

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 438**

51 Int. Cl.:

A61K 35/44 (2006.01)

A61K 35/50 (2015.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2009 PCT/US2009/038634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09121002**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2009 E 09725684 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2271209**

54 Título: **Materiales y métodos para la recogida hipotérmica de sangre entera**

30 Prioridad:

27.03.2008 US 39966
27.03.2008 US 39978

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2016

73 Titular/es:

BIOLIFE SOLUTIONS, INC. (100.0%)
3303 Monte Villa Parkway, Suite 310
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

NICOUD, IAN B.;
CLARKE, DOMINIC M.;
MATTHEW, ABY J. y
RICE, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 588 438 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

Materiales y métodos para la recogida hipotérmica de sangre entera.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las técnicas de biopreservación de células sanguíneas (BC) eficaces para mantener la viabilidad y la función *ex vivo* representan la base de los bancos de sangre modernos. Los procesos de rutina, tales como la recogida, el almacenamiento y el transporte, que se realizan por los centros de donación y los servicios de transfusión, se basan en la capacidad de prevenir o retrasar los efectos bioquímicos, biofísicos y morfológicos perjudiciales de la preservación de BC *ex vivo*. El campo de la biopreservación de BC se impulsa en gran medida por la necesidad clínica de los productos de BC.

El mantenimiento de la calidad y seguridad de los productos sanguíneos usados clínicamente requiere técnicas eficaces para la preservación de la viabilidad y la función de BC. Los daños a las BC inducidos por la biopreservación tienen un impacto significativo sobre la eficacia de la transfusión y se pueden vincular a efectos pro-inflamatorios e inmunomoduladores, un aumento de las infecciones, un aumento de la duración de la estancia en el hospital, y un aumento de la morbilidad y la mortalidad.

La mejora de las prácticas de almacenamiento de BC hipotérmico puede tener un enorme efecto sobre la disponibilidad de unidades de sangre para transfusión, la seguridad y la calidad; además, extendiendo los tiempos de almacenamiento hipotérmicos mejora la logística de la sangre por la disminución de las pérdidas de BC debido a la expiración y el transporte, y mejorando el almacenamiento de sangre autólogo y remoto. Durante los últimos 25 años, la investigación de la biopreservación de BC se ha centrado en las modificaciones de la composición de solución de almacenamiento, los protocolos de extracción de sangre, y los dispositivos en un esfuerzo para alargar el almacenamiento hipotérmico de BC.

Sin embargo, las técnicas para el almacenamiento líquido de BC han permanecido relativamente sin cambios desde su creación en la década de 1940, y el progreso en la mejora de la calidad y la función de los BC almacenados hipotérmicamente *ex vivo* ha sido muy lento. El enfoque actual de la medicina transfusional ha pasado de extender los tiempos de almacenamiento a la mejora de la calidad de los productos sanguíneos almacenados hipotérmicamente.

Un objeto de la presente invención es proporcionar métodos y materiales mejorados para la recogida y transporte hipotérmico de sangre entera que mejoren ambos la calidad y extiendan la viabilidad de la sangre entera, incluyendo la sangre del cordón umbilical, y los componentes aislados a partir de la misma.

RESUMEN DE LA INVENCION

Existe la necesidad, satisfecha por las realizaciones de la presente invención, de una mejor calidad y tiempos de mantenimiento extendidos para las unidades de sangre entera o componentes de la misma. Como se desvela en el presente documento, esto se realiza cuando dichos materiales biológicos se conectan con y/o están contenidos en un entorno rico en nutrientes óptimo en condiciones hipotérmicas. Además, la utilización de dichas soluciones sin suero y sin proteínas como el entorno hipotérmico preferido crea una circunstancia óptima que permite una compatibilidad de preservación criogénica para las células entre las soluciones de transporte y crioprotectoras, además de eliminar el riesgo de transmisión biológico xenográfico.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que puede usarse una solución de preservación hipotérmica para recoger sangre entera y aislar componentes celulares de la misma como se expone en el presente documento. Cualquier solución de preservación que se formula para reducir la acumulación de radicales libres en las células que experimentan una preservación hipotérmica para ayudar a mediar el nivel de necrosis y apoptosis post-almacenamiento, disminuyendo directamente de esta manera el nivel de muerte celular durante y tras el intervalo de preservación, es adecuada para su uso. Además, se observan beneficios adicionales cuando se realiza un almacenamiento congelado a largo plazo de componentes celulares aislados usando una solución de criopreservación formulada para abordar los aspectos biológicos moleculares de las células durante el proceso de criopreservación reduciendo directamente de esta manera el nivel de muerte celular de aparición retardada inducida por la criopreservación y mejorando la viabilidad y la función celular post-preservación. A través de la modulación de la respuesta bioquímica celular al proceso de preservación, tal solución de preservación puede mejorar la viabilidad y la funcionalidad celular eliminando al mismo tiempo la necesidad de incluir suero, proteínas o altos niveles de

agentes citotóxicos. En base a estos descubrimientos, son ahora posible preparaciones y manipulaciones de sangre entera que no se habían descrito previamente, incluyendo, por ejemplo, sangre del cordón umbilical, que son inesperados y superan las limitaciones de las preparaciones y protocolos convencionales.

- 5 En un aspecto, la invención se refiere a un método para el almacenamiento hipotérmico de sangre entera como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de sangre entera y una solución de preservación adaptada al equilibrio osmótico celular a temperaturas hipotérmicas como se define en las
10 reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención puede describirse de forma ilustrativa en referencia al dibujo adjunto, en el que:

- 15 La figura 1 es un gráfico de barras que muestra viabilidad de las células sanguíneas después del almacenamiento hipotérmico en HYPOTHERMOSOL[®], de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.
La figura 2 es un gráfico de barras que muestra la recuperación de células nucleadas, y células CD34 y CD45 positivas viables, de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.
20 La figura 3 es un gráfico de barras que compara la viabilidad celular media de las muestras sanguíneas recogidas en bolsas pre-rellenadas con HYPOTHERMOSOL[®] en comparación con los valores medios de muestras sanguíneas recogidas en bolsas que contienen anticoagulante, de acuerdo con una realización ilustrativa de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Existe la necesidad, satisfecha por las realizaciones de la presente invención, de una mejor calidad y tiempos de mantenimiento extendidos para las unidades de sangre entera o componentes de la misma. Como se desvela en el
30 presente documento, esto se realiza cuando dichos materiales biológicos entran en contacto con y/o están contenidos en un entorno rico en nutrientes óptimo en condiciones hipotérmicas. Además, la utilización de dichas soluciones sin suero y sin proteínas como el entorno hipotérmico preferido crea una circunstancia óptima que permite una compatibilidad de preservación criogénica para las células entre las soluciones de transporte y crioprotectoras, además de eliminar el riesgo de transmisión biológico xenográfico. Tal solución preferida es
35 HYPOTHERMOSOL[®]. Una vez que se aplica HYPOTHERMOSOL[®] o un equivalente funcional del mismo a la sangre entera, se produce una acción directa de osmosis que permite que las células se saturen completamente con HYPOTHERMOSOL[®]. Esto es óptimo cuando se usan adicionalmente junto con su homólogo crioprotector químico compatible, tal como CRYOSTOR[™] (BioLife Solutions, Inc., Bothell, WA) o un equivalente funcional del mismo.

40 La línea HYPOTHERMOSOL[®] de soluciones de preservación está diseñada para preparar y conservar células, tejido y órganos para entornos hipotérmicos (es decir, baja temperatura, por ejemplo, aproximadamente 2-10 °C) y almacenamiento o transporte hipotérmico a corto plazo. Por ejemplo, HYPOTHERMOSOL[®] se ha diseñado para abordar los requisitos moleculares de células aisladas durante un proceso de preservación hipotérmico (por ejemplo,
45 aproximadamente 2-10 °C). Se ha formulado para reducir la acumulación de radicales libres en las células que se someten a preservación hipotérmica, lo que ayuda a medir el nivel de necrosis y apoptosis post-almacenamiento reduciendo directamente de esta manera el nivel de muerte celular durante y tras el intervalo de preservación. Por ejemplo, se ha demostrado que HTS-FRS es muy eficaz en la preservación de tejidos de miocardio y de riñón, ambos de los cuales tienen elevadas demandas energéticas que pueden conducir a la acumulación de radicales
50 libres.

Como se contempla en el presente documento, un entorno, condición o solución hipotérmica se refiere a un entorno, condición o solución a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 18 grados Celsius, preferiblemente de aproximadamente 0 a aproximadamente 15 grados Celsius, más preferiblemente de
55 aproximadamente 2 a aproximadamente 18 grados Celsius, pero más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 grados Celsius, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 grados Celsius, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 grados Celsius.

Son especialmente importantes los beneficios obtenidos al usar los materiales y métodos de la presente invención

junto con HYPOTHERMOSOL® de forma coordinada con sus productos asociados especialmente formulados de la familia CRYOSTOR™ de soluciones de preservación cuando se desea un almacenamiento en congelación a largo plazo. Diseñado para preparar y preservar células en entornos a temperatura ultra baja (por ejemplo, de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -196 °C), CRYOSTOR™ proporciona un entorno protector y seguro para células y tejidos durante el proceso de congelación, almacenamiento y descongelación. CRYOSTOR™, un miembro de la plataforma HYPOTHERMOSOL® de BioLife, está formulado únicamente para abordar los aspectos de la biología molecular de las células durante el proceso de criopreservación, reduciendo directamente de esta manera el nivel de muerte celular de aparición retardada inducida por la criopreservación y mejorando la viabilidad y la función celular después de la descongelación. A través de la modulación de la respuesta bioquímica celular al proceso de criopreservación, CRYOSTOR™ proporciona una mejor viabilidad y funcionalidad celular, eliminando al mismo tiempo la necesidad de incluir suero, proteínas o altos niveles de agentes citotóxicos. Por ejemplo, CRYOSTOR™ CS-5 es un medio de criopreservación de fórmula exclusiva que contiene sulfóxido de dimetilo al 5 % (DMSO). CRYOSTOR™ ha demostrado mejorar significativamente la viabilidad y la función celular tras la criopreservación en comparación con los planteamientos de medio de cultivo + suero + DMSO convencionales. Además de mejorar la supervivencia y la función celular general, CRYOSTOR™ CS-5 también proporciona la ventaja de ser un medio de criopreservación sin proteínas y sin suero completamente definido.

Se entiende que, cuando se hace referencia de principio a fin, HYPOTHERMOSOL® y CRYOSTOR™ se identifican y se denominan como soluciones de preservación y criopreservación ejemplares, respectivamente, y que la presente invención contempla HYPOTHERMOSOL® y CRYOSTOR™ como realizaciones ejemplares de soluciones de preservación y criopreservación, respectivamente, adecuadas para su uso con la sangre, células, materiales y métodos expuestos en el presente documento. Se entiende adicionalmente que la presente invención también contempla equivalentes funcionales tanto de HYPOTHERMOSOL® como de CRYOSTOR™; todo lo que se precisa es que una solución de preservación o criopreservación cumpla los requisitos funcionales expuestos en el presente documento y los realice de una manera comparable al usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas. Los equivalentes funcionales de HYPOTHERMOSOL® o CRYOSTOR™ pueden identificarse y reconocerse fácilmente por el experto que pone en práctica las enseñanzas desveladas en el presente documento.

Los usos de una solución de preservación hipotérmica para la recogida hipotérmica, transporte hipotérmico y almacenamiento hipotérmico provisional de productos de sangre entera, incluyendo componentes celulares aislados de los mismos, no se habían desvelado hasta ahora. De hecho, la recogida hipotérmica de productos de sangre entera como se describe en el presente documento es contraria a las metodologías convencionales. Es decir, según se describe en el presente documento, la sangre entera se diluye significativamente (al menos aproximadamente 1 parte de sangre con respecto a 0,1 partes de solución de preservación) tras la recogida y después se transporta y/o se almacena. Además, es contraria a las metodologías convencionales para recoger sangre entera en ausencia de un anticoagulante como se describe en el presente documento, así como inesperado que las poblaciones específicas de células puedan ser aún fácilmente aisladas de dichas preparaciones diluidas de sangre entera usando metodologías de recolección de células convencionales y, de manera importante, que dichas células aisladas tengan al menos una viabilidad tanto pre-preservación como post-preservación al menos comparable, si no mejorada. Estos resultados inesperados están relacionados directamente con el entorno hipotérmico óptimo proporcionado por una solución de preservación tal como HYPOTHERMOSOL®, o un equivalente funcional del mismo, así como el entorno criotérmico óptimo proporcionado por una solución de criopreservación tal como CRYOSTOR™, o un equivalente funcional del mismo.

Al utilizar CRYOSTOR™, o un crioprotector similar que se exceda en el proceso criogénico permitiendo una mayor viabilidad post-descongelación de las células con concentraciones reducidas de un agente crioprotector (10 % o menos de DMSO), reduciendo de esta manera la toxicidad potencial, es importante apreciar la relación entre el fluido de transporte de nutrientes HYPOTHERMOSOL® y el medio de criopreservación compatible CRYOSTOR™. Por ejemplo, dado que la solución de nutrientes es capaz de penetrar la biología celular de los componentes de la sangre del cordón umbilical, prepara de manera autónoma las células para una saturación posterior del crioconservante seleccionado requerido para el proceso criogénico. Es significativo que no sea necesario ningún lavado de la solución de nutrientes antes del contacto posterior con el crioconservante. Esta optimización del proceso a través de la eliminación de cualquier etapa de lavado para eliminar la solución de matriz de nutriente permite una mayor viabilidad celular y reduce el daño, lo que a su vez disminuye la posibilidad de daño celular. También pueden añadirse de forma óptima enzimas, productos químicos y/o nutrientes adicionales para mejorar la viabilidad celular.

Aunque la combinación de la utilización de HYPOTHERMOSOL® y CRYOSTOR™ crea un protocolo de congelación criogénica óptima para la compatibilidad entre la solución de nutrientes y el medio de criopreservación, pueden

usarse de forma óptima otros crioprotectores que comprenden uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, lactosa, glucosa, DMSO, propilenglicol, etilenglicol, un dextrano, glicerol, almidón de hidroxietilo, polivinilpirrolidona, formamida, 1-2-propanodiol, etanol, metanol y polietileno.

- 5 Actualmente, el trasplante de sangre del cordón umbilical ofrece la posibilidad de curar una diversidad de leucemias y linfomas, mieloma múltiple y otros trastornos de las células plasmáticas, SCID y otros trastornos del sistema inmune hereditarios, síndrome de Hurler y otros trastornos metabólicos heredados, trastornos mielodisplásicos y mieloproliferativos, y otras neoplasias, incluyendo varios cánceres infantiles.
- 10 La recolección eficaz para el almacenamiento de sangre del cordón umbilical necesita que el cordón umbilical del neonato se corte muy pronto, en 30 segundos desde el nacimiento (vaginal o por cesárea), antes de que deje de palpar, desviando de esta manera la sangre valiosa lejos del neonato. La cantidad de sangre que se extrae de la recolección del cordón es de 100 ml de media (variando de 60 ml a 180 ml), equivalente a 1/3-1/2 del volumen de sangre total del neonato. Una recogida de sangre del cordón umbilical adecuada requiere al menos 75-80 ml para
- 15 asegurar que habrá células suficientes para usarse en el trasplante. Después de la recogida, la unidad de sangre del cordón umbilical se envía a un laboratorio para el procesamiento y criopreservación.

Existen dos métodos de recogida de sangre del cordón umbilical de la vena umbilical: antes de expulsar la placenta (*in utero*), y después (*ex utero*). Con el método de recogida *ex utero*, la sangre del cordón umbilical se recoge

20 después de la expulsión de la placenta y el cordón umbilical del recién nacido se pinza. La técnica de recogida establecida es colocar la placenta en una estructura de soporte estéril con el cordón umbilical colgando a través del soporte. La sangre se recoge por drenaje por gravedad produciendo 40-150 ml de sangre del cordón umbilical. Se realiza un método de recogida similar *in utero*, excepto que la sangre del cordón umbilical se recoge después de que se haya expulsado el bebé pero antes de la expulsión de la placenta.

- 25 Una vez recogidas, las células pueden aislarse en la suspensión de sangre entera de HYPOTHERMOSOL®. Las suspensiones se cargan en Ficoll-Hypaque y la densidad se centrifugó a x435 g durante 30 min. Las células mononucleares se eliminan cuidadosamente de la capa de interfase y se lavan dos veces con HBSS más EDTA. Los recuentos de células nucleadas totales se realizan usando un contador Coulter.

- 30 Como alternativa, las células mononucleares se aíslan de la sangre entera, tal como, por ejemplo, sangre del cordón umbilical usando PrepaCyte® (BioE; St. Paul, MN). A modo de ejemplo, se mezclan volúmenes iguales de PrepaCyte®-WBC (BioE; St. Paul, MN) y sangre del cordón umbilical en tubos cónicos de 50 ml. A continuación, usando un agitador basculante, los tubos se mezclan completamente suavemente (durante 20 minutos a
- 35 temperatura ambiente; ~15 balanceos completos, hacia atrás y hacia delante, por minuto). Después de esto, los tubos se transfieren a una gradilla, los tapones se aflojan y las células se dejan en reposo (sin perturbación o movimiento) durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se produzca la agregación y la precipitación. Después de observar una capa de sobrenadante transparente y una capa de glóbulos rojos, se usa una pipeta de transferencia para eliminar lenta y suavemente el sobrenadante (que contiene las células mononucleares) teniendo
- 40 cuidado de no perturbar las células precipitadas en la capa de glóbulos rojos. A continuación, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de centrifuga y se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos. Finalmente, las células se suspenden de nuevo en medio fresco para un procesamiento adicional.

- Cabe señalar que una vez que la sangre entera se recupera, ésta debe procesarse y usarse de acuerdo con la
- 45 presente invención tan pronto como sea posible para impedir la coagulación y para mantener cualquier célula que pueda estar presente y viva. Cuanto más espere un operador para proporcionar la sangre entera con los métodos y elementos apropiados como se indica en el presente documento, menos serán las oportunidades de una recuperación máxima de células viables.

- 50 En un punto de interés relacionado, pueden recogerse células madre adicionales de fuentes no sanguíneas a partir de la placenta a través de un banco de placenta y sangre del cordón umbilical. Después de que el profesional de la salud extraiga la sangre del cordón umbilical, la placenta se envía al laboratorio de células madre, donde se procesa para obtener células madre adicionales. Almacenando las células madre obtenidas de la placenta, así como de la sangre del cordón umbilical, las familias pueden guardar hasta dos veces el número células madre CD34+ para su
- 55 uso en trasplantes. Tener tantas de estas células madre como sea posible es médicamente importante: las investigaciones publicadas muestran que el tamaño del trasplante de células madre (especialmente el número de células CD34+) es consecuentemente un factor significativo en el logro de un tratamiento exitoso y la supervivencia del paciente.

- En resumen, se ha descubierto que puede usarse una solución de preservación hipotérmica para recoger sangre entera y aislar los componentes celulares de la misma como se expone en el presente documento. Cualquier solución de preservación que se formula para reducir la acumulación de radicales libres en las células que experimentan una preservación hipotérmica para ayudar a mediar el nivel de necrosis y apoptosis post-almacenamiento, reduciendo directamente de esta manera el nivel de muerte celular durante y tras el intervalo de preservación, es adecuada para su uso. Además, se observan beneficios adicionales cuando se realiza un almacenamiento congelado a largo plazo de componentes celulares aislados usando una solución de criopreservación formulada para abordar los aspectos biológicos moleculares de las células durante el proceso de criopreservación reduciendo directamente de esta manera el nivel de muerte celular de aparición retardada inducida por la criopreservación y mejorando la viabilidad y la función celular post-descongelación. A través de la modulación de la respuesta bioquímica celular al proceso de criopreservación, tal solución de criopreservación puede mejorar la viabilidad y la funcionalidad celular eliminando al mismo tiempo la necesidad de incluir suero, proteínas o altos niveles de agentes citotóxicos.
- 15 Como se contempla en el presente documento y se ilustra en otra parte en el presente documento, una solución de preservación preferida está exenta de proteínas y suero, está adaptada para el equilibrio osmótico celular del tejido, y es químicamente compatible con un crioprotector. Una solución de preservación es preferiblemente HYPOTHERMOSOL® (BioLife Solutions, Inc., Bothell, WA).
- 20 La invención se ilustrará adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Métodos

- 25 Preservación de células aisladas (criotérmica e hipotérmica).
- Protocolo de criopreservación
- 30 Suspendir el sedimento celular directamente en CRYOSTOR™ frío (2-8 °C) y transferir la muestra a un criovial enfriado previamente. Incubar las muestras a 2-8 °C durante 10 min, después congelar las muestras siguiendo un protocolo estándar (1 °C/min) con un congelador de velocidad controlada o un recipiente de congelación de baño de isopropanol Nalgene "Mr. Frosty" usando un protocolo de congelador mecánico en 2 etapas (2 horas a -20 °C/2 horas a -80 °C), después transferir las muestras a nitrógeno líquido para su almacenamiento. Las muestras pueden recuperarse retirando la muestra del nitrógeno líquido y poniéndolas inmediatamente en un baño de agua a 37 °C durante 2-4 min para calentar las muestras hasta que se descongelen (la agitación suave de la muestra durante el intervalo de descongelación conseguirá una descongelación uniforme de la muestra). Una vez que la muestra se ha derretido a fase de aguanieve, transferir inmediatamente las muestras a un entorno estéril y diluir en medio de cultivo a 37 °C para su cultivo celular.
- 40 Protocolo de preservación hipotérmica
- Suspendir el sedimento celular directamente en HYPOTHERMOSOL® frío (2-8 °C) y almacenar la suspensión celular a 2-8 °C durante 1-3 días. Si las células se colocan en placas para su cultivo y posterior utilización, colocar en placas las células en medio de cultivo y cultivar a 37 °C hasta que las células se fijen. Después, las placas pueden almacenarse a 2-8 °C reemplazando el medio de cultivo celular por HYPOTHERMOSOL® y colocando las células en placas en frío durante 1-3 días. Tras el almacenamiento, retirar las células del frío, reemplazar el HYPOTHERMOSOL® con medio de cultivo y poner las células en incubación. Después de un intervalo de recuperación, las células estarán lista para su utilización en diferentes aplicaciones.
- 50 Recogida de sangre. Recogida por venopunción aséptica típica en bolsas de sangre estándares, o las pre-rellenadas con volúmenes de HYPOTHERMOSOL® como se indica en otro lugar en el presente documento.
- Aislamiento de células mononucleares de suspensiones de sangre y HYPOTHERMOSOL®. Las suspensiones se cargan sobre Ficoll-Hypaque y la densidad se centrifuga a x435 g durante 30 min. Las células mononucleares se retiran cuidadosamente de la capa de interfase y se lavan dos veces con HBSS y EDTA. Los recuentos de células nucleadas totales se realizaron usando un contador Coulter.

Como alternativa, las células mononucleares se aíslan de la sangre del cordón umbilical usando PrepaCyte®. Para

ello, se mezclan volúmenes iguales de PrepaCyte®-WBC y sangre del cordón umbilical en tubos cónicos de 50 ml. A continuación usando un agitador basculante, los tubos se mezclan completamente suavemente (durante 20 minutos a temperatura ambiente; ~15 balanceos completos, hacia atrás y hacia delante, por minuto). Después de esto, los tubos se transfieren a una gradilla, los tapones se aflojan y las células se dejan en reposo (sin perturbación o movimiento) durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se produzca la agregación y la precipitación. Después de observar una capa de sobrenadante transparente y una capa de glóbulos rojos, se usa una pipeta de transferencia para eliminar lenta y suavemente el sobrenadante (que contiene las células mononucleares) teniendo cuidado de no perturbar las células precipitadas en la capa de glóbulos rojos. A continuación, el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de centrifuga y se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos. Finalmente, las células se suspenden de nuevo en medio fresco para un procesamiento adicional.

Para el cultivo de células mononucleadas, los sedimentos celulares se suspenden de nuevo con 20 ml de medio de cultivo celular de cultivo estándar y se ponen en placas en un matraz T-75. El medio de cultivo celular usando es una mezcla de medio Eagle modificado por Dulbecco al 60 % y medio MCDB 105 al 40 % complementado con FCS al 10 % y Penicilina-Estreptomicina al 1 %.

Citometría de flujo

Recuento de células nucleadas total. Un recuento de células nucleadas total (TNC) representa todas las células nucleadas que incluyen glóbulos rojos nucleados. El recuento de células nucleadas total (TNC) junto con la dosis de células CD34⁺ ha demostrado ser un determinante crucial de la recuperación hematopoyética y el resultado general tras el UCBT, y la dosis celular limitada de unidades UCB individuales es claramente la barrera más importante para un uso más generalizado, especialmente en adultos. El TNC se obtiene típicamente mediante el uso de un contador coulter, pero el número puede obtenerse mediante una diversidad de medidas.

Protocolo multi-plex para TNC, viabilidad (7-AAD), CD34 y CD45.

Las células mononucleares pueden cuantificarse por el subtipo en muestras sanguíneas usando métodos inmunofluorescentes y citometría de flujo. Se usan anticuerpos para cuantificar y purificar las células madre progenitoras hematopoyéticas para investigación y para trasplante clínico de médula ósea. Las células observadas como CD34⁺ son de una forma primitiva y no diferenciada, y se consideran células madre hematopoyéticas pluripotentes.

Para determinar la viabilidad y los recuentos de células nucleadas, incluyendo subpoblaciones de CD34 y CD45, obtener un tubo de 12 x 75 mm y transferir 2 ml de solución de tampón hemolítica de amonio al tubo. A continuación, si no se ha hecho ya, realizar un recuento celular en el espécimen para determinar el volumen necesario. Añadir el volumen calculado de muestra al tubo y agitar vorticialmente para permitir la lisis de los glóbulos rojos. Una vez lisados, centrifugar el tubo en la centrifuga a 1500 rpm durante 2 minutos. Decantar el sobrenadante y lavar con 2 ml de solución de lavado. Centrifugar la muestra y realizar un lavado de nuevo. Tras el lavado, eliminar el sobrenadante y añadir anticuerpos de tinción 7-AAD (eBioscience, catálogo número 00-6993-50), CD34 (Becton Dickenson, catálogo número 340669) y CD45 (Becton Dickenson, catálogo número 340664). Suspender de nuevo el sedimento en solución de tinción y poner el tubo/muestra a 4 °C durante 20-30 minutos. Tras la incubación, añadir solución de lavado y centrifugar. Decantar el sobrenadante, añadir la solución de flujo y realizar la citometría de flujo.

Ensayo UFC. El ensayo de unidades formadoras de colonias es una técnica citológica para medir la capacidad funcional de las células madre ensayando su actividad. El ensayo es básicamente una evaluación de las células individuales y la capacidad de clonarse en toda una colonia de células idénticas.

Una vez que las células mononucleares se separan y se recogen, realizar un recuento celular y registrar el número total antes de la criopreservación. Usando el número total, deben prepararse dos concentraciones celulares separadas (típicamente 3×10^4 /ml y 1×10^5 /ml) en metilcelulosa. Observación, las células deben ponerse en placas en un volumen de 1 ml por cada una de 4 placas a una relación de 1:10 (v:v) células con respecto a metilcelulosa. Debido a la viscosidad de la metilcelulosa, debe prepararse un volumen total de 5 ml (células, metilcelulosa y medio) con el fin de colocar en placas de 4-1 ml. A partir del recuento celular del espécimen, multiplicar cada una de las concentraciones celulares deseadas por 5 para determinar el número total de células necesarias. Añadir el número apropiado de células y medio (IMDM) a la metilcelulosa hasta un volumen total de 5 ml y mezclar el contenido. Distribuir 1 ml de la suspensión a cada una de las placas de cultivo tisular de 4-10 x 35 mm. Mover suavemente para girar el contenido de cada placa de manera que todo el fondo de la placa se cubra uniformemente. Colocar las placas en una placa de Petri mayor junto con una placa de hidratación que contiene agua destilada estéril. Poner los

cultivos en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C y almacenar durante 14 días. Tras la incubación, las colonias se contarán. Los tipos de colonias contados son: Unidad formadora de brotes eritroide (UFB-e), unidad formadora de colonias (UFC), y a veces unidades formadoras de colonias mixtas (UFC-Mix). Una vez contadas, los cálculos se realizan en base al número inicial de células para determinar el número total de cada tipo de colonia para un producto. Si las células se preparan para la criopreservación, los ensayos de colonias pueden configurarse de una manera similar a partir de cultivos de post-descongelación para determinar el número de colonias y la eficacia del proceso de preservación.

Ensayos de viabilidad

10

ALAMAR BLUE™

ALAMAR BLUE™ es soluble y estable en medio de cultivo y no es tóxico. Por lo tanto, se permite el control continuo de las células en cultivo. Específicamente, ALAMAR BLUE™ no altera la viabilidad de las células cultivadas varias veces ya que se controla por exclusión de azul de tripano. Se ha descubierto que las células cultivadas en presencia de ALAMAR BLUE™ y analizadas posteriormente por citometría de flujo para CD44, CD45RB, CD4 y antígeno termoestable producen números similares de células viables y células que expresan antígeno como las células no expuestas a ALAMAR BLUE™. Dado que ALAMAR BLUE™ no es tóxico, las células bajo estudio pueden devolverse al cultivo o usarse para otros fines, incluyendo estudios histológicos. Las medidas de proliferación con ALAMAR BLUE™ pueden hacerse espectrofotométricamente controlando la absorción del medio de cultivo celular complementado con ALAMAR BLUE™ a dos longitudes de onda. Como alternativa, las medidas de proliferación con ALAMAR BLUE™ pueden hacerse fluorométricamente.

Calceína-AM

25

El ensayo de Calceína-AM proporciona un método sencillo, rápido y preciso para medir la viabilidad celular y/o la citotoxicidad. La Calceína-AM es un compuesto no fluorescente e hidrófobo que permea fácilmente las células vivas intactas. La hidrólisis de Calceína-AM por las esterasas intracelulares produce calceína, un compuesto hidrófilo, fuertemente fluorescente que se retiene bien en el citoplasma celular. Las células cultivadas en placas pueden teñirse y cuantificarse en menos de dos horas.

Una evaluación inmediatamente posterior a la descongelación tiende a dar datos incompletos e imprecisos con respecto a la viabilidad y la función de la muestra; por lo tanto, se recomienda que la evaluación de la viabilidad se realice de 24 a 48 horas después de la descongelación. La evaluación de la viabilidad y el rendimiento inmediatamente después de la descongelación puede ser útil para evaluar la extensión de la muerte celular de aparición retardada (es decir, al comparar los valores 1 hora post-descongelación con los valores 24 horas post-descongelación); sin embargo, al determinar la eficacia de la preservación, se garantiza una evaluación con especial atención y comparación de tanto los rendimiento como la viabilidad entre los valores previos a la congelación, los valores posteriores a la descongelación y 24-48 h post-descongelación. Esto permitirá una determinación precisa del estado de la muestra y la eficacia de preservación.

Ejemplo 1: Recogida de sangre entera hipotérmica.

Recogida de sangre del cordón umbilical (sin tejido del cordón). Después de la expulsión del neonato, pinzar y cortar el cordón umbilical, después seguir uno de dos enfoques:

Método de sistema cerrado

Después de la expulsión de la placenta, los extremos proximal y distal del cordón umbilical se frotran con alcohol, se dejar secar y se frotran de nuevo con tintura de yodo. Una aguja 16G fijada a una bolsa de recogida de sangre que contiene un volumen de HYPOTHERMOSOL® se inserta en el sitio proximal lo más cerca posible de la pinza. La sangre comenzará a llenar la bolsa a través de drenaje por gravedad. Después, el extremo distal se canula inmediatamente con un angiocatéter 16G. Una jeringa de 50 ml pre-rellenada con HYPOTHERMOSOL® se fija a la cánula a través de un luer-lock, y la sangre se lava abundantemente del cordón umbilical a la bolsa de recogida. Debe usarse un total de 150 ml de solución (3 jeringas) para lavar por completo la sangre en la bolsa de recogida. Después de la recogida, la bolsa se cierra herméticamente atando tres nudos en el tubo de la línea de recogida, dejando al menos 6 pulgadas de tubo expuesto entre los nudos y la bolsa.

Método de recogida alternativo

El extremo proximal del cordón umbilical puede sumergirse en un recipiente de recogida de 250 ml que contiene 50 ml de HYPOTHERMOSOL® y anticoagulante y después se quita la pinza, o puede usarse una aguja 16G fijada a una bolsa de recogida de sangre de 250 ml como se describe en el método de sistema cerrado. Después, la sangre se "exprime" aplicando presión al cordón entre el pulgar y el índice en gancho y tirando suavemente en una dirección distal-proximal. Este proceso puede repetirse hasta que se recoja el volumen de sangre deseable.

Ejemplo 2: Las células sanguíneas almacenadas en condiciones hipotérmicas conservan la viabilidad post-sedimentación.

Se recogió sangre del cordón umbilical en sitios donantes por venopunción en bolsas de sangre que contenían citrato-fosfato-dextrosa (Baxter US Healthcare). Después de determinar que la unidad es de "calidad de investigación" ($TNC \leq 9 \times 10^8$), la unidad se dividió uniformemente en dos bolsas de transferencia. Se añadió HYPOTHERMOSOL® frío (2-8 °C) a una bolsa en una relación 1:1 con el volumen de sangre y se almacenó a 4 °C. La otra mitad de la unidad sirvió como control y se mantuvo a temperatura ambiente. Las muestras se procesaron después de 24 horas y las recuperaciones del recuento total de células nucleadas viables se determinaron a través de citometría de flujo después de la sedimentación y de nuevo, después de la reducción plasmática. Los controles se mantuvieron a temperatura ambiente la misma duración. Los resultados se expresaron como porcentaje de recuperación en comparación con las recuperaciones de recuento de células nucleadas total de la sangre inicial extraída en el momento de la recogida.

Para determinar si HTS-FRS + Hetastarch puede actuar como una solución de sedimentación por gravedad para racionalizar el procesamiento de la sangre del cordón umbilical y mejorar la recuperación y la viabilidad de los TNC, tres unidades de sangre del cordón umbilical se dividieron cada una por la mitad y se procesaron con las siguientes soluciones: 1) Solución de sedimentación estándar: Hetastarch (40 %), NaCl al 0,9 % (48%), ACD-A al 6 % (12 %); 2) HTS-FRS (60 %), Hetastarch (40 %). Después de 1 hora, la sangre que contenía solución de sedimentación estándar sedimentó por completo; sin embargo, la sangre que contenía solución de sedimentación HTS-FRS necesitó 90 minutos para sedimentar. La sangre diluida 1:1 con HTS-FRS y almacenada a 4 °C demostró recuperaciones del 74,52 % post-sedimentación y un 72,12 % de reducción post-plasmática en comparación con las recuperaciones del 90,98 % post-sedimentación y un 93,98% de reducción post-plasmática a partir de muestras no diluidas almacenadas a temperatura ambiente, probando que las células sanguíneas almacenadas en HYPOTHERMOSOL® conservan su viabilidad después de la sedimentación y un procesamiento adicional.

Ejemplo 3: Las células sanguíneas almacenadas en condiciones hipotérmicas durante extensos periodos conservan la viabilidad.

Se recogió sangre del cordón umbilical en el momento de la cirugía en los sitios donantes de 3 secciones C programadas por venopunción en bolsas de recogida (Pall Medical) que se habían rellenado previamente con 35 ml de HYPOTHERMOSOL® frío (4 °C). No se añadió anticoagulante. Los volúmenes de recogida fueron 87,3, 72 y 85 ml. Las unidades se almacenaron hasta 72 horas a 4 °C y se controlaron cada 24 horas para comprobar la coagulación por determinación visual de la formación de coágulos. La viabilidad TNC se determinó en cada punto temporal usando 7-AAD y citometría de flujo. No se observó coagulación en ningún punto temporal y, como se muestra en la figura 1, la viabilidad celular se mantuvo durante 72 horas de almacenamiento en frío en comparación con el valor inicial (extracción de sangre inicial en el momento de la recogida). En la figura 1, las barras de error son error estándar +/- 1 de la media. Estos datos demuestran que la viabilidad celular se conserva durante extensos periodos de almacenamiento hipotérmico de sangre entera en HYPOTHERMOSOL®. Además, estos datos validan el uso de HYPOTHERMOSOL® para almacenar la sangre entera durante extensos periodos en ausencia de anticoagulantes.

Ejemplo 4: Los tipos celulares significativos se preservaron y podían recuperarse al recogerse y almacenarse en condiciones hipotérmicas.

Se recogió sangre del cordón umbilical de tres donantes como se ha descrito en el Ejemplo 3. No se añadió anticoagulante. Después de 24, 48 y 72 h de almacenamiento a 4 °C en HYPOTHERMOSOL®, se retiraron 25 ml de muestra de la sangre del cordón umbilical para su procesamiento; se tomó 1 ml de alícuota para el ensayo de pre-procesamiento y los 24 ml restantes se procesaron usando métodos de procesamiento de sangre del cordón umbilical convencionales. Se utilizó citometría de flujo para determinar el rendimiento pre-procesamiento, la recuperación TNC, la viabilidad usando 7-AAD, y la positividad de CD34 y CD45. Como se muestra en la figura 2, en comparación con el valor inicial (extracción de sangre inicial en el momento de la recogida), los recuentos de células

TNC, CD34⁺ y CD45⁺ disminuyeron ligeramente las primeras 24 horas, pero se estabilizaron durante el resto del almacenamiento en frío de 72 horas. En la figura 2, las barras de error son error estándar +/- 1 de la media.

Después del agotamiento de los glóbulos rojos y el plasma, la población de células nucleadas total se suspendió de nuevo en 10 ml de IMDM para un ensayo post-procesamiento. Se utilizó citometría de flujo para determinar el rendimiento post-procesamiento, la recuperación TNC, la viabilidad usando 7-AAD, y la positividad de CD34 y CD45. Los datos se comparan con 8 muestras de sangre del cordón umbilical no preservadas seleccionadas aleatoriamente recogidas usando recogida por venopunción en bolsas de recogida de citrato-fosfato-dextrosa estándares (Baxter) en ausencia de HYPOTHERMOSOL[®]. La figura 3 muestra la viabilidad media, el TNC viable, CD34⁺ viable y CD45⁺ viable de tres unidades de sangre del cordón umbilical recogidas en bolsas pre-rellenadas con HYPOTHERMOSOL[®] sin anticoagulante y almacenadas a 4 °C durante 24, 48 o 72 horas. Como se muestra en la figura 3, la viabilidad celular se mantiene durante 72 horas. Los recuentos de células TNC, CD34⁺ y CD45⁺ disminuyeron ligeramente las primeras 24 horas, pero se estabilizaron durante el resto del almacenamiento en frío de 72 horas. Estos datos demuestran que los tipos celulares relevantes (por ejemplo, células madre) son viables y pueden recuperarse después de extensos periodos de almacenamiento hipotérmico de sangre entera en HYPOTHERMOSOL[®]. Además, estos datos validan el uso de HYPOTHERMOSOL[®] para almacenar la sangre entera durante extensos periodos en ausencia de anticoagulantes.

En las figuras 1, 2 y 3, se calcularon los valores de TNC viable, CD34⁺ viable y CD45⁺ viable como se indica a continuación:

$$\begin{aligned} \text{TNC viable} &= (\% \text{ de viabilidad} \times (\text{NC/ml}) \times (\text{volumen})) \\ \text{CD34}^+ \text{ viable} &= (\% \text{ de CD34}^+ \text{ en recuento de NC}) \times (\text{TNC viable}) \\ \text{CD45}^+ \text{ viable} &= (\% \text{ de CD45}^+ \text{ en recuento de NC}) \times (\text{TNC viable}) \end{aligned}$$

Ejemplo 5: Almacenamiento hipotérmico de sangre periférica entera en condiciones hipotérmicas.

La sangre periférica se extraerá de acuerdo con técnicas convencionales con y sin anticoagulante de ácido-citrato-dextrosa. A partir de la muestra inicial, se dispensarán 40 M de células y cada uno de los 5 tubos y se diluirán 1:0, 1, 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10 con volúmenes de HYPOTHERMOSOL[®] (2-8 °C). Los viales de control negativo serán sangre no diluida a temperatura ambiente y sangre no diluida a 4 °C. Las muestras se ensayarán en 18, 36 y 72 horas por citometría de flujo para un recuento de células nucleadas total, viabilidad y positividad CD34 y CD45. Una muestra de la sangre inicial extraída se ensayará inmediatamente después de la donación para servir como control inicial.

Se espera que las células de sangre periférica entera, al recogerse, aislarse y almacenarse en presencia de HYPOTHERMOSOL[®] o un equivalente del mismo en condiciones hipotérmicas, muestren al menos una viabilidad y capacidad de recuperación comparables en el tiempo en condiciones hipotérmicas en comparación con las células procesadas convencionalmente. Por lo tanto, este estudio demostrará que, una vez más, los beneficios de la presente invención que se ha ilustrado anteriormente en los Ejemplos 1-4 también serán aplicables a la sangre periférica entera y las células obtenidas de la misma.

En base a las enseñanzas anteriores, ahora es evidente que la sangre entera recogida y almacenada usando los materiales y los métodos desvelados en el presente documento, tiene una mejor integridad y su contenido en BC tiene una mejor viabilidad y capacidad de recuperación al compararse con los métodos estándares de recogida y almacenamiento actualmente disponibles. Y, ahora es evidente que las células madre aisladas de dicha sangre entera muestran alta viabilidad y velocidades de recuperación en comparación con las preparaciones convencionales. Además, se espera que la viabilidad y la recuperación celular se mantengan más allá de 72 horas, preferiblemente hasta al menos 7 días, 14 días, 21 días, o más, al recogerse, procesarse y/o almacenarse en las condiciones y de acuerdo con las prácticas descritas en el presente documento.

En base a los descubrimientos descritos e ilustrados en el presente documento, las composiciones y métodos no descritos hasta ahora dan como resultado una viabilidad e integridad inesperadas de la sangre entera recogida en condiciones hipotérmicas en comparación con la sangre entera recogida de forma convencional. Y adicionalmente, los componentes de sangre entera obtenidos de acuerdo con la presente invención muestran menos daño estructural, químico y/o funcional en comparación con los componentes aislados de forma convencional. Aún más si cabe, se espera que dichos componentes aislados, al criopreservarse posteriormente de acuerdo con las enseñanzas expuestas en el presente documento, se recuperen en mayor medida y muestren una viabilidad y funcionalidad superiores en comparación con la sangre entera recogida de manera convencional. Las enseñanzas

de la presente invención son particularmente eficaces para la recogida de sangre del cordón umbilical y células aisladas de la misma, especialmente células madre.

Equivalentes

5

Las presentes realizaciones se considerarán ilustrativas y no restrictivas, estando el alcance de la invención indicado por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la descripción anterior.

Calceína-AM

10

El ensayo de Calceína-AM proporciona un método sencillo, rápido y preciso para medir la viabilidad celular y/o la citotoxicidad. La Calceína-AM es un compuesto no fluorescente e hidrófobo que permea fácilmente las células vivas intactas. La hidrólisis de Calceína-AM por las esterasas intracelulares produce calceína, un compuesto hidrófilo, fuertemente fluorescente que se retiene bien en el citoplasma celular. Las células cultivadas en placas pueden

15 teñirse y cuantificarse en menos de dos horas.

Una evaluación inmediatamente posterior a la descongelación tiende a dar datos incompletos e imprecisos con respecto a la viabilidad y la función de la muestra; por lo tanto, se recomienda que la evaluación de la viabilidad se realice de 24 a 48 horas después de la descongelación. La evaluación de la viabilidad y el rendimiento

20

inmediatamente después de la descongelación puede ser útil para evaluar la extensión de la muerte celular de aparición retardada (es decir, al comparar los valores 1 hora post-descongelación con los valores 24 horas post-descongelación); sin embargo, al determinar la eficacia de la preservación, se garantiza una evaluación con especial atención y comparación de tanto los rendimiento como la viabilidad entre los valores previos a la congelación, los valores posteriores a la descongelación y 24-48 h post-descongelación. Esto permitirá una determinación precisa del

25

estado de la muestra y la eficacia de preservación.

Ejemplo 1: Recogida de sangre entera hipotérmica.

30

Recogida de sangre del cordón umbilical (sin tejido del cordón). Después de la expulsión del neonato, pinzar y cortar el cordón umbilical, después seguir uno de dos enfoques:

Método de sistema cerrado

35

Después de la expulsión de la placenta, los extremos proximal y distal del cordón umbilical se frotran con alcohol, se dejar secar y se frotran de nuevo con tintura de yodo. Una aguja 16G fijada a una bolsa de recogida de sangre que contiene un volumen de HYPOTHERMOSOL® se inserta en el sitio proximal lo más cerca posible de la pinza. La sangre comenzará a llenar la bolsa a través de drenaje por gravedad. Después, el extremo distal se canula

40

inmediatamente con un angiocatéter 16G. Una jeringa de 50 ml pre-rellenada con HYPOTHERMOSOL® se fija a la cánula a través de un luer-lock, y la sangre se lava abundantemente del cordón umbilical a la bolsa de recogida. Debe usarse un total de 150 ml de solución (3 jeringas) para lavar por completo la sangre en la bolsa de recogida. Después de la recogida, la bolsa se cierra herméticamente atando tres nudos en el tubo de la línea de recogida, dejando al menos 6 pulgadas de tubo expuesto entre los nudos y la bolsa.

Método de recogida alternativo

45

El extremo proximal del cordón umbilical puede sumergirse en un recipiente de recogida de 250 ml que contiene 50 ml de HYPOTHERMOSOL® y anticoagulante y después se quita la pinza, o puede usarse una aguja 16G fijada a una bolsa de recogida de sangre de 250 ml como se describe en el método de sistema cerrado. Después, la sangre se "exprime" aplicando presión al cordón entre el pulgar y el índice en gancho y tirando suavemente en una dirección

50

distal-proximal. Este proceso puede repetirse hasta que se recoja el volumen de sangre deseable.

Ejemplo 2: Las células sanguíneas almacenadas en condiciones hipotérmicas conservan la viabilidad post-sedimentación.

55

Se recogió sangre del cordón umbilical en sitios donantes por venopunción en bolsas de sangre que contenían citrato-fosfato-dextrosa (Baxter US Healthcare). Después de determinar que la unidad es de "calidad de investigación" ($TNC \leq 9 \times 10^8$), la unidad se dividió uniformemente en dos bolsas de transferencia. Se añadió HYPOTHERMOSOL® frío (2-8 °C) a una bolsa en una relación 1:1 con el volumen de sangre y se almacenó a 4 °C. La otra mitad de la unidad sirvió como control y se mantuvo a temperatura ambiente. Las muestras se procesaron

después de 24 horas y las recuperaciones del recuento total de células nucleadas viables se determinaron a través de citometría de flujo después de la sedimentación y de nuevo, después de la reducción plasmática. Los controles se mantuvieron a temperatura ambiente la misma duración. Los resultados se expresaron como porcentaje de recuperación en comparación con las recuperaciones de recuento de células nucleadas total de la sangre inicial extraída en el momento de la recogida.

Para determinar si HTS-FRS + Hetastarch puede actuar como una solución de sedimentación por gravedad para racionalizar el procesamiento de la sangre del cordón umbilical y mejorar la recuperación y la viabilidad de los TNC, tres unidades de sangre del cordón umbilical se dividieron cada una por la mitad y se procesaron con las siguientes soluciones: 1) Solución de sedimentación estándar: Hetastarch (40 %), NaCl al 0,9 % (48%), ACD-A al 6 % (12 %); 2) HTS-FRS (60 %), Hetastarch (40 %). Después de 1 hora, la sangre que contenía solución de sedimentación estándar sedimentó por completo; sin embargo, la sangre que contenía solución de sedimentación HTS-FRS necesitó 90 minutos para sedimentar. La sangre diluida 1:1 con HTS-FRS y almacenada a 4 °C demostró recuperaciones del 74,52 % post-sedimentación y un 72,12 % de reducción post-plasmática en comparación con las recuperaciones del 90,98 % post-sedimentación y un 93,98% de reducción post-plasmática a partir de muestras no diluidas almacenadas a temperatura ambiente, probando que las células sanguíneas almacenadas en HYPOTHERMOSOL® conservan su viabilidad después de la sedimentación y un procesamiento adicional.

Ejemplo 3: Las células sanguíneas almacenadas en condiciones hipotérmicas durante extensos periodos conservan la viabilidad.

Se recogió sangre del cordón umbilical en el momento de la cirugía en los sitios donantes de 3 secciones C programadas por venopunción en bolsas de recogida (Pall Medical) que se habían rellenado previamente con 35 ml de HYPOTHERMOSOL® frío (4 °C). No se añadió anticoagulante. Los volúmenes de recogida fueron 87,3, 72 y 85 ml. Las unidades se almacenaron hasta 72 horas a 4 °C y se controlaron cada 24 horas para comprobar la coagulación por determinación visual de la formación de coágulos. La viabilidad TNC se determinó en cada punto temporal usando 7-AAD y citometría de flujo. No se observó coagulación en ningún punto temporal y, como se muestra en la figura 1, la viabilidad celular se mantuvo durante 72 horas de almacenamiento en frío en comparación con el valor inicial (extracción de sangre inicial en el momento de la recogida). En la figura 1, las barras de error son error estándar +/- 1 de la media. Estos datos demuestran que la viabilidad celular se conserva durante extensos periodos de almacenamiento hipotérmico de sangre entera en HYPOTHERMOSOL®. Además, estos datos validan el uso de HYPOTHERMOSOL® para almacenar la sangre entera durante extensos periodos en ausencia de anticoagulantes.

Ejemplo 4: Los tipos celulares significativos se preservaron y podían recuperarse al recogerse y almacenarse en condiciones hipotérmicas.

Se recogió sangre del cordón umbilical de tres donantes como se ha descrito en el Ejemplo 3. No se añadió anticoagulante. Después de 24, 48 y 72 h de almacenamiento a 4 °C en HYPOTHERMOSOL®, se retiraron 25 ml de muestra de la sangre del cordón umbilical para su procesamiento; se tomó 1 ml de alícuota para el ensayo de pre-procesamiento y los 24 ml restantes se procesaron usando métodos de procesamiento de sangre del cordón umbilical convencionales. Se utilizó citometría de flujo para determinar el rendimiento pre-procesamiento, la recuperación TNC, la viabilidad usando 7-AAD, y la positividad de CD34 y CD45. Como se muestra en la figura 2, en comparación con el valor inicial (extracción de sangre inicial en el momento de la recogida), los recuentos de células TNC, CD34⁺ y CD45⁺ disminuyeron ligeramente las primeras 24 horas, pero se estabilizaron durante el resto del almacenamiento en frío de 72 horas. En la figura 2, las barras de error son error estándar +/- 1 de la media.

Después del agotamiento de los glóbulos rojos y el plasma, la población de células nucleadas total se suspendió de nuevo en 10 ml de IMDM para un ensayo post-procesamiento. Se utilizó citometría de flujo para determinar el rendimiento post-procesamiento, la recuperación TNC, la viabilidad usando 7-AAD, y la positividad de CD34 y CD45. Los datos se comparan con 8 muestras de sangre del cordón umbilical no preservadas seleccionadas aleatoriamente recogidas usando recogida por venopunción en bolsas de recogida de citrato-fosfato-dextrosa estándares (Baxter) en ausencia de HYPOTHERMOSOL®. La figura 3 muestra la viabilidad media, el TNC viable, CD34⁺ viable y CD45⁺ viable de tres unidades de sangre del cordón umbilical recogidas en bolsas pre-rellenadas con HYPOTHERMOSOL® sin anticoagulante y almacenadas a 4 °C durante 24, 48 o 72 horas. Como se muestra en la figura 3, la viabilidad celular se mantiene durante 72 horas. Los recuentos de células TNC, CD34⁺ y CD45⁺ disminuyeron ligeramente las primeras 24 horas, pero se estabilizaron durante el resto del almacenamiento en frío de 72 horas. Estos datos demuestran que los tipos celulares relevantes (por ejemplo, células madre) son viables y pueden recuperarse después de extensos periodos de almacenamiento hipotérmico de sangre entera en

HYPOTHERMOSOL®. Además, estos datos validan el uso de HYPOTHERMOSOL® para almacenar la sangre entera durante extensos periodos en ausencia de anticoagulantes.

En las figuras 1, 2 y 3, se calcularon los valores de TNC viable, CD34⁺ viable y CD45⁺ viable como se indica a continuación:

$$\begin{aligned} \text{TNC viable} &= (\% \text{ de viabilidad} \times (\text{NC/ml}) \times (\text{volumen})) \\ \text{CD34}^+ \text{ viable} &= (\% \text{ de CD34}^+ \text{ en recuento de NC}) \times (\text{TNC viable}) \\ \text{CD45}^+ \text{ viable} &= (\% \text{ de CD45}^+ \text{ en recuento de NC}) \times (\text{TNC viable}) \end{aligned}$$

10

Ejemplo 5: Almacenamiento hipotérmico de sangre periférica entera en condiciones hipotérmicas.

La sangre periférica se extraerá de acuerdo con técnicas convencionales con y sin anticoagulante de ácido-citrato-dextrosa. A partir de la muestra inicial, se dispensarán 40 M de células y cada uno de los 5 tubos y se diluirán 1:0,1, 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10 con volúmenes de HYPOTHERMOSOL® (2-8 °C). Los viales de control negativo serán sangre no diluida a temperatura ambiente y sangre no diluida a 4 °C. Las muestras se ensayarán en 18, 36 y 72 horas por citometría de flujo para un recuento de células nucleadas total, viabilidad y positividad CD34 y CD45. Una muestra de la sangre inicial extraída se ensayará inmediatamente después de la donación para servir como control inicial.

20

Se espera que las células de sangre periférica entera, al recogerse, aislarse y almacenarse en presencia de HYPOTHERMOSOL® o un equivalente del mismo en condiciones hipotérmicas, muestren al menos una viabilidad y capacidad de recuperación comparables en el tiempo en condiciones hipotérmicas en comparación con las células procesadas convencionalmente. Por lo tanto, este estudio demostrará que, una vez más, los beneficios de la presente invención que se ha ilustrado anteriormente en los Ejemplos 1-4 también serán aplicables a la sangre periférica entera y las células obtenidas de la misma.

25

En base a las enseñanzas anteriores, ahora es evidente que la sangre entera recogida y almacenada usando los materiales y los métodos desvelados en el presente documento, tiene una mejor integridad y su contenido en BC tiene una mejor viabilidad y capacidad de recuperación al compararse con los métodos estándares de recogida y almacenamiento actualmente disponibles. Y, ahora es evidente que las células madre aisladas de dicha sangre entera muestran alta viabilidad y velocidades de recuperación en comparación con las preparaciones convencionales. Además, se espera que la viabilidad y la recuperación celular se mantengan más allá de 72 horas, preferiblemente hasta al menos 7 días, 14 días, 21 días, o más, al recogerse, procesarse y/o almacenarse en las condiciones y de acuerdo con las prácticas descritas en el presente documento.

35

En base a los descubrimientos descritos e ilustrados en el presente documento, las composiciones y métodos no descritos hasta ahora dan como resultado una viabilidad e integridad inesperadas de la sangre entera recogida en condiciones hipotérmicas en comparación con la sangre entera recogida de forma convencional. Y adicionalmente, los componentes de sangre entera obtenidos de acuerdo con la presente invención muestran menos daño estructural, químico y/o funcional en comparación con los componentes aislados de forma convencional. Aún más si cabe, se espera que dichos componentes aislados, al criopreservarse posteriormente de acuerdo con las enseñanzas expuestas en el presente documento, se recuperen en mayor medida y muestren una viabilidad y funcionalidad superiores en comparación con la sangre entera recogida de manera convencional. Las enseñanzas de la presente invención son particularmente eficaces para la recogida de sangre del cordón umbilical y células aisladas de la misma, especialmente células madre.

40

45

Equivalentes

La invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o características esenciales de la misma. Por lo tanto, las presentes realizaciones se considerarán ilustrativas y no restrictivas, estando el alcance de la invención indicado por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la anterior descripción y, por lo tanto, todos los cambios que están dentro del significado y rango de equivalencia de las reivindicaciones pretenden incluirse en las mismas.

55

REIVINDICACIONES

1. Un método para el almacenamiento hipotérmico de sangre entera, comprendiendo el método:
 - 5 (a) diluir un volumen de una muestra de sangre entera en un volumen de solución de preservación adaptada al equilibrio osmótico celular a temperaturas hipotérmicas, de tal forma que la relación de sangre entera con respecto a la solución de preservación es de al menos aproximadamente 1:0,1 en volumen; y
 - (b) mantener la mezcla de sangre entera/solución de preservación de aproximadamente 2 °C a
 - 10 la mezcla de sangre entera/solución de preservación está exenta de un reactivo anticoagulante introducido de manera exógena, y
 - la solución de preservación comprende: una solución acuosa de electrolitos que contiene iones de potasio a un intervalo de concentración de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 mM, iones de sodio a un intervalo de
 - 15 concentración de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 mM, iones de magnesio a un intervalo de concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, iones de cloro a un intervalo de concentración de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mM, e iones de calcio a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mM; un anión impermeante; manitol; un agente oncótico macromolecular; al menos un azúcar simple; un sustrato para la regeneración de ATP, y un tampón de pH biológico
 - 20 eficaz en condiciones hipotérmicas fisiológicas.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente aislar uno o más componentes de la sangre entera.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la sangre entera es sangre del cordón umbilical.
4. Un método para el aislamiento de un componente de una muestra de sangre del cordón umbilical, comprendiendo el método:
 - 30 (a) mezclar una muestra de sangre del cordón umbilical proporcionada de un donante con un volumen de solución de preservación adaptada al equilibrio osmótico celular a temperaturas hipotérmicas de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 18 °C, de tal forma que la relación de sangre del cordón umbilical con respecto a la solución de preservación es de al menos aproximadamente 1:0,1 en volumen; y,
 - 35 (b) aislar uno o más componentes de la mezcla de sangre del cordón umbilical y la solución de preservación; en el que
 - la mezcla de sangre del cordón umbilical/solución de preservación está exenta de un reactivo anticoagulante introducido de manera exógena, y
 - 40 la solución de preservación comprende: una solución acuosa de electrolitos que contiene iones de potasio a un intervalo de concentración de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 mM, iones de sodio a un intervalo de concentración de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 mM, iones de magnesio a un intervalo de concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, iones de cloro a un intervalo de concentración de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mM, e iones de calcio a un intervalo de concentración de
 - 45 aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mM; un anión impermeante; manitol; un agente oncótico macromolecular; al menos un azúcar simple; un sustrato para la regeneración de ATP, y un tampón de pH biológico eficaz en condiciones hipotérmicas fisiológicas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación de sangre con respecto a la solución de preservación es de al menos aproximadamente 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:5, o 1:10.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución de preservación comprende adicionalmente glutatión, un derivado de vitamina E, un antioxidante, y combinaciones de los mismos.
- 55 7. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 4, en el que el componente o componentes de la sangre comprenden células madre.
8. Una composición que comprende una mezcla de una muestra de sangre entera y una solución de preservación adaptada al equilibrio osmótico celular a temperaturas hipotérmicas de aproximadamente 2 °C a

aproximadamente 18 °C, de tal forma que la relación de sangre entera con respecto a la solución de preservación es de al menos aproximadamente 1:0,1 en volumen; en la que

la composición está exenta de un reactivo anticoagulante introducido de manera exógena, y

- 5 la solución de preservación comprende: una solución acuosa de electrolitos que contiene iones de potasio a un intervalo de concentración de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 mM, iones de sodio a un intervalo de concentración de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 mM, iones de magnesio a un intervalo de concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 mM, iones de cloro a un intervalo de concentración de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mM, e iones de calcio a un intervalo de concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mM; un anión impermeante; manitol; un agente oncótico
- 10 macromolecular; al menos un azúcar simple; un sustrato para la regeneración de ATP, y un tampón de pH biológico eficaz en condiciones hipotérmicas fisiológicas.

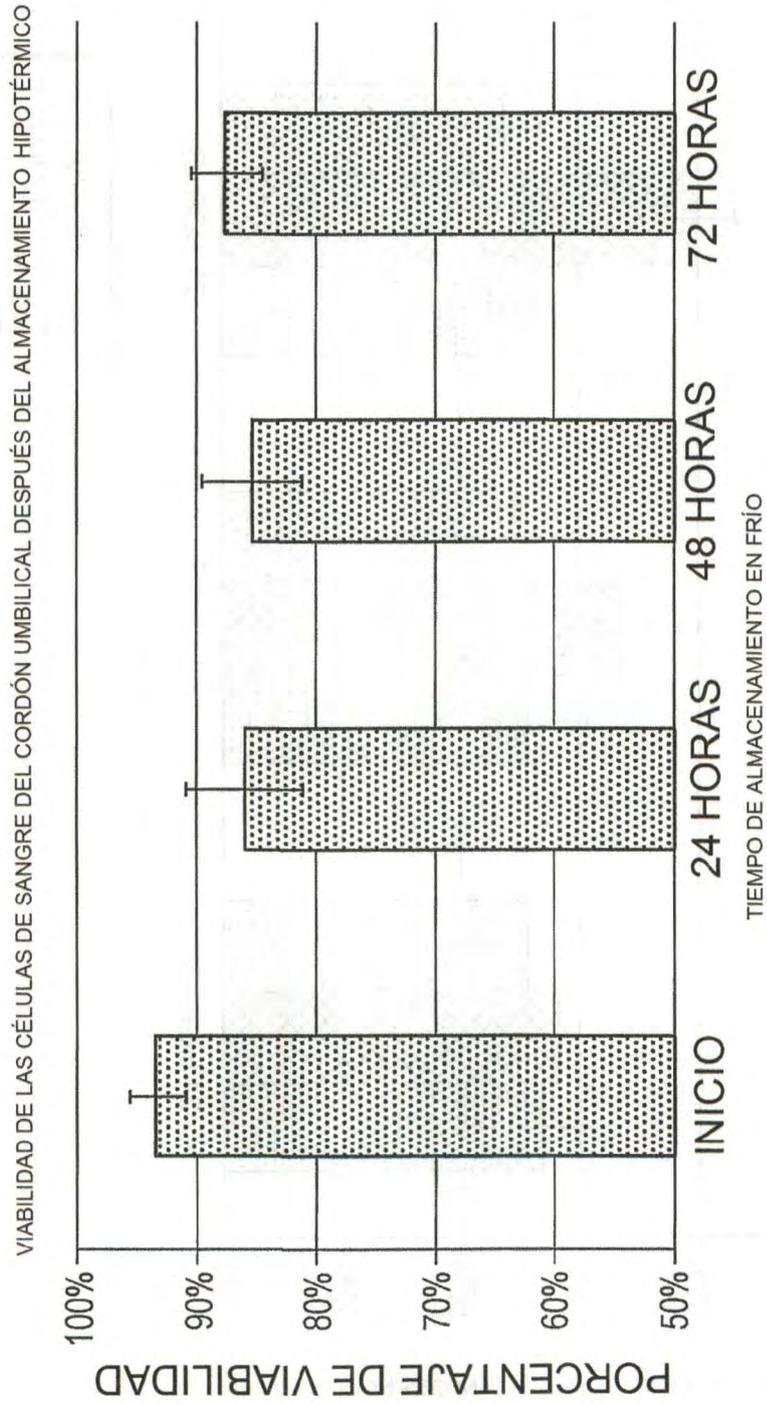


FIG. 1

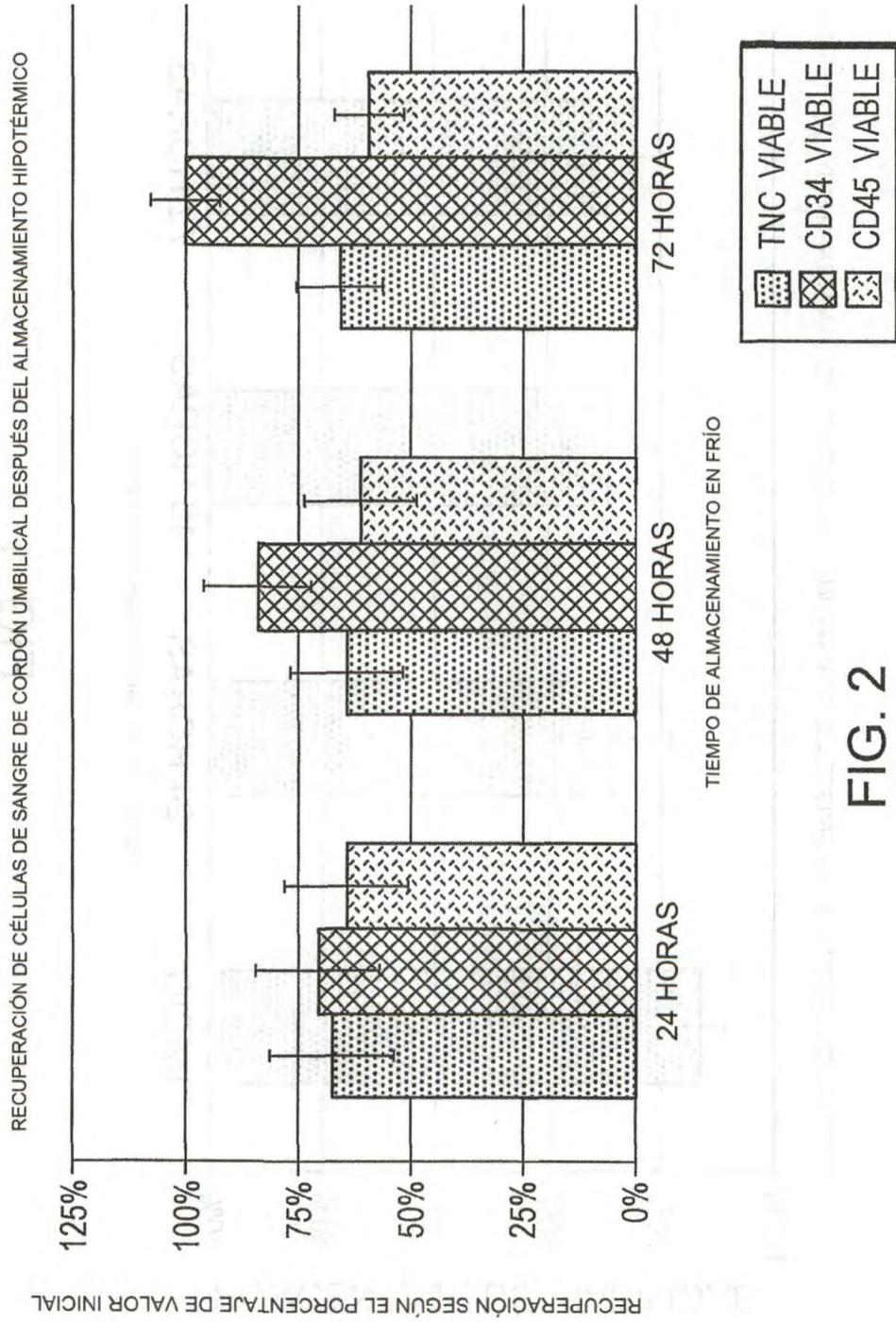


FIG. 2

