

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 786**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2010 E 10704157 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2398898**

54 Título: **Procedimiento para la crioconservación de células, construcciones de células artificiales o ensamblajes tridimensionales de tejidos complejos**

30 Prioridad:

**19.02.2009 EP 09153248**

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

**30.01.2015**

73 Titular/es:

**NATURIN GMBH & CO. (100.0%)  
Badeniastrasse 13  
69469 Wienheim, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMITT, TIMO;  
JUST, LOTHAR;  
MASER, FRANZ y  
BECKER, HOLGER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 527 786 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

Procedimiento para la crioconservación de células, construcciones de células artificiales o ensamblajes tridimensionales de tejidos complejos

### Campo de la invención

5 La presente invención está en el campo de la crioconservación de cultivos de células y de tejidos, más específicamente se refiere a un procedimiento para la crioconservación y almacenamiento a largo plazo de células, construcciones de células o ensamblajes tridimensionales de tejidos complejos. El procedimiento se basa en el uso de un vehículo de células de colágeno que tiene una composición específica, así como un espesor muy específico y propiedades mecánicas adecuadas en las que se mantienen después de la descongelación. El uso de dicho

10 vehículo celular de colágeno (CCC) proporciona un soporte muy adecuado para la crioconservación que resulta en tasas de supervivencia muy altas después del proceso de descongelación y proporciona células y ensamblajes de tejidos ya adheridos a un soporte mecánicamente estable y biocompatible.

La invención también se refiere a ensamblajes de células vehículo de colágeno congeladas y a construcciones de células artificiales congeladas o ensamblajes tridimensionales de tejidos complejos que pueden obtenerse mediante el procedimiento de la invención y al uso de los mismos después de la descongelación.

15

### Antecedentes de la invención

#### **Crioconservación**

La crioconservación desempeña un papel importante en la conservación a corto y a largo plazo de las células y, por tanto, es de importancia central en los bancos de células y tejidos. Las células crioconservadas tales como las células madre hematopoyéticas humanas se han trasplantado con éxito para el tratamiento clínico de rutina de la leucemia durante décadas. Cada vez más se usan terapias basadas en células utilizando tejidos de bancos en otras áreas de la medicina regenerativa también. El gran potencial de estas aplicaciones crece a medida que nuevos hallazgos conducen a la generación de nuevos productos para el uso clínico.

20

Con la ayuda de la criotecnología se pueden disponer de suspensiones de células, células adherentes e incluso tejidos generados artificialmente "justo a tiempo" en los bancos de células. La implementación de este tipo de proyectos, sin embargo, requiere la disponibilidad de los tejidos regenerados basados en las células correspondientes, así como de los sistemas de crioconservación con la que se pueden producir células adherentes o ensamblajes de tejidos complejos y conservar en su forma tridimensional natural con un estrecho seguimiento, en condiciones producibles y rentables.

25

Con el fin de proteger a las células durante los procesos de congelación y descongelación, se añaden al medio de congelación productos químicos especiales, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), trehalosa, glicerina o hidroxietil almidón (HES).

30

Estos llamados crioprotectores protegen las células y sus orgánulos del daño en la membrana por los cristales de hielo y de la deshidratación intracelular durante la transición de agua desde la fase líquida a la fase cristalina. Se sabe que la congelación y la descongelación están asociadas con una pérdida de la vitalidad y de función en las células, dependiendo el grado de pérdida del tipo de célula que se está congelando. En los procedimientos convencionales, el dimetilsulfóxido se usa en concentraciones de hasta el 10 % (v / v) ya sea solo o en combinación con almidón de hidroxietilo. El DMSO funciona principalmente en el compartimento intracelular mediante la reducción del punto de congelación, lo que reduce la formación de cristales de hielo y, por lo tanto, reduce al mínimo la deshidratación celular durante la congelación. Por el contrario, la acción de macromoléculas tales como hidroxietilalmidón es extracelular mediante la formación de una envoltura protectora para las células y la prevención de la pérdida de líquido de las células durante la congelación.

35

40

#### **Vehículos celulares**

Además de los crioprotectores, el tipo correcto de vehículo celular es también de importancia principal en el proceso de crioconservación. Idealmente, su espesor debe ser aproximadamente el de las células que lo colonizan es decir, menos de 150  $\mu\text{m}$ . Debido a su mayor capacidad de almacenamiento de calor, los vehículos celulares más gruesos pueden actuar como tampón, especialmente durante el proceso de congelación y descongelación, produciendo un gradiente de temperatura que afecta negativamente a las velocidades estándar de congelación o descongelación. La reproducibilidad y la normalización se vuelven aún más importantes cuando las células sensibles y caras, ensamblajes celulares complejo o tejidos regenerados basados en células deben conservarse. La velocidad de congelación o descongelación y la presión ambiente ayudan a determinar el grado hasta el cual tiene lugar la cristalización cuando se alcanza el punto de congelación. Además, debe tenerse en cuenta que la cristalización también puede tener lugar dentro del material de los vehículos celulares con una cierta capacidad para absorber fluidos. Los vehículos celulares más finos tienen la ventaja adicional de que los crioprotectores penetran rápidamente en el interior.

45

50

55

Se han utilizado varios materiales como vehículo celular para el cultivo de células y / o la crioconservación de células

o tejidos. El ácido hialurónico, alginato, agarosa, fibrina, quitina / quitosano, polilactida (PLA), poliglicólido (PGA) o ácido poli-L-láctico (PPLA) son algunos de los materiales conocidos en la técnica anterior como armazón o vehículo para el cultivo y / o la criopreservación de las células.

5 Los vehículos que contienen colágeno se han usado ampliamente como matriz para el cultivo de células, así como para la criopreservación de las mismas (documento WO 2007059855 y McKay GC et al. Toxicology in vitro, vol. 16(1), 2002:71-79). El colágeno es uno de los principales componentes en la estructura de los tejidos conectivos, por ejemplo, piel, vasos sanguíneos, ligamentos, tendones y el cartílago, y en las estructuras de los huesos y los dientes. Hasta la fecha, se han identificado más de 28 tipos diferentes de colágeno mostrando solo diferencias insignificantes entre las distintas especies. Este hecho, junto con el hecho de que la degradación de colágeno no produce ningún producto de degradación tóxico hace que el colágeno sea biocompatible y muy útil en medicina.

10 Sin embargo, los vehículos de células de colágeno utilizados hasta ahora para la criopreservación de células adherentes están normalmente en forma de hidrogeles, es decir, un material similar a la gelatina con alta viscosidad y un contenido de agua muy alto. Dichos hidrogeles a base de colágeno generalmente se han utilizado en diferentes conformaciones para la criopreservación. La conformación más habitual y simple es en monocapa, es decir, las células o los tejidos se siembran directamente en placas de cultivo recubiertas con una simple monocapa de gel de colágeno. Otra conformación ampliamente utilizado para la criopreservación de células o tejidos en los hidrogeles a base de colágeno es la conformación de tipo sándwich, es decir, las células se criopreservan entre dos capas de gel de colágeno.

15 Sin embargo, estos hidrogeles a base de colágeno tienen el inconveniente de que normalmente tienen espesores superiores a 150 µm que afectan negativamente a la vitalidad celular después de la descongelación por las razones explicadas antes. Además, los hidrogeles de colágeno puro no poseen suficiente estabilidad mecánica para permitir la transferencia controlada de la construcción en el organismo después de la descongelación.

20 El documento WO2005014774 da a conocer un hidrogel de colágeno para el cultivo de células preparadas secando completamente el hidrogel y mediante la rehidratación de las mismas. La película divulgada en este documento tiene un espesor del orden de µm-1mm, sin embargo, el documento no menciona nada sobre la idoneidad de esta película para sufrir un proceso de criopreservación.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar procedimientos para la criopreservación de células, las construcciones de células o ensamblajes de tejidos complejos soportados por los portadores de células que tienen una estabilidad mecánica suficiente después de la descongelación. Esto permitiría, en el caso de la medicina regenerativa, la implantación directa e inmovilización de la construcción vehículo celular en el organismo dañado pero conservando al mismo tiempo el efecto beneficioso con respecto a la biocompatibilidad y degradabilidad ya conocidas para los vehículos de colágeno.

30 Todas las matrices de vehículo mecánicamente estables actualmente disponibles para la criopreservación de células adherentes se basan en materiales sintéticos o complejos o tienen un espesor de más de 150 µm. Una integración de las células en los vehículos celulares sintéticos no tiene lugar o sólo es posible en un grado limitado.

35 Los procedimientos para la criopreservación de células, las construcciones de células y los ensamblajes de tejidos proporcionados en este documento se basan en las características de la recientemente desarrollada, membrana de colágeno simple y estandarizada (CCC) que tienen una combinación de alta estabilidad mecánica y delgadez extrema. La CCC es un vehículo celular biodegradable para la criopreservación que permite la congelación no destructiva de células adherentes así como la fácil transferencia del ensamblaje de células después de la descongelación. La preparación de una CCC tal como se utiliza en el procedimiento descrito en el presente documento se enseña en la solicitud PCT / EP / 2008/006660.

### **Breve descripción de las figuras**

45 **Figura 1:** vista microscópica de la superficie de la CCC. **A:** Imagen de microscopio electrónico de la superficie. Barra de escala 500 µm. **B:** Corte transversal de la membrana. Barra de escala 10 µm.

**Figura 2:** **A:** Resistencia a la fuerza de la CCC. Línea continua: CCC seca, línea discontinua: CCC húmeda. **B:** se representa la configuración del ensayo de tracción. **C:** geometría de la muestra de ensayo.

**Figura 3:** **A:** Crioinserto para el cultivo de células adherentes (sobre sus lados) y tubos de criopreservación para el almacenamiento de la pieza de inserción. **B:** Crioinserto con membrana vehículo a base de colágeno.

50 **Figura 4:** **A/B:** Tinción nuclear DAPI de células madre mesenquimatosas (MSC) en el lado superior de la membrana (A) y células Caco-2 en la parte inferior (B). Imagen tomada con un microscopio de fluorescencia inversa. Barra de escala 100 µm. **C:** Inmuntinción combinada de MSC (vimentina, rojo) y células Caco-2 (citoqueratina, verde). Reconstrucción tridimensional con un microscopio de barrido láser de fluorescencia. Barra de escala 50 µm.

55 **Figura 5:** **A:** Cardiomiocito murino fetal cultivado en CCC. Inmuncitoquímica de alfa-actinina tras 7 días de cultivo. **B:** Inmuncitoquímica de alfa-actinina de cardiomiocitos criopreservados. Cardiomiocitos murinos fetales

se cultivaron en un vehículo celular de colágeno y se almacenaron durante 3 semanas en nitrógeno líquido. Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

**Figura 6:** Inmunocitoquímica con vimentina y BrdU de células SAOS-2 crioconservadas. Las células se cultivaron en un vehículo celular de colágeno y se almacenaron durante 230 días en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, las células se incubaron con BrdU y se analizaron mediante inmunocitoquímica. Las flechas indican las células positivas a BrdU. Barra de escala 40  $\mu\text{m}$ .

### **Descripción de la invención**

Un primer objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la crioconservación y almacenamiento a largo plazo de uno o varios tipos de células, las construcciones de células o ensamblajes tridimensionales de tejidos complejos que comprenden:

a) Sembrar uno o varios tipos de células o diferentes tipos de células que conforman las construcciones de células o los ensamblajes de tejido tridimensional sobre un vehículo celular estable de colágeno (CCC) que tiene un espesor de menos de 150  $\mu\text{m}$ , una masa por unidad de área de 10 a 170  $\text{g} / \text{m}^2$  y la siguiente composición:

i) colágeno [% en peso]: 30 a 80,

ii) nitrógeno de amida [% en peso]: de 0,06 a 0,7,

iii) poliol [% en peso]: de 0 a 50,

iv) lípidos [% en peso]: de 0 a 20,

v) agua [% en peso]: 5 a 40,

b) cultivar las células hasta su adhesión a la CCC,

c) lavar las células no adherentes,

d) congelar el vehículo celular de colágeno con células adherentes en un medio de congelación.

El procedimiento de crioconservación de la presente invención es especialmente interesante, ya que permite la congelación de células adherentes o construcciones celulares o ensamblajes de tejidos tridimensionales que después de la descongelación permanecen unidos a la CCC. El ensamblaje de células-CCC o la construcción de células o la construcción de tejido tridimensional unido al soporte mecánicamente estable de la película de colágeno pueden descongelarse siempre que sea necesario y proporcionarse justo a tiempo para su aplicación o uso.

En los procedimientos de la técnica anterior, antes de la congelación, las células adherentes generalmente se desprendieron de la superficie de cultivo celular con proteasas tales como tripsina, se lavaron en una serie de etapas de centrifugación y después se congelaron después de la adición del medio de crioconservación. Cuando fue necesario, las células se descongelaron y se sembraron. En otros procedimientos de la técnica anterior, las células se congelaron dentro o unidas al vehículo y después de la descongelación se desprendieron de la superficie del vehículo y se aislaron mediante los mismos procesos. Sin embargo, tanto el tratamiento con proteasa con la destrucción concomitante del contacto célula-célula y el contacto célula-sustrato como la tensión mecánica de la centrifugación y el pipeteado conducen a tasas de supervivencia reducidas o a daños en las células.

La crioconservación de las células adherentes que crecen en una membrana de vehículo biocompatible como en el procedimiento de la presente invención tiene la gran ventaja sobre los procedimientos de aislamiento de células de que ya no es necesario desprender las células de la superficie sobre la que se cultivaron. Esto aumenta tanto la tasa de supervivencia como la vitalidad de las células después de la descongelación. Esto se aplica particularmente a la crioconservación de células sensibles tales como cardiomiocitos primarios o células hepáticas. La alta tasa de supervivencia de acuerdo con el procedimiento de esta invención tiene también la ventaja de que pequeñas cantidades de células se pueden ultracongelar. Esto, de nuevo, contrasta con los procedimientos de aislamiento de células en los que se necesita un número mínimo de células de 100.000 para obtener un sedimento celular visible después de la centrifugación, adecuado para transferir a un medio de cultivo fresco y sembrar después.

Una variante o forma de realización concretas del procedimiento de la invención comprende la siembra y el cultivo de uno o varios tipos de células en cada lado del vehículo celular de colágeno con el fin de obtener una conformación espacial específica a ambos lados de la película de colágeno. Esta variante del procedimiento puede ser útil cuando se desarrollen conformaciones de tejidos complejos. La interfaz de colágeno proporciona un almacén temporal para el sistema celular de varias capas de células diferentes. La estratificación controlada de células con características individuales y las funcionalidades resultantes proporcionan la base para sistemas de células complejos similares a in vivo. La Figura 4 representa un ejemplo de esta forma de realización, donde dos diferentes tipos de células (células madre mesenquimatosas y células Caco-2) se cultivan cada una sobre los lados de la CCC.

Como se expresó antes, las ventajas del presente procedimiento de crioconservación se derivan en gran medida de las características específicas de la CCC utilizada. La CCC con las características antes mencionadas proporciona

- propiedades físicas y químicas especiales que lo hacen especialmente adecuado no sólo para el cultivo de células, sino también para la crioconservación de las mismas. Se ha observado que la CCC descrita en el presente documento tampoco presenta ninguna pérdida significativa de la biocompatibilidad ni de estabilidad mecánica después de los procesos de congelación y descongelación, incluso después de tiempos de crioconservación prolongados.
- Las características mecánicas especiales de la CCC se obtienen a través de la desecación con aire de la composición de colágeno en el curso de la fabricación de la película de colágeno correspondiente. Este proceso irreversible hace que sea muy estable y resistente. La composición de colágeno se forma preferiblemente en una película plana estable y fina secada al aire que consigue resistencias a la tracción de alrededor de 20 a alrededor de 100 N / mm<sup>2</sup>.
- La figura 2 muestra el comportamiento mecánico de la CCC en el diagrama de fuerza-tensión utilizando el aparato de ensayo de tracción con el software UTS 209,00 V 04/06/04 (Pruebas de acuerdo con la norma alemana DIN 53 455). La configuración de la prueba utilizada para llevar a cabo la prueba también se muestra en la figura 2.
- En realizaciones particulares en las que se necesitan resistencias a la tracción más exigentes, la composición de colágeno puede obtenerse mediante reticulación con agentes de reticulación químicos tales como aldehídos bifuncionales como glutaraldehído, isocianatos como diisocianato de hexametileno (HMDI), carbodiimidas como 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) o cualquier otro reticulante químicos conocido en la técnica y sin la introducción de niveles no deseados de toxicidad en el producto resultante. La reticulación también se puede lograr por procedimientos físicos como la reticulación deshidrotérmica o irradiación (UV o radiación ionizante), o mediante reacciones enzimáticas utilizando, por ejemplo, transglutaminasa.
- Para llevar a cabo el procedimiento de la invención, la película de colágeno se puede presentar en cualquier tipo de soporte para el cultivo de células, tales como placas de cultivo celular, platos o frascos, microbeats. También se puede presentar en una estructura de inserción para los pocillos de una placa de cultivo celular o cualquier otro tipo de construcción (véase la figura 3). Esta última presentación permite la práctica de la realización de la invención donde los diferentes tipos de células se cultivan simultáneamente en cada uno de los lados de la CCC.
- Además de la conformación como una película delgada y plana, la composición de colágeno también se puede formar como una película tubular para su uso como reservorios de células. Los tubos de colágeno pueden crioconservarse después de llenarse con suspensiones celulares fluidas. Después de la descongelación, se pueden usar para transferir suspensiones de células de regeneración-estimulación a un defecto de tejido en el cuerpo.
- El espesor de la película de colágeno seco utilizado en el procedimiento de la invención es siempre menor que 150 µm a fin de no afectar negativamente al proceso de congelación. En una forma de realización preferida de la invención, el espesor de la CCC seco es de menos de 80 µm y en una realización todavía preferida, el espesor es igual o inferior a 40 µm. El bajo espesor de pared permite una rápida penetración de los crioprotectores y también conduce a un rápido lavado de los mismos después de la descongelación.
- Cualquier tipo de colágeno fibrilar de cualquier fuente animal es útil en la preparación de la CCC utilizada en el procedimiento de la invención. No obstante, una forma de realización preferida de la invención comprende el uso de colágeno bovino I obtenido de cueros o pieles de bovino. Otras realizaciones particulares comprenden una mezcla de colágeno I y colágeno III o una mezcla de colágeno I y / o III con elastina.
- Un componente importante de la composición de colágeno utilizado en el procedimiento de la invención es el poliol. Esto actúa como un humectante que evita un inadecuado secado de la CCC. Aunque la película se seca al aire durante su preparación, es conveniente que conserve una cierta cantidad de humedad para que no se convierta en frágil. Se pueden utilizar muchos polioles diferentes en el contexto de la presente invención, tal como glicerol, etilenglicol, butenodiolos, propenodiolos, sorbitol u otros hexitoles, xilitol u otros pentitoles y mezclas de los mismos. Una realización preferida comprende el uso de glicerol o sorbitol o mezclas de los mismos.
- Otro componente de la CCC podrá ser grasa. Preferiblemente, la grasa aplicada es esencialmente de origen vegetal. El uso de aceites vegetales aumenta la elasticidad de la película de colágeno-
- Una forma de realización particular y preferida de la invención está representada por una CCC que tiene, en su estado seco, un espesor de 20 µm, una masa por unidad de área de 25 a 35 g/m<sup>2</sup> y la siguiente composición:
- Colágeno [% en peso]: 50 a 70,  
 Nitrógeno de amida [% en peso]: 0,14 a 0,4,  
 Glicerol [% peso]: 12 a 35,  
 grasa [% en peso]: 1 a 5,  
 Sorbitol [% en peso] 0 a 20,  
 Agua [% en peso]: 5 a 40,

5 Aunque no es una característica esencial para llevar a cabo el procedimiento de la invención, la CCC opcionalmente puede modificarse con diferentes tipos de moléculas en su superficie. Por ejemplo, la CCC se puede recubrir con las proteínas estructurales de la matriz extracelular tales como laminina, fibronectina, elastina o ácido hialurónico, también con apatita o con moléculas funcionales tales como factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de orientación o anticuerpos. Estos factores pueden influir en la viabilidad de la célula, la adhesión celular, la orientación celular, la proliferación celular y la diferenciación celular.

10 Las condiciones específicas para el cultivo de las células hasta la adherencia pueden variar dependiendo del tipo de células. Es sustancial a todas las células que se cultivan en condiciones de inmersión en un medio de nutrición o en una niebla de nutrición que garantiza que las células no se secan. Además se necesita una atmósfera específica de células y una superficie biocompatible como la de la CCC se utiliza en el presente documento, en la que las células pueden adherirse. Generalmente se necesitan un medio de nutrición, una atmósfera específica de células procariontas y eucariotas y una temperatura específica. Los medios de cultivo de células y condiciones de cultivo en CCC para cada célula son los mismos que los descritos para aplicaciones de cultivo celular convencionales.

15 Antes de la congelación, las células no adherentes se lavan con una o varias etapas de lavado en una solución tampón.

20 La congelación del ensamblaje de células - CCC o de la construcción de células o tres ensamblajes de tejidos tridimensionales en la CCC se lleva a cabo en presencia de un medio de crioconservación. Esto normalmente comprende un medio de cultivo suplementado con crioprotectores, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), glicerina trehalosa o hidroxietil almidón (HES). La forma de realización preferida de la invención comprende el uso de DMSO en el procedimiento de crioconservación. La congelación se lleva a cabo normalmente en nitrógeno líquido, aunque pueden utilizarse otros protocolos de procedimientos y / o de congelación conocidos.

Se ha demostrado que el procedimiento de la presente invención tiene éxito en la crioconservación de una gama muy amplia de células o bien eucariotas o procariontas, ya sea genéticamente modificadas o no.

25 Entre las células eucariotas varias células animales, plantas u hongos se han cultivado y ultracongelado con éxito. Entre las células procariontas también se ha demostrado que varias especies de bacterias son viables después de la descongelación.

El procedimiento para la crioconservación de la invención es especialmente adecuado para las células de mamíferos, ya sea para células primarias o para líneas celulares inmortalizadas.

30 La siguiente es una lista de los tipos de células que podrían someterse al procedimiento de crioconservación de la invención:

a) Las células madre (embrionarias, fetales, neonatales, adultas) y sus células progenitoras

- - Líneas de células madre embrionarias
- Células madre pluripotenciales inducidas
- Células madre mesenquimatosas
- 35 - Células madre endoteliales,
- -Células madre hematopoyéticas
- Células madre neurales
- Células madre de las crestas neurales
- Células madre gastrointestinales

40 b) Células somáticas

- Células endoteliales,
- Células epiteliales de estómago e intestino
- Células epiteliales mamarias
- Melanocitos
- 45 - -Células epiteliales de pulmón
- Células epiteliales renales

- Queratinocitos
- Células uroteliales
- Hepatocitos
- Células corneales
- 5 - Células del cristalino
- Osteoblastos,
- Osteocitos
- Odontoblastos
- Condrocitos
- 10 - Células del ligamento
- Células de los tendones
- Células glandulares (células de la hipófisis, células de las glándulas salivales, glándula suprarrenal, células pancreáticas exocrinas y endocrinas, células de Leydig)
- Adipocitos,
- 15 - Fibroblastos
- Células retinianas
- Neuronas (neuronas dopaminérgicas, GABAérgicas, glutaminérgicas, colinérgicas, adrenérgicas)
- Células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann)
- - Células de músculo liso
- 20 - Células del músculo esquelético
- Cardiomiocitos
- Células inmunitarias (linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células asesinas naturales, células M, microglía)
- c) Células modificadas genéticamente
- 25 d) Líneas celulares de cáncer
- HeLa, Adenocarcinoma de cuello uterino humano
- CCF-STTG1, Astrocitoma cerebral humano
- - Hep G2, Carcinoma hepatocelular de hígado humano
- SK-MEL-5, melanoma, de piel humana maligno
- 30 - - SAOS-2 osteosarcoma humano de hueso
- WERI-Rb-1, Retinoblastoma ocular retina humana
- e) Líneas celulares inmortalizadas
- Nuli, epitelio bronquial humano
- CuFi, epitelio bronquial humano
- 35 - CHON-001, fibroblastos de cartílago de hueso humano,
- BJ-5ta, fibroblastos de prepucio humano
- hTERT-HME1 (ME16C), epitelio mamario humano,

- hTERT-HPNE, de tipo epitelial del conducto del páncreas humano,
- hTERT RPE-1, epitelio pigmentado de la retina humana,
- NeHepLxHT, de tipo epitelial de hígado humano,
- T HESC, líneas celulares de hibridoma de tipo fibroblastos de endometrio humano

5 f) Células vegetales

- *Brownanthus corallinus*
- *Carpanthea pomeridiana*
- *Conophytum meyeræ*
- *Delosperma ecklonis*
- 10 - *Sesuvium portulacastrum*
- *Sphalmanthus trichomotus*
- *Amaranthus retroflexus*
- *Pleuropetalum darwinii*
- *Amaryllidaceae*
- 15 - *Crinum x powellii hort.*
- *Catharanthus longifolius*
- *Dictyophleba leonensis*
- *Ervatamia coronaria*

g) Células fúngicas

20 Hongos filamentosos

- *Dacrymyces deliquescens*
- *Fennellomyces linderi*
- *Cunninghamella blakesleeana*
- *Tolyptocladium inflatum*
- 25 - *Radiomyces spectabilis*
- *Wallemia sebi*
- *Lophodermium seditiosum*

Levaduras

- *Saccharomyces cerevisiae*
- 30 - *Candida albicans*,
- *Debaromyces japonicus*
- *Fellomyces polyborus*
- *Brettanomyces abstinentis*
- *Hyphopichia burtonii*
- 35 - *Kloeckera brevis*

h) Bacterias

- *Acidobacterium capsulatum*
- *Escherichia coli*
- *Saccharococcus thermophilus*
- 40 - *Lactobacillus acidophilus*
- *Bacillus thuringiensis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus faecalis*

45 Otro objeto de la invención es el ensamblaje de CCC-células congeladas o la construcción de células artificiales congeladas o los ensamblajes de tejidos tridimensionales congelados obtenibles por el procedimiento de la invención. Estos representan una fuente potencial y prácticamente permanente de las células, así como construcciones celulares o ensamblajes de tejidos que pueden almacenarse a largo plazo y proporcionarse "justo a tiempo" cuando sea necesario. Este material compuesto conserva su disposición tridimensional después de la descongelación y garantiza la inmovilización de las células en el sitio donde se necesitan.

50 Por último, también es un objeto de la invención el uso después de descongelar del ensamblaje de CCC-células congeladas o la construcción de células artificiales congeladas o los ensamblajes de tejidos tridimensionales



congelados obtenibles por el procedimiento de la invención.

Una primera aplicación comprende el uso del ensamblaje de células vehículo de colágeno, la construcción de célula artificial o el ensamblaje de tejido complejo tridimensional después de la descongelación en la medicina regenerativa, es decir, para la implantación in vivo de células o tejidos dañados. En estudios de implantación in vivo se ha demostrado que la CCC es biocompatible y no desencadena una reacción inmune en el receptor. Esto, junto con la estabilidad mecánica y el espesor reducido hace que estos productos descongelados sean especialmente interesantes como implante colonizado por células para diversas aplicaciones clínicas en animales y seres humanos. La crioconservación permite generar los implantes antes de tiempo y descongelarlos "justo a tiempo" para el trasplante.

10 La alta estabilidad mecánica de la CCC (incluso después de la descongelación) también proporciona protección y la estabilización en la fase inicial en el caso de los trasplantes hasta que lo reabsorbe el tejido circundante.

Se prefiere que los implantes congelados / descongelados contengan células autólogas en lugar de heterólogas con el fin de evitar o reducir cualquier posible reacción inmune del receptor del implante.

15 Una segunda aplicación comprende el uso de del ensamblaje de células vehículo de colágeno, la construcción de células artificiales o el ensamblaje de tejido complejo tridimensional después de la descongelación para sistemas de ensayo in vitro. Estos se pueden usar para aplicaciones en investigación básica o como sistemas de ensayo para las sustancias farmacológicas, los productos químicos o cosméticos, y hacen posible el análisis de sustancias citoactivas sin el uso de ensayos con animales. Un sistema establecido, bien conocido para probar sustancias farmacológicas o cosméticos es el modelo de la piel. Este modelo puede por supuesto reproducirse y congelarse de acuerdo con el procedimiento de la invención.

20 La posibilidad de congelar / descongelar los ensamblajes de células complejas junto con sus matrices vehículo al tiempo que conservan su estructura tridimensional como en la presente invención abre nuevas opciones para aplicaciones en la industria farmacéutica o biotecnológica. Los sistemas de ensayo crioconservados preparados de acuerdo con la invención pueden liberarse sin ningún peligro de contaminación o compromiso de la vitalidad celular resultante de la fluctuación de las condiciones de cultivo durante el transporte.

25 Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención, pero no tienen que considerarse como una limitación del ámbito de la invención.

### **Ejemplo 1: Preparación del vehículo celular de colágeno**

#### **1.1 Producción como una película plana de acuerdo con la invención**

30 50,0 kg de pedazos de cuero bovino se precortaron mecánicamente y se lavaron tres veces con agua (3 veces 50 kg). Posteriormente, la materia prima se sometió a un tratamiento alcalino en una suspensión de 0,29 kg de hidróxido de calcio en 50 kg de agua a un valor de pH de 11,8 durante 150 horas. El tratamiento alcalino se detuvo mediante la adición de ácido clorhídrico (10 % en peso en agua) hasta que el pH del flotante alcanzó un valor de 0,6. A continuación, la mezcla de reacción se aclaró de nuevo con agua hasta que el flotante adoptó un pH de 2,8. Las "cortezas de colágeno" resultantes se procesaron a continuación mecánicamente con control de la temperatura (< 24 °C) en una masa viscoelástica de tipo gel moliéndolos y presionando el material picado a través de una serie de discos perforados con diámetros consecutivamente más pequeños de los respectivos agujeros. El rendimiento fue de 78,1 kg de masa de colágeno "concentrada".

40 6060,0 kg de esta masa "concentrada" se transfirió a un recipiente equipado con un agitador y una camisa de refrigeración. Se añadió agua (376,4 kg) y glicerina (2,15 kg) en agitación. Al mismo tiempo, el valor pH se ajustó con ácido clorhídrico a 2,9. La mezcla se pasó posteriormente a través de un homogeneizador, se desaireó y después se extruyó a través de una boquilla de rendija sobre una cinta transportadora, en la que la película de gel resultante pasó a través de un secador de túnel. Antes de entrar en la secadora, se neutraliza con amoníaco gaseoso, elevando así el valor pH del gel. Al final de la secadora, la película seca se pasó a través de una zona de rehidratación antes de enrollar.

#### **1.2 Producción como una película tubular de acuerdo con la invención**

50 La masa "concentrada" se fabricó de forma análoga a 1.1, pero la duración del tratamiento alcalino se redujo a 48 h. 60,0 kg de la masa de colágeno "concentrada" resultante se transfirieron a una amasadora y se diluyeron con amasado mediante la adición gradual de agua (36,0 kg) bajo el control estricto de la temperatura (<24 ° C). En paralelo, el valor pH de la masa de colágeno se ajustó a 2,8. La masa resultante se pasó a través de un homogeneizador y después se almacenó durante la noche para relajarse en 20 °C. Al día siguiente, la masa de colágeno obtenida de este modo se extruyó a través de una boquilla anular, produciendo de ese modo una película tubular sin fin. Para evitar que el tubo se colapse y para neutralizar el colágeno, una mezcla de aire y amoníaco gaseoso se inyectó en el tubo a la cabeza de la extrusión. A continuación, la película tubular inflada se transportó a través de una serie de duchas de lavado (agua) y, en el último baño de aspersion, se roció con una solución de 4 % de glicerina en agua. Finalmente, la película tubular se pasó a través de un secador de túnel al final de la cual se colocó plana entre rasquetas y se enrolló en los carretes. El procedimiento descrito en 1.2 se realizó dos veces

utilizando diferentes cabezales de extrusión para producir una película tubular con un diámetro de 60 mm y una con un diámetro de 115 mm.

Una fracción de las películas tubulares obtenido se abrió para producir una película plana.

### 1.3 Ajuste del valor de pH

5 El valor pH de las películas planas o tubulares resultantes de 1.1 o 1.2 se ajustó fuera de las líneas de extrusión en el laboratorio mediante el uso tampón de fosfato que contiene calcio y magnesio [solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (PAA H15-001) para alcanzar el intervalo fisiológico de pH 7,2 a pH 7,5. Para este fin, la película de colágeno correspondiente se lavó con el sistema de tampón en agitación durante un máximo de 5 días. El tampón se intercambiaba dos veces al día.

10 En un procedimiento alternativo, las membranas de colágeno obtenidas de acuerdo con 1.1 o 1.2 se sumergieron durante una hora en un tampón fosfato que contiene glicerina con un valor de pH de 7,3 (tampón fosfato: 15,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 71,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  y se disolvieron 492,9 g de glicerina en 7.722 g de agua destilada). Posteriormente, la película procesada se dejó escurrir y se colocó en un marco de estirado, donde se secó durante la noche a temperatura ambiente.

### 15 1.4 Procesamiento adicional opcional

Después de un corto equilibrado en agua destilada, la membrana de colágeno se procesó con 100% de acetona para precipitar las fracciones de proteínas solubles en agua. Después de la eliminación de la acetona, la membrana seca se lavó 3 veces durante una hora cada uno usando el tampón de fosfato que contiene magnesio y calcio (en g / l: KCl 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2; NaCl 8,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro 1,15;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en H15-001 0,132;  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en H15-001 0,1). Para eliminar la sal tampón, la película resultante se lavó de nuevo 3 veces durante una hora cada una en agua destilada.

### 20 1.5 Conformación y esterilización

Las películas planas o tubulares de colágeno secas obtenidas por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados (01/01 a 01/04) se cortaron en cualquier forma o se perforaron en hojas de cualquier forma o tamaño compatibles con las dimensiones de la película. Las láminas resultantes se esterilizaron de nuevo mediante irradiación beta o gamma a 25 kGy o 50 kGy. Las películas tubulares secas también se cortan en cortes y se irradian de la misma manera.

La siguiente tabla muestra los parámetros de algunas películas típicas obtenidas según los ejemplos 1.1 y 1.2:

Muestra	1	2	3
Fabricada de acuerdo con	1.1	1.2	1.2
Tipo de película	plana	tubular $\varnothing$ 60 mm	tubular $\varnothing$ 115 mm
Colágeno (% en p)	67	76	77
Nitrógeno de amida (% en peso basado en colágeno seco)	0,42	0,57	0,57
Agua (% en p)	15	12	12
Glicerina (% p)	15	10	6
Grasa (% p)	2	1	1
Cenizas (% p)	1	1	2
Valor de pH	5,1	4,2	3,8
Espesor de la película seca ( $\mu\text{m}$ )	20	75	115
Peso por unidad de área ( $\text{g}/\text{m}^2$ )	30	115	160
Resistencia a la tracción longitudinal ( $\text{N}/\text{mm}^2$ )	44	--*	--*
Resistencia a la tracción transversal ( $\text{N}/\text{mm}^2$ )	41	--*	--*
* -- = No determinado			

30 Se aplicaron los siguientes procedimientos de análisis:

La cuantificación de colágeno mediante la determinación del análogo en EP1676595 de hidroxiprolina/nitrógeno de amida (Geistlich Söhne AG) / Glicerina sobre HPLC / grasa a través de la extracción de Soxhlet / Sorbitol sobre HPLC / ceniza gravimétrica después de la incineración en un horno de mufla durante 5 horas a 600 ° C) / contenido en agua gravimétrica después del secado en el armario de secado a 150 °C / valor de pH cortando la película en

trozos pequeños, inserción de los fragmentos en una solución de NaCl 5% y medición usando un electrodo de vidrio después de 10 minutos / masa por unidad de superficie pesando un trozo de película de 10 cm x 10 cm con el equilibrio de humedad / resistencia a la tracción longitudinal (= en dirección máquina) y transversal por medio de una máquina universal de ensayo UTS (modelo 3/205, UTS Testsysteme GmbH) después de acondicionar el aire a 21 ° C / 60 % de humedad relativa del cuerpo de la muestra perforada y una velocidad de desplazamiento de 100 mm / min.

### **Ejemplo 2: Crioconservación de cardiomiocitos primarios adherentes**

El éxito de la crioconservación de células madre cultivadas y / o células cardíacas primarias, por ejemplo, cardiomiocitos es un requisito previo para las terapias celulares futuras en el campo de las enfermedades cardiovasculares.

La crioconservación de cardiomiocitos primarios que se cultivaron en adherencia en andamios biocompatibles ofrece varias ventajas con respecto a la supervivencia celular, la organización celular y la función biológica de las células en comparación con suspensiones de células individuales congeladas.

A fin de evaluar la crioconservación de los cardiomiocitos primarios adherentes, las células del corazón se aislaron de ratón fetal (E15) y se cultivaron en vehículo celular de colágeno preparado según el ejemplo 1 (véase la figura 5). A continuación, los armazones de las células sembradas se congelaron en nitrógeno líquido durante 3 semanas y se analizaron posteriormente después del proceso de descongelación.

Se prepararon corazones murinos fetales y se recogieron en tampón de solución salina equilibrada de Hanks (PAA, Pasching, Austria). Los ventrículos se diseccionaron y se incubaron en solución de digestión con papaína (DMEM / F12, PAA) que contiene 0,05 % (p / v) de DNasa I (Sigma, Frickenhausen, Alemania) y 0,2% (p / v) de papaína (Sigma) durante 30 a 60 min a 37 °C. Durante la incubación, los tejidos se trituraron cuidadosamente cada 15 min con una punta azul pulida al fuego. Para detener la reacción enzimática se añadió suero de caballo a una concentración final de 10 % (v / v). Después, el tejido ventricular se trituró con una punta amarilla pulida al fuego para obtener una suspensión de células. Esta suspensión celular se centrifugó a 200 g durante 5 min y el sedimento celular restante se resuspendió en medio DMEM / F12 suplementado con 1 0% (v / v) de FCS. Después de una segunda etapa de centrifugación, el número de células y la viabilidad se determinaron en un hemocitómetro con tinción con azul de tripán. A continuación, los cardiomiocitos se sembraron sobre vehículo celular de colágeno preparado en el ejemplo 1 a una densidad de entre 20.000 a 100.000 células por cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 7 días en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada 3 días y consistía en DMEM / F12 (PAA), 10 % de suero de caballo adulto (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), penicilina (100 U / ml, PAA), estreptomycin (100 µg / ml, PAA), L-glutamina (2 mM, PAA), mezcla de insulina / transferrina / selenito (1:100, invitrogen), Albumax (1 mg / ml, invitrogen), hidrocortisona (1 µM, Sigma), glucagón (14,3 nM, Sigma), 3,3', 5'-triyodo-L-tironina (1 nM, Sigma), ascorbato-2-fosfato (200 µM, Sigma), ácido linoleico (20 µM, Sigma), estradiol (10 nM, Sigma). En estas condiciones de cultivo, los cardiomiocitos adherentes demostraron su capacidad de movimiento autónomo.

Para la crioconservación, los armazones sembrados con células se transfirieron a criotubos (Nalge Nunc International Corp., Roskilde, Dinamarca) y el medio de cultivo se reemplazó por criomedio (HEPES tamponado suplementado con DMEM con penicilina / estreptomycin, 20% (v / v) de FCS y 10% (v / v) de DMSO (Sigma)). Los armazones que contienen criotubos se enfriaron usando un recipiente de congelación estandarizado ("Mr. Frosty", Nalge Nunc International Corp., Roskilde, Dinamarca). El proceso de refrigeración, almacenamiento y descongelación se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los armazones sembrados de células se almacenaron durante 22 días en nitrógeno líquido por debajo de -150 °C. Después de esto, se descongelaron las construcciones y se lavaron 3 veces en medio de cultivo pre-calentado. Dentro de los dos primeros días después de la descongelación, los cultivos de cardiomiocitos comenzaron sus contracciones de las células autónomas. La contractilidad de los vehículos celulares de colágeno sembrados con células descongeladas (26 contracciones por minuto) se documentó por microscopía en vídeo.

Esta es la primera referencia en la técnica en la que los cardiomiocitos sembrados sobre un vehículo celular de colágeno reinician su contracción autónoma de la célula después de haber sido sometidos a crioconservación y a la posterior descongelación.

### **50 Ejemplo 3: Crioconservación a largo plazo de las células adherentes SAOS-2**

Para analizar la crioconservación a largo plazo de las células adherentes, la línea celular de osteosarcoma Saos-2 se cultivó en un vehículo celular de colágeno preparado según el ejemplo 1 y se almacenó durante 230 días en nitrógeno líquido. Después del proceso de descongelación, las células adherentes se analizaron mediante un ensayo de proliferación celular.

55 Las células SAOS-2 se sembraron sobre el vehículo celular de colágeno del Ejemplo 1 a una densidad de 25.000 por cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 3 días en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo consistió en DMEM tamponado con HEPES (PAA) suplementado con penicilina / estreptomycin y 10 % (v / v) de

5 FCS. Para la crioconservación, estos armazones sembrados con células se transfirieron a criotubos y el medio de cultivo se reemplazó por criomedio (HEPES tamponado suplementado con DMEM con penicilina / estreptomicina, 20% (v / v) de FCS y 10% (v / v) de DMSO (Sigma)). Los criotubos que contienen el vehículo celular de colágeno e enfriaron usando un recipiente de congelación estandarizado ("Mr. Frosty", Nalge Nunc International Corp.). El proceso de refrigeración, almacenamiento y descongelación se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

10 Los armazones sembrados con células se almacenaron en nitrógeno líquido a menos de -150 °C durante 230 días. A continuación, se descongelaron las construcciones, se lavaron 3 veces en medio de cultivo precalentado, y se mantuvieron durante 4 días adicionales en cultivo. Para analizar la capacidad de proliferación de las células descongeladas, se realizó un ensayo de proliferación con bromodesoxiuridina (BrdU) (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Por tanto, las células adherentes SAOS-2 se incubaron durante una hora con BrdU (10 µM), se fijaron con etanol al 70 % (v / v) enfriado con hielo y se tiñeron con inmunofluorescencia con BrdU. La cuantificación de las células positivas a BrdU reveló que el 41 % ± 7 de la población total de células que incorporaron BrdU durante la fase S del ciclo celular dentro de 1 hora del cultivo (véase la figura 6).

15 Los datos demuestran que las células adherentes sembradas en el vehículo celular de colágeno mantienen su capacidad de proliferación en un alto nivel, incluso después de la crioconservación a largo plazo.

**Ejemplo 4: Comparación del rendimiento de diversas matrices de colágeno en cultivo celular de las células Saos-2**

20 Rothamel et.al, (2003 Clin. Oral Imbl. Res. 15:443-449) informaron sobre las diferentes representaciones de membranas de colágeno disponibles comercialmente en experimentos de cultivo celular. Más específicamente, se sembraron células Saos-2 (200 / mm<sup>2</sup>) en cuatro membranas de colágeno diferentes y se contaron el número de células presentes en la membrana después de 7 días de cultivo. Los resultados obtenidos se resumen del siguiente modo:

	Recuento de células / mm <sup>2</sup> en la final de la prueba *	% de control
Control (CD)	453	100
BioGide (BG)	94	21
BioMend (BM)	0	
Ossix (OS)	41	9
TutoDent (TD)	84	19
* Para detalles metodológicos véase la literatura original		

25 En comparación con el cultivo en plástico tratado de cultivo de células, así como al número inicial de células sembradas, el recuento de células en las membranas de colágeno investigadas fue muy inferior (0 % - 21 %). Por otra parte, se informó de que la forma de las células era redondeada, lo que indica una baja eficiencia adhesión a la matriz.

30 Para evaluar el rendimiento de otro vehículo celular de colágeno disponible en el mercado, "Collagen Vitrigel" (Asahi Glass Co., LTD., Tokio, Japón), se sembraron células Saos-2 (250 / mm<sup>2</sup>) y se cultivaron durante 6 días siguiendo las instrucciones del folleto del producto (n = 4):

	Recuento de células / mm <sup>2</sup> en la final de la prueba *	% de control
Control (CD)	1269	100
Collagen Vitrigel	579	46

35 El cultivo en "Collagen vitrigel" también resultó en un número de células significativamente menor (46 %) en comparación con el plástico tratado con cultivo celular. Junto con la observación de que las células también revelaron una morfología redonda, esta matriz parece tener capacidades limitadas para la unión y la expansión de células adherentes.

En un experimento análogo se sembraron células Saos-2 (250 / mm<sup>2</sup>) en vehículo celular de colágeno (CCC) que forma parte del procedimiento de crioconservación de la presente invención. Después de 4 días de cultivo se

obtuvieron los siguientes datos (n = 6):

	Recuento de células / mm <sup>2</sup> en la final de la prueba *	% de control
Control (CD)	369	100
Vehículo celular de colágeno (CCC)	315	85

5 Después de 4 días de cultivo el número de células en la CCC fue sólo ligeramente inferior (85 %) en comparación con el plástico tratado de cultivo de células. En el microscopio, las células mostraron una forma alargada plana que corrobora los hallazgos de que la matriz de CCC ofrece excelentes condiciones ambientales para estimular la unión y la proliferación de las células de dependientes de la adherencia.

10 En general, los resultados revelan que hay enormes diferencias en el rendimiento de diferentes matrices de colágeno en cultivo celular. El uso de un vehículo celular de colágeno (CCC) con las características específicas abordadas en el ejemplo 1 representa una mejora significativa sobre el cultivo de células en otras matrices de colágeno. Su uso como una matriz en la crioconservación, por lo tanto, representa una mejora metodológica significativa en comparación con la técnica anterior.

**Ejemplo 5: Uso de "Collagen vitrigel" (Asahi Glass Co., LTD., Tokio, Japón) en un experimento de crioconservación**

15 Células SAOS-2 se sembraron a una densidad de 25.000 / cm<sup>2</sup> en una matriz de colágeno conocida como "Collagen vitrigel" (Asahi Glass Co., LTD., Tokio, Japón) y se cultivaron durante 4 días en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo consistió en DMEM tamponado con HEPES (PAA) suplementado con 1 % de penicilina / estreptomicina, 1 % de L-glutamina y 10 % (v / v) de FCS. Para la crioconservación, los denominados armazones de células sembradas se cortaron del anillo de soporte de plástico y se transfirieron en a criotubos. Además, el procedimiento era análogo al divulgado en el Ejemplo 3. Los armazones sembrados con células se almacenaron en nitrógeno líquido por debajo de -150 °C durante 8 días. A continuación, se descongelaron las construcciones, se lavaron 3 veces en medio de cultivo precalentado, y se mantuvieron durante 3 días adicionales en cultivo. Se encontraron 984.000 células muertas y 112.600 células vivas en el sobrenadante después del lavado. La tinción inmunohistoquímica con BrdU y DAPI reveló que no había células que se adhieren a al vehículo celular por más tiempo.

25 Al comparar los resultados de los ejemplos 2 y 3 con los obtenidos en el presente ejemplo 5, la superioridad de un procedimiento de crioconservación incluyendo específicamente el vehículo celular de colágeno como se describe en el presente documento se hace evidente.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la crioconservación y almacenamiento a largo plazo de uno o varios tipos de células, construcciones celulares o ensamblajes tridimensionales de tejidos complejos, que comprende:
  - 5 a) Sembrar uno o varios tipos de células o diferentes tipos de células que conforman las construcciones de células o los ensamblajes de tejido tridimensional sobre un vehículo celular estable de colágeno que tiene un espesor de menos de 150  $\mu\text{m}$ , una masa por unidad de área de 10 a 170  $\text{g} / \text{m}^2$  y la siguiente composición:
    - i) colágeno [% en peso]: 30 a 80,
    - ii) nitrógeno de amida [% en peso]: de 0,06 a 0,7,
    - iii) poliol [% en peso]: de 0 a 50,
    - 10 iv) lípidos [% en peso]: de 0 a 20,
    - v) agua [% en peso]: 5 a 40,
  - b) cultivar las células hasta su adhesión al vehículo celular de colágeno,
  - c) lavar las células no adherentes,
  - d) congelar el vehículo celular de colágeno con células adherentes en un medio de congelación.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que un tipo o varios tipos de células que forman una construcción de célula deseada o ensamblajes de tejido tridimensionales se siembran en ambos lados del vehículo celular de colágeno.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el colágeno del vehículo celular de colágeno está reticulado.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el espesor del vehículo celular de colágeno es menor de 80  $\mu\text{m}$  o menor de 40  $\mu\text{m}$ .
5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el colágeno es colágeno de tipo I o una mezcla de colágeno I y colágeno III o una mezcla de colágeno I y / o III con elastina.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los polioles son seleccionados de glicerol, etilenglicol, butenodiolos, propenodiolos, sorbitol u otros hexitoles, xilitol u otros pentitoles y mezclas de los mismos.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los lípidos son aceites vegetales.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el vehículo celular de colágeno puede estar recubierto con proteínas estructurales de la matriz extracelular, preferiblemente lamininas, fibronectina, elastina o ácido hialurónico o con apatita o con moléculas funcionales seleccionados de factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de orientación o anticuerpos.
- 30 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el medio de congelación comprende dimetilsulfóxido (DMSO), trehalosa, glicerina o hidroxietilalmidón (HES).
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las células adherentes son células eucariotas o procariotas o células eucariotas o procariotas genéticamente modificadas.
- 35 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que las células eucariotas son células vegetales, animales o fúngicas.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las células animales son células de mamíferos, ya sea células primarias o células inmortalizadas, preferiblemente células humanas.
- 40 13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que las células son seleccionadas de células madre tales como líneas de células madre embrionarias no humanas, células madre pluripotenciales inducidas, células madre mesenquimatosas, células madre endoteliales, células madre hematopoyéticas, células madre neurales, células madre de la cresta neural o células madre gastrointestinales; células somáticas, tales como células endoteliales, células epiteliales de estómago e intestino, células epiteliales mamarias, melanocitos, células epiteliales pulmonares, células epiteliales renales, queratinocitos, células uroteliales, hepatocitos, células del cristalino de la córnea, osteoblastos, osteocitos, odontoblastos, condrocitos, células de ligamentos, células tendinosas, células de la hipófisis, células de las glándulas salivales, células de la glándula suprarrenal, células del páncreas exocrino y endocrino, células de Leydig, adipocitos, fibroblastos, células de la retina, neuronas dopaminérgicas, neuronas GABAérgicas, neuronas glutaminérgicas, neuronas colinérgicas, neuronas adrenérgicas, astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, células de músculo liso, células de
- 45

- músculo esquelético, cardiomiocitos, linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células asesinas naturales, células M o microglía; células modificadas genéticamente; líneas celulares de cáncer, tales como HeLa, CCF-STTG1, Hep G2, SK-MEL-5, Saos-2 o WERI-Rb-1; líneas celulares inmortalizadas como Nuli, CuFi, CHON-001, BJ-5ta, hTERT-HME1 (ME16C), hTERT-HPNE, hTERT RPE-1, NeHepLxHT o células madre embrionarias humanas; células vegetales, tales como células de *Brownanthus corallinus*, *Carpanthea pomeridiana*, *Conophytum meyeriae*, *Delosperma ecklonis*, *Sesuvium portulacastrum*, *Sphalmanthus trichomotus*, *Amaranthus retroflexus*, *Pleuropetalum darwinii*, *Amaryllidaceae*, *Crinum x powellii hort.*, *Catharanthus longifolius*, *Dictyophleba leonensis* o *Ervatamia coronaria*; células fúngicas tales como *Dacrymyces deliquescens*, *Fennellomyces linderi*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Tolypocladium inflatum*, *Radiomyces spectabilis*, *Wallemia sebi*, *Lophodermium seditiosum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Debaromyces japonicus*, *Fellomyces polyborus*, *Brettanomyces abstinentis*, *Hyphopichia burtonii* o *Kloeckera brevis*; células bacterianas tales como *Acidobacterium capsulatum*, *Escherichia coli*, *Saccharococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Enterococcus faecalis*.
- 5
- 10
14. Ensamblaje de células-vehículo celular de colágeno o construcción celular artificial congelada o ensamblaje de tejido complejo tridimensional obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el vehículo celular de colágeno, el ensamblaje de células o la construcción celular artificial congelada o el ensamblaje de tejido complejo tridimensional presentan la misma estructura tridimensional después de la descongelación.
- 15
15. El ensamblaje de células-vehículo de colágeno descongelado, la construcción de célula artificial o el ensamblaje de tejido complejo tridimensional de acuerdo con la reivindicación 14 para uso en medicina regenerativa.
- 20
16. Uso del ensamblaje células-vehículo de colágeno descongelado, construcción de célula artificial descongelada o ensamblaje de tejido complejo tridimensional de acuerdo con la reivindicación 14 para la investigación básica o para los sistemas de pruebas in vitro tal como los sistemas de prueba de sustancias farmacológicas, productos químicos o cosméticos.

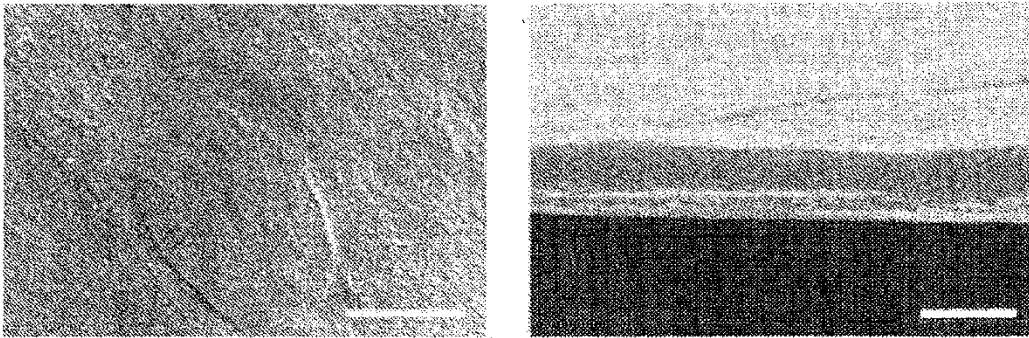


FIG. 1



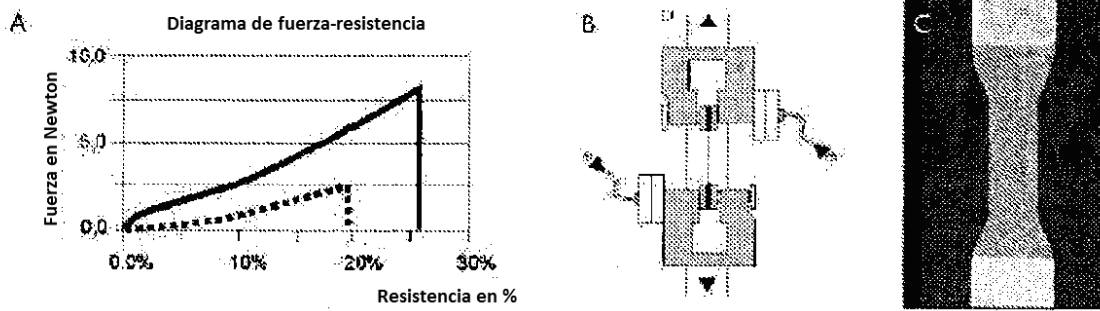


FIG. 2

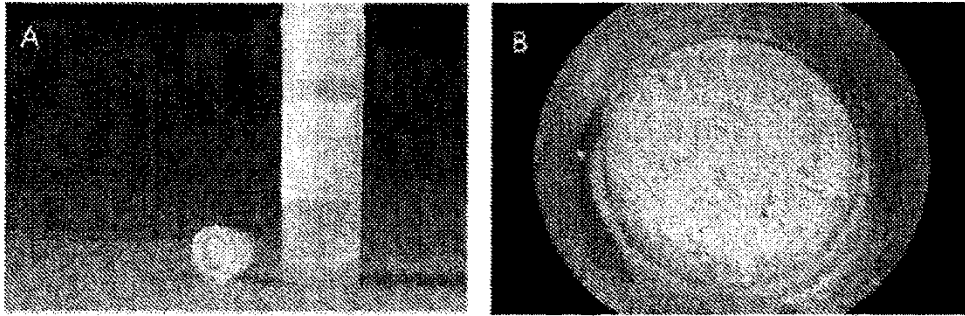


FIG. 3

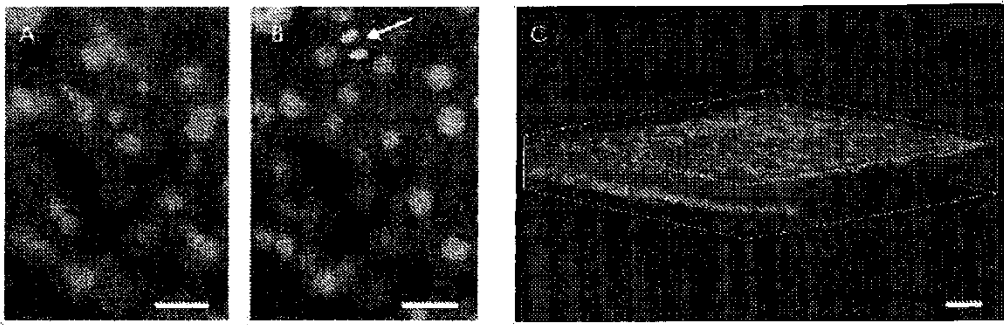
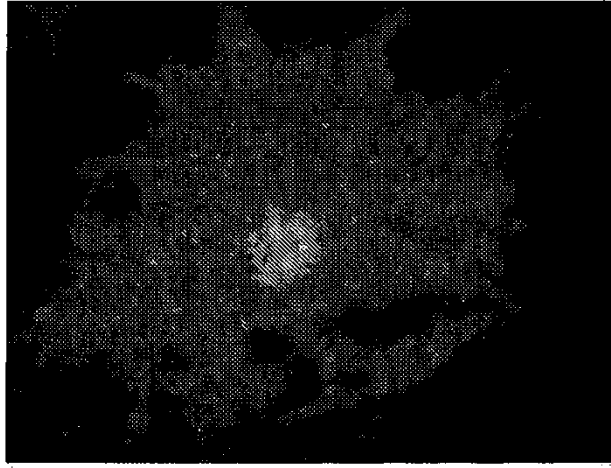


FIG. 4

A)



B)

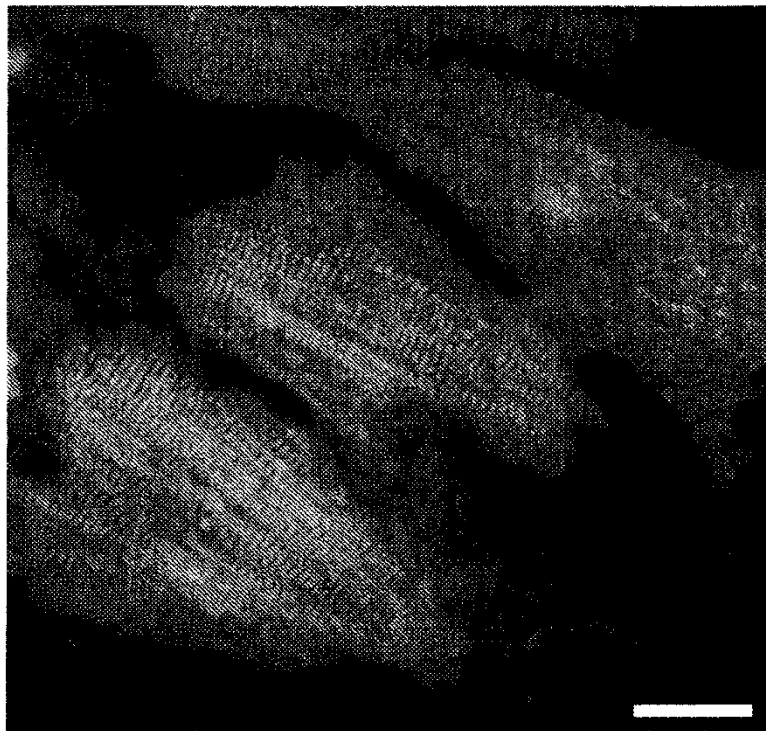


FIG. 5

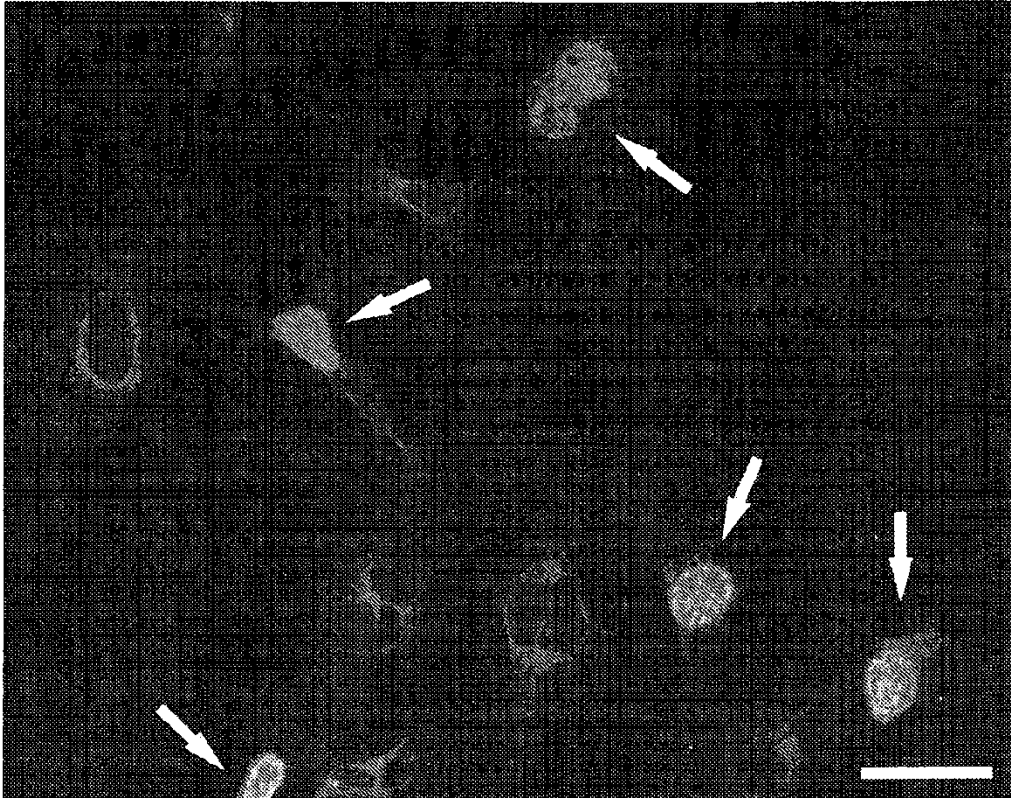


FIG. 6