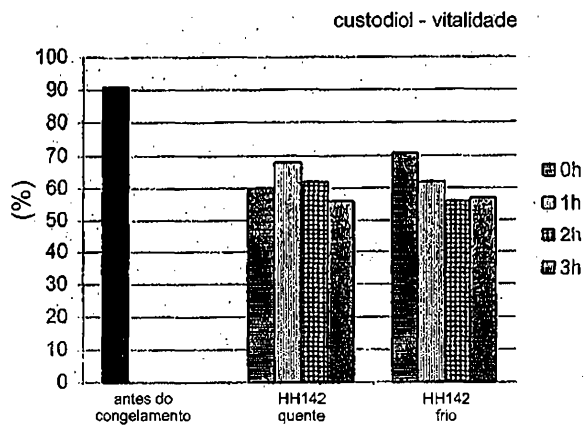
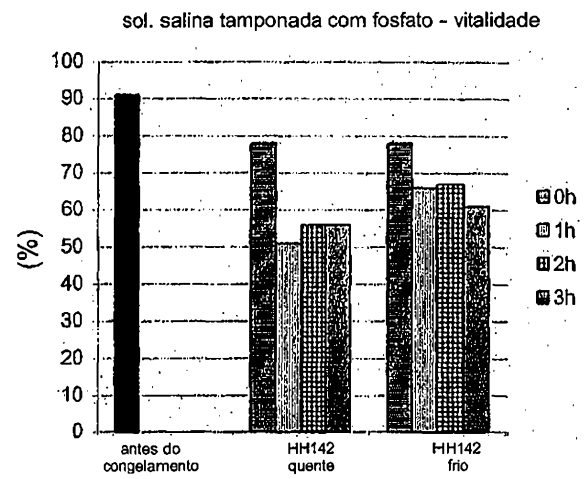
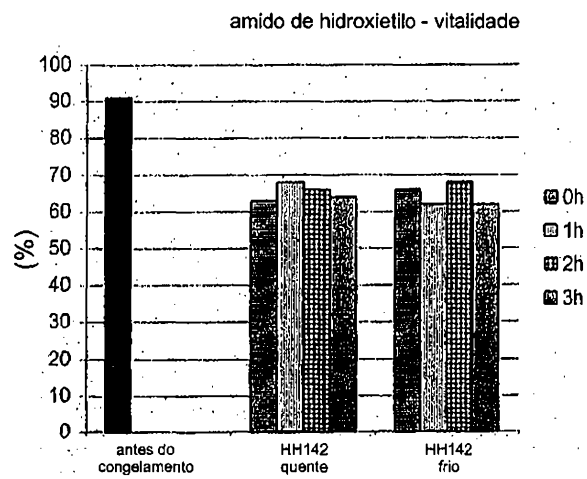


Figura 1

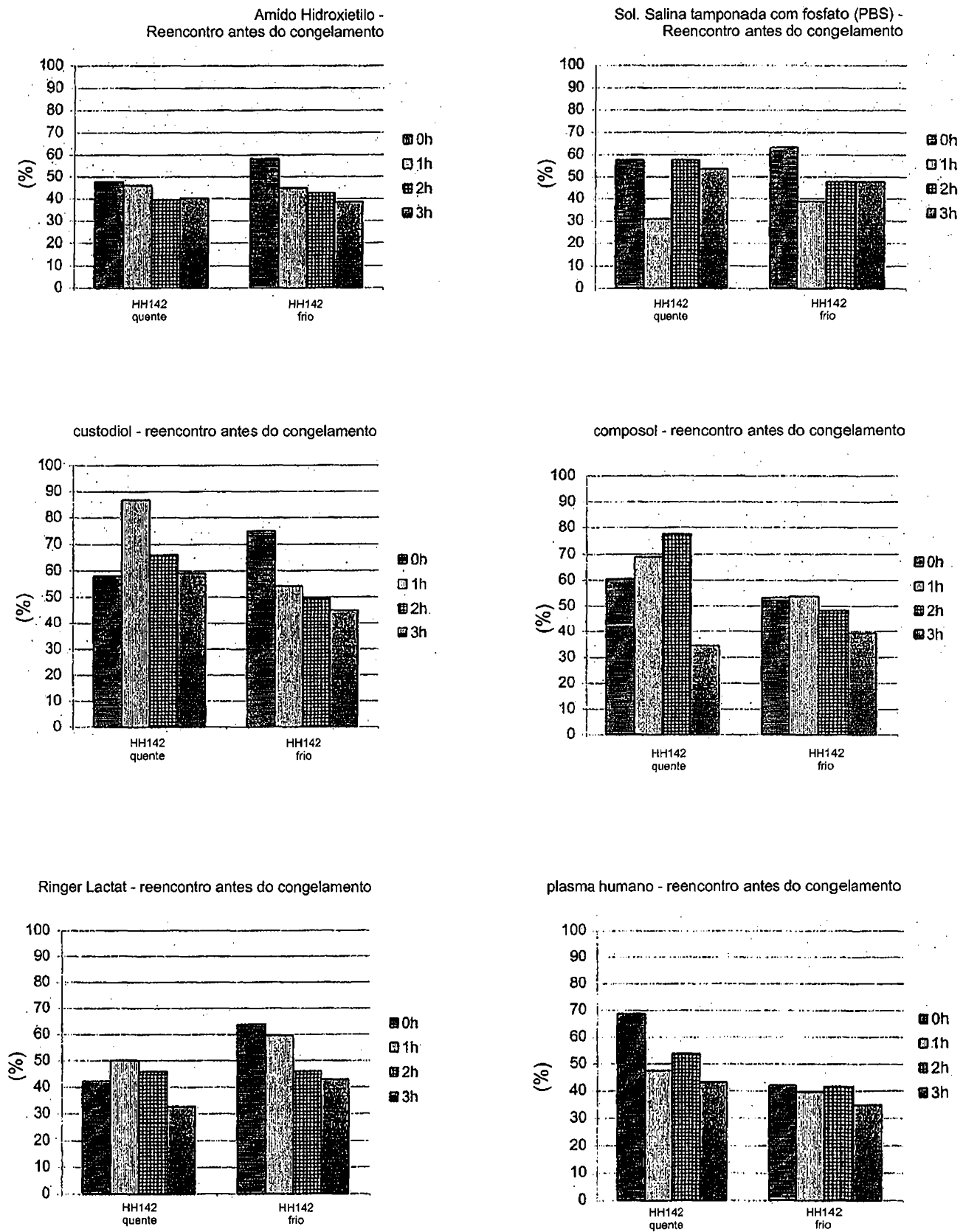


Figura 2

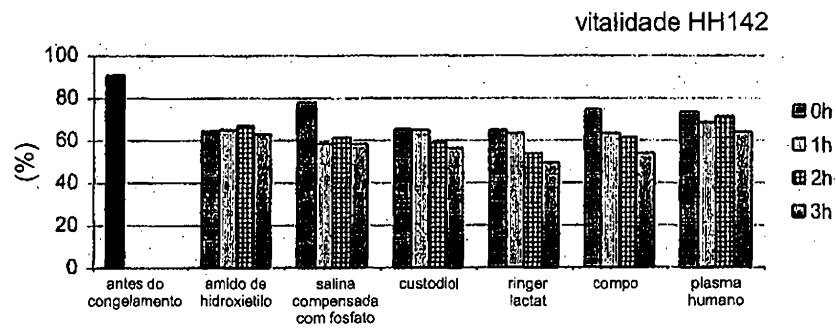


Figura 3a

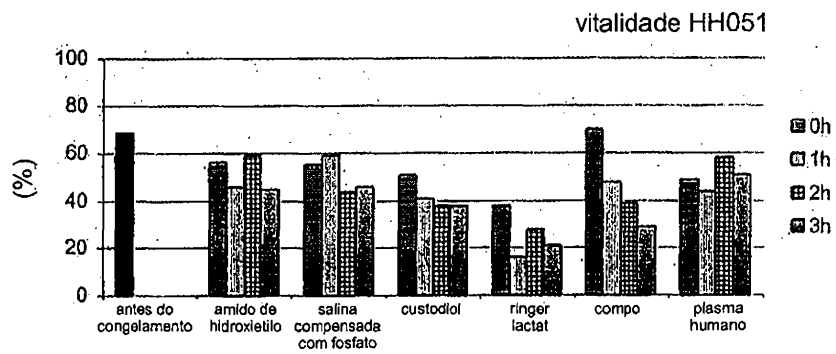


Figura 3b

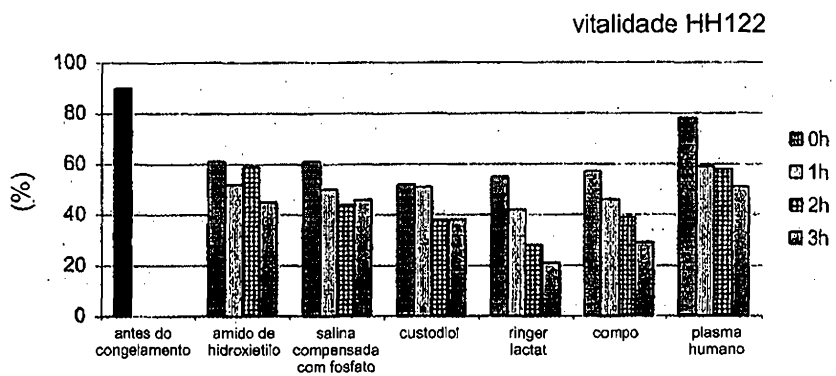


Figura 3c

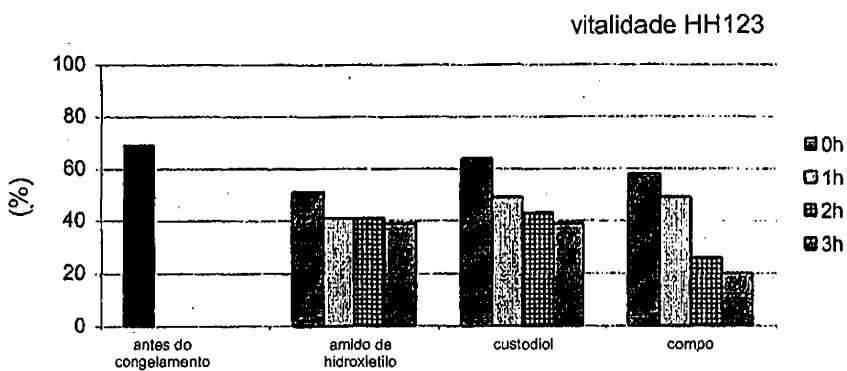


Figura 3d

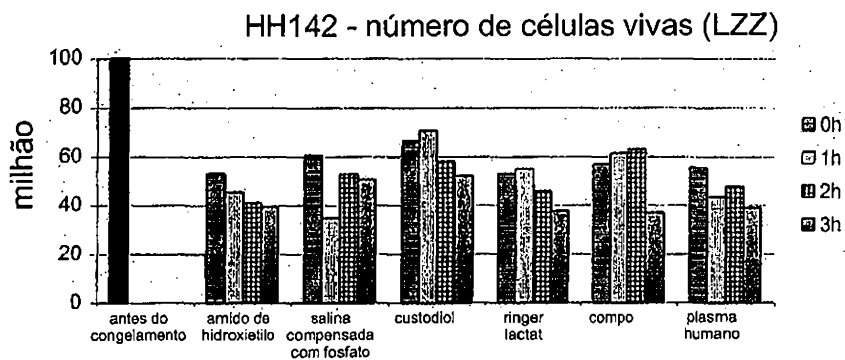


Figura 4a

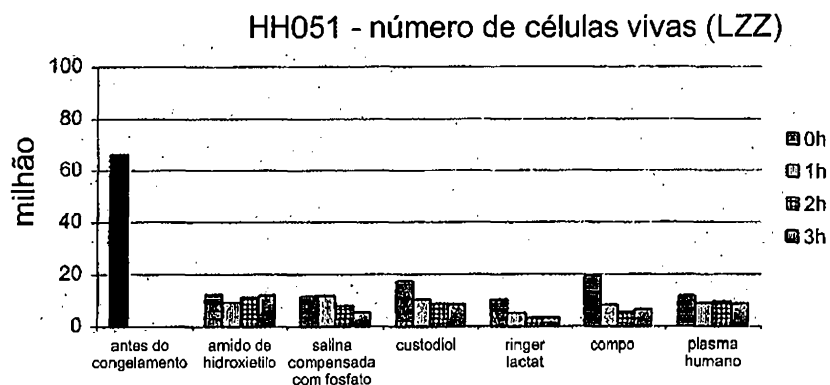


Figura 4b

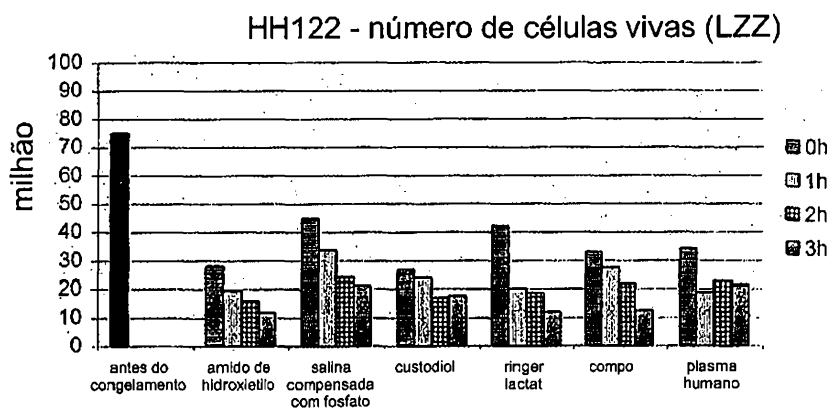


Figura 4c

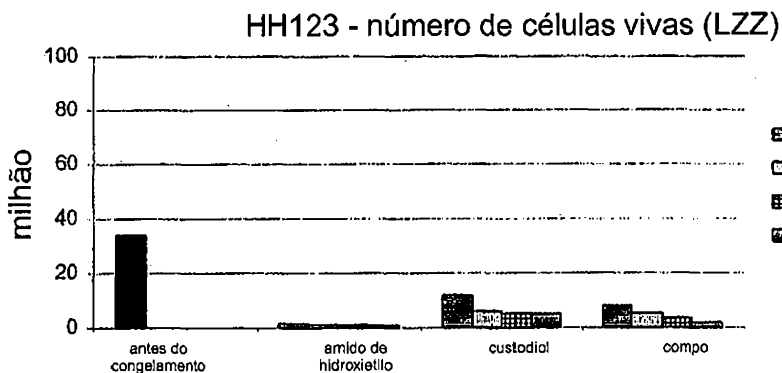


Figura 4d

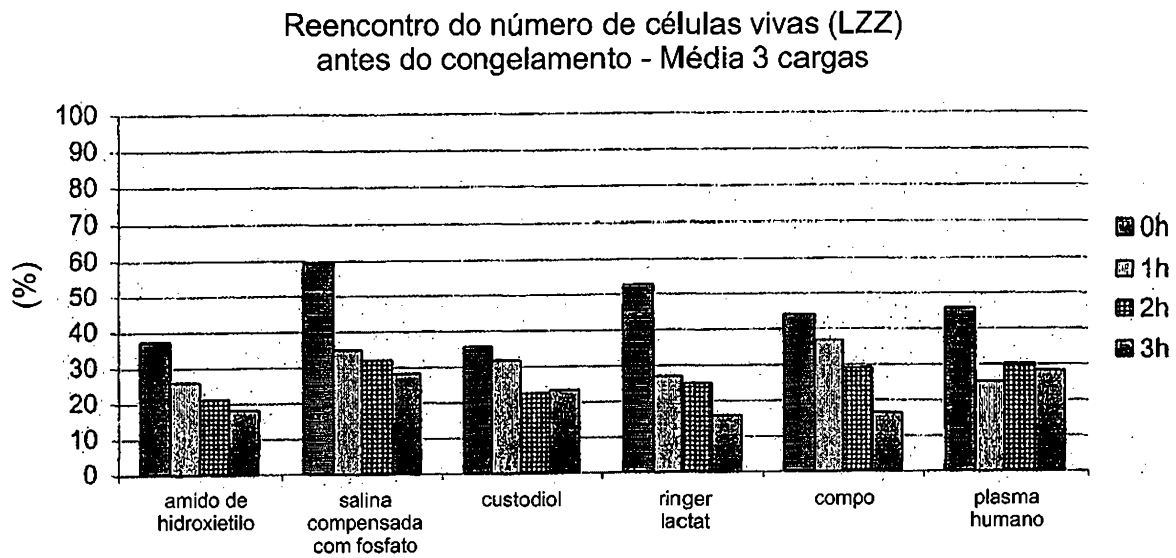


Figura 5a

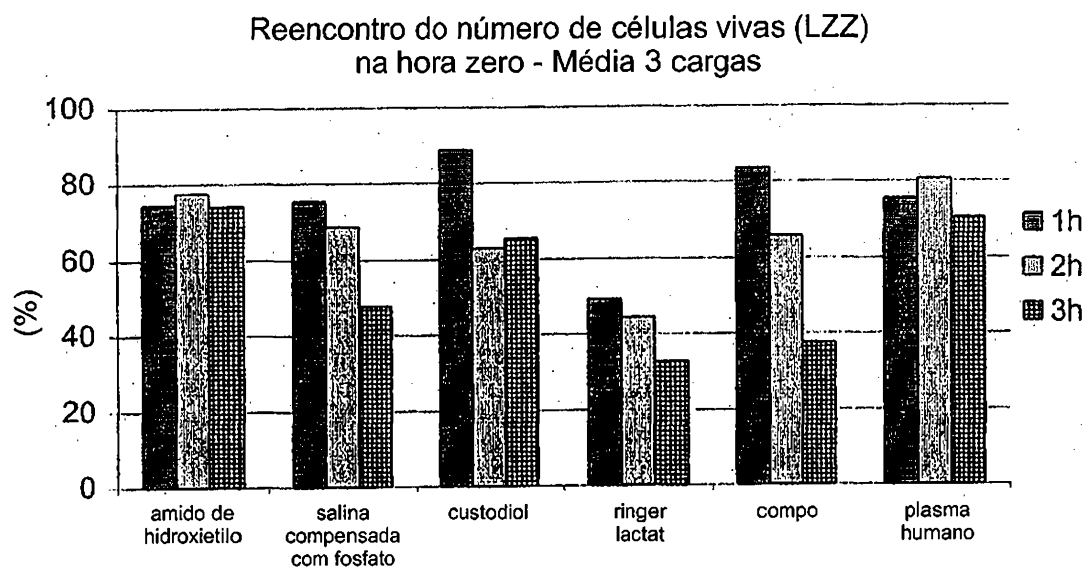


Figura 5b

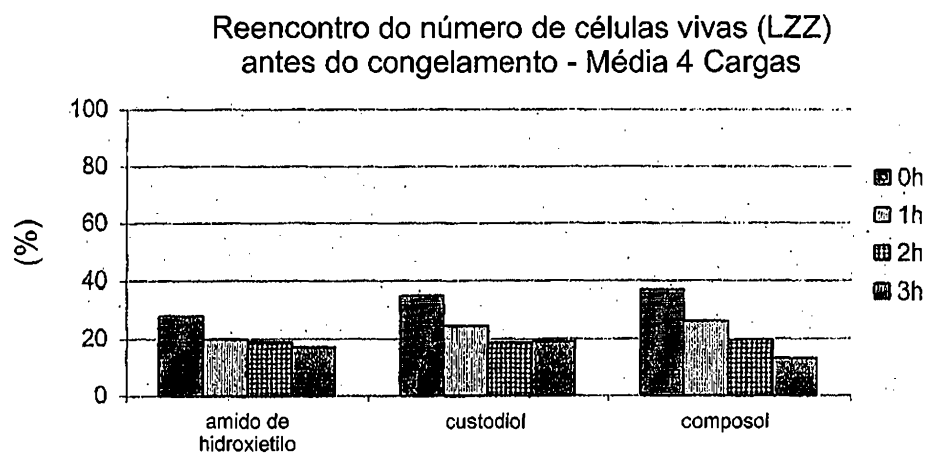


Figura 6a

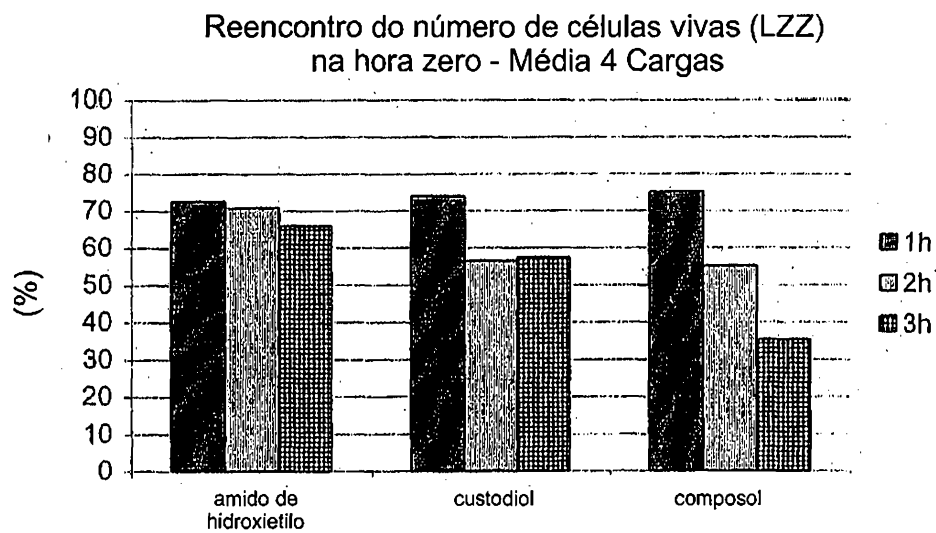
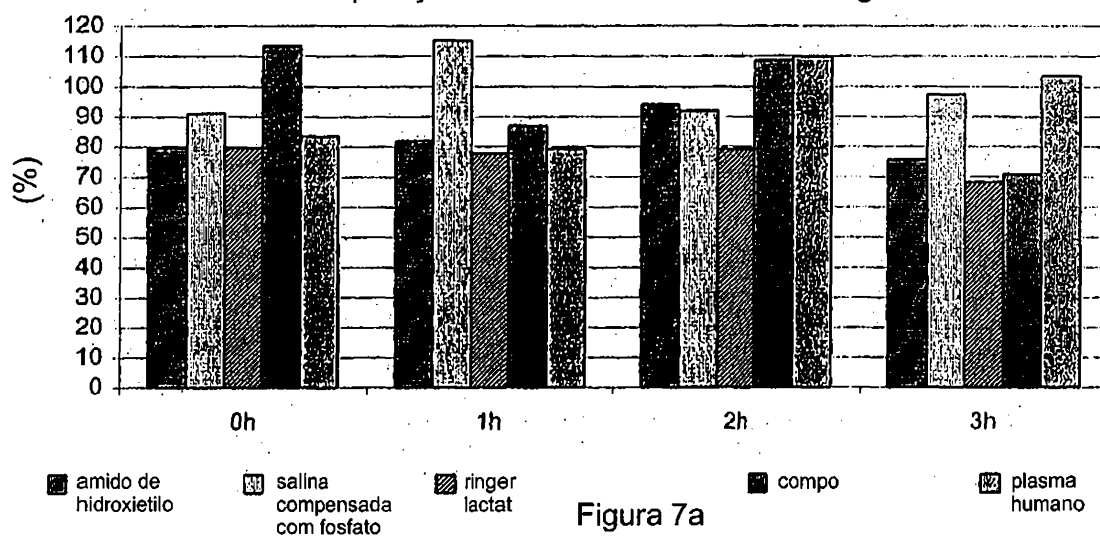
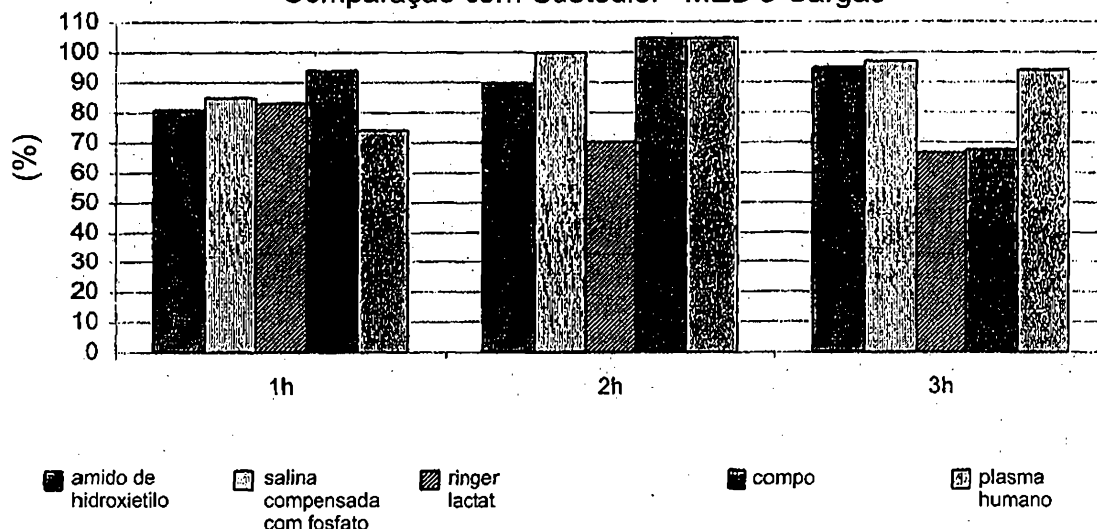


Figura 6b

Reencontro do número de células vivas (LZZ) antes do congelamento -
Comparação com Custodiol - Média 3 Cargas



Reencontro do número de células vivas (LZZ) hora zero -
Comparação com Custodiol - MED 3 Cargas



Reencontro do número de células vivas (LZZ) antes do congelamento -
Comparação com Custodiol MW 4 momentos; MED 3 Cargas

