

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 731**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**C07H 3/04** (2006.01)  
**C08B 31/04** (2006.01)  
**C08B 37/02** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 35/28** (2006.01)  
**C12N 5/0775** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2011 E 11839155 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2639296**

54 Título: **Suspensión de células madre**

30 Prioridad:

**28.12.2010 JP 2010293908**  
**09.11.2010 JP 2010251273**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.05.2016**

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.**  
**(50.0%)**  
**115 Aza-Kuguhara Tateiwa Muya-cho**  
**Naruto-shi, Tokushima 772-8601, JP y**  
**JICHI MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOBAYASHI, EIJI;**  
**WADA, TAMAKI;**  
**FUJITA, YASUTAKA;**  
**YOSHINAGA, NORIHIRO;**  
**DOI, MASAOKO;**  
**FUJIMOTO, YASUHIRO y**  
**TERATANI, TAKUMI**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 568 731 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**

Suspensión de células madre

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a una suspensión de células madre de mamífero y a un preparado farmacéutico que la contiene. Además, la presente invención se refiere a un agente de supresión de la agregación de las células madre de mamífero y a un método de supresión de la agregación de las células madre de mamífero. Además, la presente invención se refiere a un agente de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero, y a un método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero.

15 **Estado de la técnica**

Gracias a los avances realizados en la investigación sobre las células madre en los últimos años, la aplicación clínica de las células madre ya ha pasado de las etapas fundamentales de investigación a las etapas de desarrollo. En el tratamiento de enfermedades con células madre, las funciones dañadas de células y tejidos de los pacientes se complementan con dichas células y órganos recién diferenciados a partir de las células madre. En este momento, el tratamiento con las células madre se puede dividir, en gran parte, en dos de acuerdo con la forma de diferenciación de las células madre en células o tejidos somáticos.

Uno de ellos incluye el cultivo *in vitro* de las células madre en condiciones particulares para permitir la diferenciación en las células o los tejidos somáticos deseados, y el trasplante de las células o de los tejidos somáticos obtenidos en el organismo de un receptor. Por ejemplo, dado que se teme que las células madre pluripotentes, tales como las células ES, células iPS y similares, formen teratomas cuando se trasplantan directamente a un organismo, por lo general, se diferencian en determinadas células o tejidos somáticos *in vitro* para asegurarse de que se ha eliminado la capacidad de formación de teratomas, y luego se trasplantan en el organismo.

La otra realización incluye la transferencia directa de las células madre al organismo. Se ha informado que dicho método muestra efectos sobre enfermedades tales como la esclerosis amiotrófica lateral, anemia aplásica, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad del colágeno, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, leucemia, enfermedades relacionadas con el estilo de vida, cáncer y similares.

Las células madre mesenquimales se conocen como células madre que están presentes en la médula ósea y órganos similares de los mamíferos, y se diferencian en adipocitos, condrocitos, osteocitos y similares. Debido a su multipotencia, las células madre mesenquimales están llamando la atención como material de trasplante para la terapia de regeneración de muchos tejidos. Es decir, una "terapia regenerativa mediante el trasplante de células", que regenera los tejidos perdidos por enfermedades y trastornos que no se han podido regenerar mediante los métodos de tratamiento convencionales, mediante el uso de células madre mesenquimales, y recupera la función de los mismos. En concreto, ya se han iniciado o planificado tratamientos tales como, por ejemplo, el trasplante de células madre mesenquimales de médula ósea a pacientes con isquemia en la parte inferior de la pierna (enfermedad de Buerger), el trasplante de células madre mesenquimales de médula ósea a las partes afectadas por enfermedades periodontales, el trasplante de células madre mesenquimales de médula ósea a los pacientes con osteoartritis y similares.

La trehalosa es un tipo de disacárido producido mediante el enlace 1,1-glucosídico de glucosas. Dado que la trehalosa confiere dulzor y tiene una alta capacidad de retención hídrica, se usa para diversos alimentos y cosméticos. Además, dado que la trehalosa estabiliza las membranas celulares y suprime la lesión de las células, se usa como principio activo de un líquido de protección de órganos para el trasplante de órganos. Se han desarrollado soluciones de preservación de órganos superiores que contienen trehalosa tales como solución de ET-Kyoto, nueva solución de ET-Kyoto y similares (documentos de patente 1 y 2, documento no de patente 1).

El hidroxietilalmidón es uno de los almidones eterificados, y se usa como adhesivo, emulsionante, pasta y similares.

El dextrano es un tipo de polisacárido hecho de glucosa, y se usa ampliamente como espesante, humectante y similares, en los campos de los productos farmacéuticos y cosméticos.

[Lista de documentos]

[Documentos de patente]

Documento de patente 1: JP-B-3253131  
Documento de patente 2: WO2007/043698.

65

[Documento no de patente]

Documento no de patente 1: *Yonsei Medical Journal*, vol. 45, n.º 6, pág.1107-1114, 2004.

5 **Objeto de la invención**

**Problemas por resolver mediante la invención**

10 Los presentes inventores han realizado estudios intensivos sobre las condiciones para realizar de manera más estable y sin problemas el trasplante de células madre en el organismo. Han encontrado que la transferencia de células madre al organismo, que, en muchos casos, se realiza mediante infusión por goteo de una suspensión de células madre en el organismo, puede provocar, durante el goteo, la agregación de las células madre de la suspensión en la bolsa de infusión conectada a la cánula, y formar embolias en los vasos sanguíneos delgados tales como la vena pulmonar y similares. Además, los presentes inventores han encontrado que la tasa de supervivencia de las células madre en una bolsa de infusión se puede reducir gradualmente durante el goteo.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar una técnica para suprimir la agregación de las células madre de una suspensión durante el trasplante de las células madre.

20 Además, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una técnica para suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de una suspensión.

**Medios para resolver los problemas**

25 Como resultado de los estudios intensivos, los presentes inventores han encontrado que es posible suprimir la agregación de las células madre mediante la adición de polisacáridos tales como trehalosa y similares a una suspensión de células madre. Además, también han encontrado que dichos polisacáridos pueden suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre. Es más, también han encontrado que el efecto supresor sobre una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre se puede mejorar mediante una combinación de algunos de los polisacáridos. Basándose en estos hallazgos, se han realizado estudios adicionales con los que se ha completado la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a lo siguiente:

- 35 [1] Una suspensión de células madre de mamífero que comprende células madre de mamífero y al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.
- [2] La suspensión de células madre de mamífero de [1], que comprende una combinación que comprende trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano.
- 40 [3] La suspensión de células madre de mamífero de [1], en la que las células madre son células madre adhesivas.
- [4] La suspensión de células madre de mamífero de [3], en la que las células madre adhesivas son células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.
- [5] La suspensión de células madre de mamífero de [1], en la que las células madre de mamífero comprenden células madre de mamífero en un estado de una sola célula.
- 45 [6] La suspensión de células madre de mamífero de [1], en la que el polisacárido es trehalosa que tiene una concentración dentro del intervalo de 4,53 a 362,4 mg/ml.
- [7] La suspensión de células madre de mamífero de [1], en la que el polisacárido es dextrano que tiene una concentración dentro del intervalo de 30 a 100 mg/ml.
- [8] Un método de producción de una suspensión de células madre de mamífero, que comprende suspender células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.
- 50 [9] El método de producción de [8], en el que la solución fisiológica acuosa comprende trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano.
- [10] Un preparado de suspensión de células madre de mamífero que comprende la suspensión de células madre de mamífero de cualquiera de [1]-[7].
- 55 [11] Un inhibidor de la agregación de células madre de mamífero que comprende al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.
- [12] El inhibidor de la agregación de células madre de mamífero de [11], en el que la célula madre es una célula madre adhesiva.
- 60 [13] El inhibidor de la agregación de células madre de mamífero de [12], en el que la célula madre adhesiva es una célula madre mesenquimal o una célula madre pluripotente.
- [14] El inhibidor de la agregación de células madre de mamífero de [11], en el que el polisacárido es trehalosa, inhibidor que se usa de manera que la concentración de trehalosa en una suspensión de células madre de mamífero está dentro del intervalo de 4,53-362,4 mg/ml.
- 65 [15] El inhibidor de la agregación de células madre de mamífero de [11], en el que el polisacárido es dextrano, inhibidor que se usa de manera que la concentración de dextrano está en el intervalo de 30-100 mg/ml.

[16] Un método de supresión de la agregación de células madre de mamífero, que comprende suspender las células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

5 [17] El método de supresión de la agregación de células madre de mamífero de [16], en el que las células madre son células madre adhesivas.

[18] El método de supresión de la agregación de células madre de mamífero de [17], en el que las células madre adhesivas son células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.

[19] El método de supresión de la agregación de células madre de mamífero de [16], en el que las células madre de mamífero comprenden células madre de mamífero en estado de una sola célula.

10 [20] El método de supresión de la agregación de células madre de mamífero de [16], en el que el polisacárido es trehalosa que tiene una concentración dentro del intervalo de 4,53-362,4 mg/ml.

[21] El método de supresión de la agregación de células madre de mamífero de [16], en el que el polisacárido es dextrano que tiene una concentración dentro del intervalo de 30-100 mg/ml.

15 [22] Un inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero que comprende al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

[23] El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [22], que comprende una combinación que comprende trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano.

[24] El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [22], en el que las células madre son células madre adhesivas.

20 [25] El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [24], en el que las células madre adhesivas son células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.

[26] El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [22], en el que el polisacárido es trehalosa, inhibidor que se usa de manera que la concentración de trehalosa en una suspensión de células madre de mamífero está dentro del intervalo de 4,53-362,4 mg/ml.

25 [27] El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [22], en el que el polisacárido es dextrano, inhibidor que se usa de manera que la concentración de trehalosa en una suspensión de células madre de mamífero está dentro del intervalo de 30-100 mg/ml.

[28] Un método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero, que comprende suspender las células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

30 [29] El método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [28], en el que la solución fisiológica acuosa comprende una combinación que comprende trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano.

[30] El método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [28], en el que las células madre son células madre adhesivas.

35 [31] El método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [30], en el que las células madre adhesivas son células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.

[32] El método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [28], en el que las células madre de mamífero se encuentran en estado de una sola célula.

40 [33] El método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [28], en el que el polisacárido es trehalosa que tiene una concentración dentro del intervalo de 15,1-362,4 mg/ml.

[34] El método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero de [28], en el que el polisacárido es dextrano que tiene una concentración dentro del intervalo de 30-100 mg/ml.

45 **Efecto de la invención**

Usando la presente invención, se puede suprimir la agregación de células madre en una suspensión durante el trasplante de las células madre. Como resultado de ello, se reduce el riesgo de que los agregados de las células madre taponen la cánula o formen embolias en los vasos sanguíneos delgados, tales como la vena pulmonar y similar.

50 Por otra parte, usando la presente invención, se puede suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre en una suspensión. Como resultado de ello, se puede realizar un tratamiento usando células madre en mejores condiciones y, por lo tanto, cabe esperar que se mejore el efecto del tratamiento.

55 **Descripción de las figuras**

La Fig. 1 muestra la forma y la tasa de supervivencia de hBM-MSC P6 tras reposar en cada solución de la composición a 25 °C durante 1 h.

60 La Fig. 2 muestra la forma y la tasa de supervivencia de hAT-MSC P8 tras reposar en cada solución de la composición a 25 °C durante 1 h.

La Fig. 3 muestra las tasas de supervivencia tras reposar en cada solución de la composición a 25 °C, en la que las 6 barras muestran Solución salina, Medio, ET-K, Saviosol, HES70K y HES200K de izquierda a derecha.

65 La Fig. 4 muestra las tasas de supervivencia tras reposar en cada solución de la composición a 25 °C, en la que las 5 barras muestran Solución salina, Medio, ET-K, Saviosol y ET-K + Saviosol de izquierda a derecha.

La Fig. 5 muestra el número de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana de las capas

superior, media e inferior de un tubo cuando se conservan en un tampón que contiene dextrano 40 (6,5-10 % (p/v)) o solución salina, en la que el valor numérico del centro de la gráfica muestra la tasa de supervivencia de las células totales.

La Fig. 6 muestra el número de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano de las capas superior, media e inferior de un tubo cuando se conservan en un tampón que contiene dextrano 40 (6,5-10 % (p/v)) o solución salina, en la que el valor numérico del centro de la gráfica muestra la tasa de supervivencia de las células totales.

### Descripción detallada de la invención

#### I. Suspensión de células madre de mamífero

La presente invención proporciona una suspensión de células madre de mamífero que comprende células madre de mamífero y al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

Los ejemplos del mamífero incluyen roedores tales como ratón, rata, hámster, cobaya y similares, lagomorfos tales como conejos y similares, ungulados como el cerdo, bovino, cabra, caballo, oveja y similares, carnívoros tales como perro, gato y similares, primates tales como seres humanos, monos, *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, mono tífi, orangután, chimpancé y similares, y similares. El mamífero es preferentemente roedor (ratón, etc.), ungulado (cerdo, etc.) o primate (ser humano etc.).

En la presente memoria descriptiva, la "célula madre" se refiere a una célula inmadura que tiene competencia para la autorreplicación y capacidad de diferenciación/proliferativa. La célula madre incluye subconjuntos tales como células madre pluripotentes, células madre multipotentes, células madre unipotentes y similares, dependiendo de la capacidad de diferenciación. La célula madre pluripotente significa una célula que no puede ser un organismo individual por sí mismo, pero que tiene una capacidad de diferenciarse en cualquier tejido o célula que constituye organismos vivos. La célula madre multipotente significa una célula que tiene una capacidad de diferenciarse en una pluralidad de, aunque no todos, tipos de tejidos o células. La célula madre unipotente significa una célula que tiene una capacidad de diferenciarse en un tejido o en una célula en particular.

Los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre embrionarias (células ES), célula EG, célula iPS y similares. Las células ES se pueden producir mediante el cultivo de una masa celular interna en una célula de alimentación o en un medio que contiene LiF. Por ejemplo, en los documentos WO96/22362, W002/101057, US5.843.780, US6.200.806, US6.280.718, se describen métodos no ilustrativos de producción de células ES. Las células EG se pueden producir mediante el cultivo de una célula germinal primordial en un medio que contenga mSCF, LIF y bFGF (*Cell*, 70: 841-847, 1992). La célula iPS se puede producir mediante la introducción de un factor de reprogramación tal como Oct3/4, Sox2 y Klf4 (además, c-Myc o n-Myc cuando sea necesario) y similares en una célula somática (por ejemplo, fibroblastos, células dérmicas, etc.) (*Cell*, 126: pág. 663-676, 2006; *Nature*, 448: pág. 313-317, 2007; *Nat Biotechnol*, 26: pág. 101-106, 2008; *Cell* 131: pág. 861-872, 2007; *Science*, 318: pág. 1917-1920, 2007; *Cell Stem Cells* 1: pág. 55-70, 2007; *Nat Biotechnol*, 25: pág. 1177-1181, 2007; *Nature*, 448: pág. 318-324, 2007; *Cell Stem Cells* 2: pág. 10-12, 2008; *Nature* 451: pág. 141-146, 2008 ; *Science*, 318: pág.1917-1920, 2007). Una célula madre establecida mediante el cultivo de un embrión temprano producido por trasplante nuclear del núcleo de célula somática es otro ejemplo no ilustrativo de una célula madre pluripotente (*Nature*, 385, 810 (1997); *Science*, 280, 1256 (1998); *Nature Biotechnology*, 17, 456 (1999); *Nature*, 394, 369 (1998); *Nature Genetics*, 35 22, 127 (1999); *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 96, 14984 (1999)), Rideout III *et al.* (*Nature Genetics*, 24, 109 (2000)).

Los ejemplos de células madre multipotentes incluyen células madre somáticas tales como células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, células madre neurales, células madre de mieloides, células madre germinales y similares. La célula madre multipotente es preferentemente una célula madre mesenquimal. La célula madre mesenquimal significa una célula madre capaz de diferenciarse en todos o algunos de entre osteoblastos, condroblastos y adipoblastos. Las células madre multipotentes se pueden aislar de un organismo vivo mediante un método conocido en sí. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden extraer de la médula ósea de mamíferos, tejido adiposo, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, y similares mediante un método convencional conocido. Por ejemplo, las células madre mesenquimales humanas se pueden aislar mediante el cultivo o el paso de células madre hematopoyéticas tras la aspiración de la médula ósea, y similares (*Journal of Autoimmunity*, 30 (2008) 163-171). Las células madre multipotentes también se pueden obtener mediante el cultivo de las células madre pluripotentes anteriormente mencionadas en condiciones de inducción apropiadas.

Las células madre contenidas en la suspensión de la presente invención son preferentemente adhesivas. Esto se debe a que la agregación de las células madre adhesivas, que se produce fácilmente en una suspensión, se puede suprimir de manera eficaz, ya que la suspensión de la presente invención contiene trehalosa. En la presente memoria descriptiva, la célula "adhesiva" se refiere a una célula dependiente de un anclaje que puede sobrevivir, crecer y producir sustancias mediante la adhesión al anclaje. Los ejemplos de célula madre adhesiva incluyen célula madre pluripotente, célula madre mesenquimal, célula madre neural, célula madre de mieloides, célula madre

germinal, y similares. La célula madre adhesiva es preferentemente una célula madre mesenquimal o una célula madre pluripotente.

Las células madre de mamífero se pueden separar del organismo o paso cultivadas *in vitro*.

La célula madre de mamífero contenida en la suspensión de la presente invención es preferentemente una célula aislada o purificada. En la presente memoria descriptiva, "aislada o purificada" significa que se ha aplicado una operación para retirar los componentes distintos del componente objeto. La pureza de las células madre de mamífero aisladas o purificadas (proporción del número de células madre de mamífero con respecto al número total de células), en general, no es inferior al 30 %, preferentemente no inferior al 50 %, más preferentemente no inferior al 70 %, incluso más preferentemente no inferior al 90 % (por ejemplo, 100 %).

Las células madre de mamífero que están contenidas en la suspensión de la presente invención son preferentemente células madre de mamífero en estado de una sola célula. En la presente memoria descriptiva, el "estado de una sola célula" significa que la célula no ha formado una masa junto con otras células (es decir, no se encuentra en estado de agregación). Las células madre de mamífero en estado de una sola célula se pueden preparar mediante un tratamiento de las células madre de mamífero cultivadas *in vitro* con una enzima tal como tripsina/EDTA etc. La población de células madre de mamífero en estado de una sola célula, que están contenidas en las células madre de mamífero, en general, no es inferior al 70 %, preferentemente no es inferior al 90 %, más preferentemente no es inferior al 95 %, incluso más preferentemente no es inferior al 99 % (por ejemplo, 100 %). La población de células en estado de una sola célula se puede determinar mediante la dispersión de las células madre de mamífero en PBS, su observación en un microscopio, y el examen de la presencia o ausencia de agregación en varias células seleccionadas aleatoriamente (por ejemplo, 1.000).

En la suspensión de la presente invención, las células madre de mamífero están preferentemente flotando. En la presente memoria descriptiva, "flotando" significa que las células se mantienen en una suspensión sin estar en contacto con la pared interior del recipiente que contiene la suspensión.

La suspensión de la presente invención contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano. Como se muestra en los ejemplos mencionados a continuación, los polisacáridos tienen el efecto de suprimir la agregación de las células madre de mamífero. Preferentemente, por lo tanto, se suprime la agregación de las células madre de mamífero en la suspensión de la presente invención. En la presente memoria descriptiva, "agregación" se refiere a un fenómeno en el que dos o más células se agrupan para formar una masa.

En particular, las células madre adhesivas flotan en una suspensión y se agregan fácilmente cuando se encuentran en estado de una sola célula. Sin embargo, los polisacáridos anteriormente mencionados suprimen eficazmente la agregación, pudiéndose mantener un estado de una sola célula durante mucho tiempo.

Aunque sin quedar limitados a la teoría, cuando una suspensión de células madre contiene los polisacáridos anteriormente mencionados, se mantiene el estado flotante de las células en la suspensión comparativamente durante un largo período de tiempo, se suprime la precipitación de las células y se suprime el contacto de las células. Además, en general, cuando las células adherentes se exponen a un estado flotante durante un largo período de tiempo, las células se estresan, y se sabe que forman una protuberancia en un intento por adherirse a una placa y similar, dependiendo del tiempo de flotación. Sin embargo, dado que los polisacáridos anteriormente mencionados (en particular, la trehalosa) solo producen una pequeña tensión en una célula, se suprime la formación de la protuberancia. En combinación con dicha acción, se considera que los polisacáridos anteriormente mencionados proporcionan un efecto superior de supresión de la agregación de las células madre de mamífero.

Como se muestra en los ejemplos mencionados a continuación, los polisacáridos anteriormente mencionados tienen un efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. Preferentemente, por lo tanto, se suprime una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en la suspensión de la presente invención. En particular, las células madre adhesivas son propensas a sufrir daños cuando están flotando en una suspensión (especialmente, flotando en una suspensión y en estado de una sola célula), y la tasa de supervivencia de las mismas se reduce con facilidad. Sin embargo, mediante la adición de los polisacáridos mencionados anteriormente, se puede suprimir con eficacia la reducción de la tasa de supervivencia adhesiva de las células madre adhesivas.

La trehalosa que se puede usar para la suspensión de la presente invención incluye 3 tipos, la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa, la  $\alpha,\beta$ -trehalosa y la  $\beta,\beta$ -trehalosa. Aunque el tipo de trehalosa no se limita a uno en particular siempre que pueda suprimir la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero, se usa preferentemente la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa.

Aunque el peso molecular medio en peso (PMP) del hidroxietilalmidón que se puede usar para la suspensión de la presente invención no se limita a uno en particular siempre que pueda suprimir la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero, en general, está dentro del intervalo de  $5 \times 10^4$ -  $67 \times 10^4$ ,

preferentemente  $7 \times 10^4$  -  $60 \times 10^4$ , más preferentemente de  $7 \times 10^4$  -  $20 \times 10^4$ .

5 Para reforzar el efecto supresor sobre la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero, preferentemente, se usa hidroxietilalmidón que tenga un peso molecular medio en peso relativamente bajo (PMp) (por ejemplo,  $5 \times 10^4$  -  $9 \times 10^4$ , preferentemente de  $6 \times 10^4$  -  $8 \times 10^4$  (por ejemplo,  $7 \times 10^4$ )).

10 Además, aunque el grado de sustitución (número de grupos hidroxietilo por 1 unidad de glucosa) del hidroxietilalmidón que se puede usar para la suspensión de la presente invención no se limite a uno en particular siempre que pueda suprimir la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero, en general, es de 0,4 a 0,8.

15 Los ejemplos preferidos de hidroxietilalmidón para su uso en la suspensión de la presente invención incluyen hidroxietilalmidón que tiene un peso molecular medio en peso (PMp) de  $7 \times 10^4$  y un grado de sustitución de 0,50 a 0,55, e hidroxietilalmidón que tiene un peso molecular medio en peso (PMp) de  $20 \times 10^4$  y un grado de sustitución de 0,50 a 0,55 y similares. Dicho hidroxietilalmidón se encuentra disponible en el mercado, por ejemplo, en Fresenius Kabi Japan K.K. como Hespander (marca registrada).

20 El dextrano que se puede usar para la suspensión de la presente invención es un polisacárido  $(C_6H_{10}O_5)_n$  que consiste en D-glucosa, que tiene un enlace  $\alpha 1 \rightarrow 6$  como cadena principal. El tipo de dextrano no se limita a uno en particular siempre que pueda suprimir la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. El peso molecular medio en peso (PMp) del dextrano no se limita a uno en particular siempre que pueda suprimir la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. Son ejemplos preferidos el dextrano 40 (PMp = 40.000) y el dextrano 70 (PMp = 70.000) y similares.

25 La concentración de los polisacáridos anteriormente mencionados en la suspensión de la presente invención no se limita a una en particular siempre que sea suficiente para suprimir la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. Cuanto mayor sea la concentración de los polisacáridos anteriormente mencionados, mayor será el efecto de supresión de la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia. Sin embargo, cuando la concentración de polisacáridos es demasiado alta, la tasa de supervivencia de las células madre se puede ver influida negativamente.

30 Por ejemplo, cuando se usa la trehalosa como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de trehalosa en la suspensión de la presente invención, en general, no es inferior a 4,53 mg/ml, preferentemente no es inferior a 15,1 mg/ml. Para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de trehalosa en la suspensión, en general, no es superior a 362,4 mg/ml, preferentemente no es superior a 181,2 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de trehalosa de la suspensión, en general, es de 4,53 a 362,4 mg/ml, preferentemente de 15,1 a 181,2 mg/ml.

35 Incluso cuando se usan polisacáridos anteriormente mencionados distintos de la trehalosa, es posible determinar apropiadamente una concentración que presente un efecto de supresión de la agregación de las células madre y/o una reducción de la tasa de supervivencia, y suprima una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, de acuerdo con la concentración de trehalosa.

40 Cuando se usa hidroxietilalmidón como el polisacárido anteriormente mencionado, la concentración de hidroxietilalmidón en la suspensión de la presente invención, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no es inferior a 10 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de hidroxietilalmidón en la suspensión, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no es superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de hidroxietilalmidón en la suspensión, por ejemplo, es de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml.

45 Cuando se usa dextrano como el polisacárido anteriormente mencionado, la concentración de dextrano en la suspensión de la presente invención, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no es inferior a 10 mg/ml, más preferentemente no es inferior a 30 mg/ml, incluso más preferentemente no es inferior a 65 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de dextrano en la suspensión, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no es superior a 200 mg/ml, más preferentemente no es superior a 125 mg/ml, todavía más preferentemente no es superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de dextrano en la suspensión, por ejemplo, es de 1 a 500 mg/ml, preferentemente es de 10 a 200 mg/ml, más preferentemente es de 30 a 125 mg/ml, todavía más preferentemente es de 30 a 100 mg/ml, incluso más preferentemente es de 65 a 100 mg/ml.

50 La suspensión de la presente invención comprende preferentemente una combinación de trehalosa e hidroxietilalmidón, o de trehalosa y dextrano. Se espera que una combinación de trehalosa con hidroxietilalmidón o dextrano mejore el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. En particular, se espera que la combinación suprima de manera eficaz una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre adhesivas que flotan en la suspensión (en especial, las células madre adhesivas

que flotan en la suspensión y en un estado de una sola célula).

5 Cuando se usa trehalosa en combinación con hidroxietilalmidón o dextrano, la concentración de cada polisacárido en la suspensión de la presente invención se ajusta preferentemente de manera que el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero se potencie más mediante el uso de trehalosa e hidroxietilalmidón o dextrano en combinación que usando solo trehalosa, hidroxietilalmidón o dextrano.

10 En la suspensión de la presente invención, las células madre de mamífero se suspenden en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano. La solución fisiológica acuosa es preferentemente una solución isotónica acuosa tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con HEPES, solución de Ringer, solución de glucosa acuosa al 5 %, medio líquido para el cultivo de mamífero y solución acuosa de agente isotónico (glucosa, D-sorbitol, D-manitol, lactosa, cloruro de sodio etc.), o similares. En la presente memoria descriptiva, "isotónico" significa que la presión osmótica está dentro del intervalo de 250 a 380 mOsm/l.

15 La solución fisiológica acuosa puede contener además un estabilizante (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol y similares), un agente de tamponamiento (por ejemplo, tampón de fosfato, tampón de acetato de sodio), un agente quelante (por ejemplo, EDTA, EGTA, ácido cítrico, salicilato), un agente solubilizante, un conservante, un antioxidante y similares.

20 La suspensión de la presente invención se puede producir mediante la suspensión de células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contenga al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consista en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano (preferentemente, solución isotónica acuosa que contenga al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consista en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano). La concentración de cada polisacárido en la solución fisiológica acuosa es la misma que la de cada polisacárido en la suspensión anteriormente mencionada de la presente invención. La presente invención también proporciona dicho método de producción de una suspensión de células madre de mamífero.

25 La suspensión de células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene los polisacáridos anteriormente mencionados abarca la obtención de una suspensión de células madre de mamífero que contenga las células madre de mamífero y los polisacáridos anteriormente mencionados mediante la adición de los polisacáridos anteriormente mencionados a la suspensión de células madre de mamífero.

30 La suspensión de células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene los polisacáridos anteriormente mencionados se puede realizar mediante un método bien conocido en la técnica, tal como mediante pipeteo, roscado y similares.

35 La temperatura de la suspensión de la presente invención, en general, se encuentra dentro del intervalo de 0 a 37 °C, preferentemente de 0 a 25 °C.

40 La densidad de las células madre de mamífero en la suspensión de la presente invención no se limita a una en particular siempre que se pueda lograr el efecto de supresión de la agregación y/o una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero mediante al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, y, en general, se encuentre dentro del intervalo de  $10^3$ - $10^{10}$  células/ml.

45 En una realización preferible, dado que la agregación de las células madre de mamífero es suprimida por al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano en la suspensión de la presente invención, el trasplante de células madre usando la suspensión puede reducir el riesgo de taponamiento de la cánula por parte de los agregados de células madre o la formación de embolias en los vasos sanguíneos delgados tales como la vena pulmonar y similares. Por otra parte, en una realización preferible, dado que se suprime una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en la suspensión mediante al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano en la suspensión de la presente invención, se puede realizar el trasplante de células madre en mejores condiciones, y cabe esperar la mejora del efecto del tratamiento cuando con el uso de la suspensión de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un preparado de suspensión de células madre de mamífero que contiene la suspensión anteriormente mencionada de la presente invención.

50 El preparado de suspensión de células madre de mamífero de la presente invención se puede producir introduciendo la suspensión anteriormente mencionada de la presente invención en un recipiente esterilizado apropiado. Los ejemplos del recipiente incluyen botella, vial, jeringa, bolsa de plástico tal como una bolsa de infusión y similares, tubo de ensayo y similares. Estos recipientes pueden estar constituidos de diversos materiales tales como vidrio o plástico. Se pueden conectar una cánula y/o una aguja de inyección a estos recipientes para permitir la infusión por goteo de la suspensión de células madre de mamífero del recipiente a los pacientes.

II. Supresión de la agregación de las células madre de mamífero

(1. Inhibidor de la agregación de las células madre de mamífero)

- 5 La presente invención proporciona un inhibidor de la agregación de células madre de mamífero que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano. Estos polisacáridos, en concreto, suprimen la agregación de las células madre de mamífero en una suspensión (es decir, células madre de mamífero flotantes).
- 10 La definición de cada término y expresión tal como "trehalosa", "hidroxietilalmidón", "dextrano", "mamífero", "célula madre", "adhesivo/a", "aislado/a o purificado/a", "estado de una sola célula", "flotante", "agregación", "isotónico", "solución fisiológica acuosa", y similares, es, a menos que se especifique lo contrario, como se describe en el apartado I. mencionado anteriormente.
- 15 Las células madre de mamífero que serán la diana de aplicación del inhibidor de la agregación de la presente invención son preferentemente células madre adhesivas. Esto se debe a que las células madre adhesivas en suspensión (es decir, en un estado flotante) se agregan más fácilmente. Las células madre adhesivas son preferentemente células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.
- 20 Las células madre de mamífero se pueden separar del organismo o cultivarse en pasos *in vitro*.
- Las células madre de mamífero que serán diana de aplicación del inhibidor de la agregación de la presente invención están preferentemente aisladas o purificadas.
- 25 Las células madre de mamífero que serán diana de aplicación del inhibidor de la agregación de la presente invención contienen preferentemente células madre de mamífero en un estado de una sola célula. La proporción de las células madre de mamífero en un estado de una sola célula, que están contenidas en las células madre de mamífero, en general, no es inferior al 70 %, preferentemente no es inferior al 90 %, más preferentemente no es inferior al 95 %, incluso más preferentemente no es inferior al 99 % (siendo, por ejemplo, del 100 %).
- 30 Las células madre de mamífero que serán diana de aplicación del inhibidor de la agregación de la presente invención están flotando preferentemente en una suspensión de las células madre.
- En particular, las células madre adhesivas flotan en una suspensión y se agregan fácilmente cuando están en un estado de una sola célula. Sin embargo, el inhibidor de la agregación de la presente invención puede suprimir eficazmente la agregación, pudiéndose mantener un estado de una sola célula durante un largo período de tiempo.
- 35 El inhibidor de la agregación de la presente invención comprende 1, 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano. Cuando el inhibidor de la agregación de la presente invención contiene 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados de estos grupos, la combinación de los mismos es la de trehalosa e hidroxietilalmidón, o de trehalosa y dextrano, o de hidroxietilalmidón y dextrano, o de trehalosa e hidroxietilalmidón y dextrano.
- 40 El inhibidor de la agregación de la presente invención puede ser al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, o puede contener además un vehículo fisiológicamente aceptable. Los ejemplos de vehículo fisiológicamente aceptable incluyen solución fisiológica acuosa (por ejemplo, soluciones isotónicas acuosas tales como solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con HEPES, solución de Ringer, solución de glucosa acuosa al 5 %, medio líquido para el cultivo de mamífero, solución acuosa de agente isotónico (glucosa, D-sorbitol, D-manitol, lactosa, cloruro de sodio, etc.) y similares), estabilizador (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol y similares), agente de tamponamiento (por ejemplo, tampón de fosfato, tampón de acetato de sodio), agente quelante (por ejemplo, EDTA, EGTA, ácido cítrico, salicilato), excipiente, aglutinante, agentes de solubilización, conservante, antioxidante y similares. El inhibidor de la agregación de la presente invención es preferentemente una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano (solución de los polisacáridos anteriormente mencionados en una solución fisiológica acuosa), más preferentemente una solución isotónica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.
- 45 El inhibidor de la agregación de la presente invención se puede usar mediante la adición a una suspensión de células madre de mamífero. Como alternativa, cuando el inhibidor de la agregación de la presente invención es una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, las células madre de mamífero se pueden suspender en el inhibidor de la agregación de la presente invención. El inhibidor de la agregación de la presente invención se añade o las células madre de mamífero se suspenden en el inhibidor de la agregación de la presente invención, de manera que se alcance la concentración de polisacáridos suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero.
- 50
- 55
- 60
- 65

5 Cuando se usa trehalosa como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de trehalosa suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero en la suspensión, en general, es inferior a 4,53 mg/ml, preferentemente inferior a 15,1 mg/ml. Cuanto mayor sea la concentración de trehalosa, mayor será el efecto de supresión de la agregación. Sin embargo, cuando la concentración de trehalosa es demasiado alta, la tasa de supervivencia de las células madre puede verse influida negativamente. Por lo tanto, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de trehalosa de la suspensión, en general, no es superior a 362,4 mg/ml, preferentemente no superior a 181,2 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de trehalosa de la suspensión es, en general, de 4,53 a 362,4 mg/ml, preferentemente de 15,1 a 181,2 mg/ml.

10 Incluso cuando se usan polisacáridos anteriormente mencionados distintos de la trehalosa, se puede determinar apropiadamente una concentración suficiente para suprimir la agregación de células madre de mamífero en la suspensión de acuerdo con la concentración de trehalosa.

15 Cuando se usa hidroxietilalmidón como el polisacárido anteriormente mencionado, la concentración de hidroxietilalmidón suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero en la suspensión, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de hidroxietilalmidón en la suspensión, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de hidroxietilalmidón en la suspensión es, por ejemplo, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 20 100 mg/ml.

25 Cuando se usa dextrano como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de dextrano suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero en la suspensión, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml, más preferentemente no inferior a 30 mg/ml, incluso más preferentemente no inferior a 65 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de dextrano en la suspensión, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 200 mg/ml, más preferentemente no superior a 125 mg/ml, aún más preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de dextrano en la suspensión es, por ejemplo, de 1 a 30 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 200 mg/ml, más preferentemente de 30 a 125 mg/ml, aún más preferentemente de 30 a 100 mg/ml, incluso más preferentemente de 65 a 100 mg/ml.

35 Por otra parte, cuando se usan 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, el inhibidor de la agregación de la presente invención se añade, o las células madre de mamífero se suspenden en el inhibidor de la agregación de la presente invención, de forma que la agregación de las células madre de mamífero en una suspensión es consiguientemente suprimida.

40 El inhibidor de la agregación de la presente invención contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano en una cantidad suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero cuando se usa como se ha mencionado anteriormente. El contenido de los polisacáridos en el inhibidor de la agregación de la presente invención está, en general, dentro del intervalo del 0,001 al 100 % (p/p).

45 Cuando el inhibidor de la agregación de la presente invención es una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, la concentración de los polisacáridos en la solución acuosa no se limita a una en particular siempre y cuando sea suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero. Cuanto mayor sea la concentración de los polisacáridos anteriormente mencionados, mayor será el efecto de supresión de la agregación. Sin embargo, cuando la concentración de polisacáridos es demasiada alta, la tasa de supervivencia de las células madre puede verse influenciada negativamente.

50 Por ejemplo, cuando se usa trehalosa como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de trehalosa en la solución acuosa, en general, no es inferior a 4,53 mg/ml, preferentemente no inferior a 15,1 mg/ml. Para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de trehalosa en la solución acuosa, en general, no es superior a 362,4 mg/ml, preferentemente no superior a 181,2 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de trehalosa de la solución acuosa es, en general, de 4,53 a 55 362,4 mg/ml, preferentemente de 15,1 a 181,2 mg/ml.

60 Incluso cuando se usan polisacáridos anteriormente mencionados distintos de trehalosa, se puede determinar apropiadamente una concentración de trehalosa suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero de acuerdo con la concentración de trehalosa.

65 Cuando se usa hidroxietilalmidón como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa es, por ejemplo,

de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml.

5 Cuando se usa dextrano como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de dextrano en la solución acuosa de la presente invención, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml, más preferentemente no inferior a 30 mg/ml, aún más preferentemente no inferior a 65 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de dextrano en la solución acuosa, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 200 mg/ml, más preferentemente no superior a 125 mg/ml, aún más preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de dextrano en la solución acuosa es, por ejemplo, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml, más preferentemente de 30 a 125 mg/ml, aún más preferentemente de 30 a 100 mg/ml, incluso más preferentemente de 65 a 100 mg/ml.

15 Por otra parte, cuando se usan 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, la solución acuosa contiene cada polisacárido, de forma que la agregación de las células madre de mamífero es consiguientemente suprimida.

20 Al suspender las células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, que se ha preparado a dicha concentración, la agregación de las células madre de mamífero se puede suprimir convenientemente.

(2. Método de supresión de la agregación de células madre de mamífero)

25 La presente invención proporciona un método de supresión de la agregación de células madre de mamífero, que comprende suspender células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano (preferentemente, solución isotónica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano). Estos polisacáridos, en particular, suprimen la agregación de las células madre de mamífero en una suspensión (es decir, células madre de mamífero flotantes).

30 La suspensión de células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano abarca la adición de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano a una suspensión de células madre de mamífero, produciendo una suspensión de células madre de mamífero en la solución fisiológica acuosa que contiene los polisacáridos.

35 La definición de cada término y expresión tal como "trehalosa", "hidroxietilalmidón", "dextrano", "mamífero", "célula madre", "adhesivo/a", "aislado/a o purificado/a", "estado de una sola célula", "flotante", "agregación", "isotónico", "solución fisiológica acuosa", y similares, es, a menos que se especifique lo contrario, como se describe en el apartado I. mencionado anteriormente.

40 Las células madre de mamífero que se usarán para el método de supresión de la agregación de la presente invención son preferentemente células madre adhesivas. Esto se debe a que las células madre adhesivas en suspensión (es decir, en un estado flotante) se agregan más fácilmente. Las células madre adhesivas son preferentemente células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.

45 Las células madre de mamífero se pueden separar del organismo o cultivarse en pasos *in vitro*.

50 Las células madre de mamífero que se usarán para el método de supresión de la agregación de la presente invención están preferentemente aisladas o purificadas.

55 Las células madre de mamífero que se usarán para el método de supresión de la agregación de la presente invención contienen preferentemente células madre de mamífero en un estado de una sola célula. La proporción de las células madre de mamífero en un estado de una sola célula, que están contenidas en las células madre de mamífero, en general, no es inferior al 70 %, preferentemente no es inferior al 90 %, más preferentemente no es inferior al 95 %, incluso más preferentemente no es inferior al 99 % (siendo, por ejemplo, del 100 %).

60 En particular, las células madre adhesivas flotan en una suspensión y se agregan fácilmente cuando están en un estado de una sola célula. Sin embargo, al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y el dextrano puede suprimir eficazmente la agregación, pudiéndose mantener un estado de una sola célula durante un largo período de tiempo.

65 La solución fisiológica acuosa que se usará en la presente invención contiene 1, 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano. Cuando la solución fisiológica acuosa contiene 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados de estos grupos, la combinación de los mismos es la de trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano, o hidroxietilalmidón y dextrano, o trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

La solución fisiológica acuosa que se usará la presente invención contiene los polisacáridos anteriormente mencionados a una concentración suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero.

5 Cuando se usa trehalosa como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de trehalosa en la solución fisiológica acuosa no se limita a una en particular siempre que sea suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero. Por lo general, no es inferior a 4,53 mg/ml, preferentemente no inferior a 15,1 mg/ml. Para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de trehalosa en la solución fisiológica acuosa preferentemente no es superior a 362,4 mg/ml, más preferentemente no superior a 181,2 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de trehalosa de la solución fisiológica acuosa es  
10 preferentemente de 4,53 a 362,4 mg/ml, más preferentemente de 15,1 a 181,2 mg/ml.

Incluso cuando se usan polisacáridos anteriormente mencionados distintos de la trehalosa, se puede determinar apropiadamente una concentración suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero de  
15 acuerdo con la trehalosa.

20 Cuando se usa hidroxietilalmidón como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución fisiológica acuosa no se limita a una en particular siempre que sea suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero. Por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución fisiológica acuosa, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución fisiológica acuosa es, por ejemplo, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml.

25 Cuando se usa dextrano como polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de dextrano en la solución fisiológica acuosa no se limita a una en particular siempre que sea suficiente para suprimir la agregación de las células madre de mamífero. Por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml, más preferentemente no inferior a 30 mg/ml, incluso más preferentemente no inferior a 65 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de dextrano en la solución fisiológica acuosa, en general, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 200 mg/ml, más preferentemente no superior a 125 mg/ml, incluso más preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de dextrano en la solución fisiológica acuosa es, en general, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 200 mg/ml, más preferentemente de 30 a 125 mg/ml, incluso más preferentemente de 30 a 100 mg/ml, todavía más preferentemente de 65 a 100 mg/ml.

35 Por otra parte, cuando se usan 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, la solución fisiológica acuosa contiene cada polisacárido de forma que la agregación de las células madre de mamífero pueda ser consiguientemente suprimida.

40 La temperatura de una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, cuando se suspenden las células madre de mamífero, en general, está dentro del intervalo de 0 a 37 °C, preferentemente de 0 a 25 °C.

45 La densidad de las células madre de mamífero en la suspensión no se limita a una en particular siempre y cuando se pueda lograr el efecto de supresión de la agregación de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, y, en general, esté dentro del intervalo de  $10^3$  a  $10^{10}$  células/ml.

50 La suspensión de células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano se puede realizar mediante un método bien conocido en el campo técnico, tal como mediante pipeteo, roscado y similares. Mediante dicha operación, las células madre de mamífero flotan en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

III. Supresión de la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero

55 (1. Inhibidor de la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero)

60 La presente invención proporciona un inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero, que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano. Cuando el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero contiene 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados de estos grupos, una combinación de trehalosa e hidroxietilalmidón, una combinación de trehalosa y dextrano, una combinación de hidroxietilalmidón y dextrano y una combinación de trehalosa e hidroxietilalmidón y dextrano, en particular, suprimen una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en una suspensión (es decir, células madre de mamífero flotantes).

65 La definición de cada término y expresión tal como "trehalosa", "hidroxietilalmidón", "dextrano", "mamífero", "célula madre", "adhesivo/a", "aislado/a o purificado/a", "estado de una sola célula", "flotante", "agregación", "isotónico",

"solución fisiológica acuosa", y similares, es, a menos que se especifique lo contrario, como se describe en el apartado I. mencionado anteriormente.

5 Las células madre de mamífero que serán la diana de aplicación del inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención son preferentemente células madre adhesivas. Esto se debe a que la tasa de supervivencia de las células madre adhesivas se reduce más fácilmente en una suspensión (es decir, en un estado flotante) en comparación con las células no adhesivas. Las células madre adhesivas son preferentemente células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.

10 Las células madre de mamífero se pueden separar del organismo o cultivarse en pasos *in vitro*.

Las células madre de mamífero que serán diana de aplicación del inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención están preferentemente aisladas o purificadas.

15 Las células madre de mamífero que se usarán para el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención contienen preferentemente células madre de mamífero en un estado de una sola célula. La proporción de las células madre de mamífero en un estado de una sola célula, que están contenidas en las células madre de mamífero, en general, no es inferior al 70 %, preferentemente no es inferior al 90 %, más preferentemente no es inferior al 95 %, incluso más preferentemente no es inferior al 99 % (siendo, por ejemplo, del 100 %).

20 Las células madre de mamífero que serán diana de aplicación del inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención están preferentemente flotando en una suspensión de las células madre.

25 En particular, las células madre adhesivas tienden a sufrir daños cuando están flotando en una suspensión y en un estado de una sola célula, y la tasa de supervivencia de las mismas disminuye fácilmente. Sin embargo, es posible suprimir de manera eficaz una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre adhesivas mediante el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención.

30 El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención comprende preferentemente una combinación de trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano. Se espera que una combinación de trehalosa con hidroxietilalmidón o dextrano mejore el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. En particular, cabe esperar que la combinación suprima eficazmente una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre adhesivas en la suspensión en el estado de flotación (en especial, células madre adhesivas en estado de flotación en una suspensión y en estado de una sola célula).

35 El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención puede consistir al menos en un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, o puede comprender además un vehículo fisiológicamente aceptable además de estos componentes. Los ejemplos de vehículo fisiológicamente aceptable incluyen solución fisiológica acuosa (por ejemplo, soluciones isotónicas acuosas tales como solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con HEPES, solución de Ringer, solución de glucosa acuosa al 5 %, medio líquido para el cultivo de mamífero, solución acuosa de agente isotónico (glucosa, D-sorbitol, D-manitol, lactosa, cloruro de sodio, etc.) y similares), estabilizador (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol y similares), agente de tamponamiento (por ejemplo, tampón de fosfato, tampón de acetato de sodio), agente quelante (por ejemplo, EDTA, EGTA, ácido cítrico, salicilato), excipiente, aglutinante, agentes de solubilización, conservante, antioxidante y similares. El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención es preferentemente una solución fisiológica acuosa que contiene 1, 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano (solución de los polisacáridos anteriormente mencionados en una solución fisiológica acuosa), más preferentemente una solución isotónica acuosa que contiene 1, 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

50 El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención se puede usar mediante la adición a una suspensión de células madre de mamífero. Como alternativa, cuando el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención es una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, las células madre de mamífero se pueden suspender en el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención. El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención se añade o las células madre de mamífero se suspenden en el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención, de manera que se alcance la concentración suficiente de polisacáridos anteriormente mencionados para suprimir la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero.

60 Cuando se usa trehalosa como el polisacárido, la concentración de trehalosa suficiente para suprimir la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en la suspensión, en general, es inferior a 4,53 mg/ml, preferentemente inferior a 15,1 mg/ml. Cuanto mayor sea la concentración de trehalosa, mayor será el efecto de supresión de la reducción de la tasa de supervivencia. Sin embargo, cuando la concentración de trehalosa es demasiado alta, la tasa de supervivencia de las células madre puede verse influida negativamente. Por lo tanto, para

evitar una influencia adversa, la concentración de trehalosa de la suspensión, en general, no es superior a 362,4 mg/ml, preferentemente no superior a 181,2 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de trehalosa de la suspensión es, en general, de 4,53 a 362,4 mg/ml, preferentemente de 15,1 a 181,2 mg/ml.

5 Incluso cuando se usan polisacáridos anteriormente mencionados distintos de la trehalosa, se puede determinar apropiadamente una concentración suficiente para suprimir la reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero en una suspensión de acuerdo con la trehalosa.

10 Cuando se usa hidroxietilalmidón como polisacárido, la concentración de hidroxietilalmidón suficiente para suprimir la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en la suspensión, en general, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml. Cuanto mayor sea la concentración de hidroxietilalmidón, mayor será el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia. Sin embargo, cuando la concentración de hidroxietilalmidón es demasiado alta, por el contrario, la tasa de supervivencia de las células madre puede verse influida negativamente. Por lo tanto, para evitar la influencia adversa, la concentración de hidroxietilalmidón en la suspensión, por lo general, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de hidroxietilalmidón de la suspensión, en general, es de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml.

20 Cuando se usa dextrano como polisacárido, la concentración de dextrano suficiente para suprimir la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en la suspensión, en general, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml, más preferentemente no inferior a 30 mg/ml, más preferentemente no inferior a 65 mg/ml. Cuanto mayor sea la concentración de dextrano, mayor será el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia. Sin embargo, cuando la concentración de dextrano es demasiado alta, por el contrario, la tasa de supervivencia de las células madre puede verse influida negativamente. Por lo tanto, para evitar la influencia adversa, la concentración de dextrano en la suspensión, en general, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 200 mg/ml, más preferentemente, no superior a 125 mg/ml, incluso más preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de dextrano de la suspensión, en general, es de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml, más preferentemente, de 30 a 125 mg/ml, incluso más preferentemente de 30 a 100 mg/ml, todavía más preferentemente de 65 a 100 mg/ml.

30 Cuando se usa una combinación que comprende trehalosa e hidroxietilalmidón; trehalosa y dextrano; o trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano como polisacáridos, la concentración de cada polisacárido en la suspensión se ajusta preferentemente de manera que el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero se mejora más mediante el uso de estas combinaciones de mediante el uso individual de cada uno de entre trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

40 El inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano en una cantidad suficiente para suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero cuando se usa como se ha mencionado anteriormente. El contenido de polisacáridos en el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención, en general, está dentro del intervalo del 0,001 al 100 % (p/p).

45 Cuando se usa una combinación que comprende trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano como polisacárido, el contenido de trehalosa se encuentra dentro del intervalo, en general, del 0,001 al 99,999 % (p/p), y el contenido de hidroxietilalmidón o dextrano está dentro de la intervalo, en general, del 0,001 al 99,999 % (p/p), en el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención.

50 Cuando se usa una combinación que comprende trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano como polisacárido, el contenido de cada polisacárido en el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención, en general, está dentro del intervalo del 0,001 al 99,997 % (p/p).

55 Cuando el inhibidor de una reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención es una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, la concentración de los polisacáridos en la solución acuosa no se limita a una en particular siempre y cuando sea suficiente para suprimir la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. Cuanto mayor sea la concentración de los polisacáridos anteriormente mencionados, mayor será el efecto de supresión de la reducción de la tasa de supervivencia. Sin embargo, cuando la concentración de polisacáridos es demasiado alta, la tasa de supervivencia de las células madre puede verse influenciada negativamente.

60 Por ejemplo, cuando se usa trehalosa, la concentración de trehalosa en la solución acuosa, en general, no es inferior a 4,53 mg/ml, preferentemente no inferior a 15,1 mg/ml, de manera que es suficiente para suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. Para evitar una influencia adversa, además, la concentración de trehalosa en la solución acuosa, en general, no es superior a 362,4 mg/ml, preferentemente no superior a 181,2 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de trehalosa de la solución acuosa es, en general, de 4,53 a 362,4 mg/ml, preferentemente de 15,1 a 181,2 mg/ml.

Incluso cuando se usan polisacáridos anteriormente mencionados distintos de la trehalosa, se puede determinar apropiadamente una concentración suficiente para suprimir la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en una suspensión de acuerdo con la concentración de trehalosa.

5 Cuando se usa hidroxietilalmidón como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa es, por ejemplo, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml.

10 Cuando se usa dextrano como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de dextrano en la solución acuosa de la presente invención, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml, más preferentemente no inferior a 30 mg/ml, aún más preferentemente no inferior a 65 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa, la concentración de dextrano en la solución acuosa, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 200 mg/ml, más preferentemente no superior a 125 mg/ml, aún más preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de dextrano en la solución acuosa es, por ejemplo, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 200 mg/ml, más preferentemente de 30 a 125 mg/ml, aún más preferentemente de 30 a 100 mg/ml, incluso más preferentemente de 65 a 100 mg/ml.

20 Cuando se usa una combinación que comprende trehalosa e hidroxietilalmidón; trehalosa y dextrano; o trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano como polisacáridos, la concentración de cada polisacárido en la solución acuosa se ajusta preferentemente de manera que el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero se mejora más mediante el uso de estas combinaciones que mediante el uso individual de cada uno de entre trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

25 Al suspender las células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, que se ha ajustado a dicha concentración, la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero se puede suprimir convenientemente.

30 (2. Método de supresión de la reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero)

35 La presente invención proporciona un método de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero, que comprende suspender las células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene 1, 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano (preferentemente, solución isotónica acuosa que contiene 1, 2 o 3 clases de polisacáridos seleccionados del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano). Cuando se usan 2 o 3 clases de polisacáridos en combinación, una combinación de trehalosa e hidroxietilalmidón, una combinación de trehalosa y dextrano, una combinación de hidroxietilalmidón y dextrano, y una combinación de trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, en particular, suprimen una reducción de la tasa de supervivencia de células madre de mamífero en una suspensión (es decir, células madre de mamífero flotantes).

45 La suspensión de células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano también abarca la adición de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano a una suspensión de células madre de mamífero, produciendo una suspensión de células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

50 La definición de cada término y expresión tal como "trehalosa", "hidroxietilalmidón", "dextrano", "mamífero", "célula madre", "adhesivo/a", "aislado/a o purificado/a", "estado de una sola célula", "flotante", "agregación", "isotónico", "solución fisiológica acuosa", y similares, es, a menos que se especifique lo contrario, como se describe en el apartado I. mencionado anteriormente.

55 Las células madre de mamífero que se usarán para el método de supresión de la reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención son preferentemente células madre adhesivas. Esto se debe a que la tasa de supervivencia de las células madre adhesivas se reduce más fácilmente en una suspensión (es decir, en un estado flotante) en comparación con las células no adhesivas. Las células madre adhesivas son preferentemente células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.

60 Las células madre de mamífero se pueden separar del organismo o cultivarse en pasos *in vitro*.

Las células madre de mamífero que se usarán para el método de supresión de la reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención están preferentemente aisladas o purificadas.

65

Las células madre de mamífero que se usarán para el método de supresión de la reducción de la tasa de supervivencia de la presente invención contienen preferentemente células madre de mamífero en un estado de una sola célula. La proporción de las células madre de mamífero en un estado de una sola célula, que están contenidas en las células madre de mamífero, en general, no es inferior al 70 %, preferentemente no es inferior al 90 %, más preferentemente no es inferior al 95 %, incluso más preferentemente no es inferior al 99 % (siendo, por ejemplo, del 100 %).

En particular, las células madre adhesivas tienden a sufrir daños cuando están flotando en una suspensión y en un estado de una sola célula, y la tasa de supervivencia de las mismas disminuye fácilmente. Sin embargo, es posible suprimir de manera eficaz una reducción de la tasa de supervivencia adhesiva de las células madre mediante al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

La solución fisiológica acuosa que se usará en la presente invención preferentemente comprende una combinación de trehalosa e hidroxietilalmidón, o trehalosa y dextrano. Cabe esperar que una combinación de trehalosa con hidroxietilalmidón o dextrano mejore el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. En particular, cabe esperar que la combinación suprima eficazmente una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre adhesivas en la suspensión en estado de flotación (especialmente, células madre adhesivas en estado de flotación en una suspensión y en estado de una sola célula).

La concentración de los polisacáridos en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano no se limita a una en particular siempre y cuando sea suficiente para suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero.

Por ejemplo, cuando se usa trehalosa como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de trehalosa en la solución acuosa, por lo general, no es inferior a 4,53 mg/ml, preferentemente no inferior a 15,1 mg/ml, de manera que será suficiente para suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero. Para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de trehalosa en la solución acuosa, en general, no es superior a 362,4 mg/ml, preferentemente no superior a 181,2 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de trehalosa de la solución acuosa es, en general, de 4,53 a 362,4 mg/ml, más preferentemente de 15,1 a 181,2 mg/ml.

Incluso cuando se usan polisacáridos anteriormente mencionados distintos de la trehalosa, se puede determinar apropiadamente una concentración suficiente para suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero en una suspensión de acuerdo con la trehalosa.

Cuando se usa hidroxietilalmidón como el polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa, por ejemplo, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de hidroxietilalmidón en la solución acuosa es, por ejemplo, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 100 mg/ml.

Cuando se usa dextrano como polisacárido mencionado anteriormente, la concentración de dextrano en la solución fisiológica acuosa de la presente invención, por ejemplo, no es inferior a 1 mg/ml, preferentemente no inferior a 10 mg/ml, más preferentemente no inferior a 30 mg/ml, incluso más preferentemente no inferior a 65 mg/ml. Además, para evitar una influencia adversa sobre la tasa de supervivencia de las células madre, la concentración de dextrano en la solución acuosa, en general, no es superior a 500 mg/ml, preferentemente no superior a 200 mg/ml, más preferentemente no superior a 125 mg/ml, incluso más preferentemente no superior a 100 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de dextrano en la solución acuosa es, por ejemplo, de 1 a 500 mg/ml, preferentemente de 10 a 200 mg/ml, más preferentemente de 30 a 125 mg/ml, incluso más preferentemente de 30 a 100 mg/ml, todavía más preferentemente de 65 a 100 mg/ml.

Cuando se usa como polisacáridos una combinación que comprende trehalosa e hidroxietilalmidón; trehalosa y dextrano; o trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, la concentración de cada polisacárido en la solución acuosa se ajusta preferentemente de manera que el efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre de mamífero se mejore más mediante el uso de estas combinaciones que mediante el uso individual de cada uno de trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

La temperatura de una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano, cuando se suspenden las células madre de mamífero, en general, está dentro del intervalo de, en general, 0 a 37 °C, preferentemente de 0 a 25 °C.

La densidad de las células madre de mamífero en la suspensión no se limita a una en particular siempre y cuando se pueda lograr el efecto de supresión de la agregación de la trehalosa, y en general, esté dentro del intervalo de  $10^3$  a  $10^{10}$  células/ml.

La suspensión de las células madre de mamífero en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano se puede realizar mediante un método bien conocido en el campo técnico, tal como mediante pipeteo, roscado y similares. Mediante dicha operación, las células madre de mamífero flotan en una solución fisiológica acuosa que contiene al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano.

Aunque la presente invención se explica de manera más concreta a continuación haciendo referencia a los ejemplos, no se limita en modo alguno a los siguientes ejemplos.

## 10 Ejemplos

[Ejemplo 1]

1. Preparación de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo porcino (AT-MSc de cerdo)

(1) Preparación de tejido porcino

Se extrajeron tejidos adiposos subcutáneos porcinos de la región inguinal, se retiraron tejidos visibles diferentes de los tejidos adiposos tales como vasos sanguíneos, músculo y similares con microtijeras, y tras ello, se picaron y se lavaron con HBSS (solución de Hanks) repetidas veces. Se continuó el lavado hasta que se pudo confirmar a simple vista la eliminación de las células sanguíneas (o coágulos) y la eliminación de sustancias flotantes membranosas tales como el músculo y similares. Los tejidos adiposos subcutáneos porcinos obtenidos se picaron con unas tijeras.

Se mezclaron los tejidos picados con la misma cantidad de HBSS. Se agitó la mezcla suavemente y se dejó en reposo para permitir la separación en 2 capas. Solo se recuperó la capa superior. Se añadió colagenasa al 0,2 % (tipo I)/HBSS a la capa superior extraída, y se agitó la mezcla suavemente a 37 °C hasta que los tejidos adiposos se licuaron completamente (máximo 90 min). Se añadió a la mezcla de reacción  $\alpha$ MEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % en una cantidad equivalente o superior a la cantidad de la mezcla de reacción de colagenasa. Tras mezclar, la mezcla se separó en 3 capas (células nucleadas, solución y grasa, de abajo a arriba) por centrifugación. Solo se extrajo la capa inferior y se volvió a suspender en HBSS. Esta operación se repitió tres veces. Finalmente, se transfirió la suspensión de células en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 % a una placa de cultivo y se cultivó. Las MSC se adhirieron a la parte inferior de la placa de cultivo.

(2) Preparación de células (AT-MSc P6 de cerdo) para su uso en el experimento

En la operación de (1), las MSC que se adhirieron a la placa de cultivo siguieron creciendo y, de 5 a 7 días más tarde, la parte inferior de la placa de cultivo se llenó densamente con las células. Al llegar a la confluencia, se induce la interrupción del crecimiento o la muerte celular en las MSC. Antes de llegar a la confluencia, por lo tanto, se separaron las MSC de la placa de cultivo y se sembraron en una placa de cultivo nueva a una densidad baja. Se lavaron las MSC que se adhirieron a la parte inferior de la placa de cultivo tres veces con PBS, y se añadió tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA•4Na 1 mM). Se separaron las MSC de la placa de cultivo, se suspendieron en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 % en una cantidad que proporcionó baja densidad de las células, y se transfirieron a una placa de cultivo nueva. Esta operación se repitió 6 veces (6 pasos = P6).

(3) Suspensión de células en cada solución

Se usaron las AT-MSc P6 de cerdo obtenidas en (2) para el experimento.

Se lavaron las células tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA•4Na 1 mM) durante 20 s en un estado de una sola célula. Las células obtenidas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se recuperaron por centrifugación. Tras lavar dos veces con PBS (-), se sometieron las células al lavado una vez más con cada solución [ET-Kyoto (ET-K, fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), HBSS, MSCM (DMEM + FBS al 10 %)] para la adaptación. ET-K contiene trehalosa a una concentración de 45,3 mg/ml. Tras ello, se suspendieron las células en cada solución a  $2,5 \times 10^5$  células/50  $\mu$ l.

La suspensión se dejó reposar a cada temperatura (0, 25 y 37 °C), se pipeteó varias veces con 20  $\mu$ l de PIPETMAN 0, 30, 60, 120 y 240 min más tarde, y se transfirieron 10  $\mu$ l de la misma a una placa.

Se enfocó un microscopio estereoscópico en la superficie más inferior de la suspensión sobre la placa, y se realizó la observación.

Las células que formaron una masa con las células adyacentes bajo el microscopio se tomaron como la masa de agregado celular. Se confirmó que la masa de agregado celular se movía realmente como una masa mediante la agitación de la placa en la platina del microscopio.

2. Examen de la tasa de supervivencia celular

Se examinó la influencia de cada condición en la tasa de supervivencia celular.

- 5 Se calculó el número de las células supervivientes por cada 50 µl mediante tinción con azul de tripano, y se calculó la tasa de supervivencia de las células comparando el número con el de las células supervivientes en 50 µl en el momento del inicio ( $2,5 \times 10^5$  células). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tasa de supervivencia de las MSC en diversas suspensiones celulares											
30 min						60 min					
	0	25	37		0	25	37		0	25	37
MSCM	88,3	90	90,2	MSCM	84,4	83,9	82	HBSS	85,7	79,2	88,1
HBSS	82,5	91,4	93,3	ETK	89,8	86	84,8				
ETK	97,2	95	93,8								
120 min						240 min					
	0	25	37		0	25	37		0	25	37
MSCM	78,5	82,3	75,4	MSCM	83,1	74,5	55,6	HBSS	79	84,4	59,5
HBSS	79	80,4	77,8	ETK	84,5	78,7	72,5				
ETK	86,8	84,7	82,1								

- 10 Cuando se usó MSCM o HBSS, la tasa de supervivencia de las células disminuyó notablemente con el paso del tiempo. Sin embargo, se suprimió una reducción de la tasa de supervivencia con ET-K.

3. Examen del estado de agregación celular

- 15 Cuando se usó MSCM, se observó la formación de masas de agregados celulares a los 30 min de iniciarse el ensayo a 25 °C y 37 °C. Incluso a 0 °C, también se observó la formación de las masas de agregados celulares a los 60 min de iniciarse el ensayo.

- 20 Cuando se usó HBSS, se observó la formación de masas de agregados celulares a los 120 min de iniciarse el ensayo a 25 °C y 37 °C. Incluso a 0 °C, también se observó la formación de las masas de agregados celulares a los 240 min de iniciarse el ensayo.

- 25 Por otra parte, cuando se usó ET-K, no se observó la formación de una masa de agregado celular hasta 120 min después de iniciarse el ensayo a 25 °C y 37 °C, y se observó algo de formación de masas de agregados celulares a los 240 min de iniciarse el ensayo. A 0 °C, no se observó la formación de las masas de agregados celulares incluso después de 240 min de iniciarse en ensayo. Cuando se usó ET-K, el estado flotante de las células se mantuvo hasta 240 min del inicio del ensayo a cualquier temperatura.

30 4. Examen de la morfología celular

Cuando se usó MSCM, se observó que algunas de las células habían formado una protuberancia. La tasa de aparición de células hinchadas fue baja.

- 35 Cuando se usó HBSS, la proporción de las células con protuberancia aumentó con el tiempo. Además, la tasa de aparición de las células hinchadas era alta.

Por otra parte, cuando se usó ET-K, la proporción de las células con protuberancia fue baja en comparación con MSCM y HBSS. La tasa de aparición de células hinchadas fue baja en comparación con MSCM y HBSS.

- 40 En general, se sabe que las células adherentes forman protuberancia en un intento por adherirse a una placa y similares dependiendo del tiempo de flotación. Esto es porque el estado de flotación aplica una tensión a las células. Además, el hinchamiento de la célula se considera indicador de una reducción de la potencia de control de la presión osmótica dentro y fuera del citoplasma. A partir de los resultados de las observaciones anteriores de la morfología celular, se consideró que ET-K aplica una menor tensión en las células en comparación con otras soluciones de la composición.
- 45

[Ejemplo 2]

Se pasaron dos veces las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo porcino preparadas en el Ejemplo 1, y las células obtenidas (AT-MSK P2 de cerdo) se sembraron en tres placas de 10 cm. Las células se lavaron tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA·4Na 1 mM) durante 20 s en un estado de una sola célula. Se transfirieron las células obtenidas ( $1,7 \times 10^6$  células; tasa de supervivencia, 94,1 %) a un tubo Falcon de 15 ml, se recuperaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS (-) y se suspendieron en 5 ml de ET-Kyoto (ET-K fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). Se dispuso la suspensión de células en ET-K mediante 500  $\mu$ l de diez tubos de 15 ml, y se dejó reposar a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 minutos. Se añadió una cantidad apropiada de solución salina a cada tubo para diluir la suspensión de células en ET-K de 2 a 10 veces, y se dejó la mezcla en reposo durante más de 30 min. Tras ello, de la misma manera que en el Ejemplo 1, se calculó la tasa de supervivencia, y se observó la presencia o ausencia de la masa de agregado celular. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Velocidad de dilución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de células	1,25	1	1,25	0,92	1	1	1,25	0,92	1	0,92
Tasa de supervivencia	91,5	92,3	90,2	92,3	82,3	88,3	93,1	90,1	90,5	83,5
Número de agregados	0	0	0	2	2	2-3	2	2-3	2-3	2-3
Proporción de agregación	0	0	0	1 o inferior						
Volumen líquido total	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Concentración de trehalosa (mg/ml)	45,3	22,65	15,1	11,33	9,06	7,55	6,47	5,66	5,03	4,53

(Capacidad de agregación de las células)

Al usarse una solución madre de ET-K, una solución diluida 2 veces de la misma y una solución diluida 3 veces de la misma, no se observó una masa de agregado celular. Cuando se diluyó ET-K 4 veces o más, se observaron ligeramente masas de agregados de 2 a 3 células unidas. Por lo tanto, se sugirió que se presenta un efecto supresor de la agregación de células madre a una concentración de trehalosa al menos no inferior a 15,1 mg/ml.

(Propiedad de flotación de las células)

Tras la observación de la capacidad de agregación de las células, se volvieron a suspender las células, se dejaron reposar a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 min, y se observó la propiedad de flotación de las células bajo un microscopio. Al usarse una solución madre de ET-K, una solución diluida 2 veces de la misma y una solución diluida 3 veces de la misma, las células flotaban de forma estable. Por otro lado, cuando se diluyó ET-K 8 veces o más, las células precipitaron sobre todo de la misma manera que con MSCM y HBSS. Por lo tanto, se sugirió que las células madre flotan de forma estable a una concentración de trehalosa de al menos 15,1 mg/ml o superior.

(Morfología y tasa de supervivencia de las células)

Incluso al diluir ET-K con solución salina, no se observó ningún cambio significativo en la morfología celular ni en la tasa de supervivencia en el intervalo ensayado de la velocidad de dilución.

[Ejemplo 3]

Se pasaron diez veces las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo porcino preparadas en el Ejemplo 1, y las células obtenidas (AT-MSK P10 de cerdo) se sembraron en placas de 10 cm. Las células se lavaron tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA·4Na 1 mM) durante 20 s en un estado de una sola célula. Se transfirieron las células obtenidas ( $3,3 \times 10^8$  células; tasa de supervivencia, 98,5 %) a un tubo Falcon de 15 ml, se recuperaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS (-) y se suspendieron en 5 ml de ET-Kyoto (ET-K fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). Se dejó reposar la suspensión de células en ET-K a 4 °C

durante 5 h o 27 h. Tras ello, de la misma manera que en el Ejemplo 1, se calculó la tasa de supervivencia, y se observó la presencia o ausencia de la masa de agregado celular. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tras reposar durante 5 h o 27 h, las células se cultivaron además durante 24 horas, tras lo que se observó la morfología de las células bajo un microscopio.

5

(Capacidad de agregación de las células)

Tras separarlas de la placa, las células se suspendieron en ET-K y se dejaron reposar a 4 °C. Como resultado de ello, no se produjo agregación celular en ninguno de los puntos temporales de las 5 h y 27 h posteriores, y se mantuvo un estado de una sola célula. Por lo tanto, se demostró que se presentó un efecto supresor de la agregación celular proporcionado por ET-K incluso a 4 °C.

10

(Tasa de supervivencia)

15 La tasa de supervivencia a las 5 h más tarde fue del 78,7 %, y la de 27 h más tarde fue del 65,9 %. Se observó que la tasa de supervivencia se redujo en un 3,96 %/h desde las 0 h a 5 h y en un 0,58 %/h de las 5 h a las 27 h.

(Morfología de las células)

20 Tras reposar durante 5 h o 27 h, las células se cultivaron además durante 24 h. Como resultado de ello, se observó que las células que se adhirieron a la placa eran proporcionales a la tasa de supervivencia. Sin embargo, se observó que aproximadamente el 10 % de las células conservadas durante 27 h tenían una morfología irregular. La proporción de las células con morfología irregular no fue superior al 1 % de las células conservadas durante 5 h.

25 [Ejemplo 4]

(1) Preparación de MSC derivadas de médula ósea humana (hBM-MS)

30 Se extrajeron células de médula ósea (20-30 ml) de hueso ilíaco humano con una jeringa que contenía 6.000 unidades de heparina. Las células de médula ósea se lavaron una vez con PBS (-), y se recuperaron por centrifugación a 900 g durante 20 min, lo que se volvió a repetir. Las células se suspendieron en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 %, se transfirieron a una placa de cultivo y se realizó el cultivo de adhesión.

30

(2) Preparación de células (hBM-MS P3) que se usarán para el experimento

35

Por la operación de (1), las MSC que se adhirieron a la placa de cultivo siguieron creciendo y, de 5 a 7 días más tarde, la parte inferior de la placa de cultivo se llenó densamente con las células. Al llegar a la confluencia, se induce la interrupción del crecimiento o la muerte celular en las MSC. Antes de llegar a la confluencia, por lo tanto, se separaron las MSC de la placa de cultivo y se sembraron en una placa de cultivo nueva a una densidad baja. Se lavaron las MSC que se adhirieron a la parte inferior de la placa de cultivo tres veces con PBS, y se añadió tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA·4Na 0,53 mM). Se separaron las MSC de la placa de cultivo, se suspendieron en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 % en una cantidad que proporcionó baja densidad de las células, y se transfirieron a una placa de cultivo nueva. Esta operación se repitió 3 veces (3 pasos = P3).

40

45 Se sembraron MSC derivadas de células de médula ósea humana en una placa de 10 cm y se cultivaron. Las células se lavaron tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA·4Na 1 mM) durante 20 s en estado de una sola célula. Las células obtenidas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml, se recuperaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS (-), y se suspendieron en las soluciones con la siguiente composición. Tras reposar durante 240 min y 480 min, se observaron la presencia o la ausencia de la agregación celular.

50

NS: solución salina (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

H: Hespander (KYORIN Pharmaceutical Co., Ltd.)

1 × T y NS: solución salina que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

55 1 × T y H: Hespander (KYORIN Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

1 × T y H y TRase: Hespander (KYORIN Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 2 unidades/ml de trehalasa (SIGMA).

60 La trehalosa es un componente principal de ET-K, y 45,3 mg/ml es la concentración de trehalosa contenida en ET-K. Hespander es preparado de hidroxietilalmidón que contiene un 6 % (p/v) de hidroxietilalmidón (peso molecular medio en peso (PMp), de aproximadamente 70.000; grado de sustitución, 0,50-0,55).

65 Como resultado de ello, cuando se usaron NS y H, se observó la formación de masas de agregados celulares a los 240 min de iniciarse en ensayo. Por otro lado, cuando se usaron 1 × T y NS y 1 × T y H, no se observó la formación de masas de agregados celulares tanto a los 240 min ni a los 480 min de iniciarse el ensayo. Sin embargo, cuando

la trehalosa se descompuso mediante la trehalasa, se observó la formación de una masa de agregado celular.

A partir de los resultados anteriores, se demostró que el efecto supresor de la agregación celular de ET-K está causado por la trehalosa.

5

[Ejemplo 5]

(1) Preparación de MSC derivadas de tejido adiposo humano (hBM-MSC)

10 Se extrajeron tejidos adiposos subcutáneos humanos, se retiraron tejidos visibles diferentes de los tejidos adiposos tales como vasos sanguíneos, músculo y similares con microtijeras, y tras ello, se picaron y se lavaron con HBSS (solución de Hanks) repetidas veces. Se continuó el lavado hasta que se pudo confirmar a simple vista la eliminación de las células sanguíneas (o coágulos) y la eliminación de sustancias flotantes membranosas tales como el músculo y similares. Los tejidos adiposos subcutáneos humanos obtenidos se picaron con unas tijeras.

15

Se mezclaron los tejidos picados con la misma cantidad de HBSS. Se agitó la mezcla suavemente y se dejó en reposo para permitir la separación en 2 capas. Solo se recuperó la capa superior. Se añadió colagenasa al 0,05 % (tipo I)/HBSS a la capa superior extraída, y se agitó la mezcla suavemente a 37 °C hasta que los tejidos adiposos se licuaron completamente. Se añadió a la mezcla de reacción  $\alpha$ MEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Tras mezclar, la mezcla se separó en 2 capas por centrifugación. Solo se extrajo la capa inferior y se volvió a suspender en HBSS. Esta operación se repitió tres veces. Finalmente, se transfirió la suspensión de células en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 % a una placa de cultivo y se cultivó. Las MSC se adhirieron a la parte inferior de la placa de cultivo.

20

25 (2) Preparación de células (hAT-MSC P3) para el experimento

Mediante la operación de (1), las MSC que se adhirieron a la placa de cultivo siguieron creciendo y, de 5 a 7 días más tarde, la parte inferior de la placa de cultivo se llenó densamente con las células. Al llegar a la confluencia, se induce la interrupción del crecimiento o la muerte celular en las MSC. Antes de llegar a la confluencia, por lo tanto, se separaron las MSC de la placa de cultivo y se sembraron en una placa de cultivo nueva a una densidad baja. Se lavaron las MSC que se adhirieron a la parte inferior de la placa de cultivo tres veces con PBS, y se añadió tripsina-EDTA (tripsina al 0,05 %, EDTA•4Na 0,53 mM). Se separaron las MSC de la placa de cultivo, se suspendieron en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 % en una cantidad que proporcionó baja densidad de las células, y se transfirieron a una placa de cultivo nueva. Esta operación se repitió 3 veces (3 pasos = P3).

35

Se sembraron las células obtenidas mediante los pasos de hAT-MSC y hBM-MSC tres veces (hAT-MSC P3 y hBM-MSC P3) en placas de 10 cm. Las células se lavaron tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA•4Na 1 mM) durante 20 s en estado de una sola célula. Se transfirieron las células obtenidas (hAT-MSC P3,  $1,0 \times 10^5$  células: tasa de supervivencia, 98,4 %; hBM-MSC P3,  $1,25 \times 10^5$  células, tasa de supervivencia, 96,8 %) a un tubo Falcon de 15 ml, se recuperaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS (-) y se suspendieron en las siguientes soluciones de composición (100  $\mu$ l). Tras reposar a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 240 min o 24 h, se midió la tasa de supervivencia de las células, y se observaron la agregación celular y la morfología. Además, tras permanecer durante 240 min o 24 h, las células se cultivaron además durante 12 h y se observó la morfología celular.

45

0,1  $\times$  T y H: Hespander (KYORIN Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía 4,53 mg/ml de D-(+)-trehalosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

0,1  $\times$  T y NS: solución salina (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) que contenía 4,53 mg/ml de D-(+)-trehalosa

1  $\times$  T y H: Hespander que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa

1  $\times$  T y NS: solución salina que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa

2  $\times$  T y H: Hespander que contenía 90,6 mg/ml de D-(+)-trehalosa

2  $\times$  T y NS: solución salina que contenía 90,6 mg/ml de D-(+)-trehalosa

ET-K: ET-Kyoto (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

55 H: Hespander

NS: solución salina

MSCM:  $\alpha$ MEM que contiene FBS al 10 %.

60

(Tasa de supervivencia celular)

60

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

240 min			24 h		
	(%)			(%)	
	AT	BM		AT	BM
0,1 x T y H	70	71,8	0,1 x T y H	61,4	54,3
0,1 x T y NS	61,5	50	0,1 x T y NS	50	46,2
1 x T y H	75	77,8	1 x T y H	66,7	64,3
1 x T y NS	58,3	54,5	1 x T y NS	35,7	41,2
2 x T y H	83,3	80	2 x T y H	73,3	76,9
2 x T y NS	64,3	45,5	2 x T y NS	27,3	33,3
ET-K	81,8	80	ET-K	66,7	64,3
H	72,7	75	H	43,8	36,4
NS	58,3	40	NS	21,4	27,3
MSCM	36,4	46,2	MSCM	12,5	16,7

La tasa de supervivencia celular aumentó mediante la única adición de trehalosa o hidroxietilalmidón (Hespander). La tasa de supervivencia celular aumentó drásticamente mediante la adición tanto de trehalosa como de hidroxietilalmidón (Hespander).

(Agregación celular y morfología)

En 0,1 x T y NS, se observó una ligera formación de masas de agregados celulares tanto para AT como para BM a los 240 min de iniciarse el ensayo. Por otra parte, en otros grupos que contienen trehalosa en la solución de la composición (0,1 x T y H, 1 x T y H, 1 x T y NS, 2 x T y H, 2 x T y NS y ET-K), no se observó la formación de masas de agregados celulares. En los grupos que contienen trehalosa en las soluciones de la composición, no se observó la deformación de la célula.

En los grupos exentos de trehalosa e hidroxietilalmidón en las soluciones de la composición (NS, MSCM), se observaron notablemente masas de agregados celulares y la deformación de las células. En el grupo que solo contenía hidroxietilalmidón (H), se observaron masas de agregados celulares, pero la deformación de las células fue pequeña.

(Cultivo tras reposo)

Independientemente de la adición o la no adición de trehalosa, se confirmó el aumento y la reducción del número de células adherentes proporcionalmente a la tasa de supervivencia. En una parte de los grupos que contenían 0,1 x T y los grupos exentos de trehalosa, se confirmó la morfología celular anómala. Por otra parte, H mostró una buena morfología celular en comparación con la NS, y se observaron el aumento y la reducción del número de células adherentes de acuerdo con la tasa de supervivencia.

De los resultados anteriores, se demostró que la trehalosa puede suprimir la agregación celular, aumentar la tasa de supervivencia celular, y mantener la morfología y la función celulares. Además, se demostró que el hidroxietilalmidón puede aumentar la tasa de supervivencia celular, y mantener la morfología y la función celulares. Además, se ha demostrado que una combinación de trehalosa e hidroxietilalmidón aumenta notablemente la tasa de supervivencia celular.

[Ejemplo 6]

Se sometieron a tres pasos células hAT-MS C y hBM-MS C, y se sembraron las células obtenidas (hAT-MS C P3 y hBM-MS C P3) en placas de 10 cm. Las células se lavaron tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA•4Na 1 mM) durante 20 s en un estado de una sola célula. Se transfirieron las células obtenidas (hAT-MS C P3, 4,25 x 10<sup>5</sup> células, tasa de supervivencia, 97,5 %; hBM-MS C P3, 5,0 x 10<sup>5</sup> células, tasa de supervivencia, 98,2 %) a un tubo Falcon de 15 ml, se recuperaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS (-) y se suspendieron en la siguiente solución de la composición (100 µl). Tras reposar a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 8 h o 36 h, se midió la tasa de supervivencia de las células y se observó la agregación celular.

1 x T y H: Hespander (KIORIN Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa (Wako Pure

Chemical Industries, Ltd.)

2 × T y H: Hespander que contenía 90,6 mg/ml de D-(+)-trehalosa

4 × T y H: Hespander que contenía 181,2 mg/ml de D-(+)-trehalosa

8 × T y H: Hespander que contenía 362,4 mg/ml de D-(+)-trehalosa

5 ET-K: ET-Kyoto (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

H: Hespander

1 × T y H y TRase: Hespander que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa y trehalasa (SIGMA) (2 unidades/ml).

(Agregación celular)

10 En los grupos que contenían trehalosa en las soluciones de composición (1 × T y H, 2 × T y H, 4 × T y H, 8 × T y H y ET-K), no se observó la formación de masas de agregados celulares para hAT-MSM ni para hBM-MSM a las 8 h de iniciarse en ensayo. Por otra parte, cuando se usó Hespander (H), exento de trehalosa, se observó la formación de una masa de agregado celular tanto para hAT-MSM como para hBM-MSM a las 8 h de iniciarse el ensayo. Además,

15 cuando la trehalosa fue descompuesta por la trehalasa, se observó la formación de masas de agregados celulares (1 × T y H y TRase). De los resultados anteriores, se demostró que la trehalosa tiene un efecto supresor de la agregación celular.

(Tasa de supervivencia celular)

20 En la Tabla 4, se muestra la tasa de supervivencia celular a las 36 h de iniciarse en ensayo.

[Tabla 4]

	AT	BM
1 x T y H	60	62,5
2 x T y H	70	71,4
4 x T y H	75,9	75
8 x T y H	39,1	40,4
H	34,4	23,3
1 x T y H y TR	28,6	22,6
ET-K	52,8	45,8

25 Como se muestra en la Tabla 4, la tasa de supervivencia celular mediante la adición de cualquier concentración de trehalosa fue mayor que mediante la adición de Hespander (H) solo. Aunque la tasa de supervivencia celular aumentó notablemente hasta la adición de trehalosa a una concentración de 181,2 mg/ml (4 x T), el efecto fue, por el contrario, atenuado, al aumentarse la concentración de trehalosa hasta 362,4 mg/ml (8 x T). Por lo tanto, para

30 aumentar la tasa de supervivencia celular, se sugiere que la concentración de trehalosa, preferentemente, no sea superior a 181,2 mg/ml (4 x T).

[Ejemplo 7]

35 Se sometieron a 6 u 8 pasos células hAT-MSM y hBM-MSM, y se sembraron las células obtenidas (hAT-MSM P8 y hBM-MSM P6) en placas de 10 cm. Las células se lavaron tres veces con 5 ml de Hespander (KYORIN Pharmaceutical Co., Ltd.) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA·4Na 1 mM) durante 20 s en un estado de una sola célula. Se transfirieron las células

40 obtenidas (hAT-MSM P8, 2,4 x 10<sup>6</sup> células, hBM-MSM P6, 2,3 x 10<sup>6</sup> células,) a un tubo Falcon de 15 ml, se recuperaron por centrifugación y se suspendieron en la siguiente solución de la composición. Tras reposar a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 1 h, se midió la tasa de supervivencia de las células y se observó la agregación celular.

1 x T y H: Hespander que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

0,5 × T y H: Hespander que contenía 22,65 mg/ml de D-(+)-trehalosa

45 0,1 × T y H: Hespander que contenía 4,53 mg/ml de D-(+)-trehalosa

1 × T y F y H: Hespander que contenía 45,3 mg/ml de D-(+)-trehalosa y 10 µg/ml de fucoidan (Yaizu Suisankagaku Industry)

0,5 × T y F y H: Hespander que contenía 22,65 mg/ml de D-(+)-trehalosa y 10 µg/ml de fucoidan

0,1 × T y F y H: Hespander que contenía 4,53 mg/ml de D-(+)-trehalosa y 10 µg/ml de fucoidan

50 F y H: Hespander que contenía 10 µg/ml de fucoidan

ET-K: ET-Kyoto (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

H: Hespander

MSCM:  $\alpha$ MEM que contiene FBS al 10 %.

Los resultados del ensayo se muestran en las Fig. 1 y 2.

5 (Tasa de supervivencia celular)

La tasa de supervivencia de la célula mediante la adición de cualquier concentración de trehalosa fue mayor que mediante la adición de Hespander (H) solo. Dado que la adición del fucoidan produjo una reducción de la tasa de supervivencia celular, se sugirió que el fucoidan tiene citotoxicidad. La trehalosa mostró una tendencia a suprimir la citotoxicidad del fucoidan.

(Agregación celular)

Tanto para las células hAT-MSC como para hBM-MSC, se observaron un efecto de flotación de las células y un efecto supresor de la agregación celular mediante la adición de trehalosa. Por otro lado, el fucoidan mostró una tendencia a inhibir la flotación de las células, y no mostró ningún efecto de supresión de la agregación celular. Se suprimió la formación de protuberancia en la célula, y la morfología celular fue buena al añadirse trehalosa en vez de la adición de Hespander solo. El efecto supresor de la agregación celular de  $0,5 \times T$  y H fue similar al de ET-K. El efecto de flotación de las células de ET-K fue ligeramente superior al de  $0,5 \times T$  y H. En  $0,1 \times T$  y H, se observó ligeramente una protuberancia de la superficie de la célula.

[Ejemplo 8]

Se sometieron a siete pasos las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo porcino preparadas en el Ejemplo 1, y las células obtenidas (AT-MSC P7 de cerdo) se cultivaron en placas de 10 cm. Las células se lavaron tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA $\cdot$ 4Na 1 mM) durante 20 s en estado de una sola célula, y se suspendieron en solución de ET-K. La suspensión celular obtenida se usó para el siguiente ensayo.

(Evaluación de la adherencia a la pared interna de la bolsa de infusión)

Se cortó finamente la bolsa de infusión Soldem 3AG (TERUMO) y se colocó un trozo de la misma en la pared de un tubo de 50 ml. Se llenó el tubo con una suspensión celular, se tumbó y se dejó en reposo en una mesa de trabajo limpia a temperatura ambiente (25 °C) durante 30 minutos. Tras ello, se lavó el trozo de bolsa de infusión con PBS, y se evaluó la presencia o la ausencia de la adhesión celular a la pared interior de la bolsa de infusión mediante observación microscópica.

Antes de lavar con PBS, una parte de las MSC (estimada en no más del 10 %) resultó estar adherida a la pared interior de la bolsa de infusión. Mediante el lavado con PBS, sin embargo, se eliminó la mayor parte de las MSC adheridas (se estima en una cantidad no inferior al 90 %). Por lo tanto, se demostró la posibilidad de que la trehalosa evite la adhesión de las células a la pared interior de la bolsa de infusión.

(Ensayo de pasos en catéter)

Se usó un kit de catéter CV (Japan Sherwood Medical Industries Ltd.). Se conectó una aguja de inyección 18G a la punta de un catéter. Se introdujo una suspensión celular en una jeringa de 5 ml. Se fijó la jeringa al catéter y se presionó haciendo salir la suspensión celular. Se repitió dicha operación las veces predeterminadas, se midió la tasa de supervivencia celular, y se observaron las células con un microscopio. Antes de la observación con el microscopio, se lavó el catéter con 5 ml de PBS.

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Número de pasos por el catéter	0	5	10
Número de células ( $\times 10^5$ )	3,5	3,5	3,5
Tasa de supervivencia (%)	85,7	85,7	85,7

La tasa de supervivencia celular no cambió independientemente del número de pasos al menos hasta 10 veces. Aunque se observaron ligeras MSC y solución de ET-K residual en la pared interior del catéter, el número de las células tras pasar a través del catéter no varió, y no se observaron células adherentes tras el lavado con PBS. Por lo tanto, se demostró la posibilidad de la trehalosa para evitar la adhesión de las células a la pared interior del catéter.

[Ejemplo 9]

Se cultivaron células madre mesenquimales porcinas en placas de 10 cm. Se separaron las células mediante el tratamiento con tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA•4Na 1 mM) en estado de una sola célula. Las células obtenidas se suspendieron en la solución de la siguiente composición, y se dejaron reposar a temperatura ambiente (aproximadamente a 25 °C) durante 360 min. Se midió la tasa de supervivencia celular, y se observó la agregación celular.

NS: solución salina

MSCM:  $\alpha$ MEM que contiene SFB al 10 %

ET-K: ET-Kyoto (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

Saviosol: Saviosol (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

Dextrano: inyección de dextrano L de bajo peso molecular (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

El saviosol es una solución de Ringer con lactato que contiene dextrano que tiene un peso molecular medio en peso de 40.000 (dextrano 40) a una concentración de 30 mg/ml. Una inyección de dextrano L de bajo peso molecular es solución de Ringer con lactato que contiene dextrano que tiene un peso molecular medio en peso de 40.000 (dextrano 40) a una concentración de 100 mg/ml.

(Tasa de supervivencia celular)

En la Tabla 6, se muestran las tasas de supervivencia celular a los 30 min y a los 360 min de iniciarse en ensayo.

[Tabla 6]

	30 min	360 min
NS	8,3 %	0,0 %
MSCM	87,5 %	73,3 %
ET-K	83,3 %	70,6 %
Saviosol	93,3 %	62,5 %
Dextrano	85,7 %	73,3 %

Como se muestra en la Tabla 6, las tasas de supervivencia celular fueron notablemente elevadas, independientemente de la composición usada en comparación con el uso de solución salina.

(Agregación de células)

A los 360 min de iniciarse en ensayo, se observó la presencia o la ausencia de la agregación celular con un microscopio. Cuando las células se conservaron en solución salina o MSCM, se observó la formación de una gran masa de agregado celular. Sin embargo, en ET-K, Saviosol y dextrano, se suprimió la formación de una masa de agregado celular, y se mantuvo el estado de dispersión de la célula.

[Ejemplo 10]

(1) Preparación de tejido de rata

Se extrajeron tejidos adiposos subcutáneos de rata de la región inguinal, se retiraron tejidos visibles diferentes de los tejidos adiposos tales como vasos sanguíneos, músculo y similares con microtijeras, y tras ello, se picaron y se lavaron con HBSS (solución de Hanks) repetidas veces. Se continuó el lavado hasta que se pudo confirmar a simple vista la eliminación de las células sanguíneas (o coágulos) y la eliminación de sustancias flotantes membranosas tales como el músculo y similares. Los tejidos adiposos subcutáneos de rata obtenidos se picaron con unas tijeras.

Se mezclaron los tejidos picados con la misma cantidad de HBSS. Se agitó la mezcla suavemente y se dejó en reposo para permitir la separación en 2 capas. Solo se recuperó la capa superior. Se añadió colagenasa al 0,2 % (tipo I)/HBSS a la capa superior extraída, y se agitó la mezcla suavemente a 37 °C hasta que los tejidos adiposos se licuaron completamente (máximo 90 min). Se añadió a la mezcla de reacción  $\alpha$ MEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % en una cantidad equivalente o superior a la cantidad de la mezcla de reacción de colagenasa. Tras mezclar, la mezcla se separó en 3 capas (células nucleadas, solución y grasa, de abajo a arriba) por centrifugación. Solo se extrajo la capa inferior y se volvió a suspender en HBSS. Esta operación se repitió tres veces. Finalmente, se transfirió la suspensión de células en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 % a una placa de cultivo y se cultivó. Las MSC se adhieron a la parte inferior de la placa de cultivo.

(2) Preparación de células (AT-MSK P6 de rata) para su uso en el experimento

En la operación de (1), las MSC que se adhirieron a la placa de cultivo siguieron creciendo y, de 5 a 7 días más tarde, la parte inferior de la placa de cultivo se llenó densamente con las células. Al llegar a la confluencia, se induce la interrupción del crecimiento o la muerte celular en las MSC. Antes de llegar a la confluencia, por lo tanto, se separaron las MSC de la placa de cultivo y se sembraron en una placa de cultivo nueva a una densidad baja. Se lavaron las MSC que se adhirieron a la parte inferior de la placa de cultivo tres veces con PBS, y se añadió tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA•4Na 1 mM). Se separaron las MSC de la placa de cultivo, se suspendieron en  $\alpha$ MEM que contenía FBS al 10 % en una cantidad que proporcionó baja densidad de las células, y se transfirieron a una placa de cultivo nueva. Esta operación se repitió 6 veces (6 pasos = P6).

(3) Suspensión de células en cada solución

Se usaron las AT-MSK P6 de rata obtenidas en (2) para el experimento.

Se lavaron las células tres veces con 5 ml de PBS (-) por placa de 10 cm, y se separaron mediante el tratamiento con 1 ml de tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA•4Na 1 mM) durante 20 s en un estado de una sola célula. Las células obtenidas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se recuperaron por centrifugación. Tras lavar dos veces con PBS (-), se sometieron las células al lavado de aclimatación una vez más con cada solución

Solución salina: solución salina

Medio:  $\alpha$ MEM que contiene FBS al 10 %

ET-K: ET-Kyoto (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

Saviosol: Saviosol (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

HES70K: hidroxietilalmidón al 6 % (p/v) (peso molecular medio en peso de 70.000) + NaCl al 0,9 % (p/v) (Braun GmbH, Alemania)

HES200K :hidroxietilalmidón al 6 % (p/v) (peso molecular medio en peso de 200.000) + NaCl al 0,9 % (p/v) (Fresenius Kabi AG, Alemania)

ET-K+Saviosol: mezcla de ET-K y Saviosol (proporción en volumen de 1:1).

Tras ello, se suspendieron las células usando cada solución de  $2,5 \times 10^5$  células/50  $\mu$ l.

La suspensión se dejó reposar a cada temperatura (0, 25 y 37 °C), se pipeteó varias veces con 20  $\mu$ l de PIPETMAN 30-360 min más tarde, y se transfirieron 10  $\mu$ l de la misma a una placa.

Se enfocó un microscopio estereoscópico en la superficie más inferior de la suspensión sobre la placa, y se realizó la observación.

Las células que formaron una masa con las células adyacentes bajo el microscopio se tomaron como masa de agregado celular. Se confirmó que la masa de agregado celular se movía realmente como una masa mediante la agitación de la placa en la platina del microscopio.

(Tasa de supervivencia celular)

Las tasas de supervivencia celular a los 30 a 360 min de iniciarse el ensayo se muestran en las Fig. 3 y 4. Como se muestra en estas figuras, las tasas de supervivencia celular fueron notablemente elevadas, independientemente de la composición usada en comparación con el uso de solución salina. El efecto de supresión de una reducción de la tasa de supervivencia de las células fue mayor en HES70K que en HES200K.

(Agregación celular)

Se observó la capacidad de agregación celular con un microscopio a los 360 min de iniciarse el ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

[Tabla 7]

Capacidad de agregación	
Solución salina	+
Medio	+++
ET-K	-
Saviosol	-
HES70K	-

Capacidad de agregación	
HES200K	+
ET-K + Saviosol	-

En comparación con la conservación en un medio, la formación de una masa de agregado celular se inhibió en otras condiciones. El efecto de supresión de la agregación celular fue mayor en HES70K que en HES200K. En ET-K, Saviosol, HES70K y ET-K + Saviosol, no se observó la formación de agregación celular, y la dispersión de la célula se mantuvo bien.

[Ejemplo 11]

Se cultivaron células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (número de pasos = 8) y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (número de pasos = 8), que se habían separado y purificado de ser humano, hasta que cubrieron aproximadamente el 90 % de la parte inferior de una placa de cultivo fabricada por Nunc. Se lavó la placa de cultivo tres veces con PBS (-) (fabricado por Takara Bio, Inc.). Se separaron cada una de las células madres mesenquimales con una solución de tripsina (fabricada por Gbco, US) de la placa de cultivo y se recuperaron en un tubo de centrifugación de 15 ml fabricado por Assist. Se formaron agregados celulares en la parte inferior del tubo de centrifugación mediante una operación de centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min, y se desechó el sobrenadante con un aspirador. Se rompió el agregado celular tocando con el dedo, y se añadió PBS (-) (fabricado por TaKaRa). Se rompieron más las células pipeteando varias veces, y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min. Se confirmó la formación de agregados celulares en el fondo del tubo de centrifugación, y se desechó el sobrenadante con un aspirador. Se repitió esta operación de lavado con PBS (-) dos veces más. Se midió el número de células con un hemocitómetro, y las células se transfirieron a un tubo de 1,5 ml fabricado por Assist en condiciones de  $1,0 \times 10^6$  células/tubo. Se formaron agregados celulares en la parte inferior del tubo mediante una operación de centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se retiró con una micropipeta. Se añadió a cada tubo cada uno de un total de 4 tipos de soluciones de:

- (1) solución salina (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 1 ml),
- (2) una mezcla de Saviosol (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 500  $\mu$ l) e inyección de dextrano L (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 500  $\mu$ l) (dextrano 40 al 6,5 % (p/v)),
- (3) una mezcla de Saviosol (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 250  $\mu$ l) e inyección de dextrano L (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 750  $\mu$ l) (dextrano 40 al 8,25 % (p/v)), e
- (4) inyección de dextrano L (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., dextrano 40 al 10 % (p/v), 1 ml),

y se mezclaron las mezclas con un mezclador de vórtice durante varios segundos. Usando una aguja de inyección 30G y una jeringa de 1 ml (fabricada por TERUMO Corporation), se procesaron las células en un estado de una sola célula, y se dejaron reposar en un tubo de pie a temperatura ambiente (aproximadamente a 25 °C). Tras reposar durante 30 min y 60 min, se extrajo la solución (10  $\mu$ l) de cada tubo, se mezcló con una cantidad igual de una solución de azul de tripano fabricada por GIBCO, y se sometió la solución a la medición del número de células y la tasa de supervivencia con un hemocitómetro. Las soluciones evaluadas se separaron suavemente de tres partes de cada tubo: el centro de la superficie del líquido (parte superior), el centro de la mitad del líquido (medio) y el centro de la parte inferior del tubo (parte inferior). Con el total de los números de células de la parte superior, media e inferior como el 100 %, se calculó el estado de distribución de las células como la proporción de cada número de células en el numerador y el número total de células en el denominador. Además, se calculó por separado la tasa de supervivencia de las células enteras.

Los resultados se muestran en las Fig. 5 y 6. Cuando las células madre mesenquimales se conservaron en un tampón que contenía dextrano (6,5-10 % (p/v)), los números de las células en la parte superior, media e inferior del tubo no mostraron una gran diferencia, independientemente de la derivación de las células madre mesenquimales, y se mostró el mantenimiento de la dispersión uniforme de las células. En este caso, además, la tasa de supervivencia de las células permaneció invariable, resultando ser del 100 %. Por otro lado, cuando se usó solución salina, las células precipitadas en la parte inferior del tubo, y la tasa de supervivencia de las células tras la conservación durante 60 min se redujo hasta el 80 %.

### Aplicabilidad Industrial

Con el uso de la presente invención, se puede suprimir la agregación de las células madre en una suspensión durante el trasplante de las células madre. Como resultado de ello, se reduce el riesgo de que los agregados de células madre taponen una cánula o formen embolias en los vasos sanguíneos delgados tales como la vena pulmonar, y similares.

Por otra parte, con el uso de la presente invención, se puede suprimir una reducción de la tasa de supervivencia de las células madre en una suspensión. Como resultado de ello, se puede realizar un tratamiento usando células madre en mejores condiciones, y por lo tanto, cabe esperar que el efecto del tratamiento sea mejor.

Por lo tanto, la presente invención es útil en el campo del tratamiento con trasplantes utilizando células madre.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, hidroxietilalmidón y dextrano como un inhibidor de la agregación de células madre de mamífero en una suspensión de células madre de mamífero, en el que:
- cuando el polisacárido es trehalosa, el inhibidor se usa de manera que la concentración de trehalosa en la suspensión de células madre de mamífero está en el intervalo de 4,53 a 362,4 mg/ml;
  - 10 - cuando el polisacárido es hidroxietilalmidón, el inhibidor se usa de manera que la concentración de hidroxietilalmidón en la suspensión de células madre de mamífero está en el intervalo de 1 a 500 mg/ml;
  - y cuando el polisacárido es dextrano, el inhibidor se usa de manera que la concentración de dextrano en la suspensión de células madre de mamífero está en el intervalo de 30 a 100 mg/ml.
- 15 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula madre es una célula madre adhesiva.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la célula madre adhesiva es una célula madre mesenquimal o una célula madre pluripotente.

Fig. 1

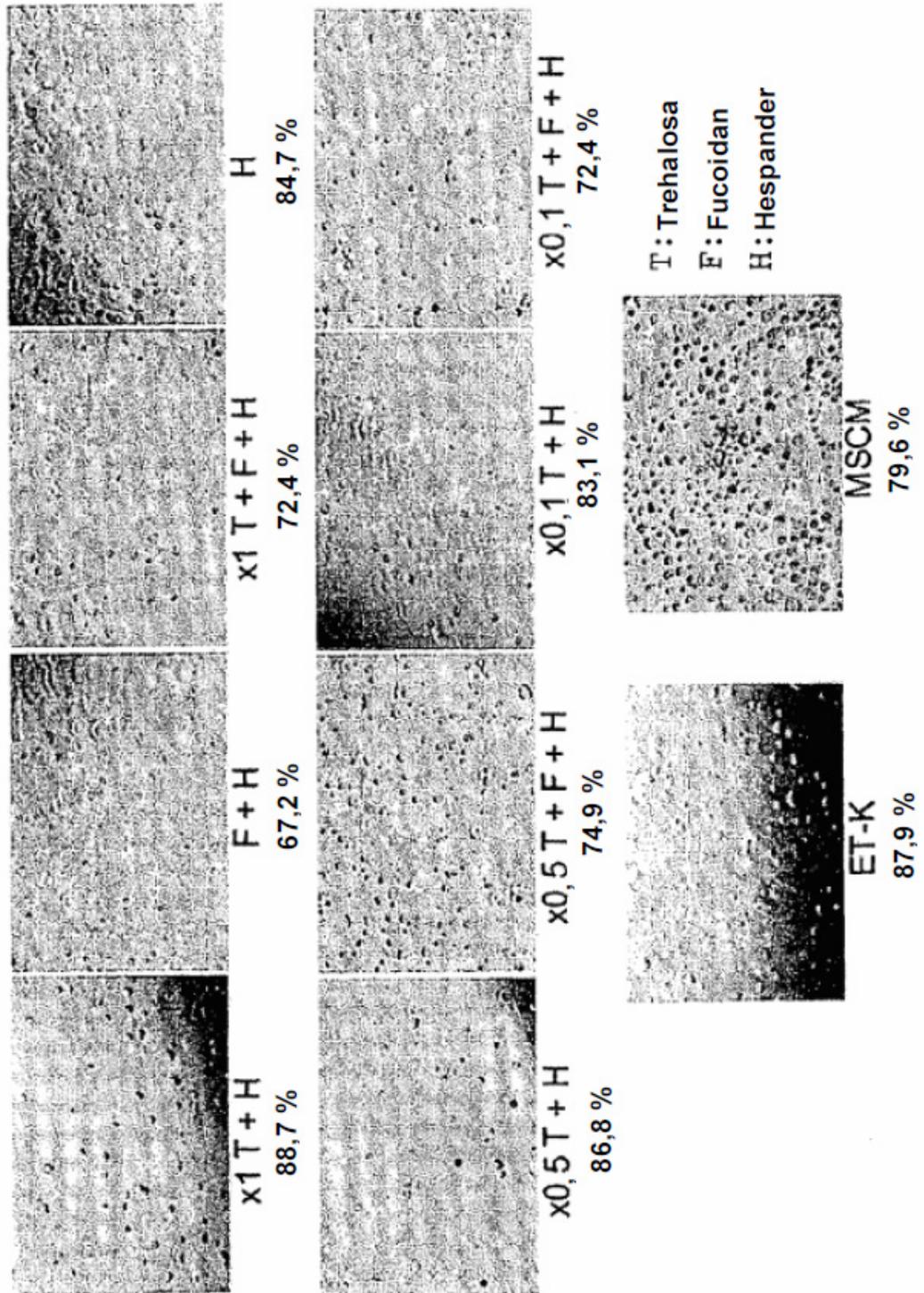
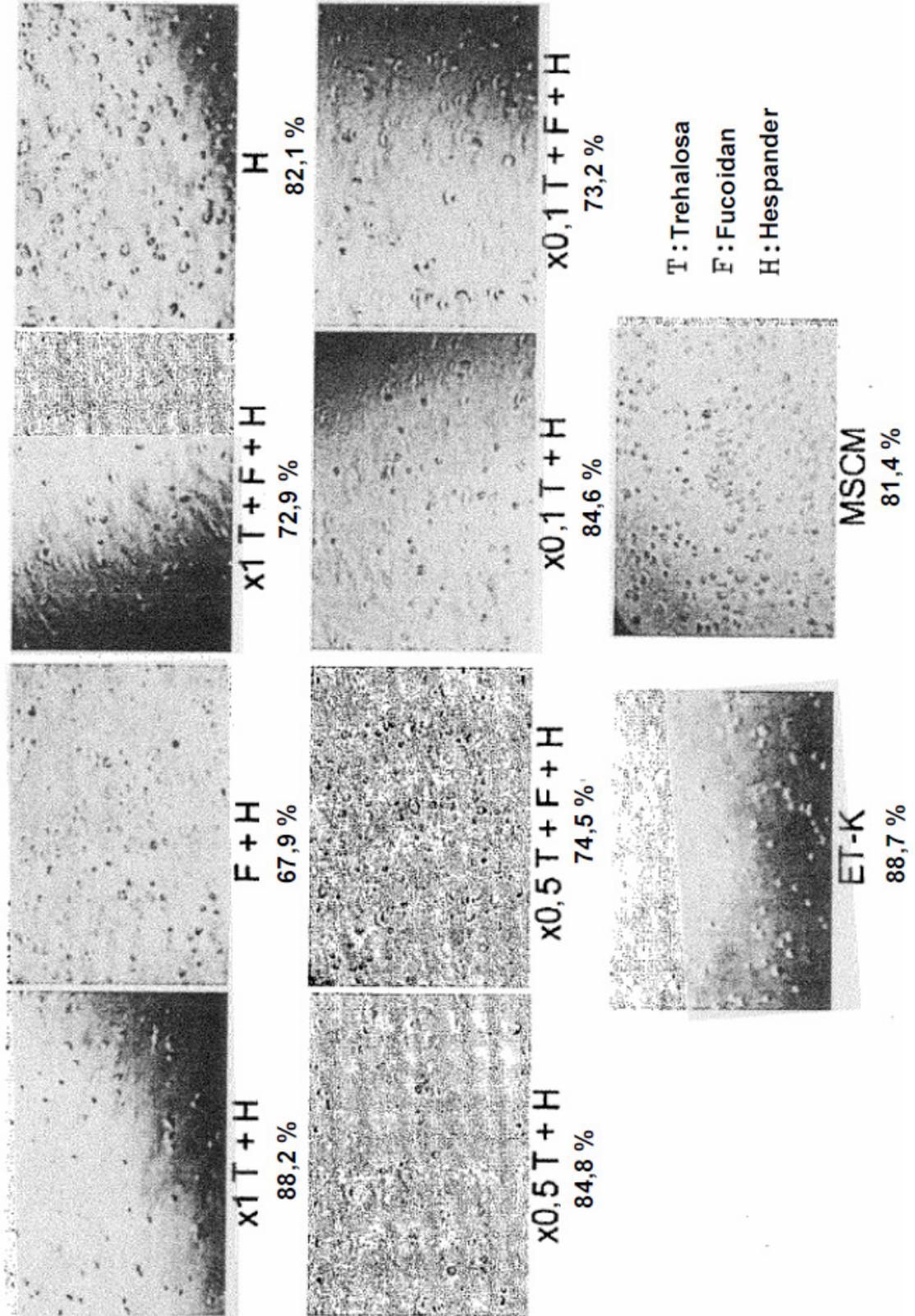
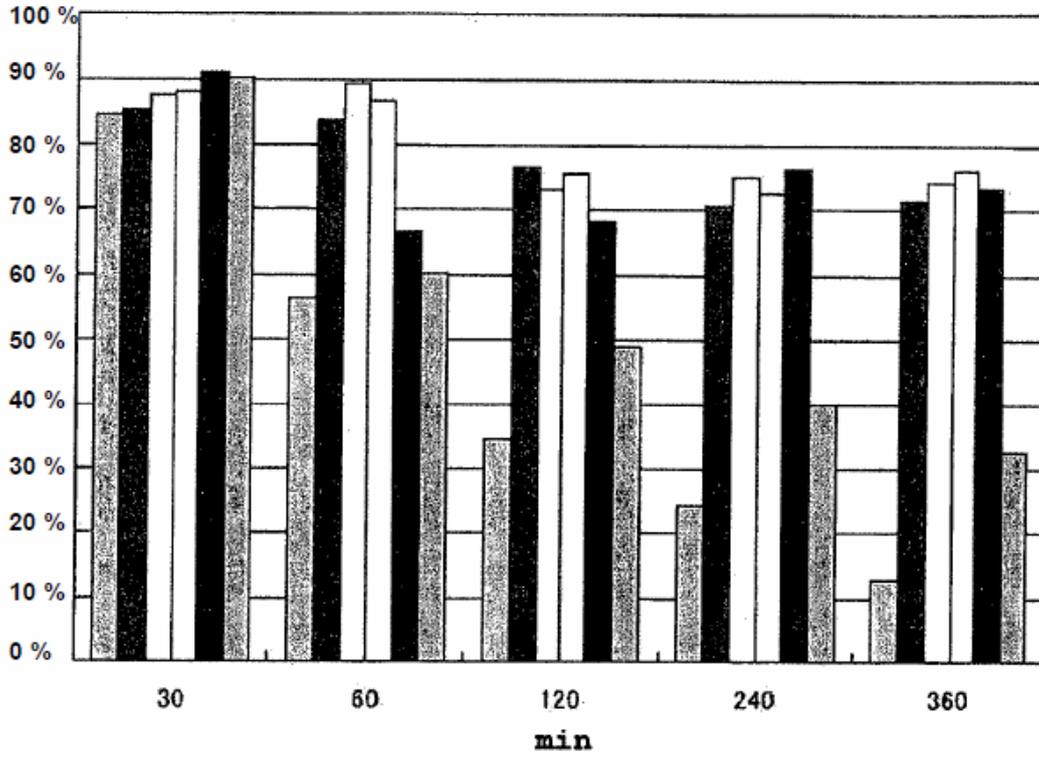


Fig. 2



**Fig. 3**



**Fig. 4**

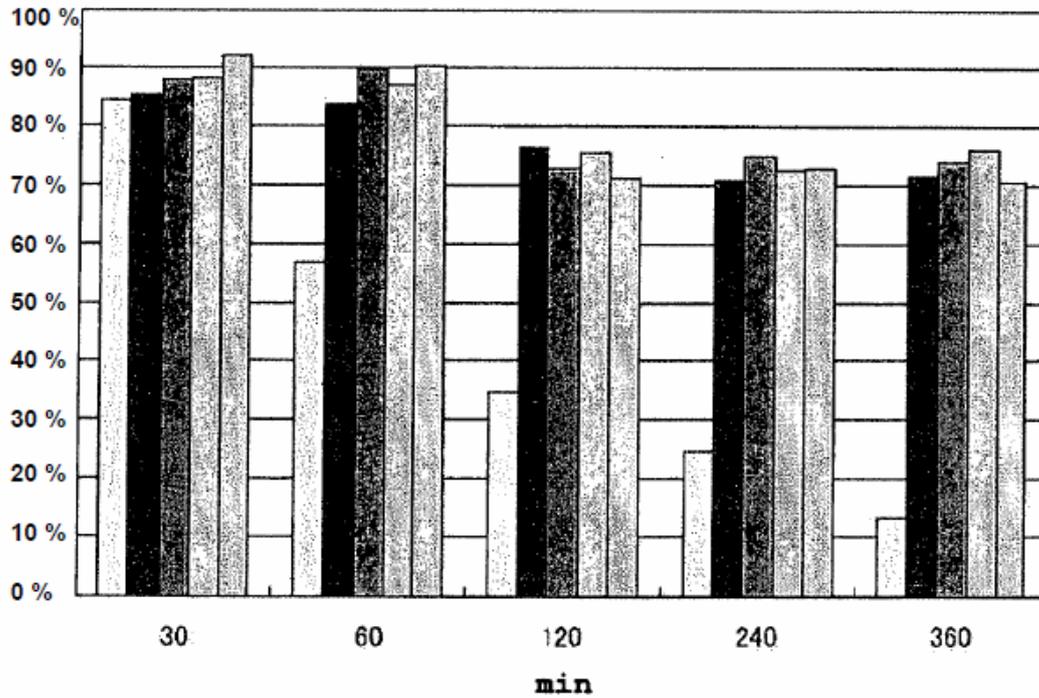


Fig. 5

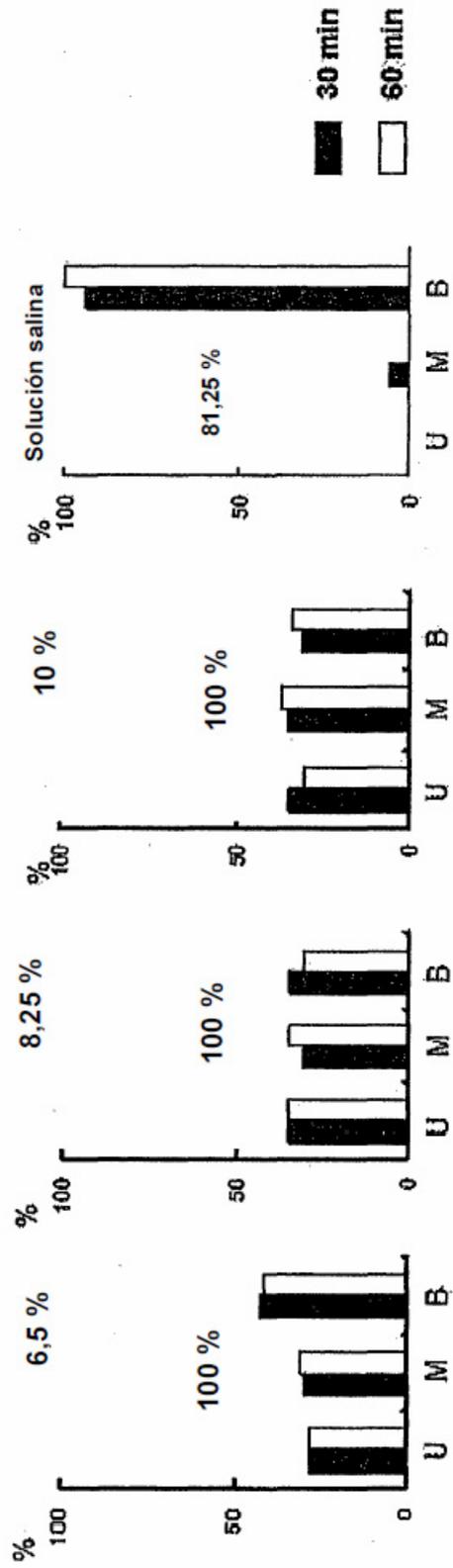


Fig. 6

