

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 014**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2019 E 19461506 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3685665**

54 Título: **Uso de una disolución que comprende PEG para la conservación de células madre**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2023

73 Titular/es:

**CARNAMEDICA SP. Z O.O. (100.0%)
ul. Olszynki Grochowskiej 21/U6
04-281 Warsaw, PL**

72 Inventor/es:

**SZCZUDLO, PAWEL y
KALASZCZYNSKA, ILONA**

74 Agente/Representante:

DE PABLOS RIBA, Juan Ramón

Observaciones:

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

ES 2 949 014 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

Uso de una disolución que comprende PEG para la conservación de células madre

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de una disolución acuosa que comprende polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular de aproximadamente 35.000 Da como agente extracelular para conservar células madre.

10 **Técnica anterior**

Las células madre se utilizan ampliamente en la investigación científica y en terapias clínicas debido a su potencial de autorrenovación y diferenciación multidireccional. Las células madre tienen muchas funciones y aplicaciones; por ejemplo, se pueden utilizar en la investigación relacionada con el crecimiento de tejidos y órganos *in vitro*, para el desarrollo de modelos de enfermedades, para el cribado, así como en métodos de tratamiento. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden usar en el tratamiento de la diabetes, la cirrosis hepática, las lesiones cutáneas y el infarto de miocardio. Además, pueden reforzar la hematopoyesis, regular la respuesta inmunitaria.

Las terapias basadas en células madre están avanzando cada vez más a través de ensayos preclínicos y clínicos. La mejora de las disoluciones portadoras utilizadas para la conservación y el suministro de células permitirá ampliar a escala mundial la posibilidad de aplicación de terapias avanzadas basadas en células madre. Además, un aumento de la estabilidad de las células, entendida como el mantenimiento de la viabilidad y la funcionalidad, proporcionará la flexibilidad y la ampliación del ámbito de aplicación de las células madre. La calidad de las células cambia con el tiempo y debido a la influencia de diversos factores externos, tales como las composiciones de las disoluciones portadoras o las condiciones de temperatura durante el transporte. Sin embargo, la aplicación de células madre en todas las aplicaciones indicadas requiere el desarrollo de métodos eficaces para su conservación, que garanticen no sólo el mantenimiento de una alta viabilidad celular, sino también la protección contra la contaminación por bacterias y agentes patógenos, así como unos costes razonables de cultivo de las células.

La conservación de órganos, tejidos y células en una cámara frigorífica (es decir, en condiciones de hipotermia) significa utilizar una temperatura que oscile entre 0 y 5 °C, por ejemplo una temperatura de aproximadamente 4 °C. Para ello se utilizan las denominadas soluciones hipotérmicas. Las células sumergidas en este tipo de disoluciones a una temperatura de 4 °C permanecen en un estado denominado hipotermia sostenida. En la técnica anterior se conocen muchas disoluciones utilizadas con ese fin, por ejemplo VIASPAN[®], también denominada disolución de la Universidad de Wisconsin o disolución UW, o EURO-COLLINS.

Sin embargo, en estas condiciones sólo es posible el almacenamiento a corto plazo. En caso de almacenamiento a largo plazo, es necesario congelar los materiales conservados en un intervalo de temperatura comprendido entre su temperatura de congelación y la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C). Este proceso también se denomina crioconservación.

En la técnica anterior existen numerosas soluciones técnicas relativas a la optimización del proceso de conservación de los órganos, tejidos y células, tanto en referencia al almacenamiento en frío como a la crioconservación.

Para garantizar la eficacia del trasplante, las células madre deben conservarse de forma que mantengan su viabilidad. Por ejemplo, en el caso de la crioconservación se ha dedicado mucho esfuerzo en eliminar la muerte celular causada por la congelación debido principalmente a la formación de hielo intracelular y al estrés quimiosmótico. Para ello se utilizan crioprotectores, por ejemplo dimetilsulfóxido (DMSO).

El documento US 6.045.990 describe una disolución sin células para el almacenamiento hipotérmico de órganos, tejidos y células humanos o animales. Las disoluciones comprenden al menos un electrolito seleccionado del grupo que incluye iones de potasio, iones de sodio, iones de magnesio e iones de calcio; un agente oncótico macromolecular; un tampón biológico; una cantidad nutritiva eficaz de al menos un azúcar simple; manitol, un anión impermeable a las membranas celulares; un sustrato eficaz para la regeneración de ATP; y glutatión.

En la publicación de N. Matsumoto *et al.*, 'Successful liquid storage of peripheral blood stem cells at subzero non-freezing temperature' *Bone Marrow Transpl.*, (2002), 30, 777-784, se describen experimentos con varias disoluciones durante la conservación de las células madre a temperaturas bajo cero, pero sin congelación. Se probó (i) una mezcla de plasma, disolución ACD-A y heparina; (ii) una disolución de Belzer UW: formulación intracelular que comprende heparina, lactobionato potásico, KH₂PO₄, rafinosa, adenosina, glutatión, alopurinol, hidroxietilalmidón y NaOH, así como las dos formulaciones mencionadas mezcladas con albúmina.

La solicitud CN105145547 describe un fluido para la crioconservación de células madre que comprende DMSO, medio condicional de células madre mesenquimales de cordón umbilical y suero bovino fetal.

El documento CN 104770363 divulga una disolución sin plasma para la crioconservación de células madre que

comprende DMSO y dextrano-40.

El documento CN105961374 divulga un fluido de crioconservación celular utilizado, entre otras cosas, para la crioconservación de células madre, que comprende: PBS o disolución salina normal; un medio de cultivo basal como ingrediente principal, así como uno o más constituyentes seleccionados de polietilenglicol, propanodiol, ectoína, albúmina, trehalosa, prolina y poloxámero 188. El fluido mencionado para la crioconservación celular no contiene suero ni DMSO. De acuerdo con el contenido de la descripción de patente, el polietilenglicol se añade para reducir la temperatura de congelación y aumentar la deshidratación de las células. El documento no divulga el peso molecular del polietilenglicol utilizado, ni define si el fluido es de tipo intracelular o extracelular.

La solicitud CN107912419 describe un líquido para la crioconservación de células mononucleares de sangre periférica humana, incluidas las células madre, que comprende: dimetilsulfóxido, polietilenglicol, albúmina de suero humano, Plasmalyte A, trehalosa, hidroxietil-almidón, betaglucano, glucosa y vitamina C. El documento no divulga la masa molecular del polietilenglicol. El polietilenglicol se utiliza, entre otras cosas, por su buena solubilidad en agua y su baja temperatura de fusión, por lo que la disolución extracelular no forma cristales de hielo durante el proceso de enfriamiento.

El documento CN102578077 divulga un agente crioprotector sin suero que comprende un agente protector de permeación intracelular (DMSO) y un agente protector extracelular que comprende NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, PEG con una masa molecular en el intervalo de 400 a 2000 Da, D-trehalosa y colágeno de tipo IV. El agente divulgado se puede usar para el almacenamiento de células madre. El documento CN106332869 divulga una composición de conservación para células madre mesenquimales que comprende RPMI-1640 y una mezcla acuosa que contiene sulfolano, etanol, etilenglicol, 1,2-propilenglicol, Tween 80, glicerol, agar en polvo, PEG-4000, PEG-6000 y PEG-8000.

La disolución descrita en el presente documento en el Ejemplo 1, que es una forma de realización preferida usada en la presente invención, se conoce como una formulación usada para la perfusión y el almacenamiento en frío de órganos para trasplante. El solicitante de la presente invención está introduciendo en el mercado esta formulación bajo el nombre comercial StoreProtect Plus.

Aunque se ha hecho un gran progreso en el campo en cuestión, todavía hay muchos problemas asociados, en particular con la crioconservación, es decir, el almacenamiento de células en un estado congelado. La principal desventaja de las disoluciones y medios conocidos es que la viabilidad de las células disminuye con el tiempo (tanto en condiciones hipotérmicas como durante la crioconservación), también durante su transporte entre el laboratorio y la ubicación del receptor.

En vista de la técnica anterior descrita anteriormente, existe una necesidad insatisfecha de proporcionar un agente que pueda usarse eficazmente para conservar células madre, también en las condiciones típicas de la crioconservación.

Sorprendentemente, resultó que la disolución acuosa que comprende polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de aproximadamente 35.000 Da se puede usar con éxito como agente extracelular para conservar células madre y, después de la adición de dimetilsulfóxido (DMSO), también como agente para la crioconservación de células madre.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es el uso como el definido en la reivindicación 1. Las formas de realización preferidas de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes 2 a 9.

Ventajas de la invención

De acuerdo con las pruebas realizadas por los presentes inventores, el uso de la presente invención permite la conservación eficaz de células madre recogidas. La viabilidad de las células madre conservadas de acuerdo con la invención supera los resultados obtenidos para formulaciones de almacenamiento típicas disponibles en el mercado.

Además, los experimentos mencionados demostraron que después de la adición de dimetilsulfóxido (DMSO), el uso de acuerdo con la invención permite también la crioconservación eficaz de células madre. También en este caso, los resultados obtenidos fueron al menos comparables a los resultados obtenidos para formulaciones típicas disponibles comercialmente, e incluso los superaron.

Por lo tanto, el uso de acuerdo con la invención permite usar intervalos de temperatura más amplios durante el transporte de las células, haciendo que las células sean más resistentes a tiempos de transporte prolongados y condiciones de temperatura variables. Por lo tanto, también se mejora la calidad de las células conservadas de acuerdo con la invención.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de las mediciones de viabilidad de las células ADSC después de 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas de almacenamiento en diversas formulaciones probadas.

5 La Figura 2 muestra el número de células ADSC viables después de 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas de almacenamiento en la formulación de HTS y la disolución usada de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 muestra los resultados de las mediciones de viabilidad de células ADSC antes y después de la criopreservación.

10 La Figura 4 muestra los resultados de las mediciones de viabilidad de las células ADSC tras la descongelación y después de 12, 24, 36, 48 y 72 horas de almacenamiento en la formulación de HTS y la disolución usada de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se ha desarrollado en base a la observación realizada por sus inventores de que la disolución acuosa que comprende polietilenglicol (PEG) con un peso molecular definido de aproximadamente 35.000 Da (35 kDA) también denominado PEG 35, que comprende

- de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mmol/l de rafinosa,
- de aproximadamente 70 a aproximadamente 140 mmol/l de ácido lactobiónico,
- de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mmol/l de MgSO₄
- de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mmol/l de KH₂PO₄,
- de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 mmol/l de glutatión
- de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mmol/l de adenosina,
- de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5 mmol/l de alopurinol,
- de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 mmol/l de NaOH

20 en donde

el pH de la disolución está en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, y la osmolalidad de la solución está en el intervalo de aproximadamente 290 a aproximadamente 320 mmol/kg, en donde la concentración de iones de sodio (Na⁺) es mayor que la concentración de iones de potasio (K⁺), permite la conservación eficaz de las células madre al tiempo que se mantiene su viabilidad.

25 El PEG usado de acuerdo con la presente invención se puede obtener mediante cualquier método conocido, en donde preferiblemente se puede sintetizar a partir de moléculas de PEG que tienen un peso molecular más bajo. En otra forma de realización preferida de la invención, el PEG puede purificarse mediante cualquier técnica anterior conocida. En una forma de realización especialmente preferida de la invención se puede usar PEG comercialmente disponible.

30 De acuerdo con la invención, el PEG se usa preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mmol/l, por ejemplo a una concentración de 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 y 5 mmol/l. En una forma de realización particularmente preferida de la invención, la concentración de PEG es inferior a 1 mmol/l y lo más preferiblemente es de aproximadamente 0,03 mmol/l.

40 De acuerdo con la presente invención, la disolución acuosa empleada se usa como agente extracelular, es decir, como agente, en el que la concentración de los iones de sodio (Na⁺) es mayor que la concentración de los iones de potasio (K⁺). Los agentes de este tipo evitan la muerte celular durante el almacenamiento al reducir la formación de hielo dentro de una célula.

45 En la forma de realización más preferida de la invención, la disolución usada contiene iones Na⁺ a una concentración de aproximadamente 125 mmol/l e iones K⁺ a una concentración de aproximadamente 25 mmol/l.

Preferiblemente, los iones de sodio se introducen en hidróxido de sodio (NaOH), mientras que los iones de potasio se introducen en dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄).

50 En una forma de realización particularmente preferida de la invención, además de los componentes mencionados anteriormente, es decir, PEG, iones de sodio e iones de potasio, la disolución usada puede contener otros componentes usados en el campo de las formulaciones de almacenamiento celular, es decir, un agente que comprende un anión impermeable, un compuesto del grupo de los azúcares, un agente estabilizador de membrana, una disolución tampón y una fuente de energía.

El anión impermeable a las membranas celulares, cuya función es prevenir la hinchazón celular causada por la hipotermia, es el ácido lactobiónico o sus sales.

5 La función de la rafinosa es el soporte osmótico adicional. En una forma de realización preferida de la invención se usa rafinosa pentahidratada (rafinosa · 5H₂O).

10 El agente estabilizador de membrana es el sulfato de magnesio, preferiblemente sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ · 7H₂O), que actúa para estabilizar el equilibrio electroquímico de la membrana celular, que determina el transporte adecuado de iones Na⁺, iones K⁺, iones de fósforo e iones Ca²⁺.

KH₂PO₄ es un sistema tampón, cuya función es mantener el pH de la solución, que proporciona el equilibrio ácido/base. Además, proporciona los iones de potasio a la disolución.

15 El glutatión y el alopurinol son agentes que contrarrestan la formación y acción de los radicales libres.

La adenosina es una fuente de precursores de ATP, que es la fuente de energía.

20 El agua usada para preparar la disolución usada de acuerdo con la invención es un agua para inyectables farmacéuticamente aceptable.

En la forma de realización más preferida de la invención, la solución mencionada comprende:

30 mmol/l de rafinosa · 5H₂O,
 100 mmol/l de ácido lactobiónico,
 5 mmol/l de MgSO₄ · 7H₂O,
 25 mmol/l de KH₂PO₄,
 3 mmol/l de glutatión
 5 mmol/l de adenosina,
 1 mmol/l de alopurinol,
 0,03 mmol/l de polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 35.000 Da

25 y

30 NaOH en una cantidad suficiente para obtener un pH de aproximadamente 7,4, y agua para inyectables, en donde la solución tiene una osmolalidad de 300 mmol/kg y comprende aproximadamente 125 mmol/l de iones Na⁺.

35 Cuando el uso de acuerdo con la presente invención (es decir, el uso del agente extracelular) está destinado a la crioconservación, es necesaria una adición de crioprotector al agente extracelular. El crioprotector puede ser cualquier componente de este tipo usado en las formulaciones de crioconservación, en donde preferiblemente es dimetilsulfóxido (DMSO). Preferiblemente, se usa dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 20% en volumen, lo más preferiblemente a una concentración de aproximadamente un 10% en volumen en base al volumen total de la solución.

40 La solución usada de acuerdo con la invención no contiene iones de calcio añadidos por separado o como componentes de los compuestos incluidos en la composición de la solución mencionada. El agua para inyectables usada para la preparación de la disolución usada de acuerdo con la invención tampoco contiene dichos iones.

45 De acuerdo con la invención, el término "aproximadamente" usado anteriormente en el presente documento y a continuación en el presente documento debe entenderse como una desviación de +/- 5% del valor dado, lo que refleja las imprecisiones que pueden aparecer durante el proceso de fabricación de la composición de la invención, por ejemplo durante las mediciones de los componentes de la disolución.

Ejemplos

50 **Ejemplo 1**

Disolución para la conservación de células madre

En experimentos relacionados con la conservación de células madre, se usó la formulación StoreProtect Plus

(Fabricante: Carnamedica) que tiene la siguiente composición:

- 30 mmol/l (17,84 g/l) de rafinosa · 5H₂O,
- 100 mmol/l (35,8 g/l) de ácido lactobiónico,
- 5 mmol/l (1,232 g/l) de MgSO₄ · 7H₂O,
- 25 mmol/l (3,402 g/l) de KH₂PO₄,
- 3 mmol/l (0,922 g/l) de glutatión
- 5 mmol/l (1,336 g/l) de adenosina,
- 1 mmol/l (0,136 g/l) de alopurinol,
- 0,03 mmol/l (1 g/l) de polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 35.000 Da

y

- 5 NaOH en una cantidad suficiente para obtener un pH de aproximadamente 7,4, agua para inyectables.

10 La solución del Ejemplo 1 presenta una osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm/kg y comprende iones de sodio (Na⁺) a una concentración de aproximadamente 120 mmol/l e iones de potasio (K⁺) a una concentración de aproximadamente 25 mmol/l.

Ejemplo 2

Disolución para la crioconservación de células madre

15 En experimentos relacionados con la crioconservación de células madre, se usó una formulación del Ejemplo 1 que comprende adicionalmente un 10% en volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) en relación con el volumen total de la disolución.

20 Ejemplo 3

Conservación a corto plazo de células madre

25 Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC) aisladas de 9 donantes se dividieron en grupos de prueba y se almacenaron 120 h. Se utilizaron los siguientes grupos experimentales: (a) disolución de NaCl (0,9%), (b) disolución de NaCl (0,9%) con glucosa, (c) disolución de Ringer (Fresenius Kabi), (d) formulación Plasmalyte (Baxter) (que comprende, por 1000 ml de la disolución: 5,26 g de cloruro de sodio, 0,37 g de cloruro de potasio, 0,3 g de cloruro de magnesio (6H₂O), 3,68 g de acetato de sodio (3H₂O), 5,02 g de gluconato de sodio, y que comprende: 140 mmol/l de iones de sodio, 5 mmol/l de iones de potasio, 1,5 mmol/l de iones de magnesio, 98 mmol/l de iones de cloruro, 27 mmol/l de iones de acetato (CH₃COO⁻), 23 mmol/l de iones de gluconato (C₆H₁₁O₇⁻), en donde la osmolaridad teórica de la disolución es de 294 mOsm/l, el pH es de aproximadamente 7,4 (de 6,5-8,0), (e) formulación HypoThermosol FRS (HTS, BioLife Solutions) (que comprende: Trolox, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, H₂PO₄⁻, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina, glutatión) y (e) la disolución como se define en el Ejemplo 1. La conservación a corto plazo (120 horas como máximo) se realizó a una temperatura de 4 °C, en el caso de los grupos (d) y (e) también a temperatura ambiente. Durante el experimento, se observó la viabilidad de las células y el número de células viables en instantes de tiempo seleccionados.

40 Con fines de recuento, las células se marcaron con yoduro de propidio y se contaron mediante un contador automático de células (NanoEntec).

La Figura 1 muestra los resultados de las mediciones de viabilidad obtenidos para los grupos experimentales (a), (b), (d) y (e), mientras que la Figura 2 muestra el número de células viables en función del tiempo de conservación para los grupos de pruebas (d) y (e).

45 Los resultados mostrados en la Figura 1 confirman que la mayor viabilidad de las células madre se obtuvo en el caso de la disolución del Ejemplo 1 (por encima del 90% tras 120 horas). El número de células viables tras 120 horas desde el inicio del experimento también fue el más elevado en el caso de la disolución del Ejemplo 1 (Figura 2).

Ejemplo 4

50 Crioconservación de células madre

En el segundo experimento se probó la usabilidad de la formulación definida en el Ejemplo 2 en la crioconservación de células madre. En este experimento se usó el mismo tipo de células madre que en el Ejemplo 1. Se usó la

formulación certificada Stem-Cell Banker (Zenoaq) como formulación de referencia. El experimento se ha llevado a cabo a una temperatura de -196 °C durante 7 días.

5 Tras descongelar las células, se realizó la medición de la viabilidad (del mismo modo que en el Ejemplo 1) y se transfirieron las células a las disoluciones de almacenamiento (HypoThermosol FRS (HTS, BioLife Solutions) (formulación de referencia) y la disolución del Ejemplo 1) para evaluar si el cambio de las condiciones de almacenamiento influye negativamente en la viabilidad de las células.

10 Durante dicha conservación, se observó la viabilidad de las células en instantes de tiempo seleccionados (12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas).

15 La Figura 3 muestra los resultados de las mediciones de viabilidad de las células madre después de la crioconservación. Las mediciones confirmaron que la formulación del Ejemplo 2 proporciona una conservación eficiente de las células madre en el estado congelado.

20 La Figura 4 muestra los resultados de las mediciones de viabilidad de las células madre tras la descongelación en instantes de tiempo seleccionados para la formulación HypoThermosol FRS y la disolución del Ejemplo 1. Los resultados presentados en la Figura 4 muestran claramente que la disolución del Ejemplo 1 presenta mejores propiedades que la formulación de referencia usada.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una disolución acuosa que comprende polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de aproximadamente 35.000 Da como agente extracelular para conservar células madre, en donde la disolución comprende

5

de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mmol/l de rafinosa,
 de aproximadamente 70 a aproximadamente 140 mmol/l de ácido lactobiónico,
 de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mmol/l de MgSO₄
 de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mmol/l de KH₂PO₄,
 de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 mmol/l de glutatión
 de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mmol/l de adenosina,
 de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mmol/l de alopurinol,
 de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 mmol/l de NaOH

y adicionalmente

10

el pH de la disolución está en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, y la osmolalidad de la disolución está en el intervalo de aproximadamente 290 a aproximadamente 320 mmol/kg, en donde la concentración de iones de sodio (Na⁺) es mayor que la concentración de iones de potasio (K⁺), en donde el término "aproximadamente" debe entenderse como una desviación de +/- 5% del valor dado.

15

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el PEG está presente en la disolución a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mmol/l.

20

3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el PEG está presente en la disolución a una concentración inferior a aproximadamente 1 mmol/l.

4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el PEG está presente en la disolución a una concentración de aproximadamente 0,03 mmol/l.

25

5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la disolución comprende iones Na⁺ a una concentración de aproximadamente 125 mmol/l e iones K⁺ a una concentración de aproximadamente 25 mmol/l.

6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la disolución comprende

30 mmol/l de rafinosa · 5H₂O,
 100 mmol/l de ácido lactobiónico,
 5 mmol/l de MgSO₄ · 7H₂O,
 25 mmol/l de KH₂PO₄,
 3 mmol/l de glutatión,
 5 mmol/l de adenosina,
 1 mmol/l de alopurinol,
 0,03 mmol/l de polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 35.000 Da

30

y

35

NaOH en una cantidad suficiente para obtener un pH de aproximadamente 7,4, y agua para inyectables, en donde la solución tiene una osmolalidad de 300 mmol/kg y comprende aproximadamente 125 mmol/l de iones Na⁺.

40

7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente extracelular para conservar células madre se usa para la crioconservación de células madre, y donde el agente extracelular comprende además un crioprotector.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la disolución comprende dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 20% en volumen en relación con el volumen total

de la disolución, como crioprotector.

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la disolución comprende DMSO a una concentración de aproximadamente un 10% en volumen en relación con el volumen total de la disolución.

5

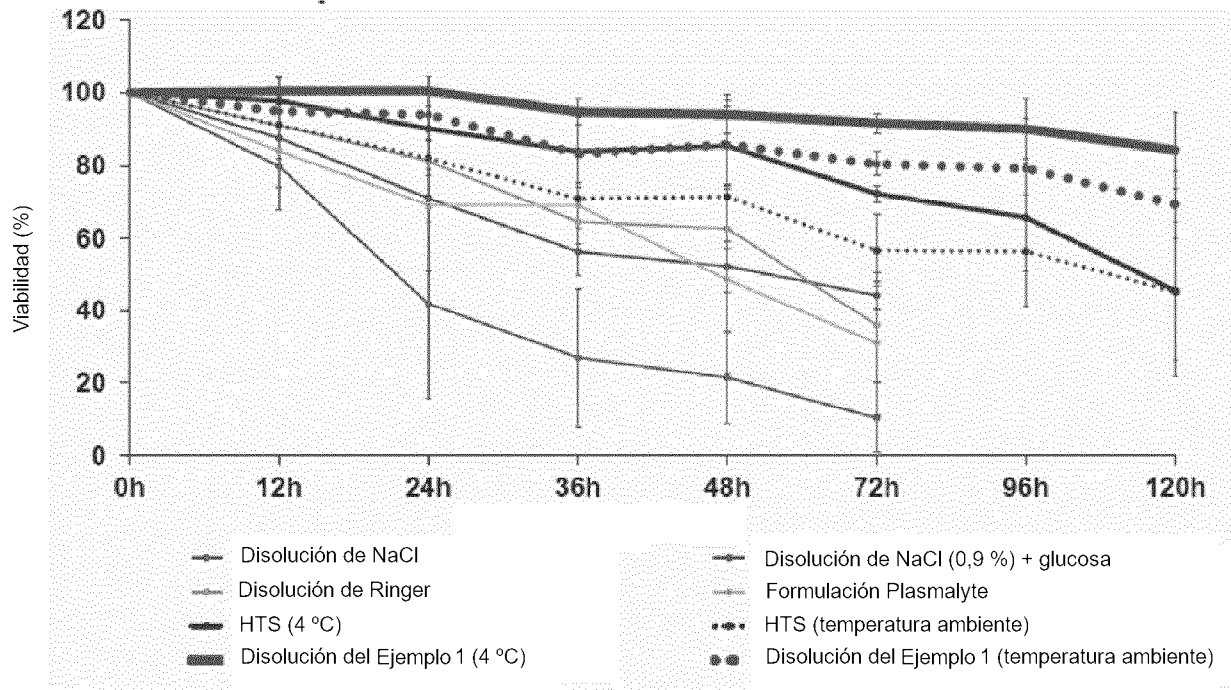


Fig. 1

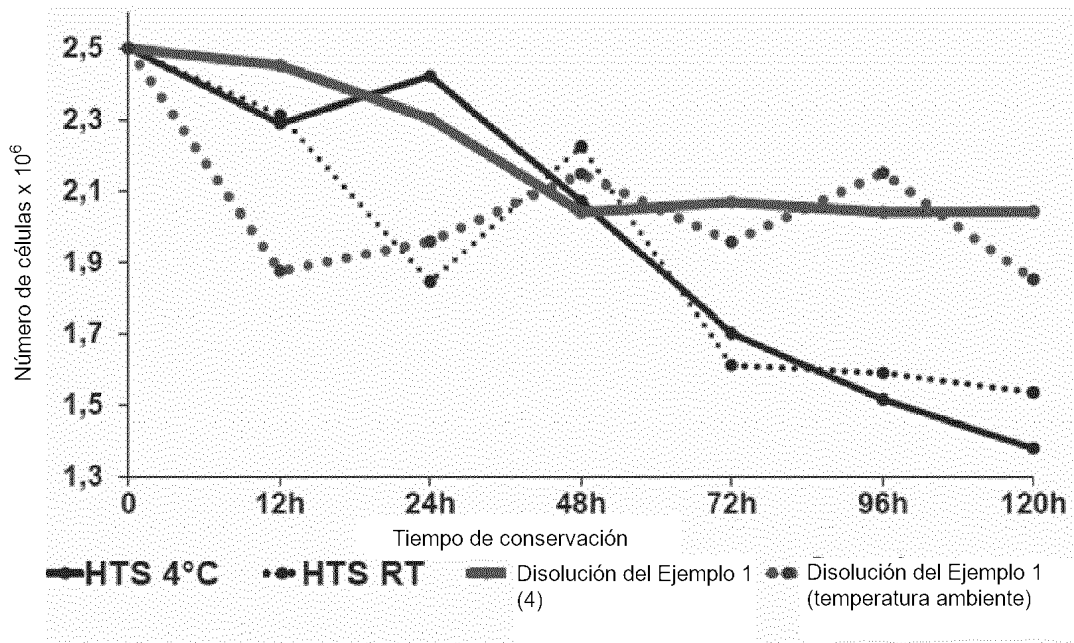


Fig. 2

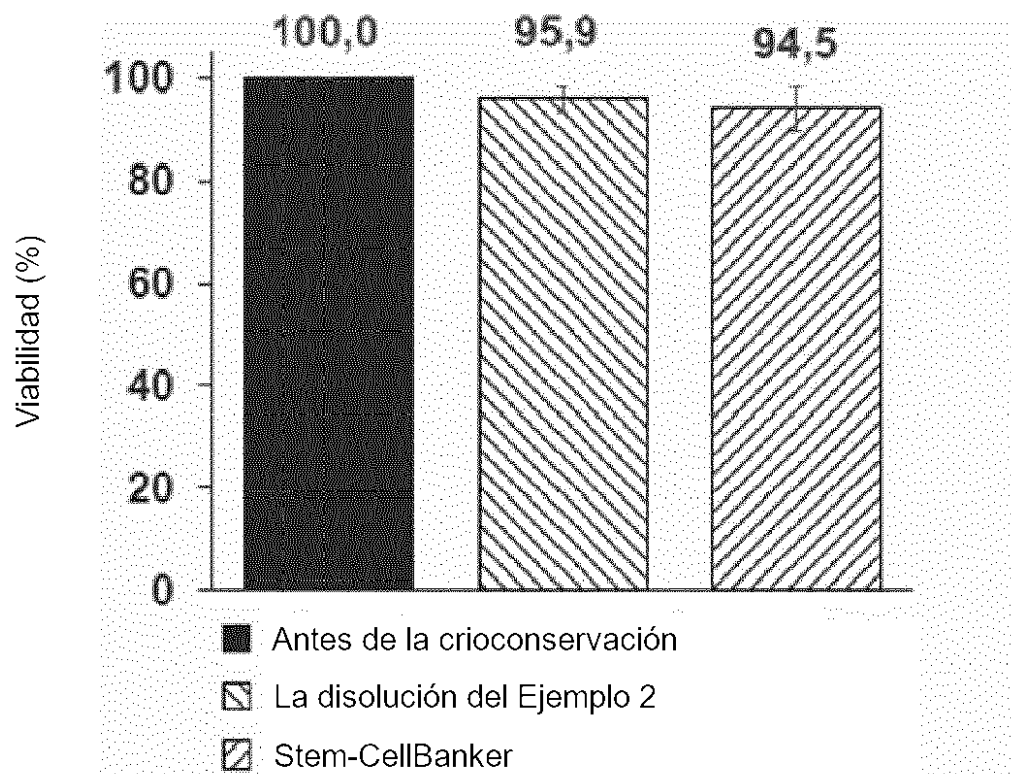


Fig. 3

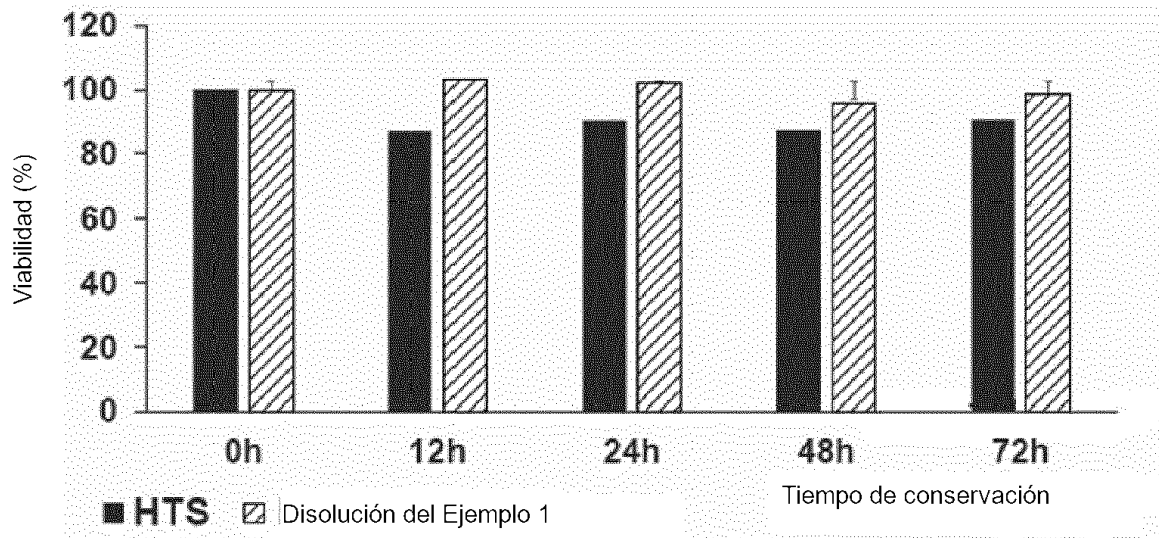


Fig. 4