

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 747**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006 E 06832864 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1950283**

54 Título: **Disolución acuosa para conservación de células**

30 Prioridad:

**17.11.2005 JP 2005333203**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.09.2015**

73 Titular/es:

**NIPPON ZENYAKU KOGYO CO., LTD. (100.0%)  
1-1 Aza-Tairanoue, Sasagawa Asaka-machi,  
Koriyama-shi  
Fukushima 963-0196, JP**

72 Inventor/es:

**YAMASHIRO, NAOTO;  
SAZE, KOHICHI;  
OHNEDA, OSAMU y  
NAGANO, MASUMI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 544 747 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**

Disolución acuosa para conservación de células.

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una disolución acuosa para conservación de células capaz de conservar células durante un largo tiempo por una simple operación y más específicamente, a una disolución acuosa para conservación de células sin componente de origen animal natural tal como un medio basal o suero.

**Técnica anterior**

10 Convencionalmente, se ha realizado criopreservación para evitar el deterioro celular de células cultivadas con pasajes sucesivos y contaminación por gérmenes a fin de que se puedan utilizar las células durante largo tiempo. Como tal método general para conservación de células se conoce un método de conservación de células en nitrógeno líquido (-196°C) por: suspensión de las células en un medio de cultivo que contiene sulfoxido de dimetilo (de ahora en adelante referido como DMSO) y suero; dispensación de la suspensión en un criotubo o una ampolla y enfriamiento de la suspensión con un congelador programado.

15 Se han preparado diversas composiciones de disoluciones de conservación para criopreservación dependiendo de los tipos de células que se tienen que conservar. Por ejemplo, se ha desarrollado un medio de cultivo sin suero para criopreservación para células cultivadas que se tienen que cultivar en un medio de cultivo sin suero (véase, por ejemplo, el Documento de Patente 1). Además, una disolución para criopreservación varía en calidad debido a diferentes lotes de suero. Además, los componentes esencialmente innecesarios para la conservación de células, tales como diversas clases de citocinas, factores de crecimiento y hormonas contenidos en el suero pueden cambiar la propiedad de las células conservadas, así se han desarrollado disoluciones para criopreservación sin usar suero (véase, por ejemplo, el Documento de Patente 2).

20 Sin embargo, la disolución de criopreservación sin suero descrita en el Documento de Patente 1 incluye un medio basal que contiene una variedad de componentes. Por ejemplo, un medio de cultivo RPMI1640 contiene un gran número de aminoácidos no definidos de origen. La influencia de esos componentes del medio de cultivo sobre las células conservadas es también desconocida. Además, se usa albúmina purificada en el Documento de Patente 2. Sin embargo, podía estar contaminada por diversos componentes dependiendo del grado de refinamiento de la albúmina, así permanecen los problemas que conciernen a influencias sobre las células.

25 Considerando las potenciales influencias sobre las células que se tienen que conservar en disolución que contiene suero o medio basal, especialmente para uso médico, se desea el desarrollo de una disolución de conservación de células bien definida químicamente exenta de componentes de origen animal naturales. Dicha disolución de conservación de células incluye componentes definidos de origen y así se puede esperar que presente la ventaja de que se mantenga constante la calidad de la disolución.

30 Desafortunadamente, la disolución de conservación de células convencional requiere medio basal, suero o sustitución de suero, tal como albúminas de suero, albúminas purificadas y similares para realizar conservación de células a largo plazo y estable. Por lo tanto, una disolución de conservación de células que esté totalmente exenta de componente de origen animal natural aún no ha sido obtenido.

Documento de Patente 1: patente japonesa JP 63-216476A

Documento de Patente 2: patente japonesa JP 2002-233356 A

**Descripción de la invención****40 Problema que se tiene que resolver mediante la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar una disolución acuosa para conservación de células exenta de componente de origen animal, natural, tal como un medio basal o suero. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para conservación de células usando la disolución de conservación acuosa.

Medios para resolver los problemas.

45 Como resultado de estudios extensos para resolver los problemas anteriores, los autores de la presente invención han completado finalmente la presente invención mediante el descubrimiento de una disolución de conservación acuosa que permite que las células después de la conservación muestren una alta tasa de supervivencia por ajuste de otros componentes y sus concentraciones excluyendo cualquier componente de origen animal, natural, tal como un medio basal o suero. Además, los autores han completado un método para conservación de células mediante la preparación de células con la disolución de conservación acuosa de la presente invención.

50 La presente invención se refiere a un método para conservación de células usando una disolución acuosa para conservación de células de acuerdo con uno cualquiera de los siguientes artículos (4) a (17), en el que la disolución

## ES 2 544 747 T3

acuosa está exenta de componentes de origen animal, naturales:

(4) una disolución acuosa para conservación de células que contiene las siguientes composiciones (a) a (e) y que tiene un pH de 6,5 a 9,0:

(a) 1,0 a 20,0 % p/v de un crioprotector;

5 (b) 1,0 a 10,0 % p/v de azúcares;

(c) 0,1 a 1,0 % p/v de un espesante;

(d) 0,01 a 1,0 % p/v de un ajustador de pH y

(e) una cantidad apropiada de agua;

10 (5) una disolución acuosa para conservación de células de acuerdo con el artículo (4), en que una presión osmótica es 1.000 mOsm o más;

(6) una disolución acuosa para conservación de células según el artículo (5) anterior, en que la presión osmótica es 1.000 a 2.700 mOsm;

(7) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos (4) a (6), en que el espesante es carboximetilcelulosa (CMC), carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na) o un polímero de ácido orgánico;

15 (8) una disolución acuosa para conservación de células según los artículos anteriores (7), en que el polímero de ácido orgánico es poliacrilato de sodio;

(9) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (8), en que el crioprotector es sulfóxido de dimetilo (DMSO, por sus siglas en inglés) o propilenglicol;

20 (10) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (9), en que el azúcar es glucosa;

(11) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (10), en que el ajustador de pH es un tampón de fosfato;

(12) una disolución acuosa para conservación de células que contiene las siguientes composiciones (a) a (e) y que tiene un pH de 6,5 a 9,0:

25 (a) 5,0 a 12,0 % p/v de DMSO;

(b) 3,0 a 5,0 % p/v de glucosa;

(c) 0,2 a 0,7 % p/v de un espesante;

(d) 0,01 a 1,0 % p/v de un tampón de fosfato y

(e) una cantidad apropiada de agua;

30 (13) una disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de los artículos anteriores (4) a (12), en que las células que se tienen que conservar son cualquiera de: linfocitos, células del bazo, timocitos, células animales, células madre somáticas y células madre embrionarias;

(14) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (13), usándose la disolución para aplicaciones médicas;

35 (15) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (14), en que el método para conservación de células es criopreservación;

(16) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (15), en que la tasa de supervivencia de las células después de la conservación es al menos 80%;

40 (17) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (15), en que la capacidad de proliferación de las células se mantiene después de conservación durante 4 días a -80 °C y después de 72 días a -196 °C y

(18) una disolución acuosa para conservación de células según uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (15), en que la capacidad de diferenciación de las células después de la conservación se mantiene.

45 (19) un método para conservación de células incluyendo: dispersar las células en la disolución acuosa para conservación de las células de acuerdo con uno cualquiera de los artículos anteriores (4) a (15); dispensar las

células en envases y someter las células a criopreservación o

(20) un método para conservar las células de acuerdo con el artículo (19) anterior, en que el número de las células dispensadas es  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  células/ml.

### Efectos de la invención

5 La disolución acuosa para conservación de las células establecida por la presente memoria está exenta de componente de origen animal natural tal como un medio basal o suero, a fin de que se pueda usar con seguridad para aplicaciones médicas debido a su baja posibilidad de estar contaminada con impurezas para las células conservadas tales como virus de la leucemia bovina, prión y similares. Además, un método de conservación usando la disolución acuosa para conservación de las células de la presente invención puede proporcionar una tasa de supervivencia de las células alta y/o mantener el potencial de proliferación y capacidad de diferenciación de las células. Además, las células se pueden presentar a un coste bajo, debido a que la disolución está exenta de componentes no definidos de origen, por ejemplo, medio basal, suero y similares.

### Breve descripción de los dibujos

15 La Fig. 1a es un diagrama que ilustra los números de las células supervivientes conservadas en cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K (Ejemplo 6).

La Fig. 1b es un diagrama que ilustra el número de células proliferantes conservadas en cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K (Ejemplo 6).

La Fig. 2a es un diagrama que ilustra la diferenciación de células conservadas en cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K para osteoblastos (Ejemplo 6).

20 La Fig. 2b es un diagrama que ilustra la diferenciación de células conservadas en cada una de las disoluciones acuosas para conservación de las células M, I y K para adipocitos (Ejemplo 6).

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

Una disolución acuosa para conservación de las células de la presente invención se refiere a una disolución acuosa que contiene un espesante, un crioprotector y azúcares al tiempo que está exenta de cualquier componente de origen animal, natural, para conservar las células. Además, la disolución se refiere a una disolución acuosa que contiene un ajustador de pH pero está exenta de todo componente de origen animal, natural. Esto es debido a que se desconoce la influencia del componente de origen animal natural sobre las células que se tienen que conservar. El elemento característico de la disolución acuosa para conservación de células de la presente invención es que la composición de la disolución incluye sólo componentes bien definidos de origen que no afecten a las células que se tienen que conservar. Así, es deseable que no esté incluido ningún componente de origen animal, natural, en la disolución con independencia de una combinación de los componentes de origen animal, naturales.

Los componentes de origen animal, naturales, que no están incluidos deseablemente en la disolución acuosa para conservación de células de la presente invención, incluyen componente de origen animal, natural, usado convencionalmente para la conservación y cultivo de células y otro componente de origen animal, natural. Por ejemplo, se incluyen suero, medio basal de origen no definido y similares que se puedan usar para cultivo celular. Además, también se incluyen albúmina purificada, proteína purificada, yema de huevo de pollo, emulsión de grasa, lactato (por ejemplo, sal de lactato y leche materna) y similares. Ejemplos del suero incluyen suero bovino adulto, suero de ternera, suero de ternera neonatal y suero fetal bovino, etcétera. Ejemplos del medio basal incluyen un medio RPMI, un medio MEM, un medio HamF-12, un medio DM-160 y similares. En otras palabras, la disolución acuosa para conservación de las células de la presente invención se refiere a una disolución acuosa que está exenta de cualquier componente de origen animal, natural, como se ejemplificó anteriormente pero contiene productos químicos sintéticos solos o tanto productos químicos como componentes procedentes de plantas.

La disolución acuosa para conservación de células de la presente invención se refiere a una combinación de un espesante, un crioprotector y azúcares. Además, la disolución se puede combinar además con un ajustador de pH. Esos componentes se usan en el estado de una disolución acuosa. Sin embargo, cualquier tipo de tal empleo corresponde al uso de la presente invención que se disuelve en agua o similar polvo, que se somete a liofilización o similar, y después se usa como una disolución acuosa y que lo que se prepara previamente en un estado acuoso se usa directamente.

El espesante de la presente invención puede ser cualquiera de los espesantes siempre que el espesante pueda constituir una disolución acuosa para conservación de células capaz de conservar adecuadamente las células incluso en una disolución acuosa completamente exenta de componente de origen animal, natural. Ejemplos del espesante incluyen carboximetilcelulosa (de ahora en adelante referido como CMC), carboximetilcelulosa-Na (de ahora en adelante referida como CMC-Na), polímeros de ácido orgánico, alginato de propilenglicol y alginato de sodio y similares. De esos, se usa preferiblemente CMC o CMC-Na. En particular, se usa preferiblemente CMC-Na. Además, de los polímeros de ácido orgánico, se usa preferiblemente poliácido acrílico. El contenido de espesante

en la disolución acuosa para conservación de células es 0,1 a 1,0 p/v%, preferiblemente 0,1 a 0,5 p/v%, en particular preferiblemente 0,25 p/v%.

5 El crioprotector de la presente invención puede ser cualquiera de los crioprotectores siempre que el crioprotector pueda constituir una disolución acuosa para conservación de células capaz de conservar adecuadamente las células incluso en una disolución acuosa completamente exenta de cualquier componente de origen animal, natural. Ejemplos del crioprotector incluyen DMSO, glicerol, propilenglicol y 1-metil-2-pirrolidona y similares. De esos, se usan preferiblemente DMSO y propilenglicol. En particular, se usa preferiblemente DMSO. El contenido del crioprotector en la disolución acuosa para conservación de células es 5 a 12 % p/v. En el intervalo, es preferible particularmente un contenido de 10 % p/v.

10 El azúcar de la presente invención puede ser cualquiera de los azúcares siempre que el azúcar pueda constituir una disolución acuosa para conservación de células capaz de conservar adecuadamente las células incluso en una disolución acuosa completamente exenta de cualquier componente de origen animal, natural. Ejemplos del azúcar incluyen glucosa, trehalosa, sacarosa y lactosa y similares. De esos, se usa preferiblemente en particular glucosa. El contenido de los azúcares en la disolución acuosa para conservación de células es 3 a 5 % p/v y en el intervalo, es preferible en particular un contenido de 3 % p/v.

15 El ajustador de pH de la presente invención puede ser cualquiera de los ajustadores de pH siempre que el ajustador de pH pueda constituir una disolución acuosa para conservación de células capaz de conservar adecuadamente las células incluso en una disolución acuosa completamente exenta de componente de origen animal, natural. Ejemplos del ajustador de pH incluyen bicarbonato de sodio, HEPES y un tampón de fosfato, etc. Además, cuando una disolución patrón básica (BSS, por sus siglas en inglés) no contiene tampón de fosfato, también se puede usar una a la que se ha añadido cloruro de sodio, que presenta una función de impartir una capacidad amortiguadora alrededor de un valor de pH adecuado para las células. De esos, se usa preferiblemente en particular el tampón de fosfato. El ajustador de pH se usa preferiblemente en una cantidad apropiada para ajustar el pH de la disolución acuosa para conservación de células a aproximadamente 6,5 a 9,0, más preferiblemente 7,0 a 8,5. A propósito, el tampón de fosfato de la presente invención se refiere a, por ejemplo, cloruro de sodio, fosfato monosódico (anhidro), fosfato de monopotasio (anhidro), fosfato disódico (anhidro), fosfato trisódico (anhidro), cloruro de potasio o dihidrógenofosfato de potasio (anhidro), etc. En particular, se usa preferiblemente cloruro de sodio, fosfato monosódico (anhidro), cloruro de potasio o dihidrógenofosfato de potasio (anhidro).

20 El contenido del ajustador de pH en la disolución acuosa para conservación de células es preferiblemente 0,01 a 1,0 % p/v, más preferiblemente 0,05 a 0,5 p/v%.

La presión osmótica de la disolución acuosa para conservación de células de la presente invención es preferiblemente 1.000 mOsm o más, más preferiblemente 1.000 a 2.700 mOsm para mantener la realización de la disolución como una disolución de conservación.

25 La composición de la disolución acuosa para conservación de células de la presente invención puede ser cualquier combinación de los componentes ejemplificados específicamente enumerados anteriormente siempre que las células se puedan conservar de manera adecuada. Ejemplos de la composición incluyen: una disolución acuosa para conservación de células preparada por mezclamiento de cantidades apropiadas de CMC como espesante, DMSO como crioprotector, glucosa como azúcar, bicarbonato de sodio y HEPES como ajustador de pH y una disolución acuosa para conservación de células obtenida por adición adicional de un tampón de fosfato a la disolución anterior. Además, la composición puede incluir CMC-Na o un polímero de ácido orgánico en vez de CMC como espesante. Alternativamente, la composición puede incluir propilenglicol, etc. en vez de DMSO como crioprotector.

30 La disolución acuosa para conservación de las células de la presente invención es deseablemente una que tiene una tasa de supervivencia de 80% o más, preferiblemente 90% o más, más preferiblemente 100% después de conservación durante al menos una semana, aunque la tasa de supervivencia puede variar dependiendo de las células que se tienen que conservar.

35 Un método para conservación de células de la presente invención puede ser cualquiera de los métodos con que las células se puedan conservar de manera adecuada. Por ejemplo, el método puede implicar: dispersar las células que se tienen que conservar en la disolución acuosa para conservación de las células de la presente invención; dispensar la suspensión a un envase tal como una ampolla o un criotubo; congelar de manera preliminar la suspensión durante 20 a 30 minutos y después someter la suspensión a crioconservación a -80°C o -196°C. Según sin un congelador programado.

40 El número de células conservadas en la disolución acuosa para conservación de células se ajusta a, pero no se limita específicamente a, preferiblemente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  células/ml, más preferiblemente  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/ml.

45 Las células que se tienen que conservar pueden ser cualquier clase de células siempre que las células se puedan conservar con la disolución acuosa para conservación de células de la presente invención. Ejemplos de tales células incluyen estirpes celulares establecidas, linfocitos, células de bazo, timocitos, huevos fertilizados, células de mieloma, células madre somáticas, células madre mesenquimales y células madre embrionarias (células ES), etc. de

diversos animales, en los que se excluyen huevos fertilizados humanos y células madres embriónicas humanas (células ES humanas). En particular, el animal puede ser ratón, (por ej., BALB/C, ICR y C3H), rata, conejo, conejillo de indias, gato, vaca, cabra, perro, cerdo o ser humano, etc. Además, la disolución acuosa para conservación de células de la presente invención se puede usar no sólo para la conservación de células sino también para la conservación de tejidos y de órganos.

5 De ahora en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

#### Ejemplo 1

Preparación de disolución acuosa para conservación de células.

10 1. Preparación de cada componente.

Los respectivos componentes de una disolución acuosa para conservación de células se prepararon como se describe a continuación:

(1) Espesante

a. CMC

15 Se preparó CMC en un volumen total de 750 ml por disolución de 5 g de carboximetilcelulosa (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en agua destilada a alta temperatura o a temperatura normal.

b. CMC-Na

Se preparó CMC-Na en un volumen total de 750 ml por disolución de 5 g de carboximetilcelulosa de sodio (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en agua destilada a alta temperatura o a temperatura normal.

20 c. Poliacrilato de sodio

Se preparó poliacrilato de sodio en un volumen total de 750 ml por disolución de 5 g de poliacrilato de sodio (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en agua destilada.

(2) Crioprotector

d. Dimetilsulfóxido (DMSO)

25 Se usaron cien ml de dimetilsulfóxido (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

e. Propilenglicol

Se usaron cien ml de propilenglicol (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

(3) Azúcares, ajustadores de pH, etc.

f. Tampón de fosfato

30 Se usó un tampón de fosfato (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.).

g. Disolución patrón básica (de ahora en adelante BSS)

Se preparó BSS en un volumen total de 150 ml añadiendo 30,0 g de glucosa, 0,8 g de bicarbonato de sodio, 0,36 g de HEPES (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 1,576 g de PBS (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) a agua doblemente destilada.

35 (4) Medio basal (para comparación).

h. RPMI1640

Se usó RPMI1640 (fabricado por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) en una cantidad de 1,576 g.

2. Preparación

40 Se mezclaron los respectivos componentes preparados en el artículo 1 anterior al tiempo que se agitaba para preparar cada composición como se describe en la Tabla 1. Se esterilizaron las respectivas composiciones por filtración a través de una serie de tamaños de poro decrecientes de filtro de 1,0  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$  y 0,22  $\mu\text{m}$  (fabricado por Millipore Co., Ltd.).

[Tabla 1]

	Componente	Disolución acuosa para conservación de células (g/l)												Comparación M
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
Espesante	CMC	5	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	
	CMC-Na	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	
	Polímero de ácido orgánico	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	
Crioprotector	DMSO	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-	100
	Propilenglicol	-	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-
Azúcares, ajustadores de pH	Tampón de fosfato	-						1,576						-
	BSS	Glucosa	30											30
		Bicarbonato de sodio	0,8											0,8
		HEPES	0,36											0,36
Medio mínimo esencial	RPMI1640	-											1,576	
Agua	Agua destilada	Cantidad adecuada												

Ensayo de realización y ensayo de especificación de disolución acuosa para conservación de células.

1. Ensayo de realización.

- 5 La realización de una disolución acuosa para conservación de células fue investigada midiendo la tasa de supervivencia de células en conservación.

Se recogieron células X63Ag8-6.5.3 (mieloma de ratón) precultivadas en un medio de cultivo RPMI1640 al que se añadió FBS al 10 % v/v por centrifugación y se añadió después 1 ml a cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células C, I y M a fin de que se suspendieran las células en la disolución a  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/ml, seguido por dispensación de la disolución a criotubos de volumen 2 ml (fabricada por Nunc Co., Ltd.). Inmediatamente después de eso, se congelaron rápidamente los criotubos a  $-80^\circ\text{C}$  y después se conservaron durante 7 días ( $n = 3$ ).

- 10

2. Ensayo de especificación.

- 15 Se investigó el pH y la presión osmótica de cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células preparadas como se describió anteriormente.

Además, los resultados del ensayo de realización y el ensayo de especificación para las disoluciones acuosas respectivas para conservación de células se mostraron en la Tabla 2 ( $n=3$ ). Como se muestra la Tabla 2, las dos

disoluciones de conservación acuosas C e I mostraron una tasa de supervivencia de 80% o más.

Por consiguiente, los resultados confirmaron que las dos disoluciones de conservación acuosas C y I mostradas en la Tabla 1 presentan realización de conservación comparable a la de la disolución M de conservación acuosa que contiene un componente de medio basal a pesar de que ninguna de las disoluciones C y I contenía el suero y los componentes del medio basal.

5

[Tabla 2]

Disolución de conservación acuosa		C			I			M		
Ensayo de realización	Tasa de supervivencia (%)	90,5	90,1	88,8	95,1	92,7	95,3	97,2	98,2	95,7
	Promedio (%)	89,8			94,4			97,0		
Ensayo de especificación	pH	7,89			7,86			7,98		
	Presión osmótica (mOsm)	2.062			2.107			2.131		

Ejemplo 2

Tasa de supervivencia de diferentes tipos de células.

10 Se recogieron las células descritas en la Tabla 3, que había sido recogidas y fraccionadas de antemano de un medio de cultivo RPMI1640 al que se había añadido FBS al 10% v/v, por centrifugación y se añadió 1 ml de la disolución acuosa para conservación de células J o la disolución acuosa comparativa para la conservación de células M a fin de que se suspendieran las células en la disolución a  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/ml, seguido por dispensación de la disolución en criotubos de 2 ml de volumen (fabricados por Nunc Co., Ltd.). Inmediatamente después de eso, se congelaron rápidamente los criotubos a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se conservaron después durante un cierto periodo de tiempo. Las tasas de supervivencia de las células después de los respectivos periodos de conservación en el caso de los linfocitos se muestra en la Tabla 3, las tasas de supervivencia de las células después de los respectivos periodos de conservación en el caso de células del bazo se muestran en la Tabla 4 y las tasas de supervivencia de las células después de los respectivos periodos de conservación en el caso de los timocitos se muestran en la Tabla 5.

15

20 [Tabla 3]

Especies animales <Linfocitos>	Periodo de conservación (días)	Tasa de supervivencia (%)					
		I			M		
Gato	7	98,6	100,0	97,1	100,0	100,0	100,0
Ganado		97,6	93,6	99,9	97,9	96,4	100,0
Cabra		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Perro		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Cerdo		100,0	99,8	100,0	100,0	100,0	100,0
Ser humano		97,0	99,4		97,4	98,5	
Ganado (2°) Ensayo de estabilidad dependiente del tiempo	7	100,0			100,0		
	14	100,0			100,0		
	30	100,0			100,0		
	60	100,0			100,0		



[Tabla 4]

< Células de bazo> Clases de ratones	Periodo de conservación (días)	Tasa de supervivencia (X)	
		I	M
BALB/C(1 año)	7	98,0	97,9
BALB/C(6S)		96,1	98,4
ICR(8S)		100,0	100,0
C3H(7S)		100,0	100,0

[Tabla 5]

Clases de ratones <Timocitos>	Periodo de conservación (días)	Tasa de supervivencia (%)	
		I	M
BALB/C(1 año)	7	96,0	93,4
BALB/C(6S)		93,6	98,3
ICR(8W)		99,9	99,8
C3H(7S)		99,9	99,7

5 Como se muestra en las Tablas 3 a 5, se mostró una tasa de supervivencia de casi 100,0% en la conservación de cada uno de linfocitos, células del bazo y timocitos de diversas especies animales con la disolución acuosa para conservación de las células de la presente invención. Los resultados confirmaron que la disolución acuosa para conservación de células de la presente invención fue capaz de conservar de manera adecuada las células incluso en ausencia de componente de origen animal, natural.

#### 10 Ejemplo 3

Investigación de concentración de glucosa.

15 Se prepararon disoluciones de conservación de células C y N a R usando los respectivos componentes preparados en 1 del Ejemplo 1 descrito anteriormente a fin de que se pudieran obtener sus composiciones descritas en la Tabla 6. Además, de una manera similar al Ejemplo 1 descrito anteriormente, el ensayo de realización y el ensayo de especificación de cada disolución acuosa para conservación de células se llevaron a cabo usando células X63Ag8-6.5.3. Los resultados de los ensayos se mostraron en la Tabla 6.

20 Como se muestra en la Tabla 6, las disoluciones de conservación acuosas que contenían 2 % p/v o menos o 7 % p/v de glucosa cada una mostraron una tasa de supervivencia baja. Por el contrario, las disoluciones de conservación acuosas conteniendo cada una al menos 3 a 5 % p/v de glucosa mostraron cada una una tasa de supervivencia de 80% o más.

[Tabla 6]

	Componentes		Disolución acuosa para conservación de células (g/l)					
			N	O	C	P	Q	R
Espesante	CMC-Na		5					
Crioprotector	DMSO		100					
Azúcares, ajustadores de pH	Tampón de fosfato		1,576					
	BSS	Glucosa	10	20	30	40	50	70
		Bicarbonato de sodio	0,8					
		HEPES	0,36					
Agua	Agua destilada		Cantidad adecuada					
Ensayo de realización	Tasa de supervivencia (%)		15,0	18,0	95,0	93,0	82,0	20,0

Ejemplo 4

Investigación de concentración de crioprotector.

- 5 Se prepararon disoluciones de conservación de células C y S a X usando los respectivos componentes preparados en 1 del Ejemplo 1 descrito anteriormente a fin de que se pudieran obtener sus composiciones descritas en la Tabla 7. Además, de una manera similar al Ejemplo 1 descrito anteriormente, el ensayo de realización y el ensayo de especificación de cada disolución acuosa para conservación de células se llevó a cabo usando células SK-007 o células Jurkat. Los resultados de los ensayos se mostraron en la Tabla 7.
- 10 Como se muestra en la Tabla 7, las disoluciones de conservación acuosas conteniendo cada una 3 % p/v o menos de DMSO o 15 % p/v de DMSO como un crioprotector mostraron cada una una tasa de supervivencia baja para cualquiera de las células. Por el contrario, las disoluciones de conservación acuosas conteniendo cada una al menos 5 a 12 % p/v de DMSO mostraron una tasa de supervivencia de 80% o más.

Células SK-007 o células Jurkat.

- 15 SK-007: células de leucemia mieloide humana (células de leucemia de células B).

Jurkat: células de leucemia de células T humanas.

Cada una de las células se cultivó en un medio de cultivo RPMI1640 al que se añadió suero fetal bovino al 10% en las condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C.

[Tabla 7]

	Componente		Disolución acuosa para conservación de células (g/l)						
			S	T	U	V	C	W	X
Espesante	CMC-Na		5						
Crioprotector	DMSO		30	50	70	90	100	120	150
Azúcares, ajustadores de pH	Tampón de fosfato		1,576						
	BSS	Glucosa	30						
		Bicarbonato de sodio	0,8						
		HEPES	0,36						
Agua	Agua destilada		Cantidad adecuada						
Ensayo de realización	Tasa de supervivencia (%)	células SK-007	15,0	80,0	82,0	85,0	95,0	91,0	63,0
		células Jurkat	26,0	86,0	90,0	84,0	95,0	88,0	58,0
Ensayo de especificación	pH		7,64	7,65	7,73	7,78	7,74	7,77	7,8
	Presión osmótica(mOsm)		740	1.080	1.523	1.956	2.274	2.698	3.564

## Ejemplo 5

## Investigación de concentración de espesante

- 5 Se prepararon disoluciones de conservación de células Y a AC usando los respectivos componentes preparados en 1 del Ejemplo 1 descrito anteriormente a fin de que se pudieran obtener sus composiciones descritas en la Tabla 8. Además, de una manera similar al Ejemplo 1 descrito anteriormente, el ensayo de realización y el ensayo de especificación de cada disolución acuosa para conservación de células se llevó a cabo usando células SK-007 o células Jurkat. Los resultados de los ensayos se mostraron en la Tabla 8.
- 10 Como se muestra en la Tabla 8, las disoluciones de conservación acuosas que contenían 0,1 % p/v a 1,0 % p/v de un polímero de ácido orgánico como espesante mostraron una tasa de supervivencia de 90% o más para cualquiera de las células.

[Tabla 8]

	Componente		Disolución acuosa para conservación de células (g/l)				
			Y	Z	AA	AB	AC
Espesante	Polímero de ácido orgánico		1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Crioprotector	DMSO		100				
Azúcares, ajustadores de pH	Tampón de fosfato		1,576				
	BSS	Glucosa	30				
		Bicarbonato de sodio	0,8				
		HEPES	0,36				
Agua	Agua destilada		Cantidad adecuada				
Ensayo de realización	Tasa de supervivencia (%)	células SK-007	97,0	100,0	99,0	98,0	98,0
		células Jurkat	94,0	99,0	97,0	96,0	95,0
Ensayo de especificación	pH		7,97	7,99	8,02	8,1	8,08
	Presión osmótica (mOsm)		2.098	2.119	2.124	2.123	2.172

Ejemplo 6

Ensayo de realización de disolución acuosa para conservación de células.

- 5 La realización de una disolución acuosa para conservación de células se evaluó por investigación de la tasa de supervivencia, la capacidad de proliferación y la capacidad de diferenciación de las células en la conservación.

1. Investigación de la tasa de supervivencia de las células.

10 Se evaluó la realización de cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K con respecto a la tasa de supervivencia de las células en la conservación. Se añadieron células madre mesenquimales procedentes de sangre umbilical humana cultivadas con antelación en un medio de cultivo IMDM enriquecido con FBS al 10% v/v en las condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C con 1 ml cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K a fin de que las células se suspendieran en la disolución a 2x10<sup>5</sup> células/ml, seguido por dispensación del resultante en criotubos de 2 ml de volumen (fabricados por Nunc Co., Ltd.). Inmediatamente después de eso, se congelaron rápidamente los criotubos a -80°C, se conservaron durante 4 días y después se conservaron a -196°C (tanque de nitrógeno líquido) durante 72 días (n = 3).

15 Se descongelaron los tubos congelados que contenían células a 37 °C en un baño de agua, se lavaron dos veces con una mezcla de 9 ml de IMDM y 1 ml de FBS. Se recogieron las células por centrifugación y se contó el número de células. Como se representa en la FIG. 1a, la disolución acuosa para conservación de células I y K mostró cada una una tasa de supervivencia similar de las células como aquella en el caso de conservación en la disolución acuosa para conservación de células M. Las tasas de supervivencia de células en las respectivas disoluciones

acuosas para conservación de células fueron 97% para M, 90% para I y 86% para K y cada una de ellas mostró alta realización en conservación de células.

2. Investigación de capacidad de proliferación.

5 Se investigó la retención de capacidad de proliferación celular en las células criopreservadas con disolución de conservación M, I y K. Las células conservadas en el artículo 1 anterior, se sembraron en una placa de cultivo (35 mm) a fin de que el número de células fuera  $5 \times 10^4$  y después se cultivaron, seguido por recuento del número de células después de 4 días y 8 días. Para el recuento de células, se usó azul Trypan para excluir las células muertas. Como se ilustra en la Fig. 1b, las células conservadas en cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células I y K mostraron el crecimiento celular similar al de las células conservadas en la disolución acuosa para conservación de células M. Por lo tanto, los resultados confirmaron que cada una de las disoluciones acuosas para conservación de las células M, I y K fue capaz de conservar las células al tiempo que se retenía la capacidad de proliferación celular.

3. Investigación de capacidad de diferenciación.

15 Se sembraron células conservadas como se describió en el artículo 1 anterior en una placa de cultivo (35 mm) a fin de que el número de células pudiera ser  $5 \times 10^4$  células y después se cultivaron en un medio de inducción de diferenciación para osteoblasto o adipocito mostrado en la Tabla 9 durante 28 días, seguido por investigación de si las células retenían cada una su capacidad de diferenciación.

[Tabla 9]

	Medio de inducción de diferenciación para osteoblasto	Medio de inducción de diferenciación para adipocito
Componentes del medio	IMDM+1% v/v de FBS Dexametasona 0,1 $\mu$ M ácido ascórbico 50 $\mu$ g/ml fosfato de $\beta$ -glicerol 10 mM hEGF 10 ng/ml	IMDM+10% v/v de FBS Dexametasona 0,1 $\mu$ M 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM indometacina 0,1 mM

20 Como se muestra en la Fig. 2a, la tinción con Rojo de Alizarina se realizó 28 días después del cultivo. Como resultado, las células conservadas en cualquiera de las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K mostraron la inducción de diferenciación de osteoblasto. En la Fig. 2b, asimismo, la tinción rojo O al aceite mostró que la inducción de diferenciación de adipocito tenía lugar en cualquiera de las células conservadas en las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K. Por lo tanto, se confirmó que cada una de las disoluciones acuosas para conservación de células M, I y K era capaz de conservar las células al tiempo que se retenía la capacidad de diferenciación de las células.

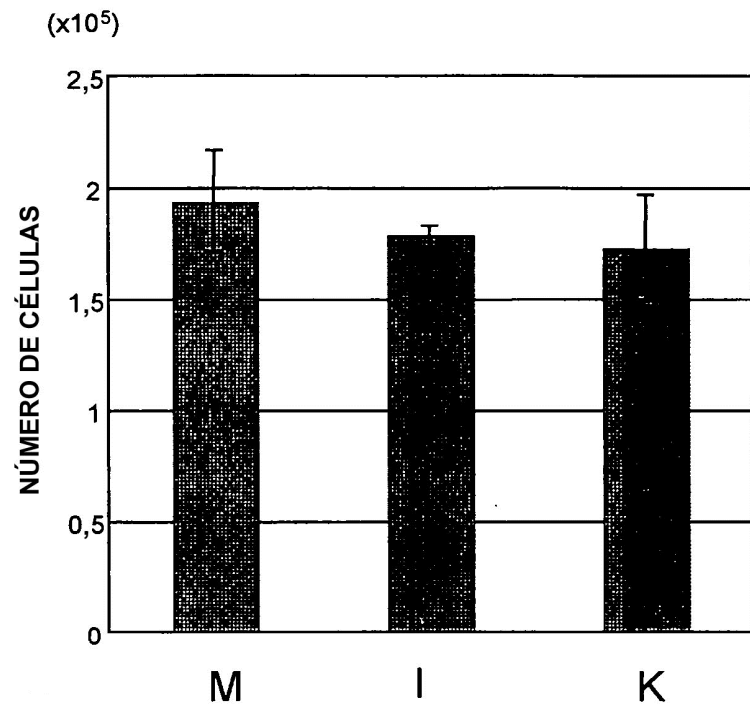
**Aplicabilidad industrial**

30 Puesto que la disolución de conservación de células de la presente invención está exenta de componentes de origen animal naturales a partir de medio basal y suero, puede ser segura por consiguiente para uso médico debido al bajo riesgo de contaminación con impurezas que puede presentar influencias sobre las células que se tienen que conservar. Además, la disolución está disponible a un coste bajo debido a que la disolución no usa ninguno de un medio basal, suero, etc.

**REIVINDICACIONES**

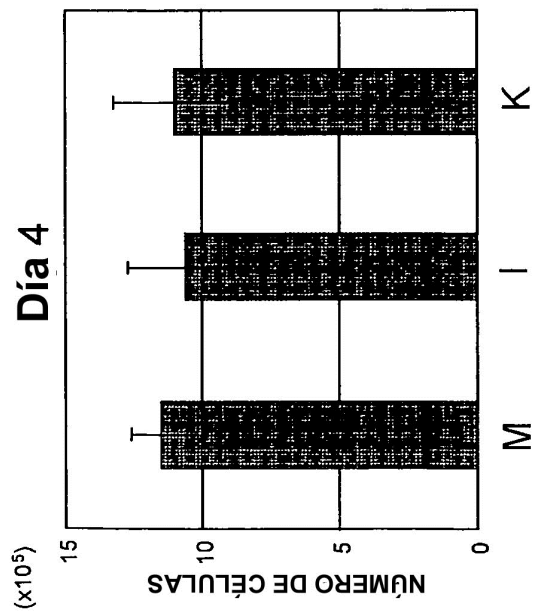
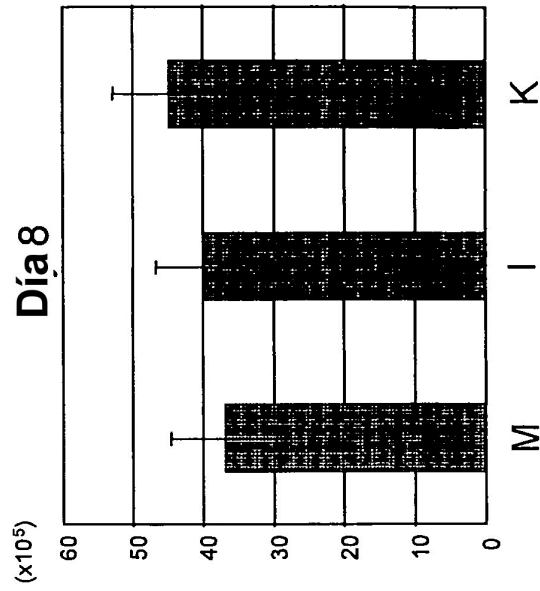
1. Una disolución acuosa para conservación de células, que comprende las siguientes composiciones (a) a (e) y que tiene un pH de 6,5 a 9,0:
- (a) 5,0 a 12,0 % p/v de un crioprotector;
  - 5 (b) 3,0 a 5,0 % p/v de un azúcar;
  - (c) 0,1 a 1,0 % p/v de un espesante;
  - (d) 0,01 a 1,0 % p/v de un ajustador de pH y
  - (e) una cantidad apropiada de agua;
- estando la disolución acuosa exenta de componentes de origen animal naturales.
- 10 2. La disolución acuosa para conservación de células según la reivindicación 1, en la que una presión osmótica es 1.000 mOsm o más.
3. La disolución acuosa para conservación de células según la reivindicación 2, en la que la presión osmótica es 1.000 a 2.700 mOsm.
- 15 4. La disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el espesante comprende carboximetilcelulosa (CMC), carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na) o un polímero de ácido orgánico.
5. La disolución acuosa para conservación de células según la reivindicación 4, en la que el polímero de ácido orgánico comprende poliacrilato de sodio.
- 20 6. La disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el crioprotector comprende dimetilsulfóxido (DMSO) o propilenglicol.
7. La disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el azúcar comprende glucosa.
8. La disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el ajustador de pH comprende un tampón de fosfato.
- 25 9. La disolución acuosa para conservación de células según la reivindicación 1, que comprende las siguientes composiciones (a) a (e):
- (a) 5,0 a 12,0 % p/v de DMSO;
  - (b) 3,0 a 5,0 % p/v de glucosa;
  - (c) 0,2 a 0,7 % p/v de un espesante;
  - 30 (d) 0,01 a 1,0 % p/v de un tampón de fosfato y
  - (e) una cantidad apropiada de agua.
10. La disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además células que se tienen que conservar, en la que las células que se tienen que conservar comprenden cualquiera de linfocitos, células de bazo, timocitos, células animales, células madre somáticas, células madre mesenquimales y células madre embrionarias no humanas.
- 35 11. La disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en aplicaciones médicas.
12. Uso de una disolución acuosa para conservación de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como un crioprotector.
- 40 13. Un método para conservación de células, que comprende: dispersar células en la disolución acuosa para conservación de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; dispensar las células en envases y someter las células a crioconservación.
14. El método para conservación de células según la reivindicación 13, en el que el número de las células dispensadas es  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  células/ml.

[Fig. 1a]



DISOLUCIÓN ACUOSA  
PARA CONSERVACION DE CÉLULAS

[Fig. 1b]

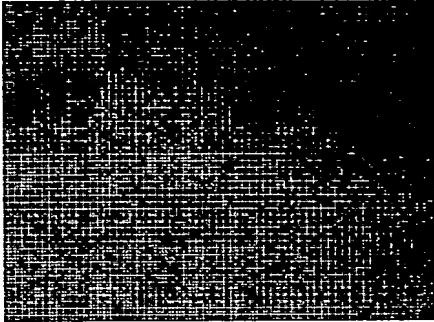


DISOLUCIÓN ACUOSA  
PARA CONSERVACIÓN DE CÉLULAS

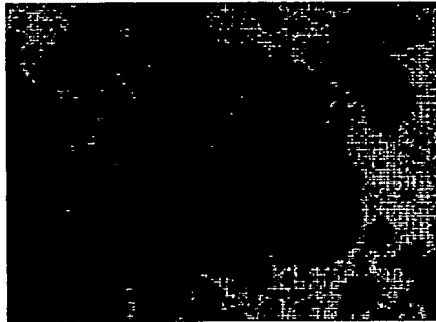


[Fig. 2a]

No inducción  
(disolución acuosa  
para conservación de células I)



Disolución acuosa  
para conservación de células I



Disolución acuosa  
para conservación de células M



Disolución acuosa  
para conservación de células K



Barra escala = 200  $\mu\text{m}$

[Fig. 2b]

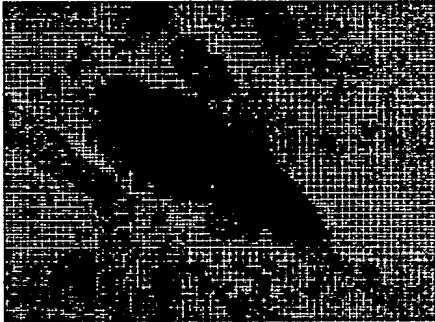
No inducción  
(disolución acuosa  
para conservación de células I)



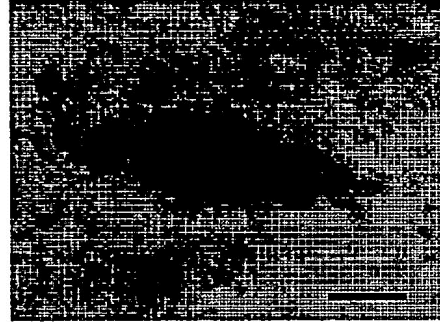
Disolución acuosa  
para conservación de células M



Disolución acuosa  
para conservación de células I



Disolución acuosa  
para conservación de células K



Barra escala = 20  $\mu\text{m}$