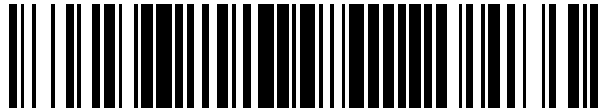


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 867**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2006 E 06754641 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1901605**

54 Título: **Medio de almacenamiento para células**

30 Prioridad:

01.07.2005 DE 102005031532

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

18.07.2014

73 Titular/es:

**CYTONET GMBH & CO. KG (100.0%)
ALBERT-LUDWIG-GRIMM-STRASSE 20
69469 WEINHEIM/BERGSTRASSE, DE**

72 Inventor/es:

**ARSENIEV, LUBOMIR;
ALEXANDROVA, KRASSIMIRA;
BARTHOLD, MARC;
GRIESEL, CARSTEN;
HEUFT, HANS-GERD;
KAFERT-KASTING, SABINE y
PRIESNER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 477 867 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 de almacenamiento para células

5 La invención se refiere a procedimientos para el almacenamiento de, en particular, células hepáticas humanas, a medios celulares para el almacenamiento de células hepáticas así como al uso de tales medios celulares para el almacenamiento de las células, conservándose la vitalidad de las células durante el almacenamiento.

10 La criopreservación representa un método usado frecuentemente para el almacenamiento de células vivas a lo largo de periodos de tiempo más prolongados. Las técnicas de criopreservación en el transcurso de la última década se han perfeccionado y mejorado constantemente. Existe una necesidad de almacenar células también por poco tiempo, por ejemplo, directamente después del aislamiento de un órgano, antes de la congelación o después de o durante la descongelación de las células después de la criopreservación. Con frecuencia es necesario que las células después de este almacenamiento se suministren de nuevo directamente a un organismo, en particular a un ser humano. Este suministro de las células se puede realizar, por ejemplo, mediante una administración intravenosa de las células. La administración de células almacenadas, en particular mediante criopreservación, a un ser humano se puede aprovechar, sobre todo, como aplicación clínica, en particular como aplicación terapéutica. De este modo se pueden administrar por vía intravenosa, por ejemplo, trasplantes de células hepáticas humanas para la aplicación terapéutica. Sin embargo, el proceso de congelación y el proceso de descongelación de nuevo y el almacenamiento *in vitro* anterior o directamente posterior en relación con la vitalidad y el número de células vivas de las células a almacenar continúa representando un problema, en particular en la aplicación clínica.

25 La presente invención se basa en el problema técnico de facilitar un medio celular fácil de producir y, en la medida de lo posible, económico para el almacenamiento de células hepáticas. Las células preferentemente se han de almacenar, en relación con la criopreservación, antes de la congelación y/o después de la descongelación. Por tanto, la presente invención también se basa en el problema técnico de facilitar un medio celular que permita un almacenamiento por poco tiempo de células animales, preferentemente de células humanas, de forma particularmente preferente de células hepáticas o trasplantes de células hepáticas con una pérdida lo más reducida posible de la vitalidad y del número de células vivas y, por tanto, que represente una alternativa a los medios celulares conocidos.

30 En relación con la criopreservación son conocidos medios celulares para el almacenamiento y la descongelación de nuevo. Sin embargo, contienen constituyentes tales como del 5 al 20 % de suero fetal bovino (FCS) que para una administración, en particular una administración intravenosa al ser humano, legalmente no están autorizados o incluso son inadecuados.

35 El documento EP 1 149 900 A1 desvela un procedimiento para el almacenamiento de células hepáticas a bajas temperaturas. Para esto se emplea una solución que contiene lactobionato de sodio, sulfato de magnesio, fosfato de potasio, rafinosa y glutatión. La publicación Marsh D. C. *et al.* "Hypothermic Preservation of Hepatocytes, II. Importance of Ca²⁺ and Amino Acids", *Cryobiology*, Academic Press Inc. US, 27 (1), febrero 1990: 1-8, describe medios de almacenamiento y exigencias mínimas para el almacenamiento hipotérmico de hepatocitos. Un medio de cultivo celular conocido a partir de esto presenta cloruro de sodio, cloruro de potasio, hidrogenofosfato de potasio/sodio, hidrogenocarbonato de sodio y polietilenglicol (PEG) así como una adición de iones de calcio y magnesio así como aminoácidos y sustrato tal como glucosa.

40 Por tanto, la presente invención se basa además en el problema técnico de poner a disposición un medio que permita, con una reducida pérdida de la vitalidad y del número de células vivas de células hepáticas, una administración sin riesgos de las células a un animal, en particular a un ser humano.

45 De este modo se puede emplear de forma exitosa Custodiol[®] como medio celular, por ejemplo, para el almacenamiento en particular de células descongeladas, originalmente criopreservadas, tales como células hepáticas; se desarrolló como solución de conservación para el trasplante de órganos de órganos completos. Sin embargo, Custodiol[®] no está autorizado legalmente para una administración intravenosa al ser humano. Por tanto, la invención se basa también en el problema técnico de poner a disposición un medio celular para el almacenamiento por poco tiempo de células, en particular en relación con la criopreservación, que esté autorizado para una administración intravenosa en el ser humano y, por tanto, que las células se puedan administrar por vía intravenosa, por ejemplo, después de la descongelación sin etapas de lavado complejas y que reduzcan el número de células vivas a un ser humano en este medio celular.

50 La presente invención resuelve el problema técnico en el que se basa esencialmente facilitando un procedimiento para el almacenamiento por poco tiempo de células hepáticas animales o humanas de acuerdo con las reivindicaciones. Se facilita un procedimiento, recogiendo las células en un medio celular líquido que contiene solución salina, que contiene cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y citrato de sodio, así como glucosa y, además, albúmina sérica y/o plasma sanguíneo, y almacenándose en este medio celular.

60

65

5 En formas de realización preferentes, las células hepáticas son células de mamífero. Se puede tratar, por ejemplo, de células porcinas, bovinas o murinas. De forma particularmente preferente se trata de células humanas. Con células de acuerdo con la invención se quiere decir también suspensiones celulares y trasplantes celulares. Las células pueden ser de un tipo, pero se puede emplear también una composición o co-cultivo de distintos tipos celulares.

10 De acuerdo con la invención, preferentemente en el caso de las células animales se trata de células para la administración terapéutica. En otra forma de realización preferente, en el caso de las células animales se trata de células para el cultivo *in vitro*.

15 En relación con la presente invención, por células hepáticas se entiende una mezcla de células sobre todo compuesta de hepatocitos. Sin embargo, pueden contener también distintas partes de cantidades de linfocitos, células endoteliales y otros grupos celulares no parenquimatosos.

20 La descongelación y/o el almacenamiento de trombocitos, denominados también plaquetas, queda excluido de la invención. Los trombocitos no son células animales en el sentido de la invención.

25 En el contexto de la presente invención, por almacenamiento por poco tiempo se entiende un almacenamiento *in vitro* en un medio de acuerdo con la invención a lo largo de un periodo de tiempo de hasta 24 horas, en particular hasta 10 horas, preferentemente hasta 5 horas, en particular hasta 3 horas.

30 Por crioconservación se entiende un almacenamiento, la mayoría de las veces a largo plazo, de células por debajo de 0 °C, en particular a de -20 °C a -200 °C. La congelación se realiza, por norma general, a 1 °C/min.

35 En relación con la presente invención, por un medio celular, denominado también medio, medio de descongelación o medio nutriente, en particular se entiende una solución acuosa líquida. El medio celular sirve para el almacenamiento *in vitro* de células vivas conservando el mayor número posible de células vivas, es decir, un índice de mortalidad lo más reducido posible de las células, así como una viabilidad o vitalidad lo más elevada posible, conocida por el experto también como *viability*.

40 De acuerdo con la invención, preferentemente los constituyentes de un medio celular empleado de acuerdo con la invención están autorizados legalmente para la administración, en particular la administración intravenosa, a un organismo animal, preferentemente a un organismo humano. De acuerdo con la invención, las células después del almacenamiento en un medio de acuerdo con la invención se pueden usar para una aplicación clínica, en particular una administración terapéutica o para ensayos *in vitro*.

45 En relación con la presente invención, por una solución salina se entiende una solución acuosa de una o varias sales. La solución salina de acuerdo con la invención contiene cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y citrato de sodio, estando disueltas las sales en agua. El agua empleada es agua estéril, preferentemente desionizada, para la inyección.

50 Una solución salina preferente de acuerdo con la invención es Composol[®] o una solución correspondiente a la composición de Composol[®]. Composol[®] es una solución acuosa de cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidrato y citrato de sodio. Contiene 173 mmol/l de sodio, 5 mmol/l de potasio, 1,5 mmol/l de magnesio, 98 mmol/l de cloruro, 10,9 mmol/l de citrato, 27 mmol/l de acetato y 23 mmol/l de gluconato, preferentemente está compuesta de los mismos.

55 De acuerdo con la invención, preferentemente, la solución salina por tanto contiene del 0,45 al 0,60 % en peso, de forma particularmente preferente el 0,53 % en peso de cloruro de sodio, del 0,45 al 0,55 % en peso, de forma particularmente preferente el 0,50 % en peso de gluconato de sodio, del 0,20 al 0,25 % en peso, de forma particularmente preferente el 0,22 % en peso de acetato de sodio, del 0,03 al 0,04 % en peso, de forma particularmente preferente el 0,037 % en peso de cloruro de potasio, del 0,025 al 0,035 % en peso, de forma particularmente preferente el 0,031 % en peso de cloruro de magnesio hexahidrato y del 0,31 al 0,33 % en peso, de forma particularmente preferente el 0,32 % en peso de citrato de sodio, preferentemente está compuesta de los mismos. La solución salina preferentemente tiene un valor de pH de 7,0 a 7,4, de forma particularmente preferente de 7,2.

60 En otra forma de realización es constituyente del medio una solución acuosa de al menos un azúcar de alto peso molecular. Los azúcares de alto peso molecular de acuerdo con la invención son, por ejemplo, dextrano, también soluciones de dextrano tales como Perfadex, almidón de hidroxietilo (HES) y derivados de almidón de hidroxietilo. De acuerdo con la invención se usa preferentemente como azúcar de alto peso molecular almidón de hidroxietilo.

65 De acuerdo con la invención se añade la glucosa al medio celular en forma sólida o como solución acuosa.

De acuerdo con la invención se añade la albúmina sérica disuelta en medio celular o en forma líquida. La albúmina sérica puede estar presente, por ejemplo, como albúmina fetal bovina (FCS), albúmina sérica bovina (BSA) o

albúmina sérica humana (HSA). De acuerdo con la invención es preferente la albúmina sérica humana, ya que la misma está autorizada para la administración intravenosa al ser humano.

5 En otra forma de realización, la albúmina sérica está sustituida o complementada con plasma sanguíneo. De acuerdo con la invención se prefiere plasma sanguíneo humano, preferentemente autólogo. En particular se emplea plasma y/o HSA como crioprotector, preferentemente en solitario o junto con otros crioprotectores conocidos, en particular DMSO.

10 En otras formas de realización preferentes, el medio empleado de acuerdo con la invención contiene al menos otro constituyente, seleccionado de aminoácidos, hormonas, vitaminas, provitaminas y sustancias de efecto antiapoptótico.

15 El experto seleccionará los constituyentes de la composición del medio dependiendo del campo de uso según su conocimiento técnico, después de que la enseñanza de acuerdo con la invención le haya sugerido emplear los mismos de forma correspondiente a la invención y en las concentraciones de acuerdo con la invención.

El procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo, preferentemente, con un medio celular que se ha mencionado anteriormente con un valor de pH de 6,4 a 8, preferentemente de 7,0 a 7,4, en particular de 7,2.

20 Preferentemente se lavan las células después de la descongelación de la crioconservación en medio celular de acuerdo con la invención, se separan del medio de conservación y el medio celular de acuerdo con la invención y entonces se recogen en medio celular de acuerdo con la invención reciente para el almacenamiento. La separación se realiza, preferentemente, mediante retirada por centrifugación.

25 El procedimiento se lleva a cabo, preferentemente, a una temperatura de 2 a 40 °C. El medio celular tiene preferentemente una temperatura de 2 a 40 °C. De forma particularmente preferente se lleva a cabo el procedimiento a 4 °C y/o el medio usado tiene una temperatura de 4 °C. En otra variante preferente se lleva a cabo el procedimiento a 10 °C y/o el medio usado tiene una temperatura de 10 °C. En otra variante particularmente preferente se lleva a cabo el procedimiento a 25 °C y/o el medio usado tiene una temperatura de 25 °C. En otra variante particularmente preferente se lleva a cabo el procedimiento a 37 °C y/o el medio usado tiene una temperatura de 37 °C.

35 El objeto de la invención, evidentemente, también es el medio celular especial para el almacenamiento por poco tiempo de células hepáticas animales o humanas, en particular descongeladas después de la crioconservación, en particular un medio celular líquido que contiene cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y citrato de sodio así como glucosa y, además, albúmina sérica y/o plasma sanguíneo y en el que están disueltos en agua los constituyentes mencionados.

40 Un medio celular preferente está compuesto de cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidrato y citrato de sodio así como glucosa y, además, albúmina sérica y/o plasma sanguíneo, estando disueltos en agua los constituyentes mencionados. Un medio celular particularmente preferente contiene del 0,45 al 0,60 % en peso de cloruro de sodio, del 0,45 al 0,55 % en peso de gluconato de sodio, del 0,20 al 0,25 % en peso de acetato de sodio, del 0,03 al 0,04 % en peso de cloruro de potasio; del 0,025 al 0,035 % en peso de cloruro de magnesio hexahidrato y del 0,31 al 0,33 % en peso de citrato de sodio así como glucosa y, además, albúmina sérica y/o plasma sanguíneo, disolviéndose en agua los constituyentes mencionados.

Preferentemente, el medio celular contiene del 0,01 al 0,5 % en peso de glucosa, de forma particularmente preferente del 0,1 al 0,2 % en peso de glucosa.

50 De acuerdo con la invención, preferentemente el medio celular contiene albúmina sérica humana. La albúmina sérica humana puede sustituirse, de acuerdo con la invención, por plasma sanguíneo humano, en particular autólogo. En una forma de realización preferente, el medio contiene del 0,5 al 50 % en peso de albúmina sérica, de forma particularmente preferente del 3 al 5 % en peso de albúmina sérica. En otra forma de realización preferente, el medio contiene del 0,5 al 50 % en peso de plasma sanguíneo, de forma particularmente preferente del 3 al 5 % en peso de plasma sanguíneo.

El medio celular de acuerdo con la invención tiene, preferentemente, un valor de pH de 6,4 a 8, preferentemente de 7,0 a 7,4, en particular de 7,2.

60 De acuerdo con la invención, preferentemente los constituyentes de un medio celular de acuerdo con la invención están autorizados legalmente para la administración, en particular para la administración intravenosa, a un organismo animal, preferentemente a un organismo humano.

65 De acuerdo con la invención se prefieren también combinaciones de formas de realización de acuerdo con la invención del procedimiento de acuerdo con la invención y/o del medio celular de acuerdo con la invención.

La invención comprende también el uso del medio celular de acuerdo con la invención que se ha mencionado anteriormente para el almacenamiento por poco tiempo de células hepáticas animales descongeladas después de la criopreservación, en particular según el procedimiento de acuerdo con la invención.

5 Las figuras muestran:

Figura 1: vitalidad de las células almacenadas (después de la criopreservación) dependiendo del tiempo de almacenamiento, del medio de almacenamiento usado y de la temperatura de almacenamiento, leyenda: "HH142": número de la preparación celular individual (carga), "caliente": temperatura de almacenamiento de 18 °C, "frío": temperatura de almacenamiento de 4 °C, "HES": medio 2, "PBS", medio 5, "Custodiol[®]": medio 1, "Composol[®]": medio 4, "Ringer lactato": medio 3, "plasma humano": medio 6;

Figura 2: recuperación de las células almacenadas (antes de la criopreservación) dependiendo del tiempo de almacenamiento, del medio de almacenamiento usado y de la temperatura de almacenamiento, leyenda véase la Figura 1;

Figura 3: vitalidad de células almacenadas (después de la criopreservación) dependiendo del tiempo de almacenamiento, del medio de almacenamiento usado y de la temperatura de almacenamiento, leyenda véase la Figura 1;

Figura 4: número de células vivas (LZZ) de células almacenadas (después de la criopreservación) dependiendo del tiempo de almacenamiento y del medio de almacenamiento usado, leyenda véase la Figura 1;

Figura 5: número de células vivas (LZZ) de células almacenadas (antes de la criopreservación) dependiendo del tiempo de almacenamiento y del medio de almacenamiento usado, mediana a lo largo de tres preparaciones celulares individuales (carga); leyenda véase la Figura 1;

Figura 6: número de células vivas (LZZ) de células almacenadas (antes de la criopreservación) dependiendo del tiempo de almacenamiento y del medio de almacenamiento usado, mediana a lo largo de cuatro preparaciones celulares individuales (cargas); leyenda véase la Figura 1;

Figura 7A-C: recuperación, número de células vivas (LZZ) de células almacenadas (antes de la criopreservación) dependiendo del tiempo de almacenamiento y del medio de almacenamiento usado, mediana a lo largo de 3 preparaciones celulares individuales (carga); Figura 7C: comparación con Custodiol (=100 %), valor medio a lo largo de cuatro tiempos de almacenamiento, mediana a lo largo de 3 preparaciones celulares individuales (cargas), leyenda véase la Figura 1.

Ejemplo

Se usaron células hepáticas criopreservadas de criobolsillos/criotubos especiales. Ya que la cantidad de los criotubos presentes de una preparación celular individual no eran suficientes para el alcance del estudio, se usaron solamente para la comparación de los resultados. Todas las etapas de trabajo se llevaron a cabo en condiciones asépticas. La suspensión celular estaba completamente descongelada antes de la adición del medio celular. La descongelación de los criotubos se realizó en el tiempo independientemente de la descongelación de los bolsillos. El medio de almacenamiento se añadió lentamente a las células dispuestas.

Para conseguir resultados comparables se llevaron a cabo los distintos ensayos en paralelo por al menos 2, dado el caso 3 personas.

Se prepararon los siguientes medios de descongelación:

Medio 1: Custodiol[®] (ejemplo comparativo)

Medio 2: almidón de hidroxietilo (HES) + 1 g/l de glucosa + 4 % de HSA (ejemplo comparativo)

Medio 3: Ringer-lactato + 1 g/l de glucosa + 4 % de HSA (ejemplo comparativo)

Medio 4: Composol[®] + 1 g/l de glucosa + 4 % de HSA (de acuerdo con la invención)

Medio 5: solución salina tamponada con fosfato (PBS) + 1 g/l de glucosa + 4 % de HAS (ejemplo comparativo)

Medio 6: plasma sanguíneo humano (ejemplo comparativo)

Por ciclo (un bolsillo descongelado) se necesitaron de forma aproximada, respectivamente, 50 ml de medio celular. Se descongeló plasma sanguíneo humano en un baño de agua caliente a 37 °C.

En tres ensayos se atemperaron los medios en un baño de agua caliente a 37 °C durante al menos 15 min (= "caliente"). En 2 ensayos se enfriaron los medios celulares en el refrigerador durante al menos 15 min (= "frío").

5 Se dispusieron seis tubos de 50 ml etiquetados de forma correspondiente a las soluciones y se almacenaron a temperatura ambiente.

En los ensayos "calientes" se centrifugó durante 5 min a 18 °C y 50 g y en los ensayos "fríos" se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C y 50 g.

10 Los criobolsillos se extrajeron cuidadosamente del casete de aluminio. La criosuspensión se descongeló durante 2 a 5 min con agitación constante hasta que ya no se podían ver cristales de hielo. Todo el proceso no duró más de 5 min.

15 La tapa amarilla se retiró del bolsillo y se perforó el tabique con una espiga de perforación de un Benjamix. Al Benjamix del criobolsillo se conectó una jeringa de 60 ml y se extrajeron 60 ml de suspensión celular.

Respectivamente 10 ml de suspensión celular se traspasaron a los seis tubos preparados. Para esto se añadieron respectivamente 40 ml de los medios celulares correspondientes lentamente. Todo el proceso no duró más de 5 min.

20 Después de la centrifugación se realizó el lavado de las células. Se aspiraron los sobrenadantes con una pipeta Pasteur. Los sedimentos celulares se resuspendieron por completo mediante agitación cuidadosa en 5 ml del medio celular correspondiente.

25 Se realizó un recuento celular por número de células y vitalidad y después de cada recuento celular se preparó un cultivo de células hepáticas.

Durante una duración total de almacenamiento de 3 horas se repitieron, respectivamente después de 60 min, las dos etapas mencionadas en último lugar.

30 Se usaron solo células hepáticas con una vitalidad mayor del 40 % antes de la crioconservación. El ensayo se repitió al menos 3 veces con diferentes preparaciones celulares individuales (cargas). A este respecto se descongeló al menos 1 bolsillo por carga. Para la comparación se recurrió a los resultados de la descongelación de criotubos de las cargas usadas.

35 Se ensayaron cuatro preparaciones celulares individuales (cargas) en relación con la influencia de la solución de descongelación. Los resultados se ensayaron en relación con los parámetros vitalidad y número de células vivas (LZZ) después de la descongelación así como conservación de vitalidad y número de células vivas con almacenamiento en suspensión. La temperatura del medio y para la centrifugación se estableció en 4 °C en trasplantes de células hepáticas. El ensayo con la carga HH142 se llevó a cabo una vez en "caliente" y se repitió entonces en "frío" (véase la Figura 1 y la Figura 2). Para la valoración adicional se tomaron los valores medios de ambos ensayos y se denominaron HH142.

Los resultados individuales están representados en las Figuras 3 y 4.

45 Para garantizar una valoración independiente de carga se definió el parámetro recuperación del número de células vivas en el almacenamiento en las soluciones ensayadas. Este se relacionó con dos puntos distintos de partida. Por un lado, la recuperación en relación con el número de células vivas antes de la congelación (Figura 5a). Por otro lado, la recuperación en relación con el número de células vivas después del lavado (hora 0 en medio de almacenamiento específico) (Figura 5b). Para la comparación de las cinco soluciones se calcularon valores de mediana para los parámetros mencionados a partir de las tres cargas ensayadas y se representaron gráficamente en la Figura 5.

50 Las dos soluciones seleccionadas —Composol® y HES— se valoraron adicionalmente mediante los valores de mediana de cuatro cargas y se representaron gráficamente en la Figura 6:

55 Para un mejor análisis de los resultados representados se realizó la siguiente aproximación. El parámetro recuperación de LZZ congeladas se puso en el 100 % en Custodiol®. Para las cinco preparaciones ensayadas (ejemplo comparativo/ejemplos de acuerdo con la invención) se calculó la desviación porcentual de este parámetro en comparación con Custodiol® (véase la Figura 7a y la Figura 7b).

60 Directamente después del lavado de las células, tres de las soluciones (PBS, Composol® y HES) mostraron una recuperación de LZZ comparable (coincidencia mayor del 80 %) con Custodiol® con respecto al parámetro. A este respecto, Composol® mostró incluso resultados mejores que Custodiol® (recuperación mayor del 100 %). Mientras que después de 1 h el PBS presentaba los mejores resultados, Composol® y el plasma humano mostraron después de 2 horas, a su vez, resultados de mediana aproximadamente el 10 % mejores que Custodiol®.

65

Para la comparación adicional se llevó a cabo otra evaluación. Para cada solución se calculó el valor medio de los 4 momentos (hora 0 a 3, Figura 7c).

- 5 Independientemente de la evolución en el tiempo del ensayo, HES y Ringer-lactato mostraron aproximadamente el 20 % de pérdida de LZZ en comparación con Custodiol[®], mostrando PBS, Composol[®] y el plasma humano resultados comparables (desviación menor del 10 %) al Custodiol[®].

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el almacenamiento por poco tiempo de células hepáticas, recogiendo las células en un medio celular líquido que contiene
- 5 a) solución salina
- que contiene cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y citrato de sodio,
- 10 b) glucosa y
- c) albúmina sérica y/o plasma sanguíneo
- y almacenándose en este medio celular.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, siendo las células células crioconservadas y descongelándose y lavándose después de la descongelación en el medio celular, separándose del medio celular y recogiendo entonces en medio celular reciente para el almacenamiento.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, teniendo el medio celular una temperatura de 2 a 40 °C.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, tratándose en el caso de las células de hepatocitos.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, tratándose en el caso de las células de células de mamífero.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, tratándose en el caso de las células de células humanas.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, tratándose en el caso de las células de células para la administración terapéutica.
- 35 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, tratándose en el caso de las células de células para el cultivo *in vitro*.
9. Uso de un medio celular como se caracteriza en la reivindicación 1 para el almacenamiento por poco tiempo de células hepáticas, y en particular según el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 40 10. Medio celular para el almacenamiento por poco tiempo de células hepáticas, conteniendo el medio celular disueltos en agua
- 45 a) cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y citrato de sodio,
- b) glucosa y
- c) albúmina sérica y/o plasma sanguíneo.
- 50 11. Medio celular de acuerdo con la reivindicación 10, siendo la albúmina sérica albúmina sérica humana.
12. Medio celular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 u 11, siendo el plasma sanguíneo plasma sanguíneo humano.
13. Medio celular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 12, conteniendo el medio celular del 0,45 al 0,60 % en peso de cloruro de sodio, del 0,45 al 0,55 % en peso de gluconato de sodio, del 0,20 al 0,25 % en peso de acetato de sodio, del 0,03 al 0,04 % en peso de cloruro de potasio, del 0,025 al 0,035 % en peso de cloruro de magnesio hexahidrato y del 0,31 al 0,33 % en peso de citrato de sodio.
- 55 60 14. Medio celular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 13, conteniendo el medio celular del 0,01 al 0,5 % en peso, preferentemente del 0,1 al 0,2 % en peso de glucosa.
- 65 15. Medio celular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 14, conteniendo el medio celular del 0,5 al 50 % en peso, preferentemente del 3 al 5 % en peso de albúmina sérica.

16. Medio celular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 15, conteniendo el medio celular del 0,5 al 50 % en peso, preferentemente del 3 al 5 % en peso de plasma sanguíneo.
17. Medio celular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 16, teniendo el medio celular un valor de pH de 6,4 a 8, preferentemente de 7,0 a 7,4.
18. Medio celular de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 17 que contiene al menos otro constituyente seleccionado de: aminoácidos, hormonas, vitaminas, provitaminas y sustancias de efecto antiapoptótico.

Figura 1

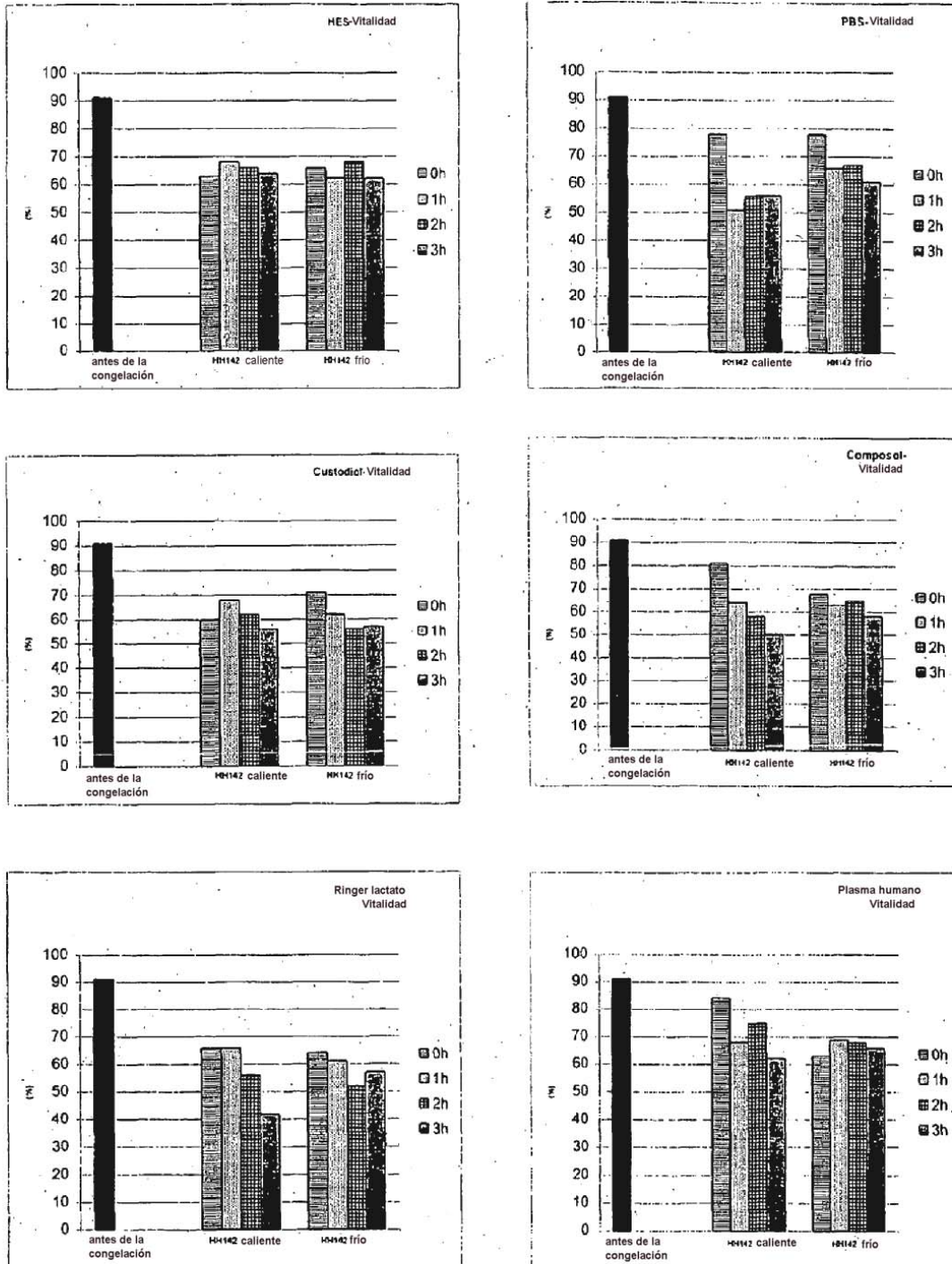


Figura 2

