

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 160**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2012 PCT/CN2012/079737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13020492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2012 E 12821828 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2807923**

54 Título: **Medio de congelación libre de suero que comprende un alto contenido de KSR y el establecimiento de una librería de células madre derivadas de tejido adiposo**

30 Prioridad:

09.08.2011 CN 201110227449

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

13.03.2017

73 Titular/es:

CELLULAR BIOMEDICINE GROUP (SHANGHAI) LTD. (50.0%)

Level 5 Building 1 333 Guiping Road

Xuhui District, Shanghai 200233, CN y

CELLULAR BIOMEDICINE GROUP (WUXI) LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

ZHANG, HELEN;

ZHANG, LUYI y

CAO, WEI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 605 160 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medio de congelación libre de suero que comprende un alto contenido de KSR y el establecimiento de una librería de células madre derivadas de tejido adiposo

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y, en particular, al medio de congelación libre de suero para células madre derivadas de tejido adiposo y al establecimiento de la librería de células madre derivadas de tejido adiposo.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Las células madre (SC) son un tipo de células pluripotentes con capacidad auto-replicante que pueden diferenciarse en varios tipos de células funcionales. Hoy en día, las células madre mesenquimales son un tipo de células madre adultas, que tienen capacidad auto-replicante pluripotente y han acaparado mucha atención. Las células madre mesenquimales se pueden cultivar y amplificar *in vitro*, y se pueden diferenciar en varias células de tejidos tales como células óseas, células de cartílago, células de grasa, células nerviosas, células musculares, etc.

15

[0003] En los últimos años, las células madre de médula ósea, las células madre del cordón umbilical y las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC) se han estudiado exhaustivamente. Las células madre derivadas de tejido adiposo son un tipo de células madre que tienen capacidad auto-replicante pluripotente y se aíslan a partir de tejido adiposo. Las ADSC tienen varias ventajas sobre las células madre de la médula ósea y las células madre de cordón umbilical. Se ha encontrado en la investigación que las ADSC pueden proliferar *in vitro* de manera constante con una baja tasa de declive, al tiempo que es fácil de obtener fuentes de ADSC y se puede obtener una gran cantidad de ADSC a partir de una pequeña cantidad de tejido. Las ADSC son apropiadas para el cultivo a gran escala y crecen de forma homogénea mientras que el daño al cuerpo es pequeño. Por otra parte, las ADSC tienen amplios recursos y gran cantidad de almacenamiento en el cuerpo y las ADSC son apropiadas para el trasplante autoplástico, y muy seguras. El establecimiento de la librería de células madre derivadas de tejido adiposo se ha convertido en un nuevo enfoque en los últimos años.

20

25

30

[0004] Puesto que el aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano necesita un largo período, se tarda alrededor de dos semanas o más para que las células primarias crezcan hasta confluencia y cerca de tres semanas para alcanzar cierta cantidad de células. El cultivo *in vitro* a largo plazo el paso de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano por lo general conduce a una diferenciación espontánea, lo que resulta en la pérdida de multi-diferenciación potencial. Por lo tanto, con el fin de garantizar la continuidad del experimento, es necesario proporcionar células de siembra en grandes cantidades en experimentos o ingeniería de tejidos en cualquier momento. Por lo tanto, es necesario establecer un método eficaz de criopreservación. La fiabilidad de los métodos de criopreservación se identifica mediante la detección del ciclo celular, el fenotipo celular y el potencial de diferenciación adipogénica de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano después de la criopreservación y la recuperación.

35

40

[0005] En la actualidad, la criopreservación por lo general adopta suero para la criopreservación. El suero es el medio natural más utilizado en el cultivo celular y sus principales ventajas son las siguientes:

45

- 1) Contiene gran cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento celular con el fin de soportar suficientemente el crecimiento celular.
- 2) La gran cantidad de proteínas del suero desempeñan un papel protector sobre las células.
- 3) Se proporcionan factores de crecimiento y los oligoelementos esenciales para la proliferación celular el cultivo celular *in vitro*;
- 4) Proporciona factores de adhesión de células dependientes de la adhesión.

50

[0006] Sin embargo, hay varias desventajas al usar suero animal en medio de congelación, incluyendo principalmente:

55

- 1) El suero contiene sustancias que son tóxicas para las células, tales como poliamina oxidasa que puede reaccionar con poliaminas (por ejemplo, espermina, espermidina) de células altamente reproductivas, formando así poliespermina que es citotóxica. El complemento, los anticuerpos y las toxinas de bacterias afectan al crecimiento celular, e incluso causan la muerte celular;

2) Según el animal individual, el origen de suero, y el número de lote del suero, la calidad de cada lote de suero es muy variable y es posible mantener la consistencia de la composición.

3) Durante la recogida de materiales, los micoplasmas y virus pueden contaminar el suero y causar efectos potenciales sobre las células, lo que resulta en un fracaso de los experimentos o resultados experimentales poco fiables.

4) El coste del suero es bastante caro, de hasta 3000-4000 RMB por 500 ml de suero.

5) La adquisición de suero a partir de un cuerpo vivo es perjudicial para animales.

[0007] Ward et al. (Efficient Germline Transmission of Mouse Embryonic Stem Cells Grown in Synthetic Serum in the Absence of a Fibroblast Feeder Layer, Laboratory Investigation) describe un medio de congelación que comprende el 10 % en v/v de DMSO, el 13 % en v/v de KSR y DMEM. Wagner et al. (Cryopreserving and Recovering of Human iPS Cells using Complete Knockout Serum Replacement Feeder-Free Medium, Journal of Visualized Experiments) describe una composición de criopreservación que consiste en una mezcla 1:1 de un medio A y un medio B con la composición final del 65 % de DMEM/F12, el 25 % de KSR y el 10 % de DMSO, véase el ejemplo). Fletcher et al. (Variations in humanized and defined culture conditions supporting derivation of new human embryonic stem cell lines, Cloning and Stem Cells) describe una mezcla de congelación que comprende el 10 % de DMSO, el 15 % de KSR y el 75 % de KODMEM. Sin embargo, el medio de congelación usado en estas referencias no puede alcanzar una tasa de recuperación satisfactoria.

[0008] Hasta la fecha, no existe un medio de congelación libre de suero que sea estrictamente adecuado para células madre derivadas de tejido adiposo o para el establecimiento de la librería de células madre derivadas de tejido adiposo. Por lo tanto, es una necesidad urgente en la técnica desarrollar un medio de congelación libre de suero nuevo y eficaz adecuado para células madre derivadas de tejido adiposo.

25 Sumario de la invención

[0009] Un objeto de la presente invención es proporcionar un medio de congelación libre de suero eficiente para células madre derivadas de tejido adiposo y un uso del mismo, evitando así los posibles riesgos del medio de congelación que contiene suero en uso clínico.

30

[0010] Otro objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo tipo de librería de células madre derivadas de tejido adiposo de alta eficiencia y el método de establecimiento de la misma.

[0011] En el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un medio de congelación libre de suero, que comprende siguientes ingredientes: medio de cultivo libre de suero, dimetilsulfóxido (DMSO) y sustituto de suero Knockout™ Serum Replacement (KSR), y el medio de congelación no contiene nada de suero; y, en base al volumen de medio de congelación libre de suero, el contenido del medio de cultivo libre de suero es a y a es del 5 %-15 % (v/v), el contenido de DMSO es b y b es del 8 %-20 % (v/v), y el contenido de KSR es c y c es del 70 %-85 % (v/v), mientras que $a + b + c \leq 100$ %.

40

[0012] En una realización preferida, a es del 8 %-12 % (v/v), b es del 10 %-14 % (v/v), y c es del 75 %-80 % (v/v), en volumen.

[0013] En una realización preferida, a es el 10 % (v/v), b es el 12 % (v/v), y c es el 78 % (v/v), en volumen.

45

[0014] En una realización preferida, el medio de cultivo libre de suero se selecciona del grupo que consiste en medio de cultivo DEME y medio de cultivo UltraMEM.

[0015] En una realización preferida, el medio de cultivo libre de suero es medio de cultivo DEME disponible en el mercado, que comprende la cantidad adecuada de insulina, transferrina, penicilina y estreptomina.

50

[0016] En el segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un uso del medio de congelación libre de suero del primer aspecto de la presente invención para el almacenamiento a largo plazo de las células madre derivadas de tejido adiposo y/o el establecimiento de una librería de células madre derivadas de tejido adiposo.

55

[0017] En el tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una mezcla de células madre derivadas de tejido adiposo, en la que la mezcla comprende:

células madre derivadas de tejido adiposo, y

el medio de congelación libre de suero del primer aspecto de la presente invención.

5 **[0018]** En el cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una librería de células madre derivadas de tejido adiposo, en la que la librería comprende la mezcla de células madre derivadas de tejido adiposo del cuarto aspecto de la presente invención.

10 **[0019]** En una realización preferida, la mezcla de células madre derivadas de tejido adiposo y el medio de congelación libre de suero se conservan en nitrógeno líquido después de que se enfríe en un gradiente de enfriamiento programado.

10 **[0020]** En una realización preferida, después de la recuperación, las células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas de la librería tienen capacidad de inducción adipogénica.

15 **[0021]** En una realización preferida, la tasa de supervivencia de las células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas de la librería es del $\geq 90\%$.

[0022] En una realización preferida, la tasa de supervivencia de las células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas de la librería es del $\geq 95\%$.

20 **[0023]** En el quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de la librería de células madre derivadas de tejido adiposo del cuarto aspecto de la presente invención para la preservación a largo plazo de las células madre derivadas de tejido adiposo.

25 **[0024]** En el sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para establecer una librería de células madre derivadas de tejido adiposo, que comprende:

i) el lavado de un material de tejido adiposo que contiene células madre derivadas de tejido adiposo, obteniendo así una mezcla de tejido de la que se eliminan las células sanguíneas;

ii) la digestión de la mezcla de tejido obtenida en la etapa (i), obteniendo así una mezcla de tejido adiposo digerido;

30 iii) la filtración de la mezcla de tejido adiposo digerido obtenido en la etapa anterior para eliminar los restos de tejido no digerido, obteniendo de esta manera un filtrado que comprende células madre derivadas de tejido adiposo;

iv) la centrifugación del filtrado obtenido en la etapa anterior, y el descarte de la grasa en la capa superior, obteniendo de este modo un precipitado que contiene células madre derivadas de tejido adiposo;

35 v) la inoculación y el paso de las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas en la etapa (iv), obteniendo de este modo células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo;

vi) la digestión de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, obteniendo de este modo células madre derivadas de tejido adiposo dispersas;

40 vii) la mezcla de las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas en la etapa (vi) con el medio de congelación libre de suero del primer aspecto de la presente invención, y la preservación de la mezcla a baja temperatura, obteniendo de esta manera la librería de células madre derivadas de tejido adiposo.

[0025] En una realización preferida, la digestión de la etapa (ii) comprende la digestión con colagenasa, preferentemente digestión con colagenasa I.

45 **[0026]** En una realización preferida, la digestión de la etapa (vi) comprende la digestión con tripsina.

[0027] En una realización preferida, la etapa (vii) comprende: mezclar el medio de congelación libre de suero con las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas en la etapa (vi) con el fin de formar una mezcla de células madre derivadas de tejido adiposo, y enfriar y conservar la mezcla en nitrógeno líquido, obteniendo de esta manera la librería de células madre derivadas de tejido adiposo.

55 **[0028]** En una realización preferida, el enfriamiento de la etapa (vii) comprende el uso de un método de congelación programado por gradiente de enfriamiento; preferentemente la velocidad de enfriamiento es de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

[0029] En una realización preferida, cuando la temperatura alcanza por debajo de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la etapa (vii), la velocidad de enfriamiento se ajusta de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

[0030] En una realización preferida, cuando la temperatura alcanza $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la etapa (vii), las células

madre derivadas de tejido adiposo se conservan directamente en nitrógeno líquido.

[0031] En el séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de autoinjerto, que comprende:

- 5 una cantidad eficaz de células madre derivadas de tejido adiposo que se recuperan después de preservarlas con el medio de congelación libre de suero del primer aspecto de la presente invención, o las células madre derivadas de tejido adiposo que se recuperan de la librería de células madre derivadas de tejido adiposo del cuarto aspecto de la presente invención, y
 10 al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0032] Se debe entender que, en la presente invención, las características técnicas descritas específicamente más arriba y a continuación (como en los ejemplos) se pueden combinar entre sí, constituyendo de este modo una o más soluciones técnicas nuevas o preferidas que no se describen específicamente una por una debido a la
 15 limitación del contexto.

Descripción de las figuras de la invención

[0033]

20 La Fig. 1 muestra los resultados de la recuperación de células madre derivadas de tejido adiposo tratadas con un medio de congelación normal que contenía suero y medio de congelación libre de suero de la presente invención; en la que la Fig. 1A muestra los resultados de la recuperación de células madre derivadas de tejido adiposo en el grupo que se trató con un medio de congelación normal que contenía suero; y la Fig. 1B muestra el resultado de la
 25 recuperación de células madre derivadas de tejido adiposo en el grupo que se trató con el medio de congelación libre de suero de la presente invención.

La Fig. 2 muestra los resultados de la identificación de marcadores de superficie de proteína de antígeno identificados por citometría de flujo en células del estroma derivadas de tejido adiposo que se recuperaron después de criopreservarse en el medio de congelación libre de suero de la presente invención (la formulación se muestra en
 30 el Ejemplo 3). Los resultados indicaban que la pureza de las células madre derivadas de tejido adiposo era bastante alta. La Fig. 2A muestra que la tasa de células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas que contienen CD34 era del 0 %. La Fig. 2B muestra que la tasa de células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas que contienen CD45 era del 0 %. La Fig. 2C muestra que la tasa de células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas que contienen CD29 era del 98,9 %. La Fig. 2D muestra que la tasa de células madre derivadas de
 35 tejido adiposo recuperadas que contienen CD73 es del 93,5 %. La Fig. 2E muestra que la tasa de células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas que contienen CD90 es del 96,3 %. La Fig. 2F muestra que la tasa de células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas que contienen CD105 es del 73,3 %.

La Fig. 3 muestra los resultados de inducción adipogénica de las células madre derivadas de tejido adiposo que se recuperaron después de la criopreservación en el medio de congelación libre de suero de la presente invención (la
 40 formulación se muestra en el ejemplo 3). La Fig. 3A muestra los resultados de inducción de las células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas en un medio de inducción adipogénico. Los resultados muestran que las células madre derivadas de tejido adiposo tratadas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención (la formulación se muestra en el Ejemplo 3) tienen una fuerte capacidad adipogénica después de la recuperación. La Fig. 3B muestra que las células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas no poseen
 45 capacidad adipogénica cuando las ADSC se cultivan en medio de cultivo normal.

Descripción detallada de la invención

[0034] A través de una investigación amplia e intensiva, el inventor ha descubierto inesperadamente que
 50 aunque la mayoría sustituto de suero no se puede utilizar para sustituir suero en medio de congelación, una congelación específica libre de suero preparado medio por KSR puede proporcionar efecto criopreservación dramáticamente superior a la de congelación medio que contiene suero, por lo tanto proporcionar un nuevo medio de congelación libre de suero adecuado para la preservación a largo plazo de las células madre derivadas de tejido adiposo por primera vez. El medio de congelación de la presente invención ha superado las desventajas del medio
 55 de congelación tradicional. Las células madre derivadas de tejido adiposo a partir de una librería de células madre derivadas de tejido adiposo establecida con el medio de congelación de la presente invención se conservan bien y con una fuerte potencia de diferenciación. La presente invención se realiza en base a este descubrimiento.

Condiciones

[0035] Tal como se usa en el presente documento, los términos "más" y "menos", incluyen el número en sí, por ejemplo, "más del 95 %" significa $\geq 95 \%$, "menos del 0,2 %" significa $\leq 0,2 \%$.

- 5 **[0036]** Los términos "libre de suero" o "sustancialmente libre de suero" se pueden utilizar indistintamente, lo que significa que el componente de suero es $\leq 0,1 \%$, preferentemente $\leq 0,01 \%$, más preferentemente $\leq 0,005 \%$ (por ejemplo, 0 %), en base al total peso del medio de congelación.

Células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC)

10

- [0037]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "células madre derivadas de tejido adiposo" se refiere a células madre que se separan del tejido adiposo. Específicamente, las células madre derivadas de tejido adiposo son las células madre separadas de tejido adiposo y poseen múltiples diferenciaciones potenciales. No hay limitación particular en cuanto a los tejidos adiposos o los materiales de tejido adiposo en la presente invención, que puede ser de cualquier tejido adiposo de cualquier posición del animal o del ser humano, preferentemente tejidos adiposos humanos. Preferentemente, los tejidos adiposos son tejidos de posiciones tales como la cintura, las caderas, el abdomen, los muslos, la parte superior de los brazos, etc. Las ADSC pueden proliferar *in vitro* de manera constante con baja tasa de declive. Las ADSC son materias primas fáciles de obtener, en una gran cantidad de almacenamiento en el cuerpo, convenientes para el cultivo en gran escala y con un mínimo daño corporal. Además, las ADSC tienen amplias fuentes y son adecuadas para el autotrasplante.
- 15
- 20

Medio libre de suero

- [0038]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "medio libre de suero" se refiere a un medio que está sustancialmente libre de suero y que puede mantener el crecimiento *in vitro* y la proliferación de las células durante un largo periodo de tiempo. No hay limitación particular en cuanto al medio libre de suero de la presente invención, que puede ser cualquier medio de cultivo libre de suero adecuado para el cultivo o la preservación de las células madre (en particular ADSC).
- 25

- 30 **[0039]** En general, los componentes básicos del medio libre de suero incluyen, pero no se limitan a:

[0040] Sales inorgánicas. Las sales inorgánicas pueden regular la presión osmótica intracelular, ajustar la actividad enzimática y el valor pH de la solución; en general, las sales inorgánicas incluyen CaCl_2 , KCl , MgSO_4 , NaCl , NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , etc.

35

[0041] Aminoácidos. Los aminoácidos son los materiales indispensables para la síntesis de proteínas de las células. En general, los aminoácidos incluyen valina, leucina, isoleucina, treonina, lisina, triptófano, fenilalanina, metionina, histidina, tirosina, arginina y cisteína, etc.

40

[0042] Vitaminas. Las vitaminas son sustancias biológicamente activas que mantienen las células mediante la formación de un cofactor o coenzima. Por lo general, las vitaminas solubles en grasa incluyen VA, VD, VE y VK, etc. En general, las vitaminas solubles en agua incluyen el ácido fólico, la nicotinamida, el ácido pantoténico, la piridoxina, la riboflavina y la tiamina, etc.

45

[0043] Hidratos de carbono. Los hidratos de carbono son la fuente de energía de las células, y también los componentes de los ácidos nucleicos y las proteínas. La glucosa es el componente más importante de los hidratos de carbono.

50

[0044] Oligoelementos. Los oligoelementos son componentes importantes que promueven el crecimiento celular y activan la función de las zimoproteínas. El selenio es el oligoelemento más común.

[0045] Factores de crecimiento y hormonas. Se pueden añadir diferentes factores de crecimiento y hormonas como la insulina en las diferentes células.

55 **[0046]** Materiales que promueven la adhesión. Muchas células deben crecer en condiciones de adhesión, y los materiales que promueven la adhesión generalmente son materiales de la matriz extracelular, tales como fibronectina, laminina, y similares.

[0047] El medio libre de suero también puede comprender antibióticos. Los antibióticos comunes incluyen,

pero no se limitan a la penicilina, la estreptomina y la concentración final de los antibióticos generalmente es de 20-100 mg/ml, y preferentemente 50 mg/ml.

5 **[0048]** El experto en la técnica puede formular el medio de cultivo libre de suero usando métodos convencionales, o se pueden adquirir diversos medios libres de suero disponible en el mercado, incluyendo (pero no limitados a): medio de cultivo libre de suero DEME, medio de cultivo libre de suero UltraMEM, etc.

Dimetilsulfóxido (DMSO)

10 **[0049]** El dimetilsulfóxido es un compuesto orgánico que contiene azufre, que es incoloro e inodoro y un líquido transparente a temperatura ambiente. Tiene características tales como una alta polaridad, alto punto de ebullición, buena estabilidad térmica, no protónico, miscible con agua, y se puede disolver en etanol, propanol, benceno y cloroformo y en la mayoría de las sustancias orgánicas. En cultivo celular, el DMSO puede actuar como agente protector de la permeabilidad, y puede reducir el punto de congelación de las células, reducir la formación de
15 cristales de hielo, reducir el daño por radicales libres a las células, y cambiar la permeabilidad de la biopelícula a electrolito, fármacos, toxinas y metabolitos.

Medio de congelación libre de suero

20 **[0050]** La presente invención proporciona un medio de congelación libre de suero eficaz adecuado para células madre derivadas de tejido adiposo, que comprende:

medio libre de suero, dimetilsulfóxido (DMSO) y el sustituto de suero Knockout™ Serum Replacement (KSR), y el medio de congelación no contiene nada de suero.

25 **[0051]** El contenido del medio de cultivo libre de suero es del 5 %-15 %, el contenido de DMSO es del 8 %-20 %, y el contenido de KSR es del 70 %-85 %, en volumen. Preferentemente, el contenido de medio de cultivo libre de suero es del 8 %-12 %, el contenido de DMSO es del 10 %-14 %, y el contenido de KSR es del 75 %-80 %. Más preferentemente, el contenido de medio de cultivo libre de suero es del 10 %, el contenido de DMSO es del 12 %, y
30 el contenido de KSR es del 78 %.

Criopreservación de células

35 **[0052]** La técnica de criopreservación de células es un método importante para la preservación de especies en ciencias biológicas. Si la criopreservación se lleva a cabo sin ningún tipo de condiciones adicionales, el agua del entorno intracelular y extracelular forma cristales de hielo, que dan lugar a daños mecánicos, aumento del nivel de electrolitos, cambios en la presión osmótica, deshidratación, cambios de pH, y desnaturalización de las proteínas en las células, e incluso puede conducir a la muerte celular. El punto de congelación se reducirá por lo que se añade un agente de protección al medio de cultivo. Esto hace que el agua intracelular se difunda fuera de las células antes de
40 congelar en condiciones de congelación lenta. La formación de cristales de hielo se reduce si se almacena a baja temperatura por debajo de -130 °C.

[0053] El medio de congelación es la parte más importante para la criopreservación. El medio de congelación tradicional contiene suero animal, principalmente suero de ternera fetal y/o suero de ternero bovino. El suero es una especie de mezcla extremadamente compleja que se produce por la eliminación de fibrina del plasma. Algunos de los constituyentes del suero todavía no están claros. Por otra parte, los constituyentes y el contenido del suero pueden variar, dependiendo del sexo, la edad, el estado fisiológico y las condiciones nutricionales de los donantes animales. El suero comprende varias proteínas plasmáticas, péptidos, grasas, carbohidratos, hormonas y sustancias inorgánicas, etc.
50

[0054] La presente invención utiliza un medio de congelación libre de suero que comprende un medio libre de suero y un sustituto de suero para la criopreservación de células a fin de reducir los defectos presentados por el suero de las células animales, así como para asegurar los efectos de criopreservación y recuperación de células.

55 **[0055]** La criopreservación de las células se puede llevar a cabo con equipos y métodos convencionales. En una realización preferida, se usa un enfriamiento programado. La caja de enfriamiento normalmente está fabricada en policarbonato, polietileno de alta densidad o espuma. Además, se requiere isopropanol y un sistema de refrigeración mecánica. La velocidad de enfriamiento es ajustable y repetible con el fin de cumplir con los requisitos para la criopreservación y recuperación de células. Un procedimiento de enfriamiento típico comprende: enfriar con

una velocidad de enfriamiento de -1 a -2 °C/min; cuando la temperatura alcanza por debajo de -25 °C, se ajusta la velocidad de enfriamiento de -5 a -10 °C/min; y rápidamente se sumerge en nitrógeno líquido cuando la temperatura alcanza por debajo de -100 °C. Las células se pueden conservar en nitrógeno líquido durante un largo periodo, que puede ser de décadas de años o más.

5

Librería de células

[0056] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "librería de células" se refiere a una población de células que se enfrían mediante un determinado programa y que se conservan a largo plazo en un medio de congelación específico. Las células de la librería de células pueden ser de origen humano o de mamíferos (no humanos) tales como ratas, ratones, monos, gatos, ovejas, etc.; y de fuentes de aves de corral, tales como pollos. Las células pueden ser de diferentes órganos o tejidos, tales como: cavidad oral, riñón, hígado, linfa, músculo, ovario. Las células de la librería de células se pueden conservar durante décadas de años o más.

15 Recuperación de células

[0057] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "recuperación de células" se refiere al proceso en el que las células se vuelven a activar desde estado latente. Generalmente, en la recuperación de células se usa la recuperación rápida, un procedimiento conocido por el experto en la técnica, que comprende el paso rápido del tubo de congelación en nitrógeno líquido a un baño de agua caliente cuya temperatura preferentemente es de 37 °C-40 °C; se agita a un intervalo variable para acelerar la descongelación; el tubo de congelación se esteriliza después de que las células se hayan descongelado completamente; se lavan y las células descongeladas se vuelven a suspender, las células se transfieren a un matraz de cultivo de células y se cultivan en una incubadora de CO₂; y se determina la tasa de supervivencia y viabilidad de las células.

20

Adhesión celular

[0058] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "adhesión celular" se refiere al hecho de que haya una superficie de soporte para la fijación durante el crecimiento de las células normales, mientras las células crecen y proliferan sobre la superficie por los factores adherentes excretados por ellas mismas o suministrados en el medio. Las células se desarrollan en dos formas después de crecer sobre la superficie, que son células similares a fibroblastos o células epitelioideas. Hay un fenómeno de inhibición por contacto durante el crecimiento de adhesión. Se lleva a cabo el tratamiento con tripsina durante el cultivo de células animales para hacer que las células adherentes se desprendan. Por otra parte, las células tumorales no tienen estas características y se pueden cultivar en el cultivo de suspensión.

25

Detección del antígeno de células madre

[0059] Las células madre derivadas de tejido adiposo criopreservadas por el método de la presente invención tienen una alta pureza después de la recuperación, que se ha demostrado mediante la detección de antígenos de superficie celular.

30

[0060] Hay varios antígenos y receptores específicos de las células madre derivadas de tejido adiposo, principalmente CD3, CD13, D29, CD34, CD45, CD49e, CD59, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, etc.

45

[0061] El antígeno CD34 es una proteína transmembrana altamente glicosilada de tipo I que se expresa selectivamente sobre la superficie de las células madre hematopoyéticas humanas (HSC), células progenitoras (PC) y células endoteliales vasculares (EC). La relación de células madre derivadas de tejido adiposo con CD34 en las células madre preferentemente es del $\leq 0,2$ %, más preferentemente del $\leq 0,2$ %.

50

[0062] CD45 existe sobre la superficie de todas las células madre hematopoyéticas, incluyendo células madre hematopoyéticas y osteoclastos, la relación de células madre derivadas de tejido adiposo con CD45 en las células madre preferentemente es del $\leq 0,1$ %.

[0063] CD29, CD73, CD90, CD105 y etc. existen principalmente sobre la superficie de las células del estroma derivadas de tejido adiposo.

55

[0064] La relación de células madre derivadas de tejido adiposo con CD29 en las células madre preferentemente es del ≥ 95 %, más preferentemente del ≥ 97 %, lo más preferentemente del ≥ 98 %.

[0065] La relación de células madre derivadas de tejido adiposo con CD73 en las células madre preferentemente es del $\geq 80\%$, más preferentemente del $\geq 90\%$, lo más preferentemente del $\geq 93\%$.

5 [0066] La relación de células madre derivadas de tejido adiposo con CD90 en las células madre preferentemente es del $\geq 80\%$, más preferentemente del $\geq 90\%$, lo más preferentemente del $\geq 95\%$.

[0067] La relación de células madre derivadas de tejido adiposo con CD105 en las células madre preferentemente es del $\geq 70\%$, más preferentemente del $\geq 72\%$, lo más preferentemente del $\geq 75\%$.

10

[0068] El experto en la técnica puede utilizar los métodos comunes para detectar la pureza y el grado de diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo, tales como el método de citometría de flujo. Se añaden anticuerpos dirigidos específicos diferentes durante la detección, en donde los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, o los anticuerpos pueden ser un fragmento de anticuerpo de un fragmento inmunorreactivo, tal como Fab' o (Fab)₂; la cadena pesada del anticuerpo; la cadena ligera del anticuerpo; la molécula Fv de cadena sencilla, que está diseñado genéticamente (Ladner et al., patente de EE. UU. n.º 4.946.778); o anticuerpos quiméricos tales como anticuerpos que tienen especificidad de unión con anticuerpos murinos al tiempo que aún conservan parte del anticuerpo humano. Las células son analizadas y clasificadas automáticamente por citometría de flujo después de que se añadan anticuerpos y se unan a antígenos sobre la superficie celular durante un cierto período de tiempo.

Adipogénesis y ensayos

[0069] Dado que las células madre derivadas de tejido adiposo tienen una capacidad de diferenciación multi-direccional, ciertas células diferenciadas que tienen una función particular se pueden obtener por diferenciación induciendo células madre derivadas de tejido adiposo bajo ciertas condiciones.

[0070] La inducción adipogénica de células madre derivadas de tejido adiposo se puede llevar a cabo por expertos en la técnica con cualquiera de los métodos comunes. Un método de inducción preferido es añadir dexametasona al medio de cultivo. Principalmente hay 3 tipos de medios de inducción que contienen dexametasona: 1. dexametasona + 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX), 2. dexametasona + insulina, 3. dexametasona + indometacina, 1-metil-3-isobutilxantina e insulina. La sustancia más importante del medio de inducción es la dexametasona. La baja concentración de dexametasona es uno de los componentes esenciales del cultivo de células madre mesenquimales con cultivo en bajo contenido de suero o libre de suero, que pueden promover la rápida proliferación *in vitro* de las células madre mesenquimales; mientras que una mayor concentración de dexametasona puede inducir a que las células madre mesenquimales se diferencien hacia adipocitos.

[0071] El experto en la técnica puede utilizar los métodos y tinciones comunes (por ejemplo, Oil Red, Sudan Red 5B, y Solvent Red 27, etc.) para detectar la inducción adipogénica de las células madre. Una tinción preferida es Oil Red (O), es decir, Oil Red O. La estructura del Oil Red O es 1-2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo-2-naftol, que es un polvo de color rojo. Se trata de un colorante azoico soluble en aceite, fácilmente soluble en benceno, etanol y acetona. Durante la inducción adipogénica, las gotitas de aceite se acumulan constantemente en el citoplasma de las células, y aumentan continuamente de volumen, y, finalmente, las gotitas de aceite ocupan el citoplasma. Como tinción biológica, el Oil Red O es fácil de combinar con aceite, pero con baja fuerza de tinción a la estructura de las propias células. La observación de la tinción adipogénica se puede llevar a cabo claramente usando un microscopio.

Composición de autotrasplante y su administración

50 [0072] La presente invención proporciona además una composición de autotrasplante que es útil para múltiples fines tales como composición anti-envejecimiento. La composición de autotrasplante comprende una dosis eficaz de células madre derivadas de tejido adiposo que se recuperan después de conservadas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención. En una realización preferida, además puede comprender un vehículo o diluyente, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. El ingrediente activo normalmente se mezcla con un excipiente o se diluye con un excipiente en la preparación de la composición. Para las composiciones que contienen células madre derivadas de tejido adiposo, la formulación preferida es una formulación líquida.

[0073] La composición de autotrasplante preparada se puede administrar o aplicar por una vía de administración común, que comprende (pero no está limitada a): vía intramuscular, intraperitoneal, intravenosa,

subcutánea, intradérmica, o tópica.

[0074] Cuando se utiliza la composición de autotrasplante de la presente invención, se administra una dosis segura y eficaz al ser humano, en la que la dosis segura y eficaz generalmente es de 10^5 - 10^8 células/persona/una vez, preferentemente 10^6 - 10^7 células/persona/una vez. Por supuesto, la dosis específica puede variar de acuerdo con factores tales como la forma de administración y el estado de salud del sujeto, que está dentro de la capacidad del médico experto.

[0075] Las principales ventajas del medio de congelación libre de suero de la presente invención incluyen:

- 1) El medio tiene ingredientes claros y no contiene ingredientes nocivos para las células.
- 2) El medio tiene una calidad estable y el contenido de los ingredientes de nutrición no varía con los lotes.
- 3) Las células se pueden recuperar bien después de la criopreservación con una alta tasa de supervivencia;
- 4) Las células, después de la criopreservación, tienen unas características antigénicas estables y una alta pureza.
- 5) Las células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas tienen una fuerte capacidad de diferenciación después de la preservación.

[0076] La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación con referencia a los ejemplos específicos. Los métodos experimentales sin condiciones específicas descritos en los siguientes ejemplos generalmente se realizan en las condiciones convencionales, por ejemplo, en las condiciones descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), o de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A menos que se indique lo contrario, las partes y porcentajes se calculan en peso.

25 Ejemplo 1
Separación de las células madre derivadas de tejido adiposo

1. Reactivos y consumibles

30 [0077]

- fórceps estéril
- filtro estéril
- tubos de centrífuga de 50 ml
- 35 frascos de cultivo
- medio libre de suero DMEM (adquirido en Hyclone Company)
- solución de tripsina al 0,125 %-EDTA al 0,01 %

[0078] El método de preparación del 0,1 % de colagenasa I (recién preparado): 0,1 g pesados de colagenasa I en polvo se disolvió en 100 ml de medio sin ningún factor, y se pre-calienta hasta 37 °C antes de su uso.

2. Separación de las células madre derivadas de tejido adiposo

45 [0079]

2.1. Lavado del tejido adiposo (con el fin de eliminar las células sanguíneas): se añadió una cantidad igual de solución salina a un tubo de centrífuga que contiene tejido adiposo. La tapa del tubo de centrífuga se apretó, se agitó durante 3 minutos para lavar a fondo el tejido adiposo, y a continuación se dejó reposar 3-5 minutos para separar las diferentes fases. Se retiró la fase acuosa inferior. El protocolo antes mencionado se repitió tres veces hasta que el líquido de la capa inferior se volvió relativamente más claro.

2.2. Digestión de la colagenasa: Después de retirar la solución salina, DMEM precalentado que contiene el 0,1 % de colagenasa I con un volumen igual a tejido adiposo se añadió en el tubo de centrífuga y se puso en el agitador a una temperatura constante de 37 °C, 200 rpm, y se digirió durante 1 h. El tubo de centrífuga se agitó durante 5-10 segundos cada 15 minutos (para hacer que la colagenasa I y el tejido adiposo entrasen completamente en contacto);

2.3. Recogida del sedimento: después de la digestión, el tubo se centrifugó durante 10 min a 2000 rpm. El tejido adiposo digerido en la capa superior se retiró y el sedimento en la capa inferior de los dos tubos se recogió en un nuevo tubo de centrífuga, a continuación se añadió 50 ml de DMEM, se centrifugó a 1000 rpm durante 8 minutos, y se lavó una vez.

2.4. Filtración y recuento: se añadió DMEM hasta 50 ml, se mezcla y se filtra con un filtro de 100 µm para extraer los

tejidos no digeridos. Se añadió DMEM hasta 50 ml, y se extrajo 1 ml de la mezcla del tubo de hacer un recuento de la cantidad y la viabilidad de las células.

Ejemplo 2

5 Cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo

[0080]

1. Inoculación: las células madre derivadas de tejido adiposo separadas descritas en el Ejemplo 1 se centrifugaron durante 8 minutos a 1000 rpm, se lavaron una vez, y se inocularon en una botella de cultivo T75, en la que la densidad del inóculo se ajustó de acuerdo con la cantidad de células contadas (densidad de inóculo: normalmente se inocularon 12 ml de liposucción adiposa en cada botella de cultivo T75, es decir, las células separadas de los 50 ml de liposucción adiposa se inocularon en cuatro frascos de cultivo T75), y a continuación se cultivó a 37 °C con el 5 % de CO₂.
2. Paso de las células: las células se volvieron adherentes durante aproximadamente 1-2 días después de inoculadas, entre las que después de tres días apareció una pequeña cantidad de células madre mesenquimales adherentes. Después de cultivadas durante 5-7 días, las células adherentes se convirtieron en una colonia. La digestión y el paso de las células se llevaron a cabo con una solución del 0,125 % de tripsina – 0,01 % de EDTA. Se añadieron 2 ml de la digestión a cada botella de cultivo T75, y el tiempo de digestión fue de 1,5-2,5 min. Las células se recogieron y se contaron, y a continuación se digirieron y se pasaron por $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ (es decir, 1:1-2 en base a la situación de adhesión primaria). Las células se hicieron crecer más rápido después de los pasos, por lo general les llevó tres días para el paso de nuevo. Las células se pasan de acuerdo con la relación de 1:2-3 en base a las condiciones de crecimiento de las células. Por lo general, el número de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo P2 es superior a 2×10^7 .

Ejemplo 3

Criopreservación de las células

1. Reactivos y consumibles

[0081]

- tubo de congelación de 2 ml
 pipeta de 52 ml
 pipeta de 102 ml
 tubo de centrifuga de 50 ml
 pajita de plástico de 3 ml
 filtro celular de 40 µm
 caja de congelación programada Nalgene (Artículo n.º 5100-0001c disponible en el mercado) 0,25 % de pancreatina-EDTA
 DMSO
 medio libre de suero (adquirido en Sciencell, el Artículo n.º 7511 es): el medio libre de suero disponible en el mercado es medio de cultivo DMEM, que contiene la cantidad adecuada de insulina, transferrina, penicilina y estreptomicina.
- Alternativas de suero: Knockout™ Serum Replacement (KSR), (adquirido en Invitrogen, Artículo n.º 10828028)
 Medio de congelación libre de suero: 10 % de medio libre de suero + 12 % de DMSO + 78 % de alternativa de suero KSR en volumen;
 medio de congelación ordinario: 10 % de suero de ternera fetal + 10 % de DMSO + 80 % de DMEM en volumen.

2. Criopreservación

[0082]

- 2.1 Se observó la morfología de las células a criopreservar, y las células se digieren cuando su confluencia alcanza el 85 %-90 %.
- 2.2 Se añadió la cantidad apropiada de medio libre de suero (2-3 ml/75 cm²) a cada vaso de cultivo después de la digestión celular. Los vasos se pipetearon o agitaron en varias ocasiones hasta que la mayoría de las células se hubo desprendido, y a continuación, se trasladaron a un tubo de centrifuga de 50 ml. Se añadió 4-5 ml de PBS a los vasos de cultivo originales para lavar la pared de los vasos, y la solución de lavado se combinó y se añadió al tubo

de centrífuga, y se centrifugó durante 10 min.

2.3 Lavado de las células: El sobrenadante en el tubo de centrífuga se retiró y se añadió 2-4 ml de PBS en cada tubo de centrífuga, y se pipetea suavemente para homogeneizarlo. La suspensión de células de los 15-20 tubos de centrífuga se combinaron en un tubo de centrífuga y se centrifugó a 210 g durante 10 min para lavar.

- 5 2.4 El medio de congelación de células libre de suero se añadió poco a poco a la suspensión de células a lo largo de la pared interior del tubo, y se pipeteó para homogeneizarlo (el intervalo de la densidad de criopreservación fue de 0,5 a 2×10^7 /ml), mientras se añadía el medio de congelación ordinario que contenía suero en el otro grupo. Hay cinco muestras para cada grupo.

2.5 Las células a criopreservar se pusieron en la caja de enfriamiento programado que contiene alcohol isopropílico.

- 10 La cantidad y los tiempos de uso del isopropanol se deben considerar antes de utilizarse con el fin de añadir o sustituir el isopropanol a tiempo de acuerdo con protocolos. Las células se mantuvieron a -80 °C durante toda la noche en el congelador con la velocidad de enfriamiento de la caja de enfriamiento mantenida a -1 °C/min, se movió al tanque de nitrógeno líquido al día siguiente, por lo que se estableció el banco de células madre adiposas.

15 **Ejemplo 4** **Recuperación de las células**

1. Reactivos y consumibles

20 **[0083]**

pipeta de 5 ml

pipeta de 102 ml

pajita de plástico de 3 ml

- 25 tubo de centrífuga de 50 ml

solución de PBS pre-enfriada a 4 °C

75 % de etanol

2. Recuperación

30

[0084]

- 2.1 La temperatura del baño de agua termostático se ajustó a 40 °C. El tubo de congelación de células se sacó del nitrógeno líquido, y a continuación, se puso inmediatamente en agua caliente a 40 °C y se agitó suavemente hasta que el medio de congelación se hubo descongelado completamente;

- 35 2.2 La tapa del tubo de congelación se limpió con etanol al 75 % y se quemó con una llama. La tapa del tubo de congelación se abrió y la suspensión celular se transfirió a un tubo de centrífuga de 50 ml (cabe señalar que el movimiento debe ser suave). A continuación se añadió 1 ml de PBS pre-enfriado a 4 °C al tubo de congelación, y se pipeteó para lavar. Las células residuales en el tubo se transfirieron a un tubo de centrífuga de 50 ml tanto como sea

- 40 posible, y a continuación se mezclaron pipeteando suavemente;
- 2.3 Se repitieron los protocolos mencionados anteriormente. La suspensión de células y el líquido de lavado de los 2-3 tubos de congelación se combinaron en un tubo de centrífuga de 50 ml. Se añadió PBS pre-enfriado a 4 °C en el tubo de centrífuga (en el que la relación de adición era de 10-15 ml por tubo de congelación). El tubo se centrifugó a 210 g durante 8 minutos. Se retiró el sobrenadante; y las células de 2-3 tubos de centrífuga se podían combinar en

- 45 un tubo de centrífuga de 50 ml, seguido de dilución de las células a través de la adición gradual de PBS pre-enfriado a 4 °C hasta 45 ml (o diluido en una relación de 15-20 ml por tubo de centrífuga), y a continuación se pipeteó suavemente para homogeneizarlo. Se tomaron 10 µl de la muestra para contar el número y la viabilidad de las células, y después se centrifugó a 210 g durante 10 min. La población de células recuperadas se obtuvo a partir del sedimento resultante.

50

Ejemplo 5

Determinación de la viabilidad de las células recuperadas de células madre derivadas de tejido adiposo

- 55 **[0085]** La tercera generación de células madre derivadas de tejido adiposo se criopreservaron utilizando el medio de congelación libre de suero que se describe en el Ejemplo 3. El proceso de recuperación de células se realizó un mes más tarde. Se dividieron cinco grupos y se prepararon en una única suspensión celular cuya concentración era de 1×10^5 /ml, de la que se tomaron 9 gotas y se movieron al tubo de EP. Se añadió en cada tubo una gota de solución de azul de tripán cuya concentración es del 0,4 %. Se utiliza la cámara de recuento sanguínea para contar el número y la viabilidad de las células en 2 min. El grupo de control era las células recuperadas

criopreservadas con medio de congelación ordinario y tratado por el mismo método mencionado anteriormente.

[0086] Los resultados se muestran en la Tabla 1.

5

Tabla 1. Viabilidad celular después de la recuperación

Grupos	Medio de congelación ordinario que contiene suero	medio de congelación libre de suero de la presente invención
1	89,0 %	95,5 %
2	90,5 %	93,5 %
3	91,0 %	94,5 %
4	93,5 %	95,5 %
5	96 %	95,0 %
Promedio	92 %	94,8 %

[0087] En la Tabla 1 se puede ver que la viabilidad celular promedio de las células recuperadas después de criopreservarlas con medio de congelación libre de suero de la presente invención es del 94,8 %, mientras que la viabilidad celular promedio de las células recuperadas después de criopreservarlas con medio de congelación ordinario que contiene suero es del 92 %. Esto indica que el efecto del medio de congelación libre de suero de la presente invención es mejor que el del grupo control.

Ejemplo 6
Determinación del tiempo de criopreservación de la disolución de criopreservación libre de suero de la presente invención

[0088] Con el fin de determinar el efecto de criopreservación del banco de células preparadas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención (cuya fórmula se muestra en el Ejemplo 3), el inventor recuperó las células madre derivadas de tejido adiposo que habían sido criopreservadas durante 1 mes, 3 meses y 6 meses, respectivamente. Cinco muestras de cada grupo se tiñeron para su recuento por el método descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Grupos	Recuperadas después de 1 mes de criopreservación	Recuperadas después de 3 meses de criopreservación	Recuperadas después de 6 meses de criopreservación
1	94,5 %	95,5 %	91,0 %
2	93,5 %	93,0 %	96,5 %
3	95,0 %	92,5 %	95,0 %
4	94,5 %	94,5 %	93,5 %
5	95,0 %	96,5 %	95,5 %
Promedio	94,5 %	94,4 %	94,3 %

[0089] El resultado mostraba que la viabilidad de las células promedio de células crioconservadas durante 1 mes, 3 meses y 6 meses fue del: 94,5 %, 94,4 % y 94,3 %, respectivamente, y las condiciones de recuperación de células eran correctas, lo que significa que las propiedades del banco de células era estable.

Ejemplo 7
Determinación de la tasa de adhesión celular

[0090] Las células tratadas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención (cuya fórmula se muestra en el Ejemplo 3) y las células tratadas con el medio de congelación de control se inocularon por separado en placas de 24 pocillos con 5×10^4 células por pocillo. Cada grupo se inoculó con células en 3 pocillos y se cultivaron durante un día. Entonces se observó la situación de adhesión celular.

[0091] El resultado se muestra en la Fig 1. La Fig 1A muestra la situación de adhesión del grupo tratado con medio de congelación libre de suero de la presente invención después de la recuperación, y la Fig 1B es la del grupo de control. El resultado muestra que las células recuperadas después de criopreservarlas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención tienen una mayor viabilidad celular y un mejor efecto de adhesión.

Ejemplo 8

Identificación de los marcadores de superficie de las células madre

[0092] Las células tratadas con el medio de congelación de la presente invención (cuya fórmula se describe en el Ejemplo 3) y las células del grupo de control se recuperaron respectivamente. Se centrifugaron las células madre, se resuspendieron, y se contaron. El concentrado de las células se ajustó a $1 \times 10^8/l$ y se centrifugó durante 5 min. El sobrenadante se retiró y las células se lavaron con D-Hanks frío a 4 °C y se resuspendieron. La suspensión celular se centrifugó a 800 r/min durante 5 min más. El sobrenadante se retiró, se resuspendió con 1 ml de D-Hanks, entonces se añadió 5-10 µl de anticuerpo y se mantuvo fuera de la luz en hielo durante 30 min. Después se lavó con D-Hanks y se retiró el sobrenadante. El mismo protocolo de lavado se repitió 2-3 veces para asegurarse de que los anticuerpos no combinados se eliminaban completamente con el lavado seguido de la adición de aproximadamente 200 a 300 µl de D-Hanks para formar una suspensión para la clasificación por el citómetro de flujo. Los anticuerpos añadidos eran anticuerpos contra CD34, CD45, CD29, CD73, CD90 y CD105 humanos, respectivamente.

[0093] Los resultados se muestran en la Fig 2. La Fig 2A es el mapa de citometría de flujo de anticuerpo monoclonal CD34, en el que el contenido de CD34 es del 0 %; la Fig 2B es el mapa de citometría de flujo de anticuerpo monoclonal CD45, en el que el contenido de CD45 es del 0 %; la Fig 2C es el mapa de citometría de flujo de anticuerpo monoclonal CD29, en el que el contenido de CD29 es del 98,9 %; la Fig 2D es el mapa de citometría de flujo de anticuerpo monoclonal CD73, en el que el contenido de CD73 es del 93,5 %; la Fig. 2E es el mapa de citometría de flujo de anticuerpo monoclonal CD90, en el que el contenido de CD90 es del 96,3 %; la Fig. 2F es el mapa de citometría de flujo de anticuerpo monoclonal CD105, en el que el contenido de CD34 es del 73,3 %.

[0094] El resultado del análisis antigénico se muestra en la Tabla 3.

25

Tabla 3

Antígeno de superficie	CD34	CD45	CD29	CD73	CD90	Cod105
Resultado	0 %	0 %	98,9 %	93,5 %	96,3 %	73,3 %

[0095] Conclusión: El análisis del marcador de antígeno de superficie celular se llevó a cabo después de que las células madre derivadas de tejido adiposo se recuperasen después de criopreservarlas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención. El resultado mostraba que las células madre procesadas a partir de los métodos mencionados anteriormente tenían una mayor pureza, las cuales eran principalmente células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Por ejemplo, el 98,9 % de las células tienen el antígeno de superficie CD29 (que era un antígeno específico de células madre adiposas bien reconocido), pero no el antígeno CD34 (un antígeno de superficie típico de células madre hematopoyéticas), ninguna célula tiene (0 %) antígeno CD45 (que era un antígeno típico conocido situado sobre la superficie de leucocitos).

35

Ejemplo 9

Adipogénesis y ensayo de células madre derivadas de tejido adiposo

[0096] Se utilizó el medio de congelación de la presente invención (Ejemplo 3) para establecer el banco de células de las células madre derivadas de tejido adiposo humano. Las células madre se inocularon en placas de 6 pocillos con 2×10^5 células por pocillo después de la recuperación. Las células madre en medio de cultivo normal sirvieron como control negativo.

[0097] Métodos de cultivo e inducción: se añadieron una concentración final de 1 µmol/l de dexametasona, 10 µmol/l de insulina, 200 µmol/l de indometacina y 0,5 mmol/l de metilxantina de isobutilo al medio básico (DMEM + 10 % de suero fetal de ternero), tales como se ha preparado en el medio adipogénico. El medio de cultivo se cambió dos veces a la semana hasta que se realizó la tinción adipogénica. También se realizaron experimentos en paralelo para cada grupo (n = 3).

50 Métodos de tinción con Oil Red O:

[0098] Tinción: la solución nutritiva se eliminó suave y gradualmente, seguido de lavado suave con D-Hanks. Se añadió el 10 % de formalina neutra y se fijó a la citomembrana durante 30 min. Se añadió el 0,5 % de Oil Red O (1,5 ml en placas de 6 pocillos) para la tinción durante 10 min-1 h.

55

[0099] Blanqueamiento: 75 % de etanol/60 % de isopropanol usado para enjuagar la tinción residual, re-tinción con hematoxilina pálida durante 1 minuto seguido de un enjuague con PBS, montaje con gelatina de glicerol,

y se observa con el microscopio.

[0100] 5-10 vistas se seleccionaron al azar en cada grupo de muestras para su observación fotografiando para evaluar el efecto de diferenciación adipogénica del método de co-cultivo. El tejido adiposo es de color rojo brillante, el núcleo de la célula azul, y el mesénquima es incoloro.

[0101] El resultado muestra que las células madre derivadas de tejido adiposo cultivadas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención todavía tienen la capacidad de diferenciarse en células de grasa cuando se tratan con un inductor de la adipogénesis (Figura 3). Se puede ver en la Figura 3A que hay un gran número de pequeños grupos de gotitas de lípidos (rojo) en las células adipogénicas diferenciadas. La Figura 3B es el control negativo, que son las células madre sin el tratamiento con el inductor de diferenciación.

Ejemplo 10

Comparación del efecto de criopreservación de diferentes tipos de medio de congelación libre de suero (sustituto de suero)

[0102] Con el fin de evaluar el efecto del medio de congelación libre de suero de la presente invención, el inventor utilizó otro medio de congelación libre de suero (sustituto de suero) para la comparación: FetalClone III (SH30109.01) disponible en el mercado en HyClone Company.

[0103] Medio de congelación libre de suero de la presente invención: 10 % de medio libre de suero + 12 % de DMSO + 78 % de KSR (en volumen)

Medio de congelación libre de suero del grupo de control: 10 % de medio libre de suero + 12 % de DMSO + 78 % de FetalClone III (en volumen).

Se tomaron células criopreservadas de tercera generación durante un mes, y se cuenta el número de células viables de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5 después de la recuperación.

[0104] El resultado se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Grupos	Medio de congelación libre de suero de la presente invención	Medio de congelación libre de suero del grupo de control	Medio de congelación que contiene suero del grupo de control
1	95,5 %	90,5 %	91,5 %
2	93,0 %	91,0 %	92,9 %
3	94,5 %	89,2 %	90,0 %
4	95,0 %	89,5 %	91,5 %
5	95,5 %	88,0 %	91,8 %
Promedio	94,7 %	89,6 %	91,5 %

[0105] Los resultados del ensayo inesperadamente muestran que el efecto de recuperación de las células tratadas con el medio de congelación libre de suero de la presente invención que no contiene nada de suero es el mejor, superior al de los grupos de control tratados con otro medio de congelación libre de suero o medio de congelación que contiene suero.

[0106] Esto demostró que, aunque la mayoría de las sustituciones de suero no eran adecuadas como alternativas al suero en el medio de congelación, el medio de congelación libre de suero que contiene KSR de la presente invención tiene un mejor efecto de criopreservación que el medio de congelación que contiene suero. Así, el medio de congelación libre de suero de la presente invención es ideal para la criopreservación de células madre derivadas de tejido adiposo.

Ejemplo 11

Comparación del efecto de la criopreservación de células utilizando un medio de congelación libre de suero con una fórmula diferente

[0107] En este ejemplo se sometieron a ensayo medios de congelación libres de suero de la presente invención de cuatro fórmulas diferentes, en el que las fórmulas se muestran en la Tabla 5.

[0108] El banco de células se preparó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3. Después de 3

meses de criopreservación, las células madre derivadas de tejido adiposo del banco se recuperaron según el método descrito en el Ejemplo 4. La viabilidad celular se determinó por el método descrito en el Ejemplo 5.

Tabla 5

Grupos	Fórmula (en volumen)
1	7 % de medio libre de suero + 8 % de DMSO + 85 % de KSR
2	10 % de medio libre de suero + 12 % de DMSO + 78 % de KSR
3	15 % de medio libre de suero + 15 % de DMSO + 70 % de KSR
4	5 % de medio libre de suero + 15 % de DMSO + 80 % de KSR

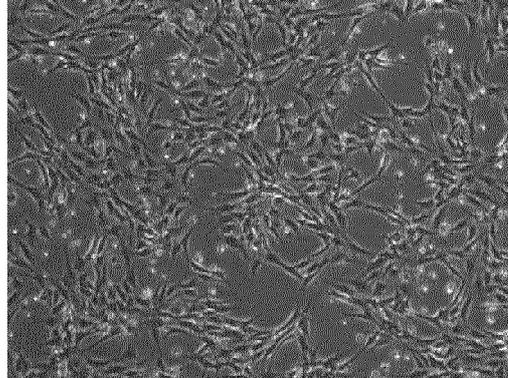
5

[0109] El resultado muestra que las células madre derivadas de tejido adiposo de bancos establecidos con las cuatro fórmulas diferentes de la presente invención tienen todas tasas de supervivencia altas (alrededor del 93-95 %) después de la recuperación.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de congelación libre de suero que comprende los siguientes ingredientes: medio de cultivo de libre de suero, dimetilsulfóxido (DMSO) y sustituto de suero Knockout™ Serum Replacement (KSR) y el medio de congelación no contiene suero; y
5 en base al volumen del medio de congelación libre de suero, el contenido del medio de cultivo libre de suero es a y a es del 5 %-15 % (v/v), el contenido de DMSO es b y b es del 8 %- 20 % (v/v), y el contenido de KSR es c y c es del 70 %-85 % (v/v), mientras que $a + b + c \leq 100 \%$.
- 10 2. El medio de congelación libre de suero de la reivindicación 1, en el que, a es del 8 %-12 % (v/v), b es del 10 %-14 % (v/v), y c es del 75 %-80 % (v/v), en volumen.
3. Un uso del medio de congelación libre de suero de la reivindicación 1 para el almacenamiento a largo
15 plazo de células madre derivadas de tejido adiposo y/o el establecimiento de una librería de células madre derivadas de tejido adiposo.
4. Una mezcla de células madre derivadas de tejido adiposo, en la que la mezcla comprende:
células madre derivadas de tejido adiposo, y
20 el medio de congelación libre de suero de la reivindicación 1.
5. Una librería de células madre derivadas de tejido adiposo, en la que la librería comprende la mezcla de células madre derivadas de tejido adiposo de la reivindicación 4.
- 25 6. La librería de células madre derivadas de tejido adiposo de la reivindicación 5, en la que la mezcla de células madre derivadas de tejido adiposo y el medio de congelación libre de suero se conserva en nitrógeno líquido después de que se enfría en un enfriamiento de gradiente programado.
7. La librería de células madre derivadas de tejido adiposo de la reivindicación 5, en la que las células
30 madre derivadas de tejido adiposo recuperadas de la librería tienen capacidad de inducción adipogénica.
8. La librería de células madre derivadas de tejido adiposo de la reivindicación 5, en la que la tasa de supervivencia de las células madre derivadas de tejido adiposo recuperadas de la librería es del $\geq 90 \%$.
- 35 9. Un uso de la librería de células madre derivadas de tejido adiposo de la reivindicación 5 para la preservación a largo plazo de las células madre derivadas de tejido adiposo.
10. Un método para establecer una librería de células madre derivadas de tejido adiposo, que comprende:
40 i) el lavado de un material de tejido adiposo que contiene células madre derivadas de tejido adiposo, obteniendo así una mezcla tejido de la que se eliminan las células sanguíneas;
ii) la digestión de la mezcla de tejido obtenido en la etapa (i), obteniendo así una mezcla de tejido adiposo digerido;
iii) la filtración de la mezcla de tejido adiposo digerido obtenido en la etapa anterior para eliminar los restos de tejido no digerido, obteniendo de esta manera un filtrado que comprende células madre derivadas de tejido adiposo;
45 iv) la centrifugación del filtrado obtenido en la etapa anterior y el descarte de la grasa en la capa superior, obteniendo de este modo un precipitado que contiene las células madre derivadas de tejido adiposo;
v) la inoculación y el paso de las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas en la etapa (iv), obteniendo de este modo células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo;
vi) la digestión de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, obteniendo de este modo células
50 madre derivadas de tejido adiposo dispersas; y
vii) la mezcla de las células madre derivadas de tejido adiposo obtenidas en la etapa (vi) con el medio de congelación libre de suero de la reivindicación 1 y la preservación de la mezcla a baja temperatura, obteniendo de esta manera la librería de células madre derivadas de tejido adiposo.

A



B

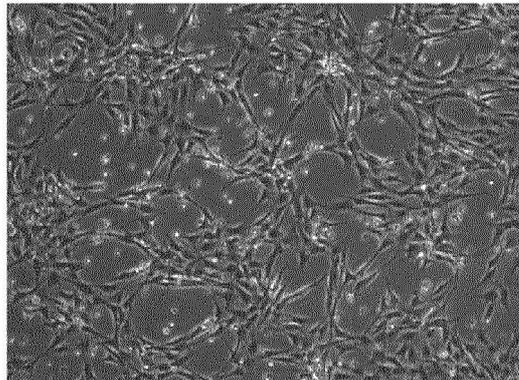


Fig 1

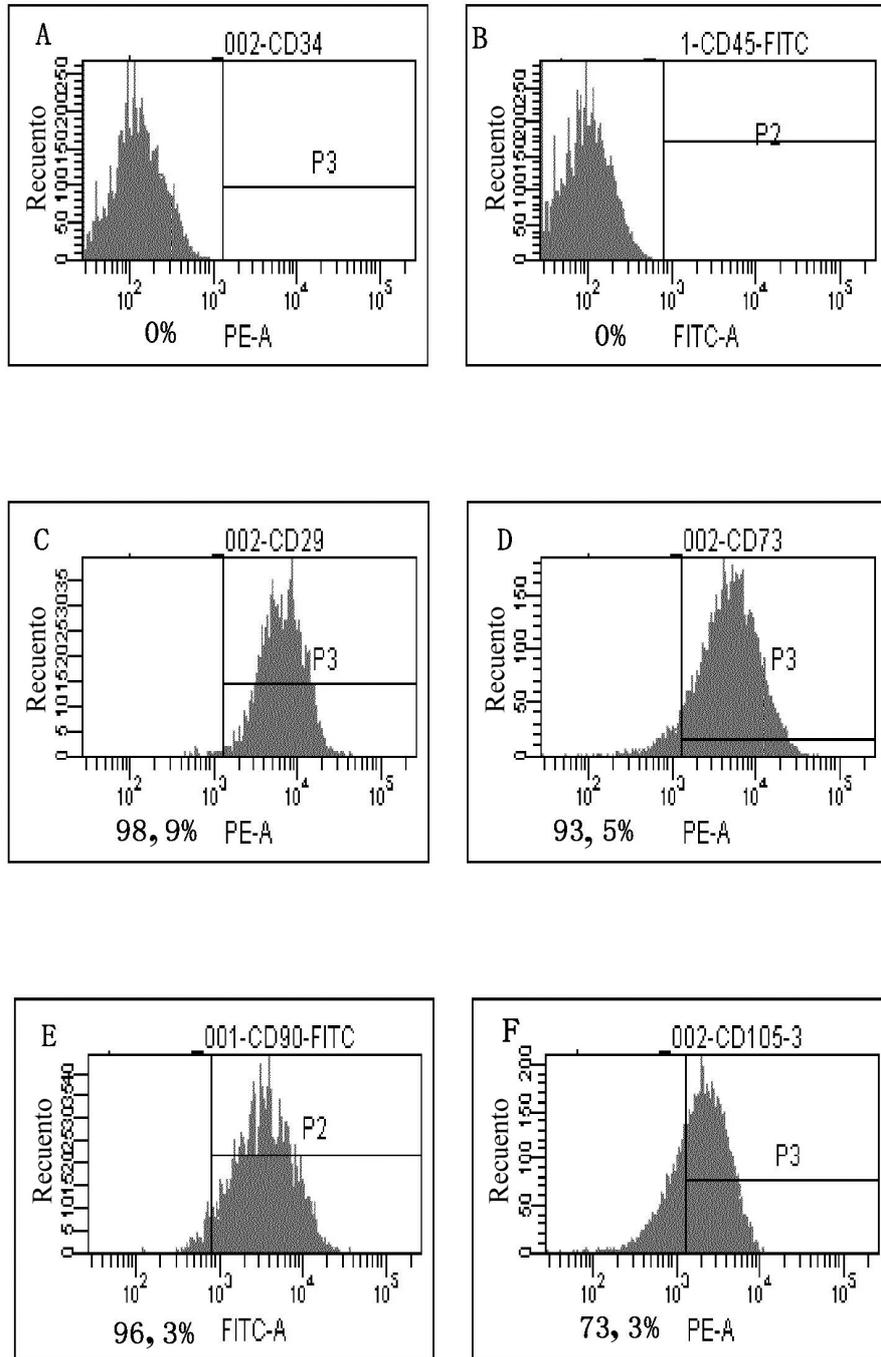
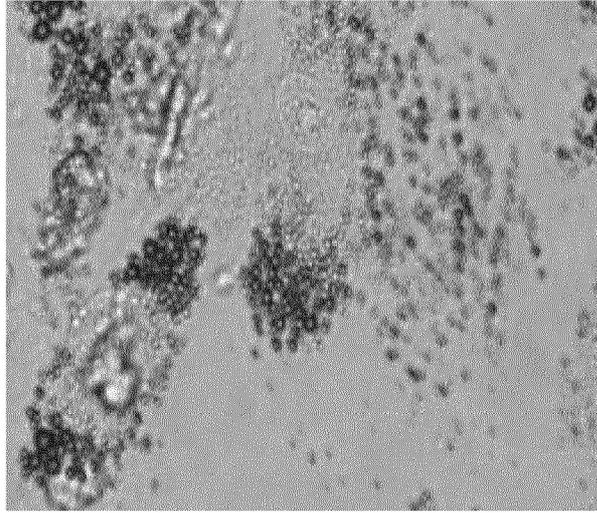


Fig 2

A



B

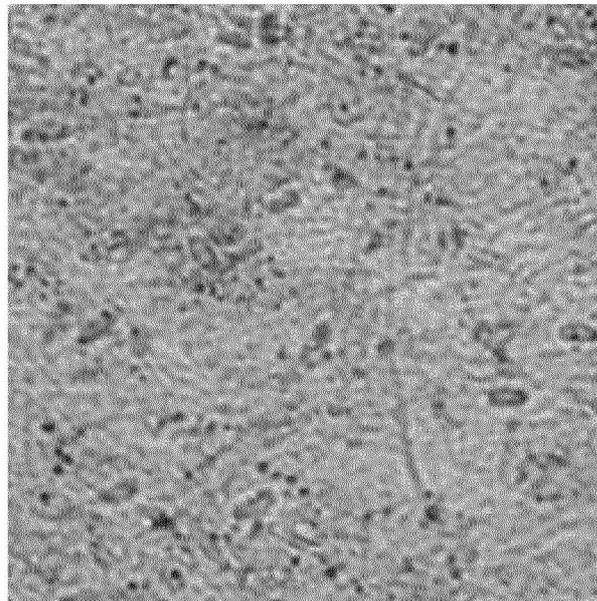


Fig 3