

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 510**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 47/36 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2017** **PCT/IB2017/052832**
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2017** **WO17195179**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2017** **E 17795730 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** **EP 3454652**

54 Título: **Medio para la conservación, el transporte y la aplicación de células madre**

30 Prioridad:

13.05.2016 CZ 20160284

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2025

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MEDICINE OF
THE CAS (50.00%)
Videnska 1083
14200 Praha 4, CZ y
BIOINOVA, A.S. (50.00%)**

72 Inventor/es:

**PETRENKO, YURIY;
SYKOVA, EVA;
CEJKOVA, JITKA;
VACKOVA, IRENA y
GROH, TOMAS**

74 Agente/Representante:

RODES CASCALES, Inmaculada

ES 2 998 510 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

Medio para la conservación, el transporte y la aplicación de células madre

5 Campo de invención

La invención se refiere a un medio para conservar, transportar y administrar células madre para uso terapéutico, que consiste en una solución acuosa tamponada de trehalosa, para conservar las células madre durante un periodo de tiempo necesario antes de administrarlas al paciente a una temperatura de unos 4 °C.

10

Antecedentes de la invención

El uso de células madre, especialmente de células madre mesenquimales (CMM - mesenchymal stem cells), está actualmente en auge debido a sus importantes propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes. Las células madre también producen diversos factores paracrinós beneficiosos para la regeneración del tejido afectado y que son al mismo tiempo capaces de diferenciarse en células del tejido afectado. Debido a estas propiedades se utilizan en la medicina moderna para tratar diversas enfermedades.

15

Antes de poder aplicar las CMM con fines terapéuticos es necesario caracterizarlas meticulosamente y someterlas a pruebas exhaustivas. En la mayoría de los casos es necesario confirmar su seguridad (pruebas de esterilidad, presencia de endotoxinas y micoplasmas) y su identidad (características de la superficie). Las CMM deben transportarse desde el lugar de producción hasta el lugar de administración de las células al paciente. Todos estos procedimientos aumentan el tiempo de almacenamiento de las células tras la cosecha (tras finalizar su producción) y aumentan las exigencias de viabilidad prolongada de las células. Como mantiene Sohn y sus colaboradores (Cytotherapy, 2013), la viabilidad de las CMM en solución salina disminuye tras solo dos horas de cultivo.

20

25

Para la conservación de las células se utilizan sobre todo soluciones modificadas desarrolladas principalmente para el transporte de órganos (US 7951590 B2, US 6045990 A, WO 2010064054 A1).

30

35

40

El uso de diferentes soluciones para la conservación a largo plazo de células madre mesenquimales también se describe en las siguientes publicaciones. Ginis y sus colaboradores (Tissue Eng Part C Methods, 2012) probaron la conservación de células madre mesenquimales adherentes en solución Hypothermosol® FRS (una solución que contiene los cationes Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y los aniones Cl⁻, H₂PO₄⁻, HCO₃⁻ y lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina, glutatión, HEPES, Trolox) a 4 °C. La viabilidad de las células así almacenadas oscilaba entre el 70-80 % tras 2-4 días de almacenamiento. Chen y sus colaboradores (Cell Transplant, 2013) probaron la conservación de células en solución Plasmalyte (una solución que contiene cationes Na⁺, K⁺, Mg²⁺ y aniones Cl⁻, CH₃COO⁻ a C₆H₁₁O₇⁻) que contiene suero humano y dextrosa. Otros medios y soluciones disponibles comercialmente HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) y ViaSpan® (una solución que contiene KH₂PO₄, MgSO₄, lactobionato de potasio, rafinosa, adenosina, glutatión, alopurinol, hidroxietilalmidón) fueron probados por Corwin y sus colaboradores (Cryobiology, 2014). La viabilidad de las CMM tras 48 h de almacenamiento a 4 °C fue del 45 %. Una publicación de Pogozhykh y sus colaboradores (PLoS One, 2015) describe una conservación de aproximadamente el 50 % de la viabilidad de las CMM tras 24 horas de almacenamiento de las células a 4 °C en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) con un 10 % de suero bovino fetal.

Las soluciones descritas contienen una serie de sustancias que deben mantener el pH correcto durante la conservación de las células, garantizar la osmolaridad óptima de la solución, proteger las células del edema intracelular, la contracción, los radicales libres, la apoptosis y otros efectos negativos de la hipotermia.

5

La trehalosa, un disacárido de la glucosa que sintetizan los organismos inferiores cuando se exponen al estrés, el frío, las altas temperaturas o la desecación, se conoce como factor antiestrés. Se utiliza ampliamente en medicina humana, por ejemplo para evitar la pérdida de agua en las células (deshidratación), cuando éstas se exponen a calor excesivo, frío o radicales de oxígeno, contra los efectos de la hipoxia o la anoxia y contra los daños por hipoxia-reoxigenación.

10 Debido a sus propiedades únicas, la trehalosa se utiliza en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Se presupone que la trehalosa evita la desnaturalización e inactivación de las proteínas y protege la bicapa lipídica de las membranas celulares contra los daños. Probablemente, la trehalosa también sirve como fuente de carbono y glucosa para las funciones celulares, como eliminador de radicales libres y proporciona protección contra el estrés oxidativo. Por ello, en algunos casos se utiliza en soluciones para la conservación a largo plazo de tejidos y células en condiciones de hipotermia, criopreservación y liofilización (criodesecación).

15

La patente WO 2014208053 A1 describe el uso de varios sueros fisiológicos con la adición de dextranos y trehalosa adecuadas para el trasplante de células de mamíferos.

20

La trehalosa también es un componente de las soluciones de conservación y trasplante de órganos protegidas por las patentes US 6365338 B1 y US 8512940 B2.

La solicitud de patente US 20150351380 A1 describe, entre otras cosas, la adición de trehalosa a una solución de preservación celular para la medicina regenerativa.

25

La solicitud de patente US 20130260461 A1 describe una solución que contiene trehalosa y células madre que inhibe la aglutinación y aumenta la viabilidad de estas células.

En un artículo de Di y sus colaboradores (J Cell Physiol, 2012) se especifica que la presencia de trehalosa en la solución de almacenamiento de células madre mesenquimales aumentaba significativamente la viabilidad de las células madre mesenquimales cuando se almacenaban a 4 °C, obteniéndose los mejores resultados con una concentración de 40 mM de trehalosa.

30

La mayoría de estas soluciones se desarrollaron originalmente para el transporte de órganos para trasplantes y a priori no están destinadas a la administración a pacientes. Estas soluciones suelen consistir en un gran número de sales inorgánicas, ácidos orgánicos, hidratos de carbono, polisacáridos, antioxidantes, agentes tamponadores y quelantes, estabilizadores o factores antiapoptóticos, que pueden no estar aprobados en todos los casos para su uso humano en administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal, subcutánea, subconjuntival, local y de otro tipo.

35

40

Sumario de la invención

Las deficiencias anteriores se eliminan mediante un medio para la conservación, transporte y aplicación de células madre para uso terapéutico, consistente en una solución acuosa tamponada de trehalosa. Esta solución contiene como constituyentes esenciales cationes K^+ en cantidades de 20 a 50 mmol/l, cationes Na^+ en cantidades de 20 a 80 mmol/l; aniones Cl^- en cantidades de 0,5 a 40 mmol/l, aniones PO_4^{3-} y/o HPO_4^{2-} y/o $H_2PO_4^-$ en cantidades totales de 20 a 65 mmol/l, y trehalosa en cantidades de 250 a 300 mmol/l. Las concentraciones de estos componentes se eligen dentro de este rango para que el pH de la solución esté entre 7,1 y 7,6. En la realización más sencilla de la invención, el medio según la invención no necesita contener ningún otro ingrediente añadido intencionadamente. En cualquier caso, la osmolaridad total óptima de la solución no supera 400 mosmol/l.

En otras realizaciones de la invención, la solución puede contener además cationes Mg^{2+} y/o Ca^{2+} en una cantidad total de 0 a 2 mmol/l y aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- en una cantidad total de 0 a 2 mmol/l. Si los cationes Mg^{2+} y/o Ca^{2+} están presentes como componente añadido deliberadamente, están presentes en la solución en una cantidad total de 0,1 a 2 mmol/l. Si los aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- están presentes como componente añadido deliberadamente, están presentes en la solución en una cantidad total de 0,5 a 2 mmol/l.

En una realización preferida de la invención, la solución contiene cationes K^+ en una cantidad de 28 a 32 mmol/l, cationes Na^+ en una cantidad de 20 a 50 mmol/l, cationes Mg^{2+} y/o Ca^{2+} en una cantidad total de 0,4 a 1,2 mmol/l, 2 mmol/l, aniones Cl^- en una cantidad de 0,5 a 20 mmol/l, aniones PO_4^{3-} y/o HPO_4^{2-} y/o $H_2PO_4^-$ en una cantidad total de 40 a 50 mmol/l, aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- en una cantidad total de 0,9 a 1,2 mmol/l.

Es especialmente ventajoso cuando la solución acuosa no contiene otros componentes añadidos intencionadamente además de los cationes K^+ , Na^+ , Mg^{2+} y/o Ca^{2+} , aniones Cl^- , aniones PO_4^{3-} y/o HPO_4^{2-} y/o $H_2PO_4^-$, aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- y trehalosa. Por supuesto, no se puede descartar que haya trazas de sustancias en la solución cuya presencia esté condicionada por la producción o sea accidental.

Prolongar la vida útil de las células madre antes de su administración al paciente es necesario para poder comprobar su esterilidad, que es un paso necesario antes de cualquier administración de células a un paciente. Prolongar la vida útil y preservar la viabilidad de las células también es necesario para poder transportarlas a distancias más largas.

Para ser más concretos, el medio según la invención está diseñado para almacenar células a una temperatura de $-4^\circ C$ a $25^\circ C$, preferentemente de $0^\circ C$ a $8^\circ C$, habitualmente de $4^\circ C$ a $6^\circ C$. Se mantiene una viabilidad celular suficiente durante al menos 72 horas. El medio según la invención consiste en compuestos farmacéuticamente aceptables y puede utilizarse directamente para la aplicación de las células madre contenidas en é.

Dicho esto, el sumario de la invención consiste también en utilizar la composición de la invención para prolongar la viabilidad de las células madre, por ejemplo a una temperatura de $0^\circ C$ a $8^\circ C$ durante un máximo de 72 horas.

El medio según la invención está destinado sobre todo a la preservación de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica o tejidos extraembrionarios (placenta, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical) o células madre embrionarias, neurales, inducidas o limbares de mamíferos, incluidos los humanos. También puede utilizarse para conservar células madre unidas a un soporte biológico.

El medio según la invención que contiene las células madre respectivas está destinado al tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluida la reacción inflamatoria postraumática después de una lesión o traumatismo, y también al tratamiento de enfermedades degenerativas y neurodegenerativas. El medio según la invención que contiene las células madre correspondientes puede utilizarse además en el tratamiento de traumatismos, defectos del desarrollo, cicatrización de heridas y quemaduras de la piel, sustitución de tejidos, tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas (tendones, articulaciones, enfermedades inflamatorias - artritis, artrosis), defectos óseos, diabetes, apoplejía, enfermedades cardiológicas y oncológicas.

En particular, las células madre conservadas en el medio según la invención pueden administrarse sin enjuagar este medio directamente al paciente, por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, subconjuntival o intratecal, solas o con un portador.

Los portadores de células madre pueden ser biomateriales funcionales. Puede tratarse de polímeros biocompatibles sintéticos (ácido poliláctido PLA, ácido poliglicólico PGA, polietilenglicol PEG, policaprolactona PCL, polihidroxibutirato PHB y otros), polímeros y polisacáridos naturales (colágeno tipo I, ácido hialurónico, fibrina, quitosano, celulosa, almidón y otros) o matrices extracelulares (MEC) en forma de hidrogel, nanofibras o microfibras. El soporte puede ser un material biodegradable o no degradable.

Alternativamente, para aplicaciones que cuentan con un portador, los cultivos de células madre pueden llevarse a cabo en presencia de estos portadores y almacenarse y aplicarse conjuntamente en un medio según la invención.

Alternativamente, las células madre pueden almacenarse en un medio según la invención y antes de aplicarse al paciente mezclarse con portadores biocompatibles y administrarse juntas al paciente.

Resumen de imágenes

Las ilustraciones adjuntas muestran microfotografías de células madre mesenquimales de médula ósea diferenciadas (BM-CMM) tras 72 horas de almacenamiento en una solución según la invención en condiciones de refrigeración. Las imágenes ilustran la capacidad de las BM-CMM para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos.

Las imágenes ilustran:

fig. 1A adipogénica,

fig. 1B condrogénica y

fig. 1C Diferenciación osteogénica.

Ejemplos de realizaciones de la invención

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de CMM de médula ósea (BM-CMM)

La aspiración de médula ósea se realizó con una aguja trepanobióptica, que forma parte de un equipo de toma de muestras que contiene solución salina con heparina y gentamicina. Tras transportar la médula ósea al área de procesamiento de material biológico estéril, la muestra se mezcló con una solución de infusión de Gelofusin (una

solución que contiene iones Na^+ , Cl^- y gelatina succinilada). La cantidad de Gelofusina añadida equivalía al 25 % del volumen de la médula ósea. La mezcla se sedimentó durante 10 – 30 minutos y después se retiró la capa de anillos de células mononucleares. La celularidad de la mezcla en la capa celular recogida se analizó con un analizador hematológico. A cada uno de los frascos de cultivo de 75 cm^2 preparados se añadieron 10 ml de medio de cultivo completo (medio Alpha MEM Eagle con un 5 % de lisado de placa humana y gentamicina) y una cantidad definida de suspensión celular aislada (5 -10 millones de células nucleadas) para el cebado. Las células se cultivaron a temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Durante el cultivo celular se intercambiaba continuamente el medio de cultivo completo con eventuales aclarados de las células utilizando 10 ml de tampón PBS por frasco de cultivo. En función de la cantidad de células en crecimiento se realizó el pasaje, es decir, el desprendimiento enzimático controlado de las células adheridas y su traslado a una superficie de cultivo mayor. Este proceso comenzaba siempre con la inspección óptica del cultivo al microscopio; el óptimo para el crecimiento del cultivo era alcanzar una cobertura celular del 80-90 % del fondo del cultivo. El pasaje requirió la aspiración del medio de cultivo, el enjuague del cultivo con 10 ml de tampón PBS y la adición de 1 ml de solución enzimática TrypLE Select CTS. Los frascos de cultivo se incubaron a $37 \pm 0,5$ °C durante aproximadamente 4 min. El correcto desarrollo de la reacción enzimática se comprobó bajo el microscopio. Si las células se movían con el líquido que fluía tras golpear el frasco de cultivo, se añadía a cada frasco 1 ml de solución de infusión de HSA (albúmina sérica humana) al 20 % y 6 ml de tampón PBS. Esta mezcla se mezcló mediante aspiración suave y succión con una pipeta y se transfirió a un tubo centrífugo y se centrifugó (230 g, 5 min). El sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo completo y la suspensión celular se dividió en el número requerido de frascos de cultivo. El tercer pasaje de las células permitió obtener la suspensión celular final. Ésta se lavó una vez más con tampón PBS y se centrifugó (230 g, 5 min).

Para formar un preparado según una realización de la invención, el sedimento obtenido por el proceso anterior se resuspendió en una solución del preparado mostrado en el ejemplo 4A (con 250 mM de trehalosa, en lo sucesivo TR-Y 250), 4B (con 200 mM de trehalosa, denominado TR-Y 200) y en una solución de Hypothermosol® FRS (aquí denominado HTS).

El contenido de células madre era por lo general de 5×10^5 a 1×10^7 CMM/ml. Cuando se administra por vía intravenosa, pueden administrarse por ejemplo 1×10^6 CMM/kg de peso del paciente.

Ejemplo 2: Aislamiento de CMM derivadas de tejido adiposo (AT-CMM)

Se recogió un lipoaspirado de 40-200 ml mediante liposucción tumescente estándar de donantes voluntarios. Las AT-CMM se aislaron del lipoaspirado mediante digestión enzimática de 60 min utilizando 0,3 U/ml de la enzima Colagenasa NB 6 GMP Grade. El lipoaspirado digerido se lavó con tampón PBS y se centrifugó a 230 g, 5 min a temperatura ambiente. El sedimento formado en el fondo del tubo se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en frascos de cultivo de 75 cm^2 . A continuación, se siguió el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Aislamiento de CMM de cordón umbilical (WJ-CMM)

El cordón umbilical humano se obtuvo de recién nacidos sanos inmediatamente después del parto. Se retiraron la arteria y la vena umbilicales y se cortó el tejido umbilical (gel de Wharton, WJ) en trozos pequeños (aproximadamente 1 - 2 mm^3). Las CMM del tejido umbilical se aislaron mediante el método del explante o por digestión enzimática. Durante el método de los explantes, los trozos de tejido se colocaron en un frasco de cultivo del que se lavaron al cabo

de 10 días. Las células que habían emigrado de la WJ y se habían adherido al plástico se siguieron cultivando y procesando según el ejemplo 1. La suspensión celular formada tras la digestión enzimática se siguió procesando y cultivando según el ejemplo 2.

5

Ejemplo 4: Posibles preparaciones de 100 ml del medio (solución) según la invención

Ejemplo 4A. Preparación de una solución según la invención con 250 mM de trehalosa (TR-Y 250). Pesamos 0,408 g de KH_2PO_4 y 0,213 g de Na_2HPO_4 , disolvemos en 20 ml de agua destilada; pesamos 0,007 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 10 ml de agua destilada; pesamos 0,012 g de MgSO_4 y disolvemos en 10 ml de agua destilada. Mezclamos las soluciones así preparadas y ajustamos el pH a 7,4. A continuación, disolvemos 9,45 g de trehalosa en la mezcla y ajustamos el volumen final a 100 ml con agua destilada. La osmolaridad resultante de la solución es de 358 mosm.

Ejemplo 4B. Preparación de una solución según la invención con 200 mM de trehalosa (TR-Y 200). Pesamos 0,408 g de KH_2PO_4 y 0,213 g de Na_2HPO_4 , disolvemos en 20 ml de agua destilada; pesamos 0,007 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 10 ml de agua destilada; pesamos 0,012 g de MgSO_4 y disolvemos en 10 ml de agua destilada. Mezclamos las soluciones así preparadas y ajustamos el pH a 7,4. A continuación, disolvemos 7,56 g de trehalosa en la mezcla y ajustamos el volumen final a 100 ml con agua destilada. La osmolaridad resultante de la solución es de 308 mosm.

Ejemplo 4C. Preparación de una solución según la invención con 250 mM de trehalosa. Pesamos 0,816 g de KH_2PO_4 y 0,426 g de Na_2HPO_4 , disolvemos en 20 ml de agua destilada; pesamos 0,014 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 10 ml de agua destilada; pesamos 0,024 g de MgSO_4 y disolver en 10 ml de agua destilada. Mezclamos las soluciones así preparadas, ajustamos el pH a 7,4 y completamos hasta 100 ml con agua destilada (se generará la mezcla 1).

Disolvemos 37,8 g de trehalosa en agua destilada y completamos hasta 100 ml (se generará la mezcla 2).

La solución resultante se obtiene mezclando tres partes de la mezcla 2, seis partes de la mezcla 1 y tres partes de agua destilada. No es necesario ajustar el pH. La osmolaridad resultante de la solución es de 358 mosm.

Ejemplo 4D. Preparación de TR-Y con 200 mM de trehalosa. Pesamos 0,816 g de KH_2PO_4 y 0,426 g de Na_2HPO_4 , disolvemos en 20 ml de agua destilada; pesamos 0,014 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 10 ml de agua destilada; pesamos 0,024 g de MgSO_4 y disolver en 10 ml de agua destilada. Mezclamos las soluciones así preparadas, ajustamos el pH a 7,4 y completamos hasta 100 ml con agua destilada (se generará la mezcla 1).

Disolvemos 37,8 g de trehalosa en agua destilada y completamos hasta 100 ml (se generará la mezcla 2).

La solución resultante se obtiene mezclando dos partes de la mezcla 2, cinco partes de la mezcla 1 y tres partes de agua destilada. No es necesario ajustar el pH. La osmolaridad resultante de la solución es de 308 mosm.

40

Ejemplo 5: Viabilidad de BM-CMM, AT-CMM y WJ-CMM tras 48-72 horas de almacenamiento

Se evaluó la viabilidad de las CMM aisladas de médula ósea humana, tejido adiposo y tejido de cordón umbilical almacenadas durante 48 y 72 horas a unos 4 °C. Las CMM de médula ósea humana, tejido adiposo y de cordón

umbilical se produjeron en conformidad con los ejemplos 1, 2 y 3. Se cosecharon las CMM y se resuspendieron en el medio según la invención en conformidad con el ejemplo 1. Tras 48 y 72 horas, respectivamente, se determinó la viabilidad celular mediante tres métodos independientes.

- 5 En primer lugar se tiñó la suspensión con yoduro de propidio y se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. En las células con una membrana plasmática alterada, el colorante se une, mientras que las células vivas intactas permanecen sin teñir. Posteriormente se colocó un volumen igual de células correspondiente a 100 000 células en estado fresco en placa de cultivo de 24 y 96 pocillos. Transcurridas 24 horas las células se sometieron al ensayo Amalar blue® (placa de 96 pocillos), indicativo de la actividad metabólica de las células cultivadas, y las células de la
- 10 placa de 24 pocillos se cosecharon y contaron utilizando una cámara Bürker. Los resultados se compararon con los obtenidos en el momento 0 (inmediatamente después de la cosecha; pasaje final). Como solución conservante de control se utilizó la solución Hypothermosol® FRS (HTS) según US 8642255.
- 15 La viabilidad determinada mediante tinción con yoduro de propidio refleja la viabilidad de células individuales en suspensión. El yoduro de propidio es una sustancia que no penetra en la membrana de las células vivas. En las células dañadas y no viables, el yoduro de propidio se une al ADN. La viabilidad de las BM-CMM observada mediante tinción con yoduro de propidio inmediatamente después de 48 h de almacenamiento fue superior al 80 % para todas las soluciones estudiadas (tabla nr. 1). Tras 72 h de almacenamiento, la disminución fue de aproximadamente un 5 % para las células en la solución TR-Y 250 y HTS, mientras que la disminución fue mayor en TR-Y 200, hasta el $73,4 \pm 3,1$ %.
- 20 Para evaluar la funcionalidad de las BM-CMM tras el almacenamiento celular, las células se cultivaron durante la noche en medio completo para evaluar su adherencia a la superficie de cultivo. La adherencia al plástico de cultivo es una de las características distintivas de las células madre. Se cosecharon las células adherentes y se determinó su cantidad utilizando una cámara de Bürker. El coeficiente de adherencia se determinó como la relación entre el número de células cosechadas y sembradas. El coeficiente de adhesión celular tras 48 horas de almacenamiento osciló entre el 80 y el 90 % y fue mayor para las células en solución TR-Y 250. Tras 72 h de almacenamiento, se observó una nueva
- 25 reducción, pero los valores más bajos se obtuvieron en las células en solución HTS ($66 \pm 4,4$ %). La actividad metabólica de las células adherentes también se controló mediante el ensayo Alamar blue®. El componente activo de la prueba Alamar blue® es el compuesto resazurina, que penetra en todas las células. Las células viables y metabólicamente activas son capaces de convertir este compuesto azul en el colorante fluorescente rojo brillante resofurina. La cantidad de fluorescencia o absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas y
- 30 corresponde a la actividad metabólica de las células. Para ello se cultivaron las células durante toda la noche para garantizar su adherencia; a continuación se añadió una solución de Alamar blue® al 10 % en un medio de cultivo completo y las BM-CMM se incubaron durante 4 horas a 37 °C. La intensidad de la fluorescencia se evaluó en un lector de placas microtituladoras a una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. La actividad metabólica de las células adherentes se presentó como la relación entre la intensidad de fluorescencia de las BM-CMM tras 48 o 72 h de almacenamiento y las células del mismo grupo antes del almacenamiento (tras la recolección). La dinámica de disminución de la actividad metabólica de las BM-CMM almacenadas en las soluciones
- 35 estudiadas fue similar a la dinámica de disminución del coeficiente de adherencia celular.

- 40 Los resultados de las mediciones de todos los parámetros de viabilidad de las BM-CMM resumidos en la tabla nr. 1 muestran que la solución más adecuada para 48 – 72 h de almacenamiento en frío es TR-Y 250. Se observó que la solución HTS disponible comercialmente conservaba la viabilidad celular más baja tras 48 h de almacenamiento en frío de BM-CMM; tras 72 h de almacenamiento de BM-CMM en esta solución sólo era superior al TR-Y 200 en uno de los tres parámetros estudiados.

Tabla 1 - CMM de médula ósea

	Viabilidad; tinción con yoduro de propidio; % de células vivas (negativas)		Coeficiente de adherencia; % de células adheridas; en relación con el tiempo 0 horas		Actividad metabólica de las células adheridas; tinción con Alamar blue®; expresada en %; en relación con el tiempo 0 horas	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
TR-Y 250	88,3 ± 4,3	84,2 ± 0,8	90,1 ± 5,2	83,0 ± 4,5	87,4 ± 4,1	80,4 ± 2,8
TR-Y 200	86,5 ± 3,2	73,4 ± 3,1	83,2 ± 3,3	76,0 ± 3,7	87,1 ± 3,8	73,0 ± 4,2
HTS	85,1 ± 1,6	80,9 ± 3,6	80,7 ± 2,1	66,0 ± 4,4	80,8 ± 1,7	72,2 ± 2,2

(TR-Y 250) un preparado según la invención que contiene 250mM de trehalosa;

(TR-Y 200) un preparado según la invención que contiene 200mM de trehalosa;

(HTS) solución de Hypothermosol® FRS.

La viabilidad de las AT-CMM tras 48 horas de almacenamiento, evaluada mediante tinción con yoduro de propidio, fue de aproximadamente el 95 % en todos los grupos estudiados y disminuyó entre un 5 y un 7 % tras 72 horas de almacenamiento (tabla nr. 2). Sin embargo, los parámetros de adhesión celular fueron un 15 % inferiores tras 48 horas de almacenamiento en comparación con el método de tinción con yoduro de propidio. Para la conservación en frío de las AT-CMM, la solución TR-Y 200 resultó ser la menos adecuada. Las diferencias entre TR-Y 250 y HTS resultaron insignificantes con las 48 horas de almacenamiento en frío, mientras que TR-Y 250 fue significativamente mejor que la solución HTS con los parámetros de seguimiento del coeficiente de adherencia y la actividad metabólica después de 72 horas.

Tabla 2 - CMM de tejido adiposo

	Viabilidad; tinción con yoduro de propidio; % de células vivas (negativas)		Coeficiente de adherencia; % de células adheridas; en relación con el tiempo 0 horas		Actividad metabólica de las células adheridas; tinción con Alamar blue®; expresada en %; en relación con el tiempo 0 horas	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
TR-Y 250	95,2 ± 5,5	90,1 ± 4,1	79,6 ± 3,7	67,4 ± 3,5	80,5 ± 3,8	65,3 ± 2,3
TR-Y 200	94,5 ± 3,6	87,5 ± 4,2	77,3 ± 2,1	60,8 ± 5,5	75,2 ± 1,5	50,1 ± 5,3
HTS	96,1 ± 3,3	90,3 ± 2,7	79,3 ± 4,5	60,2 ± 5,3	78,7 ± 2,5	58,6 ± 4,7

(TR-Y 250) un preparado según la invención que contiene 250mM de trehalosa;

(TR-Y 200) un preparado según la invención que contiene 200mM de trehalosa;

(HTS) solución de Hypothermosol® FRS.

Las células madre derivadas de tejido de cordón umbilical conservadas en una solución según la invención que contiene 250 mM de trehalosa durante 48 horas a 4 °C conservaron una viabilidad (determinada mediante tinción con yoduro de propidio) de más del 90 %, mientras que las WJ-CMM conservadas en solución HTS conservaron una viabilidad de sólo alrededor del 80 %. Los resultados de la tabla nr. 3 muestran que los valores del coeficiente de adherencia eran inferiores en comparación con el método de tinción con yoduro de propidio, pero la dinámica de las tendencias entre las soluciones seguía siendo la misma. El mayor coeficiente de adherencia de las WJ-CMM tras 72 h de almacenamiento se registró en el grupo TR-Y 250 (73,8 ± 4,3 %). En todos los parámetros estudiados las células

conservadas en TR-Y 250 mostraron la mayor viabilidad. Las WJ-CMM conservadas en solución HTS comercial presentaron la vida útil más baja en todos los parámetros estudiados.

5

Tabla 3 - CMM de tejido de cordón umbilical

	Viabilidad; tinción con yoduro de propidio; % de células vivas (negativas)		Coeficiente de adherencia; % de células adheridas; en relación con el tiempo 0 horas		Actividad metabólica de las células adheridas; tinción con Alamar blue®; expresada en %; en relación con el tiempo 0 horas	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
TR-Y 250	92,3 ± 3,2	85,3 ± 3,1	90,3 ± 2,8	73,8 ± 4,3	90,5 ± 3,3	81,0 ± 2,8
TR-Y 200	88,7 ± 4,4	78,4 ± 2,7	78,4 ± 3,2	65,3 ± 5,2	87,6 ± 4,2	75,2 ± 5,1
HTS	83,4 ± 3,1	76,6 ± 2,1	77,2 ± 4,1	55,4 ± 5,1	79,4 ± 2,5	60,6 ± 6,6

(TR-Y 250) un preparado según la invención que contiene 250mM de trehalosa;

(TR-Y 200) un preparado según la invención que contiene 200mM de trehalosa;

(HTS) solución de Hypothermosol® FRS.

10

Estos resultados demuestran que las células conservadas en solución TR-Y 250 y TR-Y 200 durante 48-72 horas en condiciones de frío mantienen una alta viabilidad en todos los parámetros estudiados.

15

Ejemplo 6: Preservación del fenotipo de las BM-CMM tras 72 horas de almacenamiento en frío - análisis de las características superficiales

Las características superficiales de las células madre son uno de los rasgos básicos que caracterizan su identidad. Se utilizó el marcado de las BM-CMM con anticuerpos conjugados con marca fluorescente para detectar las características de la superficie. Las BM-CMM marcadas tras 72 horas de almacenamiento en frío en un medio que contenía 250 mM de trehalosa (TR-Y 250) según la invención se analizaron en un citómetro de flujo utilizando láseres de excitación de longitud de onda de 405 nm, 488 nm y 633 nm. Se analizaron las características CD105, CD90, CD73, HLA-DR, CD45, CD34, CD14 y CD19. El análisis mostró la positividad de las características (>90 % de las células) CD105, CD90 y CD73, mientras que la negatividad de las características (<10 % de las células) HLA-DR, CD45, CD34, CD14 y CD19.

Estos resultados concuerdan con el fenotipo correcto de las células madre.

Ejemplo 7: Conservación de las propiedades funcionales de las BM-CMM tras 72 horas de almacenamiento en frío

Se confirmó que las BM-CMM almacenadas durante 72 horas en un medio según la invención (solución TR-Y 250) a unos 4 °C eran capaces de diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos. Tras 72 h de almacenamiento en solución TR-Y 250 en frío, las células se sembraron en plástico de cultivo y se cultivaron con los medios de diferenciación adecuados. A los 21 días, se fijaron las células y se tiñeron con rojo aceite, azul alcian y rojo alizarina para detectar indicios de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica. Se tomaron fotografías microscópicas de las células diferenciadas (fig. 1).

35

Ejemplo 8: Viabilidad de las WJ-CMM fijadas en un soporte biológico tras 48-72 horas de almacenamiento

Las WJ-CMM de tejido de cordón umbilical humano se produjeron según el ejemplo 3. Después del pasaje de las células como en el ejemplo 1, las WJ-CMM se sembraron en un soporte biológico basado en nanofibras de PCL a una densidad de 150 000 de células/cm². Tras el cultivo durante dos días, el soporte biológico que contenía las células se retiró del recipiente de cultivo, se enjuagó con solución PBS y se almacenó en el medio según el ejemplo 4A a una temperatura de unos 4 °C. La cantidad de células adheridas al soporte biológico se determinó mediante tinción fluorescente del soporte biológico con las WJ-CMM adheridas. Se utilizó un protocolo para teñir los microfilamentos con faloidina y los núcleos celulares con DAPI. La evaluación microscópica de los preparados teñidos mostró que, incluso después de 72 horas de almacenamiento, se retenía una cantidad suficiente de células vivas en el soporte, cuyo número era aproximadamente un 20 % inferior al del soporte con células teñidas inmediatamente después de su extracción del medio de cultivo. Tras 48 horas de almacenamiento, sólo se produjo una disminución del 15 % en el número de células vivas. Suponemos que las células muertas, que pierden su capacidad de adherencia y cambian su forma de alargada a esférica, fueron eliminadas del material durante el proceso de tinción.

15

Reivindicaciones

1. Medio para la conservación, el transporte y la aplicación de células madre obtenidas de médula ósea o de tejido adiposo o de sangre periférica o de tejidos extraembrionarios o de células madre fijadas sobre un soporte biológico a una temperatura de 0 °C a 8 °C, constituido por una solución acuosa tamponada de trehalosa, **caracterizada porque** la solución contiene cationes K^+ en una cantidad de 20 a 50 mmol/l, cationes Na^+ en una cantidad de 20 a 80 mmol/l; aniones Cl^- en una cantidad de 0,5 a 40 mmol/l, aniones PO_4^{3-} y/o $H_2PO_4^-$ y/o $H_2PO_4^-$ en una cantidad total de 20 a 65 mmol/l, trehalosa en una cantidad de 250 a 300 mmol/l, pudiendo contener además la solución cationes Mg^{2+} y/o Ca^{2+} en una cantidad total de 0 a 2 mmol/l y aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- en una cantidad total de 0 a 2 mmol/l, y siendo el pH de la solución de 7,1 a 7,6.
2. El medio según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la solución contiene cationes Mg^{2+} y/o Ca^{2+} en una cantidad total de 0,1 a 2 mmol/l.
3. El medio según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** la solución contiene aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- en una cantidad total de 0,5 a 2 mmol/l.
4. El medio según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la solución contiene cationes K^+ en una cantidad de 28 a 32 mmol/l, cationes Na^+ en una cantidad de 20 a 50 mmol/l, cationes Mg^{2+} y/o Ca^{2+} en una cantidad total de 0,4 a 1,2 mmol/l, aniones Cl^- en cantidad de 0,5 a 20 mmol/l, aniones PO_4^{3-} y/o HPO_4^{2-} y/o $H_2PO_4^-$ en cantidad total de 40 a 50 mmol/l, aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- en cantidad total de 0,9 a 1,2 mmol/l.
5. El medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** la solución consiste exclusivamente en cationes K^+ , cationes Na^+ , cationes Mg^{2+} y/o Ca^{2+} , aniones Cl^- , aniones PO_4^{3-} y/o HPO_4^{2-} y/o $H_2PO_4^-$, aniones SO_4^{2-} y/o HSO_4^- , trehalosa, agua y, en su caso, trazas de solutos acompañantes.

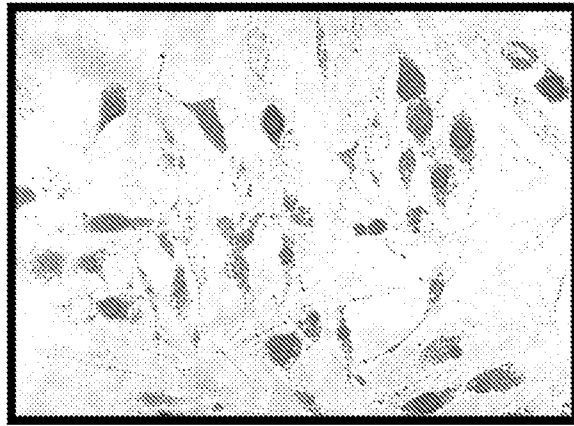


Fig. 1A

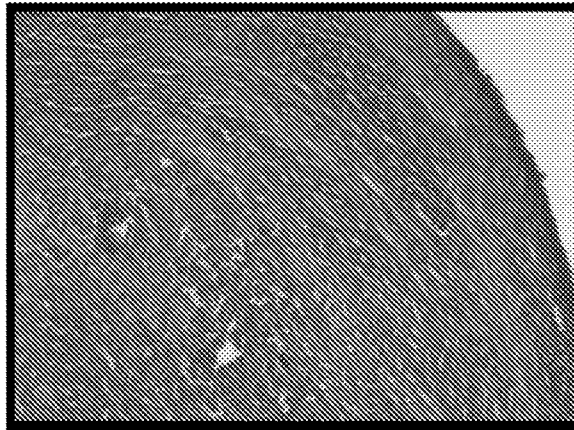


Fig. 1B

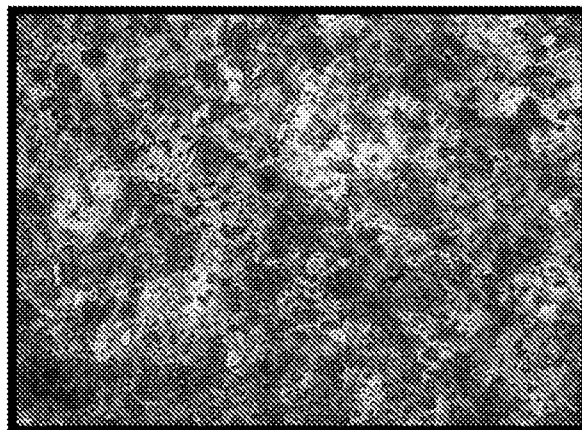


Fig. 1C