

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 166**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2013 PCT/EP2013/050795**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107797**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2013 E 13700326 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2804475**

54 Título: **Crioconservación de células, tejidos y órganos**

30 Prioridad:

17.01.2012 EP 12305065

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

10.07.2017

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**PELLE MEDDAHI, ANNE;
ABED, AÏCHA;
LETOURNEUR, DIDIER y
BAUDOT, ANNE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 623 166 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

Crioconservación de células, tejidos y órganos

5 **Sector de la técnica**

La presente divulgación proporciona un método de crioconservación de diversas células, órganos y tejidos.

Estado de la técnica

10 La crioconservación y la vitrificación son procesos mediante los cuales la muestra biológica se conserva a temperaturas bajo cero. Se sabe que las reacciones biológicas se ralentizan al reducir la temperatura. Sin embargo, dichas técnicas deben realizarse con cuidado cuando se trata de células vivas. De hecho, al ser el agua el componente principal de las células vivas y su entorno de crecimiento, se debe controlar la formación de cristal de hielo durante la congelación de dichas células vivas con el fin de preservar su integridad.

15 Se ha informado de que la congelación puede causar daños a la muestra biológica, en especial, a las células vivas. De hecho, durante la congelación, se forman cristales de hielo, que tienen un grave efecto perjudicial sobre las células. Los cristales intracelulares pueden dañar las paredes y la estructura de las células, mientras que la precipitación extracelular del agua en forma de cristales de hielo aumenta las concentraciones de sal a niveles que pueden dañar las células.

20 Por lo tanto, los compuestos que funcionan como estabilizadores químicos o físicos, en concreto, los agentes crioprotectores, se han usado ampliamente para proteger las células contra el estrés al que se enfrentan durante la congelación. La difusión de los agentes crioprotectores clásicos actuales tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) en una célula producirá un reemplazo parcial del agua intracelular y ayudará a prevenir la deshidratación de la formación de hielo durante la congelación.

30 Sin embargo, se sabe que el DMSO induce la diferenciación de algunas líneas celulares tales como HT-60, ATCC CCL-240 (Collins *et al.*, 1978). Además, se ha informado que el DMSO expone a las células, tales como las células reproductoras y los embriones, a una transformación genética, lo que es inaceptable para la crioconservación.

35 Lo que es más importante, la oxidación con DMSO, que es muy rápida, induce la formación de compuestos tóxicos. Finalmente, se ha informado que el DMSO es responsable de la desestabilización de las membranas de fosfolípidos (Anchordoguy *et al.*, 2003).

40 Por lo tanto, en la actualidad, el DMSO no está adaptado a su uso en la crioconservación. De hecho, la toxicidad de los agentes crioprotectores es un factor limitante clave en la criobiología. El uso de estos agentes puede manifestarse así en forma de daños criogénicos.

45 Existe, por tanto, la necesidad de una técnica de crioconservación que sea útil para diversas muestras biológicas, incluyendo células tales como las células reproductoras y los embriones, y que no conduzca a daños relacionados con la toxicidad de los crioprotectores, daños criogénicos de la muestra biológica congelada ni/o la transformación genética de dicha muestra.

Objeto de la invención

50 Los inventores han demostrado que el uso de un hidrogel muy específico permite la crioconservación de diversas células y tejidos, sin o con una reducción considerable de los crioprotectores clásicos tales como el DMSO.

55 Por lo tanto, el método de la invención evita el uso de crioprotectores clásicos, limitando así los riesgos de toxicidad aplicados a la muestra biológica que se va a crioproteger. Al evitar o limitar el uso de los crioprotectores y, por tanto, al limitar el riesgo de toxicidad o de transformación genética de las células congeladas, la presente invención proporciona una estrategia prometedora de crioconservación y vitrificación.

La invención palia así los inconvenientes técnicos de las técnicas de crioconservación comúnmente usadas.

Descripción detallada de la invención

60 **Definiciones**

65 Como se usan en el presente documento, los términos "**crioprotección**", "**criopreservación**" o "**crioconservación**" se refieren a un proceso que implica una etapa de congelación mediante la cual se preserva una muestra biológica de la degradación. Este término engloba técnicas convencionales de crioconservación, así como técnicas de vitrificación.

Como se usa en el presente documento, "**vitrificación**" se refiere a una estrategia de criopreservación en la que las células se convierten en un sólido amorfo vítreo que está exento de cualquier estructura cristalina. En general, dicho proceso se consigue mediante una combinación de alta concentración de crioprotector y una velocidad de enfriamiento extremadamente alta.

5 Como se usan en el presente documento, la expresión "**agente crioprotector**" o el término "**crioprotector**" se refieren a un agente usado para proteger la muestra biológica de los daños inducidos por la congelación. Más concretamente, dicho agente es útil para preservar la muestra biológica de los daños relacionados con la formación de hielo dentro de las células sometidas a una etapa de congelación. Los ejemplos no limitantes de crioprotectores clásicos actuales son dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol, polietilenglicol (PEG), glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), propanodiol, sacarosa, trehalosa. Otros ejemplos de crioprotectores son glucosa, lactosa, fructosa, rafinosa, propilenglicol, 1,2-2,3-butanodiol, acetamida, dextrano, alcohol polivinílico polimérico, polivinilpirrolidona, hidroxietilalmidón, propilenglicol, 1,2-propanodiol, butanodiol, formamida, ficoll, manitol y gluconato, carboximetilcelulosa y dextrano.

15 Como se usa en el presente documento, el término "**polisacárido**" se refiere a una molécula que comprende dos o más unidades de monosacárido.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "**solución alcalina**" se refiere a una solución acuosa que tiene un pH estrictamente superior a 7.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**solución acuosa**" se refiere a una solución en la que el disolvente principal es el agua.

25 Como se usa en el presente documento, el término "**reticulación**" se refiere a la unión de una cadena de polisacárido a otra con enlaces covalentes.

30 Como se usan en el presente documento, los términos "**hidrogel**" o "**criobiogel**" se refieren a las composiciones muy específicas que se pueden obtener mediante el método desarrollado por los inventores. Dicho hidrogel se puede obtener mediante reticulación química de un polisacárido tal como pululano, con un agente reticulante tal como trimetafosfato trisódico (STMP) en condiciones alcalinas a una temperatura de 50 °C. Dichas expresiones se pueden referir indistintamente al hidrogel que se puede obtener directamente reticulando un polisacárido con un agente reticulante, y al hidrogel que se puede obtener tras el hinchamiento de las partículas de hidrogel secadas.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "**partículas de hidrogel**" se refiere a partículas que tienen formas diferentes, como esferas, cilindros o cubos. Dichas partículas de hidrogel son, por lo tanto, partículas del hidrogel obtenido tras las etapas de molienda. A menos que se especifique lo contrario, las partículas de expresión "partículas de hidrogel" no están secadas.

40 Como se usan en el presente documento, las expresiones "**partícula de hidrogel secada**", "**partícula secada**" y "**criobiogel secado**" se refieren a una partícula de hidrogel secada que tiene un intervalo de tamaños inferior a 5 mm, preferentemente inferior a 1 mm, preferentemente inferior a 50 µm, preferentemente inferior a 25 µm. Dichas partículas de hidrogel secadas se obtienen mediante el secado de las partículas de hidrogel. Dichas partículas de hidrogel secadas se hinchan en una solución de hinchamiento apropiada con el fin de obtenerse un hidrogel.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "**hidrogel hinchado**" se refiere a un hidrogel resultante del hinchamiento de partículas de hidrogel secadas. El hidrogel obtenido directamente reticulando un polisacárido con un agente reticulante, y el hidrogel que se puede obtener tras hinchar las partículas de hidrogel secadas comparten las mismas características técnicas y funcionales.

50 Como se usan en el presente documento, las expresiones "**perla de hidrogel secada**" y "**esfera de hidrogel secada**" se usan indistintamente, y se refieren a una partícula de hidrogel que tiene una forma esencialmente esférica u ovoide.

55 La invención se refiere a un método de crioprotección de una muestra biológica que comprende la etapa de congelar dicha muestra biológica en presencia de un hidrogel, en el que dicho hidrogel se puede obtener mediante:

60 a) la reticulación química de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pululano, dextrano, sulfato de dextrano, escleroglucano, carboximetildextrano, carboximetilpululano, agar, alginato, fucoidano, quitosano, ácido hialurónico, proteoglicanos de sulfato de heparán, heparina, miméticos de heparina o de sulfato de heparán y mezclas de los mismos con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en trimetafosfato trisódico (STMP), oxiclورو de fósforo (POCl₃), epíclorhidrina, formaldehídos, carbodiimidas hidrosolubles y glutraldehído en condiciones alcalinas a una temperatura comprendida entre 30 y 70 °C, preferentemente entre 40 y 50 °C, lo más preferentemente de 50 °C.

65 Preferentemente, dicho agente reticulante es trimetafosfato trisódico (STMP). Es muy ventajoso usar partículas del

hidrogel mencionado anteriormente, en especial, partículas de hidrogel secadas que se puedan hinchar posteriormente para restituir un hidrogel. Por lo tanto, las partículas proporcionan un uso más fácil debido al tamaño de las partículas que pueden adaptarse al tipo y al tamaño de las células, del/de los tejido/s o del/de los órgano/s que se van a criopreservar. Por lo tanto, en el presente documento, también se desvela un método de crioprotección de una muestra biológica, que comprende la etapa de congelar dicha muestra biológica en presencia de un hidrogel, en el que dicho hidrogel se puede obtener mediante:

- a) la reticulación química de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pululano, dextrano, sulfato de dextrano, escleroglucano, carboximetildextrano, carboximetilpululano, agar, alginato, fucoidano, quitosano, ácido hialurónico, proteoglicanos de sulfato de heparán, heparina, miméticos de heparina o de sulfato de heparán y mezclas de los mismos con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en trimetafosfato trisódico (STMP), oxocloruro de fósforo (POCl₃), epíclorhidrina, formaldehídos, carbodiimidas hidrosolubles y glurataldehído en condiciones alcalinas a una temperatura comprendida entre 30 y 70 °C;
- b) la molienda del hidrogel obtenido en a) para obtener partículas de hidrogel;
- c) opcionalmente, el lavado de dichas partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b);
- d) opcionalmente, el tamizado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o en la etapa c);
- e) opcionalmente, el lavado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o en la etapa d), preferentemente con una solución salina, preferentemente una solución salina tamponada con fosfato bien enjuagada en agua destilada;
- f) la deshidratación de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o en etapa e), preferentemente en baños de etanol/agua;
- g) el secado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa f), preferentemente a 50 °C con el fin de obtener partículas de hidrogel secadas;
- h) opcionalmente, el tamizado de las partículas secadas obtenidas en la etapa g); y
- i) el hinchamiento de la partícula de hidrogel secada obtenida en la etapa h) en una solución de hinchamiento para obtener un hidrogel.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método de crioprotección de una muestra biológica que comprende la etapa de congelar dicha muestra biológica en presencia de un hidrogel, en el que dicho hidrogel se puede obtener mediante:

- a) la reticulación química de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pululano, dextrano, sulfato de dextrano, escleroglucano, carboximetildextrano, carboximetilpululano, agar, alginato, fucoidano, quitosano, ácido hialurónico, proteoglicanos de sulfato de heparán, heparina, miméticos de heparina o de sulfato de heparán y mezclas de los mismos con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en trimetafosfato trisódico (STMP), oxocloruro de fósforo (POCl₃), epíclorhidrina, formaldehídos, carbodiimidas hidrosolubles y glurataldehído en condiciones alcalinas a una temperatura comprendida entre 30 y 70 °C;
- b) la molienda del hidrogel obtenido en a) para obtener partículas de hidrogel;
- c) el lavado de dichas partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b);
- d) el tamizado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o la etapa c);
- e) el lavado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o la etapa d);
- f) la deshidratación de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o en etapa e);
- g) el secado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa f);
- h) el tamizado de las partículas secadas obtenidas en la etapa g); e
- i) el hinchamiento de la partícula de hidrogel secada obtenida en la etapa h) en una solución de hinchamiento para obtener un hidrogel.

Como se usan en el presente documento, la expresión "**partículas de hidrogel**" o el término "**partículas**" se refieren al producto obtenido moliendo el hidrogel de acuerdo con la invención. Por lo general, dicha etapa de molienda se realiza usando un molino de cuchillas Grindoxmix GM 200 con una velocidad variable de 2.000 a 10.000 rotaciones por minuto.

Preferentemente, las partículas de hidrogel secadas obtenidas en la etapa g) son perlas de hidrogel secadas.

Dicha etapa de congelación se realiza esencialmente exenta de o sin dimetilsulfóxido (DMSO). Preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza sin dimetilsulfóxido (DMSO).

Como se usa en el presente documento, "**esencialmente exento/a**" significa presente a una concentración que es inferior al aproximadamente 1 %, preferentemente inferior al aproximadamente 0,5 %, más preferentemente inferior al aproximadamente 0,1 %, lo más preferentemente completamente ausente. Por lo general, "esencialmente exento de crioprotector" puede corresponder a una cantidad tres veces inferior a la cantidad de crioprotector usada en los métodos convencionales.

En una realización específica, dicha etapa de congelación se realiza esencialmente exenta de 1,2-propanodiol, preferentemente con una cantidad de 1,2-propanodiol tres veces inferior a la cantidad usada en los métodos convencionales. Como alternativa, dicha etapa de congelación se realiza sin 1,2-propanodiol.

Como se usa en el presente documento, "sin" un crioprotector dado se refiere a la ausencia completa (0 %) de dicho crioprotector mientras se lleva a cabo la invención.

5 Preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza sin un crioprotector seleccionado entre dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol, propanodiol y polietilenglicol (PEG).

Preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza sin un crioprotector seleccionado entre dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol, polietilenglicol (PEG), glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MDP), sacarosa y trehalosa.

10 Más preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza sin un crioprotector seleccionado entre dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol, polietilenglicol (PEG), glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MDP), propanodiol, sacarosa y trehalosa.

15 Más preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza sin un crioprotector seleccionado entre dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol, polietilenglicol (PEG), glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), propanodiol, sacarosa, trehalosa, glucosa, lactosa, fructosa, rafinosa, propilenglicol, 1,2-2,3-butanodiol, acetamida, dextrano, alcohol polivinílico polimérico, polivinilpirrolidona, hidroxietilalmidón, propilenglicol, 1,2-propanodiol, butanodiol, formamida, ficoll, manitol, gluconato, carboximetilcelulosa y dextrano.

20 Más preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza esencialmente exenta de crioprotector.

Por lo general, la etapa de congelación se realiza de acuerdo con técnicas convencionales.

25 Preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza a una temperatura por debajo de 0 °C en condiciones de presión convencionales.

30 Preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza a una temperatura comprendida por debajo de -10 °C, -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C preferentemente por debajo de -70 °C. Más preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza a una temperatura comprendida entre -70 °C y -156 °C. Más preferentemente, dicha etapa de congelación se realiza a una temperatura comprendida entre -196 °C.

35 Preferentemente, dicha etapa es una etapa de refrigeración mecánica, a una temperatura comprendida por debajo de -70 °C, preferentemente a una velocidad de enfriamiento controlada apropiada a una temperatura comprendida entre -70 °C y -156 °C. Como alternativa, dicha etapa de congelación se produce en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C. En otra realización, dicha etapa de congelación se produce usando tecnología de vitrificación. Los detalles de dicha tecnología caen dentro del conocimiento general del experto en la materia.

40 Preferentemente, la etapa de congelación de la muestra biológica se produce en presencia de una cantidad de hidrogel suficiente para criopreservar dicho tejido biológico. El experto en la materia se encargaría de proporcionar una cantidad suficiente de dicho hidrogel para llevar a cabo de manera eficaz el proceso de la invención. El experto en la materia también se encargaría de proporcionar una cantidad de dicho hidrogel, que no provocara daños a la muestra biológica.

45 El experto en la materia adaptaría fácilmente la cantidad de hidrogel a la solución de crioconservación correcta y para la crioconservación de una cantidad específica y definida de muestra biológica. Por lo general, cuando el método de la invención implica el uso de partículas de hidrogel secadas, dicha cantidad depende del tamaño de las partículas de hidrogel, es decir, de la granulometría de dichas partículas de hidrogel.

50 Por lo general, para la crioconservación de una solución que contiene células 10^4 a 10^6 , se pueden usar de 20 a 60 mg, preferentemente de 15 a 25 mg de hidrogel o de partículas de hidrogel.

55 Por lo general, la etapa de lavado e) se puede realizar con una solución salina, preferentemente solución salina de tampón fosfato (PBS) a un pH de 7,4. Se puede proceder a varios lavados con PBS. Por ejemplo, se puede lavar el hidrogel:

- 3 veces con PBS a una concentración de 1,5 M;
- 2 veces con PBS a una concentración de 0,15 M;
- 3 veces con PBS a una concentración de 0,015 M.

60 Cada vez, el hidrogel se lava bien durante aproximadamente 20 minutos. El hidrogel se enjuaga a fondo en agua destilada durante un tiempo suficiente para obtener un hidrogel con un pH comprendido entre 6 y 8, preferentemente de aproximadamente 7, más preferentemente un pH de 7,4. Como alternativa, el hidrogel se puede enjuagar con un flujo continuo de agua destilada, seguida de solución salina tamponada (PBS) a concentraciones gradualmente decrecientes, y deshidratar luego usando baños de etanol de concentraciones variables.

65 Por lo general, la etapa de deshidratación f) se realiza en baños de etanol/agua. El experto en la materia conoce la

naturaleza y el número apropiado de dichos baños. Para esta etapa de deshidratación, puede haber varios baños de etanol/agua. Por ejemplo, se pueden usar:

- 5
- 2 baños con etanol/PBS 0,015 M a una concentración de etanol del 70 %;
 - 2 baños con etanol/PBS 0,015 M a una concentración de etanol del 50 %;
 - 1 baño con etanol absoluto.

10 Por lo general, la etapa de secado g) se puede realizar a 50 °C. Por lo general, dicha etapa se realiza por medio de un vacío. El método de la invención puede comprender una etapa adicional g') posterior a la etapa g) y previa a la etapa h) de molienda de las partículas de hidrogel para obtener un polvo.

15 La etapa de tamizado h) conduce a la formación de partículas calibradas con un diámetro deseado. Esta etapa proporciona una amplia selección de distribución del tamaño de partícula. Por lo general, el diámetro de dichas partículas está comprendido entre 5 µm y 2 mm, preferentemente entre 20 µm y 1,5 mm. Por lo general, dicha etapa de tamizado se puede realizar con ayuda de un agitador de tamiz vibratorio. Se pueden ajustar dos parámetros en este instrumento: la aceleración del fondo del tamiz, que se puede ajustar de 1,0 a 4 m/s², y la amplitud de oscilación variable, que va de 0,20 a 3 mm.

20 La etapa de hinchamiento i) se puede realizar con diferente solución de hinchamiento. Dicha solución de hinchamiento puede ser cualquier medio adecuado conocido por el experto en la materia. Sin embargo, los inventores han demostrado que algunos medios muy específicos proporcionan mejores resultados cuando se usan para hinchar las partículas de hidrogel secadas.

25 Preferentemente, dicha solución de hinchamiento es una solución salina.

Como alternativa, dicha solución de hinchamiento puede ser una solución comercial tal como SCOT30, SCOT15, Perfadex, Stem, soluciones alfa, Viapsan, solución celsior, solución UW, solución VS4, solución Bioxell, medio Eagle, solución de Hanks o medio de Dubelcco modificado por Eagle.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "**solución salina**" o "**solución fisiológica**" se refiere a una solución de cloruro de sodio en agua. Por lo general, dicha solución comprende 0,9 % de cloruro de sodio. Por lo general, dicha solución es estéril y es isotónica, es decir, tiene la misma presión osmótica que la sangre. Por lo tanto, dicha solución salina es fisiológica.

35 Preferentemente, dicha solución de hinchamiento se selecciona del grupo que consiste en:

- i) una solución SGLy, solución que comprende solución salina y glicerol, preferentemente a una concentración comprendida entre el 1 y 10 % de glicerol, lo más preferentemente del aproximadamente 5 %;
- 40 ii) una solución SGLU, solución que comprende solución salina y glucosa, preferentemente a una concentración comprendida entre el 5 y 20 % de glucosa, lo más preferentemente del aproximadamente 10 %; e
- 45 iii) una solución SPEG15, solución que está compuesta de solución salina y polietilenglicol, preferentemente a una concentración de 15 g de polietilenglicol por litro de solución salina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "SGLy" se refiere a una solución de hinchamiento que comprende solución salina y glicerol, preferentemente a una concentración comprendida entre el 1 y 10 % de glicerol, lo más preferentemente del aproximadamente 5 %.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "SGLU" se refiere a una solución de hinchamiento que comprende solución salina y glucosa, preferentemente a una concentración comprendida entre el 5 y 20 % de glucosa, lo más preferentemente del aproximadamente 10 %.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "SPEG15" se refiere a una solución de hinchamiento que comprende solución salina y polietilenglicol, preferentemente a una concentración de 15 g de polietilenglicol por litro de solución salina.

60 La cantidad de la solución de hinchamiento depende de la cantidad de partículas de hidrogel y de la naturaleza de la muestra biológica que se vaya a criopreservar. Así pues, el experto en la materia determinará fácilmente la cantidad específica de solución de hinchamiento en la que se hincharán las partículas de hidrogel secadas.

El método de la invención proporciona mayores tasas de supervivencia tras la congelación de la muestra biológica.

65 En una realización, dicha muestra biológica son células tales como células de mamífero, células vegetales, células sanguíneas, células reproductoras tales como ovocitos o células espermáticas, células embrionarias, células madre,

células del cordón umbilical, células de la corteza ovárica, progenitores hematopoyéticos o islotes pancreáticos. Dicha muestra biológica también puede ser un embrión tal como un embrión animal, humano o no humano.

5 Los inventores han demostrado que, gracias al hidrogel tan específico de la invención, la tasa de supervivencia de los ovocitos criopreservados es mucho mayor que la supervivencia obtenida con el método convencional que implica el uso de 1,2-propanodiol (PROH), usando una cantidad tres veces inferior de PROH.

10 Con el fin de evitar cualquier riesgo de choque osmótico cuando se criopreservan células o embriones, se prefiere inyectar las células dentro del hidrogel. La inyección de dichas células dentro de dicho hidrogel puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier técnica convencional. Por lo general, el hidrogel se coloca dentro de un criotubo, o en una pajita de alta seguridad en una cantidad suficiente para criopreservar las células diana. La elección del dispositivo dependerá de la naturaleza de las células que se vayan a criopreservar. A continuación, las células se inyectan dentro del hidrogel. Entonces, se puede producir la etapa de congelación.

15 En otra realización, dicha muestra biológica es un órgano tal como un corazón, un pulmón, piel, un vaso, una córnea, un ovario, un hígado, un riñón, un páncreas, un intestino, un ojo o un bazo. En esta realización particular, se prefiere colocar primero el órgano dentro de solo una parte del hidrogel antes de proporcionar la cantidad restante del hidrogel. Por lo general, antes de implementar el proceso, el experto en la materia determina la cantidad suficiente de hidrogel para criopreservar el órgano diana. A continuación, se coloca del 10 al 60 %, preferentemente del 20 al 40 % de este hidrogel dentro de un criotubo adaptado, pajita o bolsa. Una vez que se coloca el órgano dentro del hidrogel, se coloca del 40 al 90 %, preferentemente del 60 al 80 % del hidrogel restante dentro de dicho criotubo, pajita o bolsa. Entonces, se puede producir la etapa de congelación.

20 En otra realización más, dicha muestra biológica son ácidos nucleicos tales como ADN o ARN. Por lo general, dichos ácidos nucleicos se obtienen mediante un procedimiento rutinario para extracción de ADN o ARN.

25 Por lo general, el polvo de hidrogel seco útil para llevar a cabo la presente invención tiene una relación de hinchamiento comprendida entre el 1 y el 3.000 %. La relación de hinchamiento de las partículas de hidrogel secadas se determina en solución salina. Por lo general, se registra el peso del criobiogel seco (W_d) antes de la inmersión en una solución salina, preferentemente solución salina de tampón fosfato (PBS). Tras 1 h de incubación, se elimina el exceso de agua y se pesa el criobiogel hinchado (W_s). La relación de hinchamiento se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$SR = [(W_s - W_d) / W_d] \times 100.$$

35 El hidrogel seco de la invención proporciona propiedades de hinchamiento superiores a las de los hidrogeles disponibles en el mercado tales como Agar® o Agargel®. El hidrogel seco útil para llevar a cabo la presente invención muestra resultados inesperados en comparación con cualquier otro hidrogel comercial. Dichos resultados están justificados por la naturaleza muy específica del hidrogel de la invención. Por lo tanto, claramente parece que el método desarrollado por los inventores proporciona características muy específicas a dicho hidrogel.

40 Cuando se desea, la muestra biológica se descongela. Por lo general, la etapa de descongelación se realiza colocando la muestra biológica congelada o vitrificada en una solución de descongelación.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de descongelación" se refiere a una solución que permite que la muestra biológica se descongele mientras se preserva su viabilidad. Dicho medio puede ser cualquier medio conocido en la técnica que sea apropiado como medio base para la muestra biológica en particular.

50 La invención se refiere a un método de congelación de células reproductoras y/o embriones de animales. Cuando los tratamientos de fertilización *in vitro* se realizan con menos embriones con el fin de evitar embarazos múltiples, existe la necesidad de un método eficaz para la criopreservación de los ovocitos, espermatozoides y embriones. Por lo tanto, la presente invención es muy útil para la criopreservación de células reproductoras y embriones de animales (humanos y no humanos).

55 Por lo general, los embriones se pueden someter a criopreservación en diversas fases del desarrollo, preferentemente fases tempranas tales como la fase de mórula y de blástula.

La presente invención se refiere además al uso de un hidrogel como crioprotector, en el que dicho hidrogel se puede obtener mediante:

60 a) la reticulación química de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pululano, dextrano, sulfato de dextrano, escleroglucano, carboximetildextrano, carboximetilpululano, agar, alginato, fucoidano, quitosano, ácido hialurónico, proteoglicanos de sulfato de heparán, heparina, miméticos de heparina o de sulfato de heparán y mezclas de los mismos con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en trimetafosfato trisódico (STMP), oxiclóruo de fósforo ($POCl_3$), epíclorhidrina, formaldehídos, carbodiimidas

hidrosolubles y glurataldehído en condiciones alcalinas a una temperatura comprendida entre 30 y 70 °C.

La presente invención se refiere además al uso de un hidrogel como crioprotector, en el que dicho hidrogel se puede obtener mediante:

- 5 a) la reticulación química de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pululano, dextrano, sulfato de dextrano, escleroglucano, carboximetildextrano, carboximetilpululano, agar, alginato, fucoidano, quitosano, ácido hialurónico, proteoglicanos de sulfato de heparán, heparina, miméticos de heparina o de sulfato de heparán y mezclas de los mismos con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste
- 10 en trimetafosfato trisódico (STMP), oxiclóruo de fósforo (POCl_3), epíclorhidrina, formaldehídos, carbodiimidas hidrosolubles y glurataldehído en condiciones alcalinas a una temperatura comprendida entre 30 y 70 °C;
- b) la molienda del hidrogel obtenido en a) para obtener partículas de hidrogel;
- c) opcionalmente, el lavado de dichas partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b);
- 15 d) opcionalmente, el tamizado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o la etapa c);
- e) opcionalmente, el lavado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o en la etapa d), preferentemente con una solución salina, preferentemente una solución salina tamponada con fosfato bien enjuagada en agua destilada;
- f) la deshidratación de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o en etapa e), preferentemente en baños de etanol/agua;
- 20 g) el secado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa f), preferentemente a 50 °C con el fin de obtener partículas de hidrogel secadas;
- h) opcionalmente, el tamizado de las partículas secadas obtenidas en la etapa g); y
- i) el hinchamiento de la partícula de hidrogel secada obtenida en la etapa h) en una solución de hinchamiento para obtener un hidrogel.

25

Todas las características técnicas mencionadas anteriormente son aplicables.

A continuación, se ilustrará la invención por medio de los siguientes ejemplos así como de las figuras.

30 Descripción de las figuras

Figura 1: Vistas macroscópicas del criobiogel de diverso tamaño desarrollado por los inventores.

35 Figura 2.

35

a) Propiedades térmicas del hidrogel a base de pululano. Los espectros revelan una variación de T_g (145 °C para el hidrogel de pululano y 152 °C para el hidrogel polimerizado), lo que permite la caracterización del hidrogel producido.

40

b) Velocidad de hinchamiento de las partículas de hidrogel secadas útiles en el contexto de la invención. La velocidad de hinchamiento de los geles de hidrogel secado es útil en el contexto de la invención. A temperatura ambiente durante una hora, se dejaron hinchar 10 mg de hidrogel en una solución de PBS, DMEM, DMEM, FCS al 10 %. Se eliminó el exceso de líquido y se pesó el hidrogel.

45

Figura 3: Temperatura de cristalización y % de solución cristalizada en hielo para el criobiogel y DMSO. La Figura muestra la reducción de la formación de hielo cristalino cuando se usaron geles.

50

Figura 4: Viabilidad de células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) en diversos medios. Las células se congelaron en presencia de geles y sin geles. Se comparó el resultado con la referencia - una mezcla de DMEM, SVF al 10 %, DMSO al 10 %. La Figura muestra que el uso del hidrogel de acuerdo con la invención proporciona un mayor porcentaje de viabilidad celular en comparación con la referencia.

55

Figura 5: Borde de crecimiento de las células tras la descongelación. Las células se congelaron con y sin criobiogel y sin DMSO o FCS ($\times 10^3/\text{cm}^2$) en diversos medios: la referencia, SGly y SGly. El crecimiento celular fue idéntico al crecimiento de la referencia en presencia de hidrogel, a pesar de la ausencia de DMSO.

60

Figura 6: Viabilidad de células HUVEC en diversos medios y comparación con el patrón de referencia para la congelación (+ DMSO + SVF). La viabilidad celular fue idéntica a la de la referencia.

65

Figura 7: Crioconservación de la aorta en diferentes medios de la siguiente manera: DMSO al 10 %; y criobiogel desarrollado por los inventores. Los resultados se compararon con la aorta recién preparada. Los mismos resultados se obtuvieron con el criobiogel en ausencia de DMSO.

Figura 8: Comparación visual del hidrogel desarrollado por los inventores y diversos hidrogeles disponibles en el mercado. Durante una hora a temperatura ambiente, se dejaron hinchar 10 mg de cada hidrogel se en suero fisiológico.

Figura 9: Comparación visual de la viscosidad del hidrogel desarrollado por los inventores y Angargel®. Tras el hinchamiento, el hidrogel permaneció unido al fondo del tubo al darle la vuelta, lo que no fue el caso de los geles comerciales vendidos, tales como Agargel, por ejemplo, que también se usa para estas aplicaciones.

5 **Figura 10:** Observación mediante tinción con inmunofluorescencia de las formaciones de tubo en células HUVEC criopreservadas con Criobiogel o con la principal técnica convencional (DMSO al 10 %, FSO al 10 %).

10 **Figura 11:** Evaluación de la estructura de los vasos aórticos de rata y la capa de células endoteliales tras un mes de criopreservación en nitrógeno líquido con Criobiogel, y en comparación con el principal método convencional (DMSO al 10 %, FCS al 10 %).

Figura 12: Evaluación de las propiedades mecánicas (módulo de Young) de la aorta criopreservada. Se usaron tres soluciones de hinchamiento:

- 15 - una solución experimental (SGly, DMSO al 0 %); y
- dos soluciones comerciales clínicas (SCOT 15® y SCOT 30®, DMSO al 0 %, MacoPharma, Francia).

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Conservación de células y tejidos

Se obtuvo un banco de partículas de hidrogel a base de polisacáridos (Criobiogel) mediante reticulación química de pululano (PM de 200.000, Hayashibara, Okayama, Japón) con agente reticulante de trimetafosfato trisódico (STMP, 10 % (p/p, Sigma)) en condiciones alcalinas a 50 °C.

25 Se tamizó el hidrogel resultante en un colador (5 mm de diámetro), se lavó con una solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) enjuagando bien en agua destilada. A continuación, se deshidrató el hidrogel en baños de etanol/agua (uno al 70 %, dos al 50 % y tres en etanol absoluto sucesivamente). Tras secar al vacío a 50 °C, se trituraron las partículas de gran tamaño y se tamizaron, obteniéndose partículas de hidrogel calibradas (de 0,1 a 1,5 mm de diámetro).

A) Caracterización del criobiogel

35 a) Protocolos

Análisis de hinchamiento

40 Para definir el comportamiento de las partículas de hidrogel en un entorno fisiológico, se determinaron las relaciones de hinchamiento de estos hidrogeles en suero fisiológico. Se registraron los pesos del Criobiogel seco (W_d) antes de la inmersión en PBS. Tras 1 h de incubación, se eliminó el exceso de agua y se pesó el criobiogel hinchado (W_s). La relación de hinchamiento se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$SR = [(W_s - W_d) / W_d] \times 100.$$

Contenido de fosfatos

45 Se cuantificó el contenido de fosfatos unidos en el Criobiogel usando un ensayo de fosfatos. En resumen, se incubaron 50 mg de partículas de hidrogel en HNO_3 al 10 % a 105 °C hasta la degradación completa del hidrogel. A continuación, a la solución de hidrogel degradada, se añadió una solución de metavanadato de amonio (NH_4VO_3 , 11 mmol/l) y una solución de heptamolibdato de amonio ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 43 mol/l). Se realizó un intervalo de calibración usando una solución de H_3PO_4 a 0,4 mmol/l. Los espectros de muestra se registraron a 405 nm usando un espectrofotómetro.

Análisis termomecánico

55 Para definir cómo usar hidrogeles de manera eficiente, primero es necesario estudiar sus propiedades térmicas de acuerdo con su composición. En realidad, esta caracterización térmica sistemática de los hidrogeles sintetizados será un factor determinante para su uso en criobiología.

Calorimetría diferencial de barrido

60 Esta técnica, ampliamente usada en criobiología (Boutron *et al.*, 1979, Devireddy, 1998, Bischof, 2000), permite observar transiciones de fase en condiciones dinámicas en muestras de unos cuantos miligramos. La correspondiente tendencia a la formación de vidrio y la estabilidad del estado amorfo se evaluarán de este modo a partir de las mediciones de calorimetría diferencial de barrido. Las mediciones se llevaron a cabo en un analizador térmico Setaram DSC131. La muestra se enfrió de 20 °C a -150 °C a -10 °C/min. Los termogramas se analizaron usando el software de análisis térmico SETSOFT 2000.

65

b) Resultados

Las partículas de hidrogel útiles para llevarlo a cabo se representan en la Figura 1. A continuación, se describen las características específicas de dichas partículas.

5 *Velocidad de hinchamiento*

Como se muestra en la Figura 2 de la derecha, la velocidad de hinchamiento depende de la naturaleza de la solución de hinchamiento en la que se hinchan las partículas.

10 *Análisis termomecánico*

La Figura 2 de la derecha muestra las características del criobiogel útil para llevar a cabo el método de la invención.

15 **B) Preparación del criobiogel**

Se hinchó el criobiogel con 1 ml de solución de hinchamiento. Se usaron cuatro tipos de solución de hinchamiento.

- 20 1) SGLY compuesta de solución salina y glicerol al 5 %;
 2) SGLU compuesta de solución salina y solución concentrada de glucosa al 10 %;
 3) SPEG15 compuesta de solución salina y polietilenglicol (15 g/l).

Como control, se usó una solución de DMEM, DMSO al 10 % y FCS al 10 %.

25 **C) Congelación y descongelación de las células**

Congelación de las células

30 Se dejaron hinchar 20 mg de criobiogel (tamaño de partícula < 5 mm) en un criovial de 2 ml que contenía 900 µl de solución de crioconservación. Se añadieron 100 µl de solución de crioconservación que contenía 105\ml de células Huvec (células endoteliales de venas umbilicales humanas) o células CD 34+ al criotubo que contenía el criobiogel hinchado o medio de control. Se transfirieron los criotubos a un congelador automático (Freezal, Air Liquide, Francia). La velocidad de enfriamiento fue de -1 °C/min desde la temperatura ambiente a -80 °C o -196 °C. Se transfirieron los crioviales de inmediato a un congelador de -80 °C o se dispusieron en un recipiente de nitrógeno líquido.

Descongelación de las células

40 Se sumergieron los crioviales en un baño de agua a 37 °C durante 2 min. Se separaron las células y los criobiogeles con un filtro de células de 40 µl (Dutscher, Francia) en presencia de un exceso de medio. No se requirió ninguna etapa de centrifugación en esta etapa. Para el control, las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se retiró el medio de congelación. Se transfirieron las soluciones celulares a un matraz de cultivo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. El medio se cambió cada dos días.

45 *Viabilidad celular*

50 Se evaluó la viabilidad celular tras la descongelación usando tinción con azul de tripano. Debido a que este método no puede distinguir entre células necróticas y apoptóticas, la viabilidad celular también se evaluó usando el colorante indicador resaruzina (almarBlue), que usa el poder reductor natural de las células vivas para convertir la resazurina en la molécula fluorescente, la resorufina. Las células viables convierten de manera continua la resazurina en resorufina, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad y la citotoxicidad (Al-Nasiry, S. *et al.* (2007). "The use of alamarBlue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells". *Hum Reprod* 22:1304-1309).

55 *Cultivo celular*

60 Para el experimento de crecimiento celular, se sembraron células HUVEC (5 x 10³ células) en placas de 24 pocillos en Medio Mínimo Esencial de Dubelcco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 % y L-glutamina 2 mM (Sigma) a 37 °C, humedad del 95 %, CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada dos días. El día 1, 3 y 7, las células se recogieron con tripsina-EDTA y se contaron con un hematocímetro Malassez. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces y en muestras cuadruplicadas.

D) Recogida, congelación y descongelación de tejido

65 *Recogida de tejidos*

Se recogieron muestras de aorta torácica de ratas macho (Wistar, ws/ws) con un peso de 250 g. Todos los procedimientos y tratamientos con animales cumplieron con los Principios de Cuidado de Animales de Laboratorio emitidos por la Sociedad Nacional de Investigación Médica (autorización n.º 006235 del Ministerio de Agricultura francés). Tras la anestesia general, se realizó una incisión en la pared del tórax y se recogió la aorta torácica por debajo del arco aórtico, y se sumergió en solución de NaCl al 0,9 % (CDM Lavoisier Laboratories) antes del experimento. Se obtuvieron tres segmentos de 1 cm de cada recipiente.

Congelación de tejidos

Se hincharon 60 mg de hidrogel (tamaño de partícula < 0,1 mm) en un criovial de 2 ml que contenía 1 ml de solución de crioconservación o medio de control (DMEM, FCS al 10 %) con dimetilsulfóxido (Me₂SO) como crioprotector. A continuación, se dispuso 1 cm de aorta en el criovial. Se transfirieron los criotubos a un congelador automático (Freezal, Air Liquide, Francia) y se aplicó una velocidad de enfriamiento de -1 °C/min hasta alcanzar -80 °C o -196 °C. Se transfirieron los crioviales de inmediato a un congelador de -80 °C o en un recipiente de nitrógeno líquido.

Descongelación de tejidos

Tras el almacenamiento, se descongelaron rápidamente los crioviales por inmersión en un baño de agua a 37 °C. Se retiró el criobiogel por filtración. Se sumergieron los crioviales que contenían las muestras congeladas en un baño de agua a 37 °C durante 2 min. Se retiró el tejido con un fórceps y se sumergió en solución salina para retirar el hidrogel. Como alternativa, se añadió un exceso de medio y se recuperó la aorta con facilidad.

E) Evaluaciones de las viabilidades de células y tejidos

Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular tras la descongelación mediante tinción con azul de tripano. Debido a que este método no puede distinguir entre células necróticas y apoptóticas, la viabilidad celular también se evaluó usando el colorante indicador resaruzina (almarBlue), que usa el poder reductor natural de las células vivas para convertir la resazurina en la molécula fluorescente, la resorufina. Las células viables convierten de manera continua la resazurina en resorufina, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad y la citotoxicidad (Al-Nasiry, S. et al. (2007). "The use of alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells". *Hum Reprod* 22:1304-1309).

Se transfirieron 500 µl de solución de células (2 x 10⁴ células/ml) en un pocillo de placas de 24 pocillos con 50 µl de solución azul de resazurina y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. 4 h más tarde, se midió la reducción de resazurina usando el fluorómetro FluoStar Optima y se comparó con la reducción de células antes de la crioconservación a la misma concentración. El porcentaje de viabilidad celular se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad celular (\%)} = \left[\frac{\text{absorbancia de las células tras la descongelación}}{\text{absorbancia de las células antes de la congelación}} \right] \times 100$$

El medio de control fue DMEM, DMSO al 10 %, FCS al 10 % para células HUVEC o DMEM, DMSO al 10 %, albúmina al 5 % para células CD34+.

Crecimiento celular

Para el experimento de crecimiento celular, se sembraron células HUVEC (5 x 10³ células) en placas de 24 pocillos en Medio Mínimo Esencial de Dubelcco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 % y L-glutamina 2 mM (Sigma) a 37 °C, humedad del 95 %, CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada dos días. El día 1, 3 y 7, las células se recogieron con tripsina-EDTA y se contaron con un hematocímetro Malassez. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces y en muestras cuadruplicadas.

Viabilidad tisular

La viabilidad de las células tisulares se midió usando el ensayo MTT. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) se reduce al formazán púrpura en las mitocondrias de las células vivas, y esta reducción solo tiene lugar cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas. En resumen, se introdujo segmento de aorta (1 cm) en 1 ml de solución de MTT (5 mg/ml, Sigma, Francia) y se incubó durante 3 h a TA. Se disolvieron los cristales de formazán resultantes mediante la adición de 300 µl de isopropanol durante 19 h. Se midió la densidad óptica a 570 nm y se calculó el porcentaje de viabilidad celular usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad celular (\%)} = \left[\frac{\text{absorbancia del segmento de aorta experimental}}{\text{del segmento de aorta recién preparado}} \right] \times 100.$$

Resultados

Usando el protocolo previamente descrito, los inventores compararon la viabilidad de las células HUVEC en diversos medios (Figura 4). El criobiogel SGly y RGly proporcionaron mejores resultados incluso en ausencia de DMSO y FCS en comparación con los medios convencionales (que consisten en DMSO y SVF).

La Figura 5 también muestra que el crecimiento celular tras la descongelación se mejora en un medio de criobiogel en comparación con un medio de SGly convencional. Los inventores también demostraron que el criobiogel SGly proporciona resultados así como el medio de referencia.

La Figura 6 muestra que el criobiogel SGLu proporciona excelentes resultados para la crioconservación de las células HUVEC. Tras la congelación mecánica lenta, los resultados tras la descongelación revelaron idéntica viabilidad celular en presencia del hidrogel en comparación con el control y el medio de referencia.

Ejemplo 2: Crioconservación de los vasos aórticos

Se dispusieron muestras arteriales en viales de almacenamiento de nitrógeno líquido de 2 ml para la crioconservación (Nuclon-Intermed, Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) que contenían el criobiogel como medio crioprotector y crioconservador o que contenían el medio de control (DMEM, FCS al 10 %) con sulfóxido de dimetilo (Me₂SO) como crioprotector. A continuación, se sometieron los segmentos arteriales a congelación controlada automatizada a una velocidad de reducción gradual de la temperatura de 1° C/min para alcanzar -80 °C, y se almacenaron los segmentos en el congelador a esta temperatura durante un día. Tras este período de almacenamiento, se descongelaron rápidamente los segmentos por inmersión en un baño de agua a 37 °C. Se añadió un exceso de medio y se recuperó la aorta con facilidad. Se retiró el criobiogel por filtración.

La Figura 7 muestra la viabilidad celular de

- a) vaso aórtico recién preparado;
- b) vaso aórtico en presencia de DMSO;
- c) vaso aórtico en presencia de criobiogel; y solución salina.

Los inventores mostraron que el proceso desarrollado por la invención es tan eficiente como la técnica convencional que usa DMSO. Los ensayos de MTT proporcionan evidencia de viabilidad celular y función mitocondrial adecuada, demostrando que esta función se conserva con el hidrogel y, además, que los hallazgos son comparables a los observados con DMSO. Los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados usando una aorta recién preparada.

Ejemplo 3: Comparación de las propiedades de hinchamiento entre el hidrogel de acuerdo con la invención y los hidrogeles disponibles en el mercado tales como Agar® o Agargel®

Los inventores mostraron que la partícula de hidrogel usada en el contexto de la presente invención es la única que ofrece características muy específicas que permiten su uso en un proceso de crioconservación.

Como se muestra en la Figura 8, los inventores compararon las características del Agar®, Agargel® y Phytogel® disponibles en el mercado y las partículas de hidrogel usadas en el contexto de la invención. Tras el hinchamiento, parece que la viscosidad del hidrogel de la invención es superior, como se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 4. Congelación de embriones de conejo**Materiales y métodos**

Se usaron conejos macho de Nueva Zelanda sexualmente maduros (n = 14). Los animales fueron alojados en jaulas de cubierta plana, alimentados con una dieta convencional de microgránulos a discreción y con acceso libre al agua. Se usó un ciclo alterno de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Se indujo la ovulación usando rhFSH (Gonal-F 75, Serono Europe Ltd., Londres, Reino Unido), solo o en combinación con LH humano recombinante (rhLH, Luveris, Serono Europe Ltd., Londres, Reino Unido) y se inseminaron. Se extrajeron los embriones 72 h después de la inseminación artificial en la fase de mórula compactada como se ha descrito anteriormente. En resumen, los animales se anestesiaron con una inyección intramuscular de 0,4 ml de xilazina al 2 % (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y una inyección intravenosa de 1,2 ml/kg de peso corporal de ketamina (Imalgene, Merial S. A., Lyon, Francia). A continuación, se afeitó y se desinfectó la región abdominal, y se extirparon cuidadosamente los ovarios y los cuernos uterinos antes de someter al animal a eutanasia. Se realizó el examen macroscópico de los ovarios para determinar la tasa de ovulación. Se lavó abundantemente cada cuerno uterino con 50 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) que contenía albúmina de suero bovino al 0,2 % (BSA, Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España). Se transfirió el medio de lavado abundante recuperado a placas de Petri estériles para su examen

bajo un estereomicroscopio. Se clasificaron los embriones de acuerdo con criterios morfológicos según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Solo se consideraron embriones normales los embriones en fase de mórula con blastómeros homogéneos y tanto capa de mucina regular como zona pelúcida. Se congeló un total de 534 embriones.

5 Se dispusieron los embriones sucesivamente durante 5 minutos en diferentes medios de crioconservación que consistían en medio de retención de embriones ART 019449 (Imv Technology), BSA a 4 g/l y DMSO al 10 % (referencia) o DMSO al 5 % (como control) o DMSO al 5 % y partículas de hidrogel (granulometría < 0,5 mm, concentraciones que varían de 80 mg a < 20 mg). A continuación, se cargaron los embriones suspendidos en el medio de crioconservación en pajitas de plástico estériles de 0,25 ml (IMV, L'Aigle, Francia) entre dos gotas de DPBS separadas por burbujas de aire y cerradas herméticamente con un tapón estéril. A continuación, se colocaron las pajitas directamente en un congelador programable (Cryologic Pty Ltd, Mulgrave, Australia) y se congelaron siguiendo el protocolo de congelación lenta de dos etapas de Menezo. En resumen, se equilibraron los embriones 10 min a -7 °C; tras un período de equilibrio de 5 minutos, se realizó una siembra manual. A continuación, se enfriaron los embriones a -35 °C a una velocidad de congelación de 0,5 °C/min antes de sumergir las pajitas directamente en nitrógeno líquido. Tras 3 días, se realizó la descongelación colocando las pajitas a temperatura ambiente durante 10 a 15 segundos antes de sumergirlas en un baño de agua a 20 °C durante 1 minuto. Tras la descongelación, se retiró el medio de crioconservación.

20 Se cultivó un total de 534 embriones congelados-descongelados. Los embriones se cultivaron durante 48 h en medio TCM-199 + suero bovino fetal al 20 % (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) a 38,5 °C, CO₂ al 5 % y humedad saturada. Se evaluaron la viabilidad de los embriones y las etapas de desarrollo de los embriones descongelados.

25 **Resultados**

Los resultados relacionados con la viabilidad *in vitro* de los embriones se muestran en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: Determinación de la viabilidad *in vitro* de los embriones

MEDIO	DESARROLLO DE BLASTOCITOS (%)
Medio + DMSO al 10 % (referencia)	33,9
Medio + DMSO al 5 % (control)	24,9
Medio + DMSO al 5 % + GPS _ 20	22,22
Medio + DMSO al 5 % + GP5 _ 60	20,63
Medio + DMSO al 5 % + GP5 _ 80	17,65
Medio + DMSO al 5 % + GP1 _ 30	39,66*
Medio + DMSO al 5 % + GP1 _ 60	31,75*
Medio + DMSO al 5 % + GP1 _ 80	32,51*

30 El potencial de desarrollo de los embriones congelados-descongelados obtenidos de los grupos de partículas GP1 fue similar al grupo de referencia (medio + DMSO al 10 %) y significativamente superior al grupo de control (medio + DMSO al 5 %). La adición de partículas GP al medio permite una reducción significativa de la concentración de DMSO, que es interesante en la utilización clínica.

35 No se observaron diferencias entre el grupo GP5 y el grupo de control. Los resultados se correlacionaron con el tamaño de partícula y la concentración de hidrogel.

40 **Ejemplo 5: Congelación de ovocitos humanos**

El hidrogel, que se usó a diversas concentraciones, se descontaminó primero con UV durante 30 minutos, y luego se hinchó en presencia de 700 µl de medio de cultivo DMEM completo (SVF al 10 % y PSA al 1 %) en una placa de 4 pocillos. Tras el hinchamiento del hidrogel, se añadieron los ovocitos a cada pocillo.

Estos ovocitos humanos fueron proporcionados por el Laboratorio de Procreación Médicamente Asistida (MAP) del Hospital Bichat. El ovocito se debe cargar en una pajita de plástico estéril de alta seguridad para la congelación. Las pajitas se cargaron usando aspiración con una jeringa de 1 ml que tenía una punta especial en la que encajaba la pajita de plástico. Todo el aparato es estéril y desechable (de un solo uso). A continuación, se llevó a cabo la congelación usando Nicool Freezal^R (AIR LIQUIDE). Se trata de un congelador criogénico programable diseñado para todo tipo de muestras biológicas sensibles: pajitas, tubos, bolsas, etc. Se seleccionó el siguiente programa de congelación: 2 °C/min hasta -7 °C (siembra manual), luego -0,3 °C/min de -7 °C a -25 °C, luego -25 °C/min hasta alcanzar -150 °C. La siembra produce la cristalización. Tras la estabilización a -7 °C, es necesario realizar la siembra con una "barra de siembra" (que se ha sumergido en nitrógeno líquido) sobre el sembrado en el lado opuesto a los ovocitos con el fin de iniciar la congelación. Al final del ciclo de congelación, es decir, cuando la temperatura ha alcanzado -150 °C, se retiran las pajitas del Freezal usando pinzas. Se ponen en cajas y se colocan en nitrógeno líquido.

Para evaluar el aspecto morfológico de los ovocitos tras la congelación, se observaron usando un microscopio óptico y se fotografiaron en diferentes fases: antes de la congelación, los ovocitos solos, luego los ovocitos en contacto con un medio de cultivo que contenía el hidrogel (en C1, C2 y C3), y tras la congelación.

La morfología de los ovocitos se evaluó de la manera habitual cada vez que se trataban. La primera etapa consistió en colocar los ovocitos en hidrogel durante 20 minutos para asegurarse de que no habían sufrido choque osmótico y que permanecían intactos. Para este fin, se usó una placa de 4 pocillos, en la que el hidrogel sufrió hinchamiento en DMEM a diversas concentraciones (C1, C2 y C3). Tras 20 minutos, se recuperaron los ovocitos y se aislaron en una placa de Petri.

Ejemplo 6: Congelación de la piel

Materiales y métodos

El hidrogel en partículas, que se usó a diversas concentraciones, se descontaminó primero con UV durante 30 minutos, y luego se hinchó en presencia de 700 µl de medio de cultivo DMEM completo (SVF al 10 % y PSA al 1 %) en una placa de 4 pocillos. Tras el hinchamiento del hidrogel, se añadió piel de rata (6 mm de diámetro) a cada pocillo y se cargaron las pajitas usando aspiración. Se usó DMEM, 10 % de dimetilsulfóxido como referencia (control). A continuación, se llevó a cabo la congelación (congelación lenta o vitrificación) usando Nicool Freezal[®] (AIR LIQUIDE). Después, se colocaron las muestras en un tanque de nitrógeno líquido. Tras un mes en almacenamiento en nitrógeno líquido, la piel se descongeló y se estudió la viabilidad del tejido mediante el método de MTT como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2: Determinación de la viabilidad de la piel tras la congelación mediante un ensayo de MTT en presencia de Criobiogel o en DMSO

MEDIO	DO/MG DE PIEL
+ DMSO al 10 %	102,31 ± 2,2
+ Criobiogel, sin DMSO	90,91 ± 3,98

La adición de criobiogel al medio de crioconservación (DMEM, FCS al 10 %) preserva la viabilidad del tejido celular sin la adición de DMSO y en una misma proporción que la piel congelada en DMSO al 10 %.

Ejemplo 7: Inmunotinción de CD31 tras la crioconservación de células HUVEC con Criobiogel

En este experimento, los inventores investigaron los efectos de la crioconservación de HUVEC con Criobiogel sobre la diferenciación celular. Esto se examinó mediante la formación de tubos *in vitro* (gracias a la tinción de inmunofluorescencia para identificar el marcador específico CD31) sobre Matrigel y mediante la comparación con el método que implicaba una solución de DMEM, DMSO al 10 % y FCS al 10 %, designada en el presente documento principal método convencional.

Se descongeló el Matrigel a 4 °C durante la noche, se extendió uniformemente sobre cada pocillo (240 µl, 10 mg de proteína/ml) de una placa de 24 pocillos y se polimerizó durante más de 30 minutos a 37 °C. Las células se descongelaron y luego se incubaron en DMEM y FBS al 10 % durante 6 h y se sembraron sobre la capa de Matrigel a una densidad de 5 x 10⁴ células/pocillo.

Tras 24 h de incubación, se observó la formación de los tubos (Figura 10). Se observó una formación de tubos similar en las células HUVEC criopreservadas con Criobiogel o con la principal técnica convencional (DMSO al 10 %, FCS al 10 %).

5 Por lo tanto, los inventores demostraron que el Criobiogel de la invención proporciona los mismos resultados que el principal método convencional de la técnica anterior con respecto a la capacidad de los tejidos para diferenciarse.

Ejemplo 8: Criopreservación de vaso aórtico de rata en nitrógeno líquido

10 **1. Efecto sobre la organización tisular**

Se evaluaron la conservación de la estructura de los vasos aórticos y de la capa de células endoteliales de la rata tras un mes de criopreservación en nitrógeno líquido con Criobiogel. Los resultados se compararon con el principal método convencional (DMSO al 10 %, FCS al 10 %).

15 Como se muestra en la Figura 11, no se observó ninguna diferencia en la organización de los tejidos entre la principal técnica convencional y el criobiogel.

20 Las láminas elásticas eran paralelas y se preservó una capa de células endoteliales (inmunotinción de RECA1). Por el contrario, en las condiciones de control (es decir, sin adición de criobiogel), se observó una fragmentación de la lámina elástica y un gran espacio entre dos láminas elásticas (tinción de orceína, flechas amarillas). Además, la capa de células endoteliales estaba ausente en las condiciones de control.

25 **Por lo tanto, el criobiogel de la invención no tiene ningún impacto negativo sobre la organización tisular de la célula criopreservada.**

2. Efecto sobre las propiedades mecánicas

30 Los inventores investigaron además las propiedades mecánicas de la aorta criopreservada en presencia de criobiogel tras un mes en nitrógeno líquido.

35 Se evaluó la influencia de la criopreservación en presencia de criobiogel sobre las propiedades mecánicas de la aorta mediante ensayos de tracción en dirección longitudinal, y se comparó con aorta recién preparada y aorta preservada con el principal método convencional (DMSO al 10 %, FCS al 10 %).

Se usaron tres soluciones de criopreservación:

- una solución experimental (SGly, DMSO al 0 %); y
- dos soluciones comerciales clínicas (SCOT 15® y SCOT 30®, DMSO al 0 %, MacoPharma, Francia).

40 Como se muestra en la Figura 12, los módulos de Young calculados fueron mejores con la criopreservación en presencia del criobiogel en comparación con las condiciones de control, y similares al principal método convencional para las soluciones SCOT. La solución SGly mostró resultados similares a la aorta recién preparada.

45 **Por lo tanto, el criobiogel de la invención no tiene ningún impacto negativo sobre las propiedades mecánicas de la célula criopreservada. Por el contrario, el método de la invención proporciona aorta criopreservada que presenta un módulo de Young mejorado, es decir, mejores propiedades mecánicas.**

Ejemplo 9: Supervivencia de criopreservación de ovocitos de ratón

50 Los inventores compararon la tasa de supervivencia de los ovocitos en tres experiencias diferentes usando 1,2-propanodiol (PROH) de la siguiente manera:

- Grupo I: PROH a 1,5 mol/l, Sacarosa al 0,3 % (principal patrón clínico);
- 55 - Grupo II (control): PROH a 0,5 mol/l, Albúmina al 10 %; y
- Grupo III: PROH a 0,5 mol/l, Criobiogel, Albúmina al 10 %.

Los resultados son los siguientes:

<u>Supervivencia de los ovocitos (%)</u>	
Grupo I	45,7
Grupo II	0
Grupo III	59,1

60 **Los inventores han demostrado que gracias al criobiogel muy específico de la invención, obtuvieron una mayor tasa de supervivencia de los ovocitos criopreservados, aunque se usaron tres veces menos de PROH**

que en los métodos convencionales.

Referencias

- 5 A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de crioprotección de una muestra biológica que comprende la etapa de congelar dicha muestra biológica en presencia de un hidrogel,
5 en el que dicho hidrogel se puede obtener mediante:
- a) la reticulación química de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pululano, dextrano, sulfato de dextrano, escleroglucano, carboximetildextrano, carboximetilpululano, agar, alginato, fucoidano, quitosano, ácido hialurónico, proteoglicanos de sulfato de heparán, heparina, miméticos de heparina o de sulfato de heparán y mezclas de los mismos con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en trimetafosfato trisódico (STMP), oxiclورو de fósforo (POCl₃), epiclорhidrina, formaldehídos, carbodiimidias hidrosolubles y glutaraldehído en condiciones alcalinas a una temperatura comprendida entre 30 y 70 °C;
10
- en el que
15 dicha etapa de congelación se realiza a una temperatura por debajo de 0 °C en condiciones de presión convencionales y dicha etapa de congelación se realiza sin dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Un método de crioprotección de una muestra biológica que comprende la etapa de congelar dicha muestra biológica en presencia de un hidrogel, en el que dicho hidrogel se puede obtener mediante:
20
- a) la reticulación química de al menos un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pululano, dextrano, sulfato de dextrano, escleroglucano, carboximetildextrano, carboximetilpululano, agar, alginato, fucoidano, quitosano, ácido hialurónico, proteoglicanos de sulfato de heparán, heparina, miméticos de heparina o de sulfato de heparán y mezclas de los mismos con un agente reticulante seleccionado del grupo que consiste en trimetafosfato trisódico (STMP), oxiclورو de fósforo (POCl₃), epiclорhidrina, formaldehídos, carbodiimidias hidrosolubles y glutaraldehído en condiciones alcalinas a una temperatura comprendida entre 30 y 70 °C;
25
- b) la trituración del hidrogel obtenido en a) para obtener partículas de hidrogel;
30
- c) el lavado de dichas partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b);
30
- d) el tamizado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o la etapa c);
30
- e) el lavado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o la etapa d);
30
- f) la deshidratación de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa b) o en etapa e), preferentemente en baños de etanol/agua;
35
- g) el secado de las partículas de hidrogel obtenidas en la etapa f), preferentemente a 50 °C con el fin de obtener partículas de hidrogel secadas;
35
- h) el tamizado de las partículas secadas obtenidas en la etapa g); y
35
- i) el hinchamiento de la partícula de hidrogel secada obtenida en la etapa h) en una solución de hinchamiento para obtener un hidrogel;
35
- en el que
40 dicha etapa de congelación se realiza a una temperatura por debajo de 0 °C en condiciones de presión convencionales, y dicha etapa de congelación se realiza sin dimetilsulfóxido (DMSO).
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha etapa de congelación se realiza a una temperatura comprendida por debajo de -30 °C.
45
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha etapa de congelación es una etapa de refrigeración mecánica, a una temperatura comprendida por debajo de -70 °C.
50
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha etapa de congelación se realiza en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C.
50
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha etapa de congelación se realiza sin un crioprotector seleccionado entre dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y polietilenglicol (PEG).
55
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 a 6, en el que dicha solución de hinchamiento se selecciona del grupo que consiste en:
60
- i) una solución que comprende solución salina y glicerol;
60
- ii) una solución que comprende suero fisiológico y glucosa; y
60
- iii) una solución que está compuesta de solución salina fisiológica y polietilenglicol.
60
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica son células tales como células de mamífero, una célula vegetal, células sanguíneas, células reproductoras, tales como ovocitos o células espermáticas, células embrionarias, células madre, células del cordón umbilical, células de la
65

corteza ovárica, progenitores hematopoyéticos o islotes pancreáticos.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica es un embrión animal, humano o no humano.

5

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica es un órgano o un tejido tal como un corazón, un pulmón, piel, un vaso, una córnea, un ovario, un hígado, un riñón, un páncreas, un intestino, un ojo o un bazo.

10 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica es ácido nucleico tal como ADN o ARN.

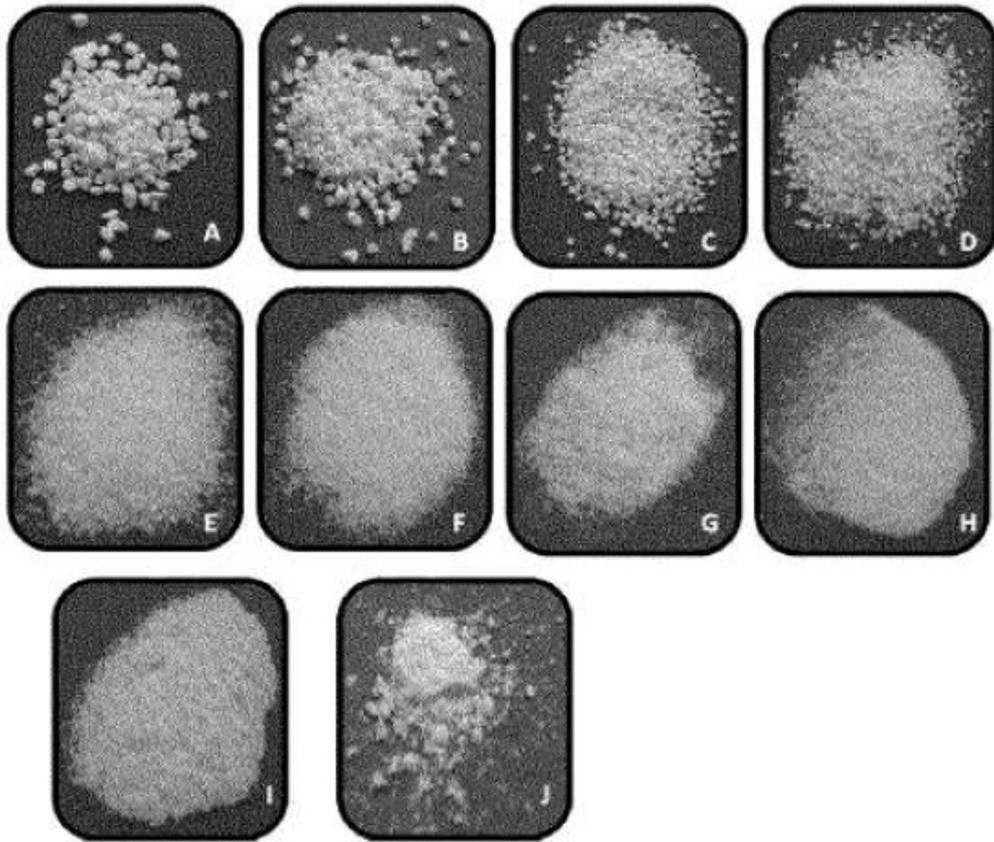


Figura 1

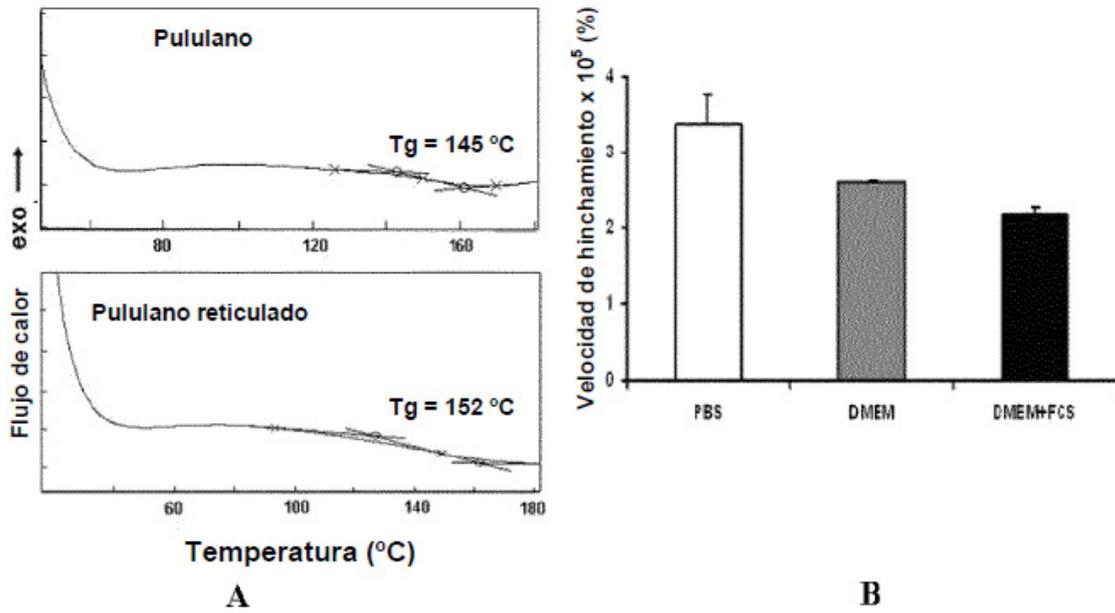


Figura 2

	T _c (Temperatura de cristalización)	q (% de solución cristalizada en hielo)
crioperlas	-16,91	36 %
DMSO	-17,49	40 %

Figura 3

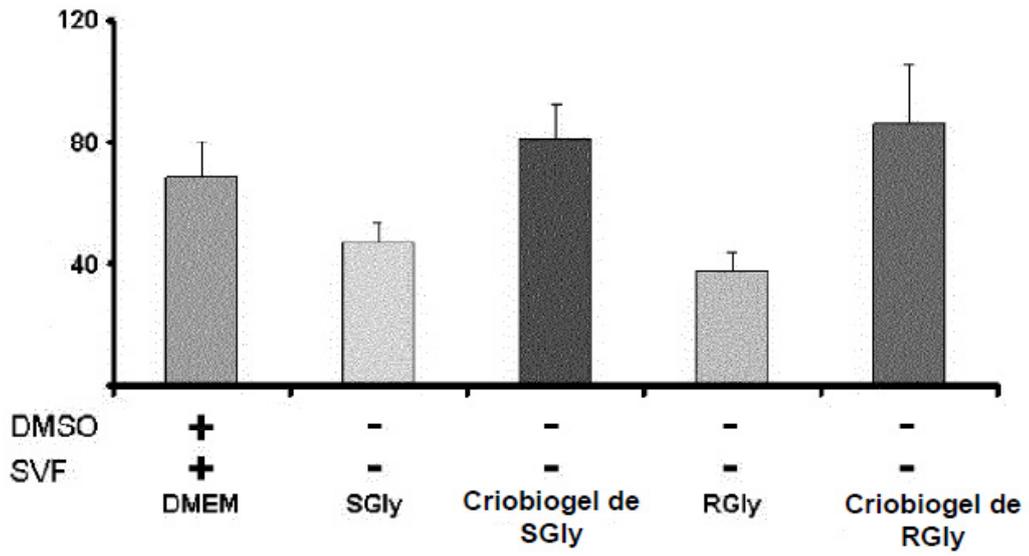


Figura 4

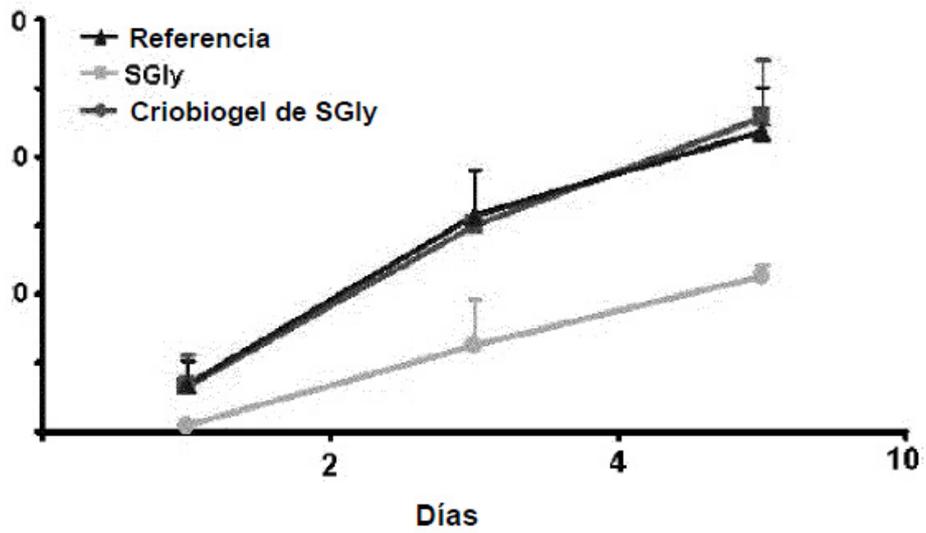


Figura 5

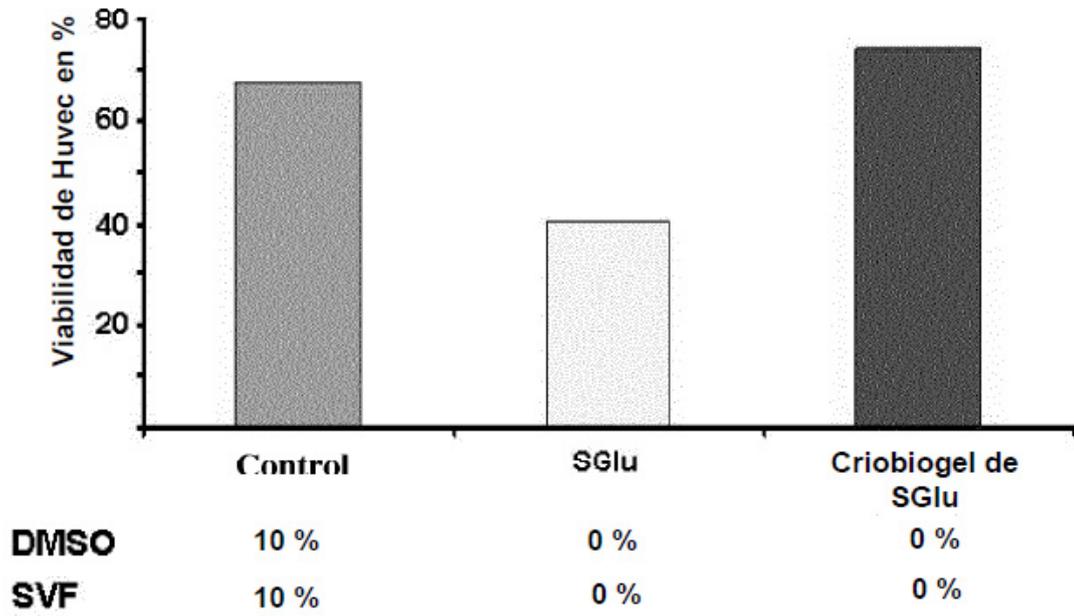


Figura 6

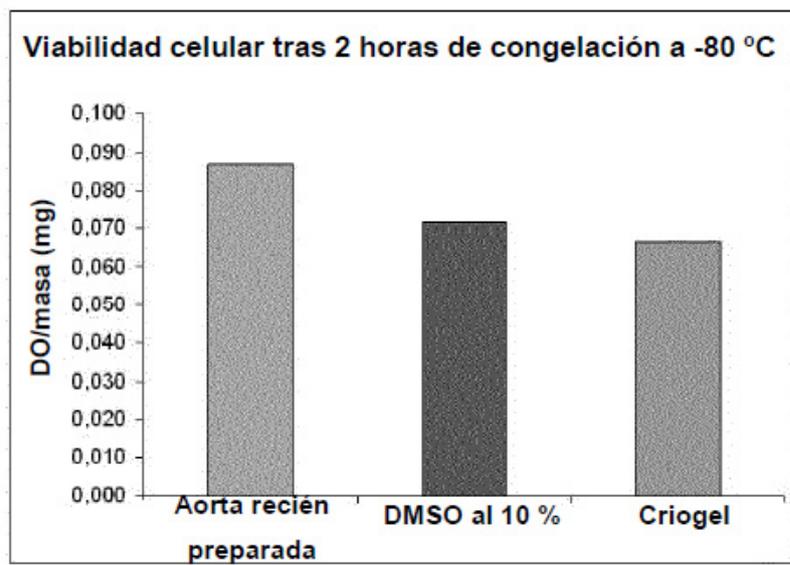


Figura 7

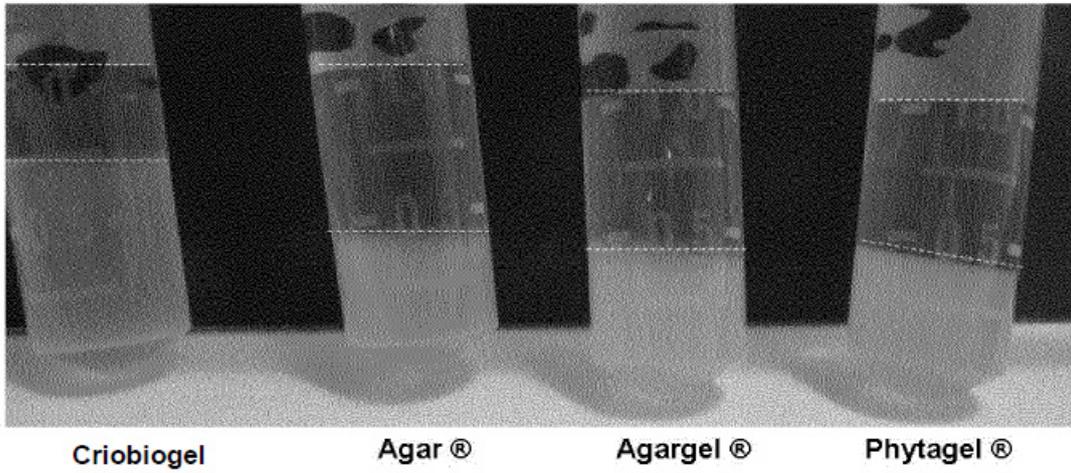


Figura 8

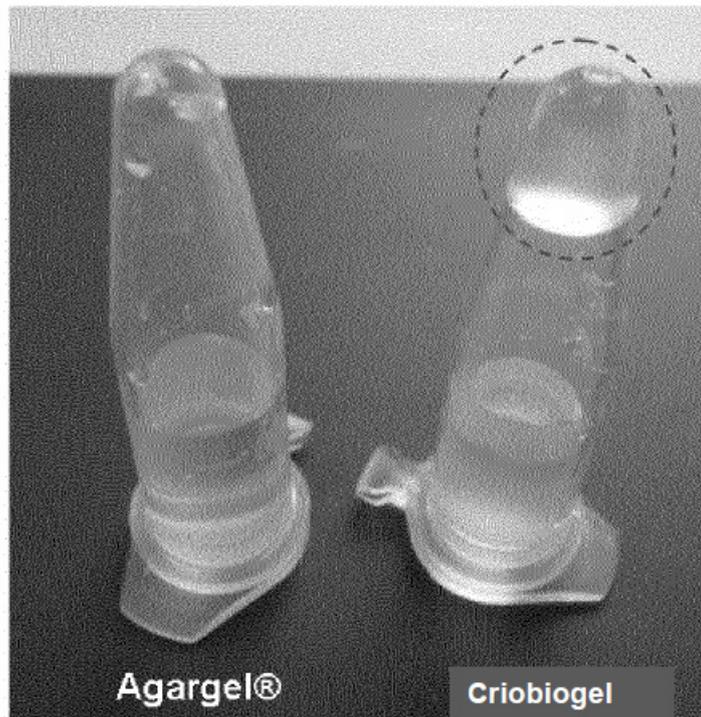


Figura 9

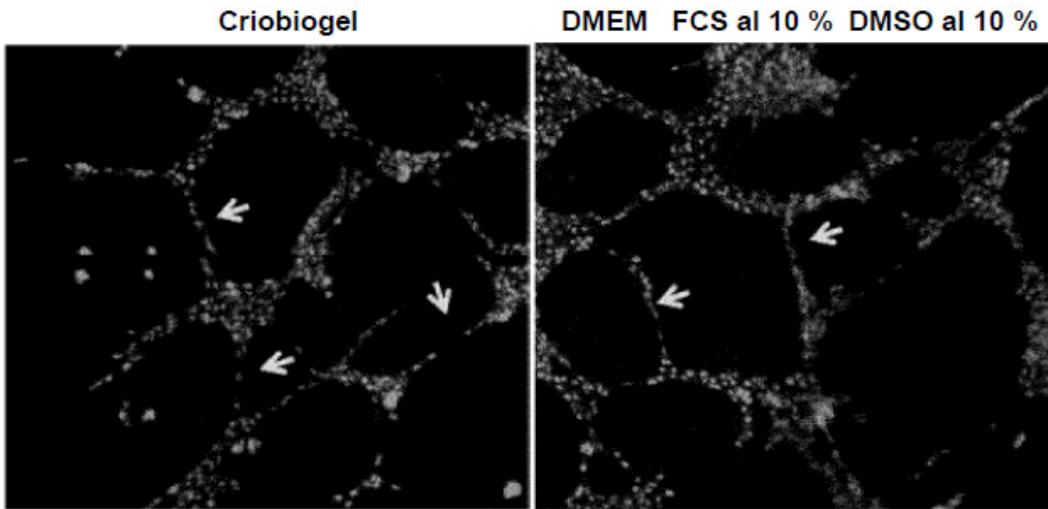


Figura 10

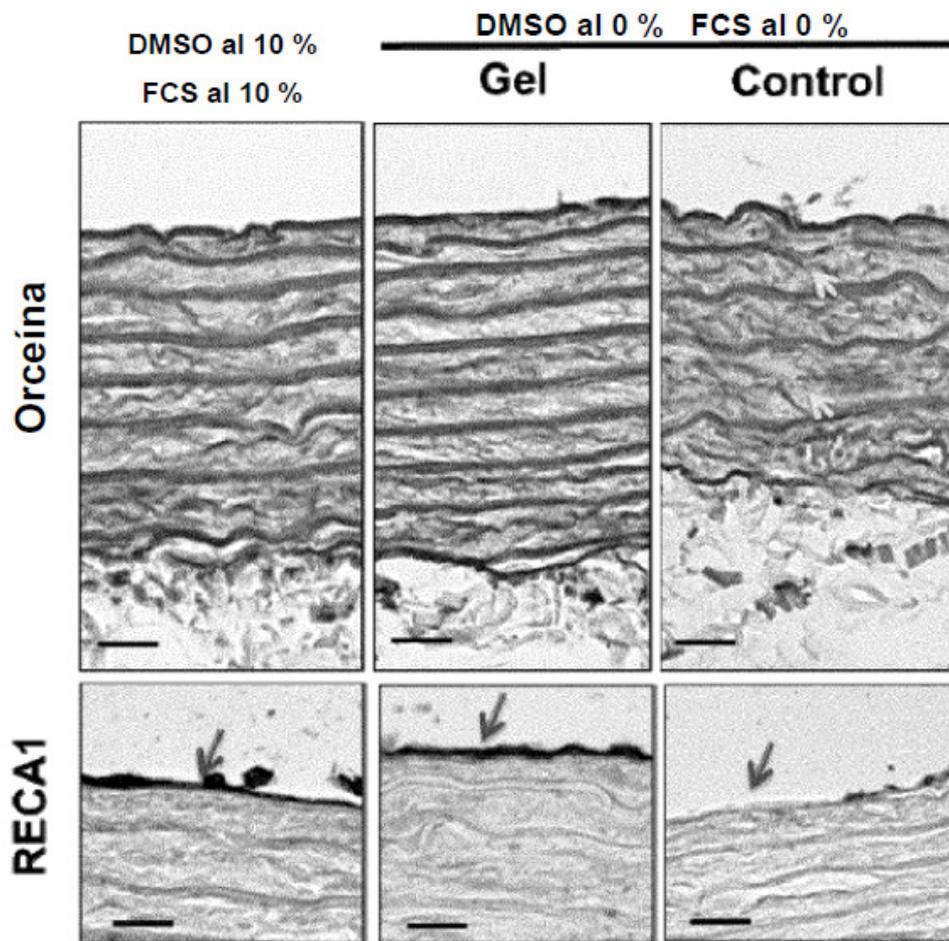


Figura 11

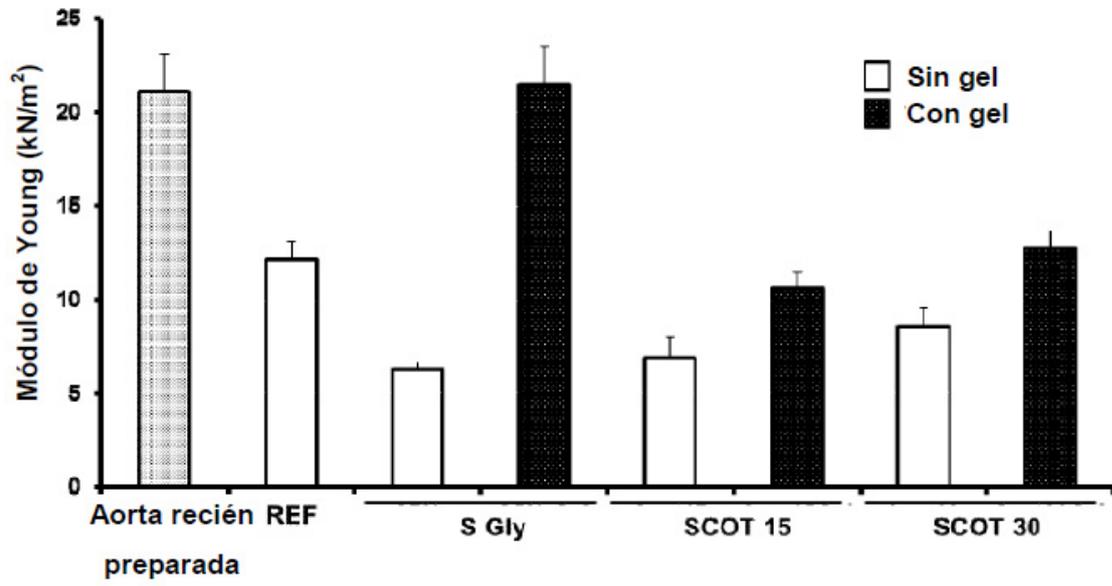


Figura 12