

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 339**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)  
**A01N 25/00** (2006.01)  
**A01N 61/00** (2006.01)  
**A01N 65/00** (2009.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**C12N 1/00** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C12N 5/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2002 PCT/US2002/23844**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2003 WO03009743**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2002 E 02752596 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 1422999**

54 Título: **Reducción hiperónica de lesiones por enfriamiento**

30 Prioridad:

**26.07.2001 US 916032**

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

**25.04.2018**

73 Titular/es:

**21ST CENTURY MEDICINE, INC. (100.0%)  
14960 Hilton Drive  
Fontana, CA 92336, US**

72 Inventor/es:

**FAHY, GREGORY M., PH., D.**

74 Agente/Representante:

**LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen**

ES 2 665 339 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**

REDUCCIÓN HIPERÓNICA DE LESIONES POR ENFRIAMIENTO

**SOLICITUDES RELACIONADAS**

- 5 Esta aplicación es una continuación en parte de la solicitud de patente de los EE. UU. 09/771,221, presentada el 26 de enero de 2001 que reivindica prioridad bajo 35 U.S.C. §119 de la Solicitud Provisional No. US 60/178,157, presentada el 26 de enero de 2000.

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 10 Esta invención se refiere en general al campo de la crioconservación. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para prevenir lesiones causadas por enfriamiento y calentamiento de tejidos y para reducir la toxicidad de soluciones de vitrificación reduciendo la cantidad de crioprotector necesario para vitrificar y para facilitar la introducción y el lavado rápidos del crioprotector sin toxicidad o lesión osmótica.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- 15 Durante el enfriamiento y calentamiento de tejidos o células en soluciones crioprotectoras, las células y tejidos a menudo sufren lesiones. Agregar y eliminar el crioprotector también puede inducir lesión, particularmente si el proceso de adición y lavado es prolongado, pero también si la dilución es demasiado rápida. Sería deseable en la técnica proporcionar un método que permita a) la adición rápida de crioprotectores, b) enfriamiento rápido o lento sin shock por enfriamiento o lesiones por enfriamiento, y c) dilución rápida del crioprotector sin choque osmótico después del recalentamiento del sistema vivo.
- 20 Existen muchas formas de dañar los sistemas vivos al enfriarse a temperaturas bajo cero y, posteriormente, al calentarse a temperaturas bajo cero. Si el sistema está congelado, puede dañarse mecánicamente por hielo intracelular o extracelular, o por las consecuencias de cambios en la composición de la parte no congelada del ambiente semicongelado. Si el sistema está vitrificado, estas fuentes de lesión pueden desaparecer, pero son posibles otras formas de lesión.
- 25 El "choque térmico" (también llamado a veces choque frío) es una lesión causada por el enfriamiento rápido per se, y se reduce al reducir la velocidad de enfriamiento. Se ha afirmado que existe una lesión por choque térmico (véase Fahy et al., En Cell Biology of Trauma, J. J. Lemasters y C. Oliver, Eds, CRC Press, 1995, pp. 333-356) dentro de una estrecha ventana de temperatura entre 0°C y aproximadamente -20°C en la corteza renal de conejo, pero no por debajo, pero actualmente se cree que no es un problema importante, aunque las tasas de enfriamiento rápido son deseables para la vitrificación a fin de reducir la probabilidad de formación de hielo y toxicidad crioprotectora.
- 30

- 35 Otra posible fuente de lesiones es la "lesión por frío", que es una forma poco conocida de lesiones causados por la exposición a bajas temperaturas per se. La lesión por enfriamiento es, a fines prácticos, esencialmente no dependiente de la velocidad de enfriamiento (excepto para sistemas pequeños, que pueden escapar de la lesión por frío a velocidades de enfriamiento muy rápidas), sino que depende principalmente de la temperatura absoluta a la que se enfría el sistema. Dicho de otra manera, el shock térmico es causado por una refrigeración rápida y es reducida o eliminada por una refrigeración lenta, y la lesión por enfriamiento no es eliminada por refrigeración rápida, excepto tal vez posiblemente a tasas de refrigeración muy altas.

- 40 Otra forma de lesión relacionada con la vitrificación (crioconservación sin formación de hielo al enfriar) es la desvitrificación. A medida que la temperatura en un sistema vitrificable se aproxima a la temperatura de transición vítrea, en general puede producirse la nucleación. Cuando el sistema se calienta, los núcleos formados en las proximidades de la temperatura de transición vítrea (Tg), que no pueden aumentar mientras el sistema permanece por debajo de la Tg, pueden aumentar y producir lesiones tanto intracelulares como extracelulares.
- 45

Otra forma de referirse a la lesión que tiene lugar al enfriar per se y que no se caracteriza formalmente como que representa un choque térmico o una lesión por frío es simplemente denominar dicha lesión como "lesión por enfriamiento".

Las principales barreras para la criopreservación por vitrificación son la toxicidad crioprotectora, la lesión por frío y la desvitrificación. La toxicidad crioprotectora se ha reducido en gran medida con inventos recientes que implican la utilización de agentes formadores de vidrio débiles y análisis qv\* y ya no es un factor limitante principal para los sistemas celulares. Debido a que la desvitrificación puede reducirse utilizando crioprotectores de baja toxicidad, bloqueadores de hielo y calentamiento rápido, también es actualmente una preocupación cada vez menor. La lesión por enfriamiento, sin embargo, sigue siendo un problema sustancial y en gran parte difícil de resolver, que es difícil de abordar en parte debido a su origen desconocido. Aunque se han realizado estudios sobre la bioquímica de la lesión por enfriamiento en sistemas naturales, no se sabe nada sobre las fuentes de lesión por frío en células que no sufren lesión por enfriamiento a 0°C y que se han cargado con concentraciones vitrificables de crioprotectores y se han enfriado a cero temperaturas por debajo de cero grados. Por lo tanto, sería particularmente valioso poder elucidar las lesiones por enfriamiento para mejorar los resultados de la vitrificación.

En la técnica se conoce un método patentado para tratar la lesión por frío en tales sistemas (véanse las patentes de los Estados Unidos 5,962,214 y 5,723,282). Fahy demostró que los riñones o las láminas de riñón expuestas a concentraciones altas pero sub vitrificables de crioprotectores a 0°C se dañaron gravemente al enfriarse a entre -20 y -30°C. Encontró que al utilizar concentraciones más bajas de crioprotectores permeantes antes del enfriamiento, la sensibilidad a la lesión por frío podría eliminarse a estas temperaturas. Se podría introducir crioprotector adicional por difusión o por perfusión a entre -20 y -25°C, con toxicidad reducida o eliminada (véase también Fahy et al., *En Cell Biology of Trauma*, JJ Lemasters y C. Oliver, Eds, CRC Press, 1995, págs. 333-356, pero especialmente la Figura 8, página 353, y su descripción, y Khirabadi y col., *Cryobiology* 31: 597, 1994, y *Cryobiology* 32: 543-544, 1995).

Sorprendentemente, se descubrió que este método de la técnica anterior tenía un defecto fatal: cuando los tejidos protegidos a aproximadamente -25°C utilizando el método se enfriaban posteriormente a Tg, en realidad sufrían lesiones mucho más graves que si se hubieran enfriado directamente desde 0°C. (Khirabadi et al., *Cryobiology* 37: 447, 1998). La falta de permeación del crioprotector adicional a -25°C se descartó como causa de la lesión por enfriamiento, ya que duplicar el tiempo de equilibrio a -25°C tuvo un efecto mínimo o nulo sobre la lesión por enfriamiento, aunque exacerbó en gran medida la lesión tóxica a -25°C. Por lo tanto, cualesquiera que sean sus virtudes, este método de la técnica anterior es insostenible.

Fahy et al. explicaron la base de su método de la técnica anterior de la siguiente manera (ver la referencia de *Cell Biology of Trauma*, págs. 351-352). "Los eritrocitos humanos normalmente no experimentan un choque frío cuando se enfrían a 0°C, pero se vuelven susceptibles al choque frío por exposición a soluciones hipertónicas antes del enfriamiento... Si se introduce la misma hipertonicidad a una temperatura inferior a 10°C, las células permanecen ilesas a la temperatura de exposición o al enfriamiento posterior. El método para evitar el choque frío, entonces, es enfriarse a través del intervalo de temperatura crítica en presencia de bajas concentraciones [baja tonicidad] y aumentar la concentración [tonicidad] solo después de que este intervalo crítico de temperatura haya sido atravesado de manera segura."

"En el caso del riñón de conejo, sabíamos que la contracción osmótica de las células tubulares es inducida por la exposición a VS4 y V52, y que la contracción celular parece ser necesaria para la lesión por choque frío en los glóbulos rojos. Dado que los riñones se enfriaron a -30°C en VS4 con una vida útil de alrededor del 60% del tiempo y los riñones se enfriaron a -30°C en V52 vida compatible 0% del tiempo, parecía que una concentración no muy por debajo de la concentración del 49% p/v de VS4 debería evitar el shock por enfriamiento por completo."

Al describir los resultados de un experimento diseñado para probar la analogía entre la lesión por choque térmico en glóbulos rojos y la lesión por enfriamiento en láminas de riñón de conejo, Fahy et al. concluyen (de la misma referencia): "Por lo tanto, parece ser que la analogía entre lesión por enfriamiento en tejido renal de conejo y shock por enfriamiento en eritrocitos humanos es válida."

WO 98/09514 A describe un método de vitrificación que comprende las fases de preparar una solución de co-solutos no permeantes de vitrificación (aminoácidos, betaínas, carbohidratos u otros co-solutos no permeantes que disminuyen de forma efectiva el potencial químico de los crioprotectores permeables en soluciones acuosas), un crioprotector permeante y un crioprotector no permeante (polivinilpirrolidona, polietileno, glicol, dextrano, almidón hidroxil etil, ficol, etc.), poner en contacto una muestra con la solución de vitrificación y almacenar la muestra a una temperatura ambiente. El método también incluye la fase de rehidratar la muestra conservada en una solución de rehidratación preparada en forma de solución de almacenamiento de vitrificación.

WO 97/45010 A describe un método de vitrificación que comprende las fases de cargar de forma gradual o escalonada una muestra con un protector permeante poniendo en contacto la muestra con soluciones que incluyen un protector y un co-soluto no permeable que limita la cantidad de protector que penetra en las

células del espécimen biológico. El método incluye asimismo la fase de descargar (rehidratación) la muestra poniendo en contacto la muestra con una o más soluciones de rehidratación que tienen concentraciones progresivamente inferiores tanto del protector como del co-soluto, de manera que el protector es eliminado de las células de la muestra.

5 EP 0306132 A2 describe un método de vitrificación, en que el material biológico que comprende estructuras incluidas en la membrana está protegido contra la lesión por frío. El método se caracteriza porque comprende la reducción de la tensión entre las membranas.

10 US 2001/039004 A1 describe un método para enfriar, recalentar y eliminar el crioprotector de las células vivas reduciendo la lesión y se presenta la criotoxicidad. El método se caracteriza por un medio hipertónico, que se utiliza para reducir tanto la toxicidad del crioprotector como la lesión por enfriamiento.

Por lo tanto, está claro que aunque se ha prestado mucha atención al problema de evitar la lesión por enfriamiento en el pasado, aún se necesita un método para prevenir dicha lesión.

### **RESUMEN DE LA INVENCION**

15 La invención se dirige a métodos para reducir o eliminar las lesiones por enfriamiento durante la crioconservación por vitrificación de sistemas vivos tal como se define en las reivindicaciones.

Existen métodos en la técnica anterior que implican el uso de polímeros u otros impermeantes para facilitar la vitrificación. En estos métodos, los polímeros se utilizan para mejorar la tendencia a la vitrificación en lugar del crioprotector extra penetrante. Sin embargo, en ninguno de estos métodos el polímero se utiliza con el propósito de inhibir la lesión por enfriamiento (en oposición a la lesión causada por la formación de hielo, que, según las definiciones en el presente documento, no constituye una lesión por enfriamiento).  
 20 Debido a esto, ningún método de la técnica anterior ha logrado una crioconservación óptima, porque, como se describe aquí, la inclusión de demasiado polímero puede negar la protección contra la lesión por enfriamiento, o incluso causar una lesión por enfriamiento adicional en comparación con la no utilización de polímeros, mientras que la utilización de muy poco impermeante puede no alcanzar la protección máxima,  
 25 y no se ha tomado conciencia de que la lesión por enfriamiento se modifica por los cambios en la concentración del polímero, por lo que la lesión por enfriamiento ha variado al azar con cambios no guiados en las condiciones experimentales. Por lo tanto, la presente invención permite lograr la crioconservación óptima optimizando el nivel de hipertonicidad y el método para introducir y eliminar la hipertonicidad a fin de optimizar la negación de la lesión por enfriamiento, una oportunidad que antes no era posible. Además,  
 30 ningún método anterior ha utilizado polímeros, otros impermeantes o cambios en la concentración de la solución transportadora para obtener beneficios mediante la simulación de congelación y descongelación. En el presente documento se describe un método para enfriar células vivas en medios vitrificables sin engendrar lesión por enfriamiento per se. Sorprendentemente, el método logra la eliminación casi total de las lesiones por frío o enfriamiento usando un planteamiento que es opuesto a los métodos anteriores. El  
 35 presente método logra la reducción o eliminación de la lesión aumentando la tonicidad del medio a mayor que la isotónica antes del enfriamiento. Otra forma de realización es la utilización de un medio hipertónico para reducir tanto la toxicidad crioprotectora como la lesión por frío, en la que el medio hipertónico se agrega y elimina de una manera que simula los efectos de la congelación y la descongelación. En una forma de realización adicional, el medio hipertónico evita lesiones por enfriamiento a temperaturas bajo cero. Otra  
 40 forma de realización es la utilización de un medio hipertónico para reducir el tiempo requerido para eliminar el crioprotector de las células vivas, en que el lavado acelerado del crioprotector se logra simulando la descongelación (dilución simultánea del medio hipertónico y el crioprotector). Una forma de realización adicional es la utilización de un medio hipertónico para proteger las células vivas del choque de dilución, en que la protección se logra mediante la presencia del medio hipertónico antes de la dilución y se mantiene por dilución simultánea del crioprotector y el medio en proporciones aproximadamente similares. En una  
 45 forma de realización adicional, el método proporciona dos etapas de tratamiento con medios hipertónicos, en los que la tonicidad de la primera etapa y la tonicidad de la segunda etapa pueden diferir, pero en las que la tonicidad en ambas etapas excede a la isotónica.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

50 La Figura 1 muestra la viabilidad de láminas corticales renales de conejo congeladas sometidas a congelación simulada en DMSO (D) o en Veg (V) a diversas concentraciones. La viabilidad se mide por relaciones K/Na del tejido después de la restauración del metabolismo activo. Cada barra representa 6-12 láminas individuales.

55 La Figura 2 muestra las proporciones K/Na de láminas expuestas a concentraciones vitrificables de crioprotectores con o sin simulación de congelación, y enfriadas con o sin uso previo del método de simulación de congelación para añadir crioprotector (elevación simultánea de la solución de

vehículo y concentración de crioprotector). Se usaron dos soluciones de vitrificación, V 16 y C40, y los efectos de todos los tratamientos se compararon solo con la exposición a la solución del vehículo (Con). Cada barra representa 12 sectores diferentes.

5 La Figura 3 muestra la lesión asociada al enfriamiento en las láminas en una solución de vitrificación que tiene una tonicidad de 1.7X. La línea punteada muestra el nivel de lesión causado en una solución IX a aproximadamente -20°C.

La Figura 4 muestra la tonicidad óptima para reducir las lesiones causadas por enfriamiento hasta -22°C.

10 La Figura 5 muestra los efectos de dos tipos de tratamientos hipertónicos sobre lesiones causadas por enfriamiento a -100 ° o inferior.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERENTE**

15 Se presenta un método inicial para añadir y eliminar crioprotector con mayor velocidad y mayor seguridad y conveniencia, simulando, sin congelarse, los eventos que tienen lugar durante la congelación y descongelación de células vivas y/o tejido. Este método utiliza la hipertonicidad del medio y un retorno a la isotonicidad del medio para agregar y eliminar crioprotectores. Como resultado, la concentración de los crioprotectores necesarios para la vitrificación puede reducirse, y/o puede reducirse el tiempo de exposición total requerido para tratar adecuadamente el sistema con crioprotectores, reduciendo de este modo la toxicidad de la solución de vitrificación. Este método se ha ampliado para lograr la eliminación de lesión por enfriamiento a temperaturas bajo cero en soluciones crioprotectoras sin congelación al aumentar la tonicidad del medio antes del enfriamiento, aumentando o sin aumentar la concentración de los constituyentes de la solución del vehículo. Los métodos de la técnica anterior implicaban disminuir la concentración de crioprotectores y, por lo tanto, la tonicidad transitoriamente efectiva del medio, antes del enfriamiento. Esto protege contra lesiones a temperaturas más altas (por encima de -30°C), pero agrava las lesiones a temperaturas más bajas (por debajo de -30°C). Sin embargo, en el presente documento se muestra que, sorprendentemente, al aumentar la tonicidad, las células se protegen a temperaturas bajo cero más altas e inferiores, sin la necesidad de reducir la concentración de crioprotectores para reducir la lesión por enfriamiento.

### **DEFINICIONES DE TONICIDAD Y DE LOS EFECTOS DE LAS SOLUCIONES SOBRE LA TONICIDAD**

30 El término "tonicidad" se refiere a un efecto observado de los solutos sobre el volumen de una célula expuesta a una solución que contiene los solutos. Las soluciones pueden ser hipotónicas, isotónicas o hipertónicas de forma permanente o transitoria dependiendo de su concentración y de la capacidad de los solutos en la solución para atravesar la membrana celular y entrar y salir de la célula.

35 Si el volumen de la célula en su estado natural no se cambia transfiriendo la célula a una solución, se dice que la solución es "isotónica". "Esto significa que la solución tiene la misma tonicidad, o concentración osmótica efectiva, que la solución intracelular.

Si el volumen de la célula aumenta al transferirse a la solución, se dice que la solución es "hipotónica". Esto significa que su concentración osmótica efectiva es inferior a la de la solución intracelular.

Si el volumen de la célula disminuye al transferirse a la solución, se dice que la solución es "hipertónica" o efectivamente más concentrada osmóticamente que la solución intracelular.

40 Si los solutos en la solución no impregnan la célula, y si, durante el transcurso del tiempo de la observación, los solutos intracelulares no se escapan de la célula, entonces la tonicidad de la solución depende únicamente de la concentración osmótica total de la solución. En el cuerpo, los solutos extracelulares se vuelven efectivamente impermeables por la "bomba" de sodio-potasio-ATPasa, y la concentración osmótica de los fluidos extracelulares es de aproximadamente 285 mOsm (285 miliosmolal), medida por la depresión del punto de congelación {punto de fusión equivalente a  $0.285 \text{ osmolal} \times (-1.86^\circ\text{C}/\text{osmolal} = -0.53^\circ\text{C})$ . Por lo tanto, una solución isotónica es aquella que tiene una osmolalidad efectiva de alrededor de 285 mOsm, aunque 300 mOsm a menudo se pueden tomar como una aproximación adecuada. Una solución hipertónica tendrá una concentración efectiva mayor de aproximadamente 285-300 mOsm, y una solución hipotónica tendrá una concentración efectiva menor de aproximadamente 285-300 mOsm.

50 Si se coloca una célula en una solución de 300 mOsm de dimetilsulfóxido, un soluto de permeación, comenzará a hincharse. Debido a que los solutos permeables pueden ingresar en la célula y ejercer un efecto osmótico igual en ambos lados de la membrana celular, dichos solutos no tienen efecto neto sobre el volumen celular, una vez que han alcanzado el equilibrio. Por lo tanto, están efectivamente ausentes. Por lo tanto, colocar una célula en una solución de 300 mOsm de dimetilsulfóxido es similar al efecto de colocar

5 una célula en agua pura. Debido a que el volumen celular depende de la ósmosis, que es el movimiento del agua desde una alta concentración de agua a las regiones de menor concentración de agua, una célula que se coloca en el agua se hinchará. Sin embargo, el dimetilsulfóxido es menos permeable a una célula que el agua y, por lo tanto, las células colocadas en dimetilsulfóxido (DMSO) se hincharán más lentamente que las células colocadas en agua pura.

10 Una célula colocada en una solución de 600 mOsm de DMSO se encogerá inicialmente, no se hinchará, debido al hecho de que la membrana celular es más permeable al agua que lo es a DMSO. En el caso extremo de permeabilidad muy baja pero finita a DMSO, la célula perderá la mitad de su agua al contacto con 600 mOsm de DMSO para aumentar la concentración celular al doble de la concentración inicial (300 miliosmoles/kg de agua se convierte en 600 miliosmoles por kg de agua si la cantidad de kg de agua se reduce a la mitad debido a la exosmosis). Después, sin embargo, la penetración de DMSO continuará y el volumen de la célula aumentará. Cuando la célula alcanza su volumen isotónico, contendrá aproximadamente 300 mOsm de DMSO y 300 mOsm de soluto intracelular, equilibrando la presión osmótica de la solución extracelular de 600 mOsm. Cuando el volumen de la célula se duplica, contendrá 150 mOsm de soluto intracelular y 450 mOsm de DMSO. La inflamación tenderá a continuar hasta que la concentración de soluto intracelular se reduzca a cero, lo que solo puede ocurrir cuando el volumen celular alcanza el infinito. El punto es que los solutos permeables como el DMSO pueden ser transitoriamente hipertónicos en el corto plazo, a pesar de que son el equivalente osmótico del agua (hipotónico) una vez que se ha permitido un período de tiempo para la penetración.

20 Si se coloca una célula en una solución que contiene 300 mOsm de DMSO y 300 mOsm de soluto impermeantes, la contracción inicial de la célula será la misma que en el caso de la transferencia de la célula a 600 mOsm de DMSO en agua, porque la osmolalidad extracelular es la misma en ambos casos. Sin embargo, cuando la célula vuelva al volumen isotónico, contendrá 300 mOsm de DMSO y 300 mOsm de soluto intracelular, lo que equilibrará los 300 mOsm de DMSO y 300 mOsm de solución extracelular impermeante osmóticamente, y no se producirán más cambios en el volumen celular. Este ejemplo ilustra la necesidad de una "solución de soporte" o "solución de vehículo" para utilizar en la adición y eliminación de crioprotectores permeables. La solución de vehículo "transporta" o administra el crioprotector a la célula de manera que la célula permanecerá en su volumen isotónico después de que el crioprotector haya penetrado completamente.

30 La tonicidad de la solución transportadora determinará el volumen de la célula en presencia de crioprotector de la misma manera que los impermeantes controlan el volumen de la célula en ausencia de crioprotector, una vez que cesan los flujos de crioprotectores. Tal como demostró Meryman (Cryobiology 19: 565-569, 1982), se establece una tonicidad normal en presencia de crioprotectores utilizando impermeantes a los mismos gramos por volumen de solución de unidad (% p/v) o moles por unidad de volumen de solución (molaridad) unidades de concentración como sería apropiado en ausencia del crioprotector. Esto es lógico porque es el volumen celular lo que se desea controlar y establecer un nivel dado de osmoles por unidad de volumen fuera de la célula dará como resultado el mismo nivel de osmoles por unidad volumen dentro de la célula, suponiendo que los crioprotectores permeantes penetran completamente y ocupan la misma fracción de volumen en la solución tanto intracelular como extracelularmente, una suposición generalmente válida.

En base a estas definiciones, las enseñanzas de la técnica anterior pueden traducirse ahora en lo que se refiere a la prevención de la lesión por enfriamiento en sistemas altamente crioprotectados (sistemas que contienen concentraciones vitrificables o casi vitrificables de crioprotectores).

45 Los glóbulos rojos se colocan en medios fuertemente hipertónicos (al menos aproximadamente de 4 a 5 veces más concentrados de lo normal, designados como 4-5X) a temperatura ambiente y se enfrían a 0°C cuando alcanzan los 10°C. Sin embargo, si están expuestos a las soluciones 4-5X a 0°C después de un enfriamiento previo a 0°C en una solución isotónica (1X), no se lisan. Además, si los glóbulos rojos se exponen a soluciones 4-5X a 0°C y a continuación se enfrían a temperaturas bajo cero sin congelación, tampoco se lisan. Por lo tanto, el choque térmico en los glóbulos rojos es un hecho específico que tiene lugar a 10°C y solo cuando la tonicidad de la solución es alta. La alta tonicidad causa lesiones por choque térmico, pero solo a temperaturas más altas. Por lo tanto, si se desea enfriar los glóbulos rojos a bajas temperaturas en soluciones de alta tonicidad, primero deben enfriarse en soluciones de baja tonicidad para evitar el choque térmico.

55 El método de la técnica anterior de los sistemas crioprotectados muestra que la hipertonicidad transitoria experimentada por las células colocadas en crioprotectores concentrados los sensibiliza a la lesión por enfriamiento de la misma manera que las soluciones hipertónicas permiten el choque térmico en los glóbulos rojos. Por lo tanto, la reducción de la concentración de crioprotectores y, por lo tanto, la

concentración efectiva transitoriamente hipertónica de la solución crioprotectora, antes de enfriar por debajo de 0°C, elimina la lesión por enfriamiento.

En la presente descripción, se descubre sorprendentemente que una estrategia completamente diferente resulta tanto factible como más efectiva que el método de la técnica anterior.

## 5 **EJEMPLOS**

En contradicción directa con el método de la técnica anterior, el presente método logra la eliminación de la lesión por enfriamiento así como otros objetivos aumentando, no disminuyendo, la tonicidad del medio antes del enfriamiento. Existen dos variantes del método. En la primera variante, el medio se hace hipertónico al aumentar la concentración de la solución del vehículo simultáneamente con un aumento en la concentración del (de los) crioprotector(es). En la segunda variante, el medio se vuelve hipertónico añadiendo soluto(s) impermeante(s) no tóxicos, y el(los) soluto(s) impermeante(s) no tóxico(s) no necesitan ser agregados al mismo tiempo que el crioprotector(s) permeante (el término "crioprotector" tal como se utiliza en este documento, puede referirse tanto a un solo crioprotector como a una mezcla de diferentes crioprotectores). En ambas variantes del método de protección hipertónica, se pueden reducir los requisitos de crioprotectores permeantes, se puede reducir el tiempo de exposición a crioprotectores permeantes y se puede lograr una dilución más rápida y segura de los crioprotectores después de la utilización, así como una protección contra la lesión inducida por enfriamiento. También son posibles diversas combinaciones de las dos variantes principales del método de protección hipertónica.

La adición de solutos impermeantes a crioprotectores antes del enfriamiento bloquea la lesión por enfriamiento sin la necesidad de reducir la concentración de crioprotectores para evitar la lesión por enfriamiento. Además, en la presente memoria descriptiva se reconocen dos regímenes térmicos para la reducción hipertónica de la lesión por enfriamiento, y se incluyen medios para optimizar la reducción de la lesión por enfriamiento mediante el uso de protección hipertónica optimizada sobre ambos regímenes térmicos.

La primera variante de estos métodos es un método en el que la solución de vehículo para crioprotectores se puede concentrar más para reducir la concentración de agentes permeantes necesarios para la vitrificación y facilitar el lavado rápido de los crioprotectores, en analogía a los procesos de congelación -la dilución mediada por concentración y descongelación tanto del vehículo como del crioprotector durante la congelación y descongelación normales.

El ámbito de la invención se define por medio de las reivindicaciones adjuntas.

Los siguientes ejemplos ilustran diversos medios de practicar el método de la presente invención.

### **EJEMPLO 1**

**Tolerabilidad de tonicidad enorme en presencia de grandes concentraciones de crioprotectores y tolerabilidad de cambios de pasos enormes positivos y negativos en la tonicidad junto con grandes cambios en la concentración de crioprotectores**

La Figura 1 muestra los efectos de simular la congelación de láminas corticales renales de conejo de 0.5 mm de grosor en DMSO al 10% p/v o en Veg al 10% p/v (Veg es una mezcla de DMSO (3.10 M), formamida (3.10 M) y glicol de etileno (2.71 M) en proporciones que se describen a continuación y se explican en la patente US6395467. En esta figura y todas las demás, las "viabilidades" de las láminas están indicadas por las proporciones K/Na del tejido. La relación K/Na se mide en todos los casos después de la restauración de las condiciones fisiológicas in vitro durante 90 minutos utilizando métodos estándar y publicados.

Los dos grupos superiores de barras muestran los efectos de la exposición al 10% de DMSO o al 10% de Veg. solamente. Estas concentraciones son inocuas, y la viabilidad es el 100% de la de las láminas de tejido fresco. Los datos del 10% de crioprotectores (DMSO o Veg) representan lo que las láminas experimentarían en el momento en que comienza la congelación.

El siguiente grupo de barras desde la parte superior de la figura es otro control, que muestra los efectos de exponer láminas al 20% p/v de Ve. solamente sin congelación simulada. Nuevamente, las proporciones K/Na están en el intervalo esperado para el tejido fresco no tratado.

Los resultados clave son los tres grupos de barras restantes, etiquetados como "20%/40%", "hasta 40% D" y "hasta 40% V".

5 En el primero de estos grupos, "20%/40%", la simulación supuso que las láminas se congelaron en un 20% de Veg. hasta que la concentración total de Veg. alcanzó el 40% o, en otras palabras, hasta que el volumen líquido de la solución se redujo a la mitad del volumen inicial. En dicha situación, la solución de vehículo, RPS-2 (menos calcio y magnesio) también se concentraría por un factor de dos. Después de la exposición a esta solución, las láminas se transfirieron de 40% de Veg. en 2X RPS-2 a 20% de Veg. en 1X RPS-2.

Sorprendentemente, este grupo no demostró esencialmente toxicidad a pesar de la exposición a una solución de vehículo concentrada por un factor de dos a 0°C (todas las exposiciones se realizaron a 0°C).

10 En el siguiente grupo, "hasta 40% D", la simulación fue de congelación en 10% de DMSO hasta una concentración total de 40% de DMSO, lo que significa que, en este caso, el vehículo RPS-2 también se concentró cuatro veces. En este experimento, las láminas expuestas al 40% de DMSO se diluyeron, después de esta exposición, de nuevo a la solución de referencia inicial en un solo paso, sin ningún "tampón osmótico" como por ejemplo manitol añadido para compensar la dilución del crioprotector. En otras  
15 palabras, las láminas se transfirieron desde 40% p/v de DMSO en 4X RPS-2 a 10% de DMSO en 1X RPS-2. Después de esta dilución inicial, el crioprotector restante se lavó en presencia de manitol 300 mM como un tampón osmótico, de acuerdo con los métodos publicados previamente. Este grupo resultó dañado, pero esto no es sorprendente porque se sabe que el 40% de DMSO es muy tóxico.

20 El grupo final etiquetado "hasta el 40% V" es más notable. En este grupo, la simulación fue de congelación en 10% de Veg a una concentración total de 40% de Veg, lo que significa que, de nuevo, el vehículo RPS-2 también se concentró cuatro veces. A continuación, las láminas se transfirieron desde 40% de Veg en 4X RPS-2 a 10% de Veg en 1X RPS-2 en un paso, y el 10% de Veg se lavó gradualmente con 300 mM de manitol como un tampón osmótico. Sorprendentemente, este grupo no mostró toxicidad demostrable atribuida ni al Veg mismo ni al vehículo concentrado ni a la abrupta reducción de 4 veces en la concentración  
25 tanto en el Veg como en el RPS-2 al diluirse del 40% de Veg y 4X RPS-2 al 10% de Veg en 1X RPS-2 en un solo paso. Por lo tanto, la congelación y descongelación simulada es una forma aceptable de añadir rápidamente y eliminar rápidamente grandes concentraciones de crioprotector.

30 Generalmente, en la técnica anterior, cuando llega el momento de eliminar altas concentraciones de crioprotector de una célula o tejido u órgano, es necesario aumentar la tonicidad del medio añadiendo una cantidad extra de soluto impermeante, como manitol o sacarosa, para evitar que las células se hinchen debido a la reducción en la concentración de crioprotector extracelular. El ejemplo 1 muestra la viabilidad de un planteamiento opuesto: la reducción de la tonicidad conjuntamente con la reducción de la concentración de crioprotectores, una nueva técnica.

35 En la Figura 1, las barras grises y oscuras se refieren cada una de ellas a seis sectores duplicados tratados como subgrupos separados. Tal como resulta evidente a partir de la inspección de la figura, ambos conjuntos duplicados de cortes para cada tratamiento estuvieron de acuerdo, validando los resultados promedio generales para cada grupo, que son proporcionados por las barras blancas.

40 En el Ejemplo 2, se determinó que las concentraciones de crioprotectores que pueden vitrificar debido a la incorporación de una solución de vehículo 2X tienen una toxicidad aceptable y suprimen profundamente la lesión por enfriamiento.

## EJEMPLO 2

### Vitrificación con una solución de vehículo 2X con crioprotector

45 La literatura publicada anterior ha indicado que la lesión por frío en el riñón probablemente se deba a la contracción celular causada por la penetración incompleta de agentes crioprotectores en las células renales. Por lo tanto, exponer las láminas a una solución de vitrificación que contiene una solución de vehículo 2X antes del enfriamiento brusco a -20°C provocaría una lesión por frío peor que enfriando las láminas a la misma temperatura de la misma manera, pero en presencia de una solución de vehículo 1X. De hecho, se observó exactamente lo contrario. Los resultados se proporcionan en la Figuras 2 y en la Tabla 1.

50 En la Figura 2, las láminas se expusieron a dos soluciones de vitrificación o solo a la solución del vehículo, como sigue:

## ES 2 665 339 T3

"Con" se refiere a controles expuestos solo a RPS-2 a 0°C.

5 V16 se refiere a la exposición durante 20 min a 0 C a una solución de vitrificación conocida como "V16", una solución que es ventajosa en vista de su muy alta estabilidad frente a la congelación al enfriar y al calentar y a la vista de su baja toxicidad. V16 es lo mismo que el 55% p/v de solutos Veg en 1X RPS-2, excepto que se agrega 2% de DMSO a la fórmula. Se añadió V16 en pasos de 1/16, 1/8, 1/4, 1/2 y con plena capacidad, a continuación se diluyó, en presencia de manitol 300 mM a lo largo de todo el proceso, a 1/2, 3/8, 1/4, 1/8, 1/16 y 0% de plena capacidad, a continuación se retornó a 1X RPS-2 sin manitol. La concentración de RPS-2 fue 1X durante todo el procedimiento. Cada paso fue de 20 minutos de duración.

10 "V2X" se refiere a la exposición a una solución que contiene 52% p/v de solutos Meg (DMSO, formamida y etilenglicol, en las proporciones estándar) en una solución de vehículo 2X RPS-2 y, como de costumbre, a 0°C durante 20 min. Esta solución se introdujo introduciendo primero, en una serie de pasos estándar (habitualmente, 1/16, 1/8, 1/4 y 1/2, de la concentración final de capacidad plena de los crioprotectores permeantes), la mitad de la capacidad plena de concentración de crioprotector y, a continuación, transfiriendo láminas a la solución de concentración completa que contiene 2X RPS-2 (menos Ca y Mg).  
15 Las láminas se diluyeron a 1/2 de la plena capacidad y a 1X de RPS-2 en una etapa posterior, se introdujo a continuación manitol 300 mM para una dilución adicional del crioprotector. Todos los pasos fueron de 20 minutos de duración.

El grupo "C16" es un grupo que se enfrió bruscamente a -20°C transfiriendo láminas de V16 a 0°C (después de 20 minutos a esa temperatura) a V16 a -20°C, y manteniéndolas a -20°C durante 20 minutos.

20 El grupo "C2X" se trató de manera idéntica, excepto que la solución crioprotectora fue la solución "V2X" en lugar de la solución "V16".

25 Finalmente, el último grupo implicó un experimento híbrido entre el mejor método conocido en la técnica anterior para evitar lesiones por enfriamiento y la utilización actual de una solución de vehículo hipertónica (mayor que 1X). En este grupo, las láminas se expusieron solo al 40% de Veg a 0°C durante 20 min, en 1X RPS-2, y a continuación se transfirieron a la solución V2X preenfriada a -20°C y se mantuvieron durante 20 min a esa temperatura como en los otros grupos de enfriamiento.

**TABLA 1**

Tratamiento	Tonicidad	K/Na	SEM	% de control
Controles (1X RPS-2)	1X	4.93	.21	100
V16 (Veg* en 1X RPS-2 + 2% p/v DMSO)	1X	4.27	.14	86.6
V2X (Veg reducido en 3% p/v en 2X RPS-2)	2X	4.66	.19	94.6
C16 (V16 refrigerado a -20°C)	1X	3.04	.15	61.7
C2X (V2X refrigerado a -20°C)	2X	4.33	.23	87.9
C40 (40% p/v de Veg CPA a 0°C y a continuación transferencia a V2X a -20°C)	1X 2X	3.68	.14	74.6

\* Veg = 16.84% p/v de etilenglicol más 13.96% p / v de formamida más 24.2% p/v de DMSO (concentración total = 55.00% p/v); V2X contiene los mismos solutos reducidos por un factor de 52/55; 40% p/v Veg CPA consiste en los mismos solutos reducidos por un factor de 40/55.

5 Los resultados, tal como se indica en la Figura 2, son extraordinarios. En primer lugar, tal como se ha señalado anteriormente, el grupo V16 obtuvo unos muy buenos resultados, proporcionando una relación K/Na promedio de 4.22 frente a la relación de control de 4.83, que representa la recuperación del 87% de la viabilidad de control (ver también la documentación tabular). Sin embargo, el grupo V2X consiguió unos resultados todavía mejores, alcanzando el 96% de la viabilidad de control (tercera barra desde abajo, K/Na = 4.64). Las láminas de enfriamiento en V16 a -20°C llevaron a la caída esperada en la viabilidad (K/Na de 3.05, que representa solo el 63% de la viabilidad de control). Pero las láminas de enfriamiento en V2X a -20°C produjeron una relación K/Na de 4.34, o 89.9% de la viabilidad de control. Finalmente, utilizar tecnología de la técnica anterior para eludir lesiones por enfriamiento, es decir, enfriar láminas en una concentración menor de crioprotector para evitar la lesión por enfriamiento mediada por contracción celular, pero enfriarlas sumergiéndolas en V2X, que es hipertónico (concentración de solución de vehículo superior a 1X), dio como resultado un K/Na aproximadamente a mitad de camino entre los resultados del enfriamiento en el vehículo 1X (el grupo C 16) y los resultados del enfriamiento en el vehículo 2X (el grupo C2X). Por lo tanto, resultó perjudicial enfriar desde el 40%, 1X en comparación con el enfriamiento desde el 52%, 2X, en total contradicción con la técnica anterior. Además, resultó más beneficioso refrigerar en una solución 2X incluso comenzando desde la solución inicial al 40%, 1X, en oposición a la refrigeración en una solución 1X, nuevamente en contradicción con la técnica anterior. Estos datos forman la base experimental inicial para la utilización de soluciones hipertónicas para reducir o eliminar la lesión por enfriamiento.

### EJEMPLO 3

25 Los resultados sorprendentes que se muestran en la Tabla 1 se confirmaron y ampliaron mediante la evaluación del nivel umbral de hipertonicidad necesario para la supresión de la lesión por enfriamiento. Tal como se muestra en la Tabla 2, el umbral de protección es asombrosamente bajo, y parece estar cerca de 1.2X.

**TABLA 2**

Crioprotector * y temperatura	Tonicidad	K/Na	SEM	% de control
Ninguno (1X portador LM5), 0°C	1.0X	7.37	0.13	100
Veg-3% D(1)F en LM5, 0°C	1.0X	7.48	0.20	101
Veg-3% D(1)F en 1. 5X LM5, 0°C	1.5X	7.38	0.23	100
Veg-3% D(1)F en 1X LM5, 0°C, transferido al mismo a-20 C	1.0X	5.37	0.10	72.9
Veg-3% D(1)F en 1.2X LM5, 0°C Transferido al mismo a-20 C	1.2X	6.75	0.15	91.7
Veg-3% D(1)F en 1.5X LM5, 0°C, transferido al mismo a-20 C	1.5X	7.17	0.15	97.3

\* Veg-3% D(1)F = 16.84% p/v etilenglicol más 12,86% p/v formamida más 22,3% p/v DMSO. Este fue el experimento 00-024, llevado a cabo el 31 de agosto de 2000. Todas las soluciones fueron expuestas durante 20 minutos a 0°C antes de la refrigeración, y después de la refrigeración se mantuvieron en las mismas soluciones durante 20 min adicionales. 12 muestras en cada grupo, como en la mayoría de los experimentos informados en este documento. Todos los grupos de crioprotector de potencia media en LM5 isotónico, a continuación se transfirieron a crioprotector de plena capacidad en la tonicidad establecida de LM5 y se lavaron utilizando crioprotector de media capacidad más manitol 300 mM en la primera etapa de lavado. Se agregaron concentraciones más bajas que la mitad de potencia y se eliminaron como 1/16, 1/8 y 1/4 de las soluciones de concentración total, y también se utilizó una solución 3/8 de la concentración total en la fase de lavado. Todas las soluciones de lavado contenían manitol 300 mM.

La Tabla 3 muestra que el factor que rige la respuesta al enfriamiento es principalmente el nivel de hipertonicidad, independientemente de cómo se establezca. En esta tabla, el efecto de aumentar las concentraciones de todos los solutos de solución portadora (excepto para Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, que se omiten regularmente de soluciones superiores a 1X y en soluciones que contienen crioprotectores para evitar problemas de solubilidad) se compararon con el efecto de agregar polímeros no penetrantes a la solución. Tal como se puede apreciar, los resultados son similares entre los dos planteamientos. Las tonicidades de los aditivos impermeantes de la Tabla 3 se proporcionan en detalle en la Tabla 4.

**TABLA 3: Prevención de la lesión por refrigeración polímeros crioprotectores**

Crioprotector * y temperatura	Tonicidad	K / Na	SEM	% de control
Controles no tratados en LM5, 0°C	1.0X	7.19	0.14	100
Veg-3% D(1)F en 1X LM5, 0°	1.0X	6.88	0.16	96
Veg-3% D(1)F en 1.5X LM5, 0°	1.5X	6.58	0.16	91.5
Veg-3% D(1)F más 0.7 Polímeros X, a 0°C (en 1X LM5)	1.7X	6.92	0.16	96.3
Veg-3% D(1)F en 1.5X LM5, transferido al mismo a -20°C	1.5X	7.31	0.21	102
Veg-3% D(1)F en 1X LM5 más 0.7X polímeros, transferidos al mismo a -20°C	1.7X	6.48	0.14	90.1

\* Veg-3% D(1)F = 16.84% p/v etileno glicol más 12.86% p/v de formamida más 22.3% p/v de DMSO. Los polímeros 0,7X son PVP al 7% p/v de peso molecular medio de 5,000 ("PVP 5000") más 1% p/v de X1000 (un producto de alcohol poli vinílico comercializado por 21st Century Medicine, 10844 Edison Court, Rancho Cucamonga, CA 91730; <http://www.21CM.com>) y decaglicerol al 1% p/v. Este fue el experimento 00-025. Todas las soluciones expuestas durante 20 minutos a 0°C antes del enfriamiento, y después del enfriamiento se mantuvieron en las mismas soluciones durante 20 min adicionales. Los grupos consisten en 12 muestras cada uno. La hipertonicidad estuvo presente solo en el crioprotector de plena capacidad, mientras que otras soluciones eran isotónicas. PVP 5000 es un polímero particularmente efectivo para promover la vitrificación, y tanto X1000 como el decaglicerol son antinucleadores útiles para la promoción de la vitrificación.

**TABLA 4: Algunas osmolalidades y tonicidades de referencia útiles**

Solución	ity	Tonicidad (X)
LM5	285 +/- 3mOsm	1.0
LM5 + 1% p/v de decaglicerol	319 mOsm	1.12
LM5 + 7% p/v PVP 5,000	417 mOsm	1.46
LM5 + 7% p/v PVP 5,000 + 1% p/v X1000 + 1% p/v decaglicerol	478 mOsm	1.68
LM5 + 1% p / v X1000 +1% p / v decaglicerol	346 mOsm (calculado)	1.21 (calculado)

\* La composición de LM5 contiene 90 mM de glucosa, 45 mM de manitol, 7.2 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5mM de glutatona reducida, 28.2 mM de KCl, 10 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 1 mM de

Adenina HCl, y se describe en la Patente nº US2002076687, "Una solución ventajosa de portador para concentraciones vitrificables de crioprotectores, y mezclas crioprotectoras compatibles", Fahy et al.

#### **EJEMPLO 5**

##### **Protección contra la lesión por enfriamiento a temperaturas inferiores a -20°C**

5 Los datos de la Figura 2 y de las Tablas 2 y 3 muestran una reducción de casi el 30% de la relación K/Na por enfriamiento, en relación con lo que se obtuvo con la misma solución crioprotectora 1X en 0°C. Esto es  
10 cuantitativamente lo mismo que la caída informada anteriormente en la corteza renal del conejo para una solución crioprotectora diferente (por ejemplo, en Fahy et al., en Cell Biology of Trauma, JJ Lemasters y C. Oliver, Eds, CRC Press, 1995, pp. 333-356) y está de acuerdo con muchas observaciones no publicadas.  
15 Además, se sabe que las lesiones por enfriamiento se vuelven aún más graves a temperaturas inferiores a -20°C. Por lo tanto, en experimentos adicionales, la falta de lesión a temperaturas en las que se espera una  
20 lesión se toma como evidencia para la respuesta exitosa de la lesión por enfriamiento.

Se realizaron muchos experimentos con la solución final enumerada en la Tabla 3, que tiene una tonicidad  
15 de 1,7X, incluyendo experimentos que investigan los efectos de temperaturas inferiores a 20°C. En la Figura 3 se da un resumen de los resultados de estos experimentos. Cada tipo de símbolo en la Figura 3 refleja un experimento separado hecho en un día separado. En la mayoría de los experimentos con temperaturas  
20 inferiores a -20°C, la exposición a baja temperatura se logró enfriando las láminas en contenedores en lugar de transfiriendo láminas sin protección a soluciones preenfriadas tal como se hizo para experimentos a -  
25 20°C. Esto fue necesario por la solidificación de estas soluciones no congelantes a medida que las temperaturas se acercan a la temperatura de transición vítrea. Por lo tanto, la Figura 3 no solo extiende la observación de la supresión hipertónica de la lesión por enfriamiento a temperaturas más bajas, sino que  
30 también extiende la observación a tasas moderadas de enfriamiento (aproximadamente 2-20°C/min).

Mientras que una tonicidad de 1.7X es capaz de suprimir en gran medida la lesión por enfriamiento a -20  
25 °C, no puede suprimir las lesiones por enfriamiento a temperaturas más bajas. La lesión continúa aumentando hasta que la temperatura alcance alrededor de -70°C a -90°C, y no aumenta aún más a  
30 temperaturas más bajas. A pesar de que no se suprimen todas las lesiones, la viabilidad retenida a -135°C, que está por debajo de la temperatura de transición vítrea de la solución, es similar a la viabilidad registrada a -20°C para las soluciones enfriadas a una tonicidad de 1X (representada por el trazo de la línea  
35 discontinua al 68% de recuperación, que es el 71% del valor inicial de -96% a 0°C, que refleja los niveles informados en las Tablas 1 y 2). La capacidad de posponer una lesión que normalmente se ve a -20°C por  
40 debajo de la temperatura de transición vítrea es un avance notable.

La Figura 3 también indica indirectamente que la lesión por enfriamiento es bioquímica y no es un artefacto  
35 de formación de hielo. (La nucleación del hielo tiene una probabilidad cero por encima del punto de fusión de la solución crioprotectora, que es cercana a -40°C, y aumenta solo cerca de la temperatura de transición vítrea, o por debajo de -100°C, un patrón opuesto al patrón de la lesión por enfriamiento. La falta de  
40 asociación de lesión con formación de hielo es evidencia de que los resultados no son un artefacto de protección inadecuada del tejido de la formación de hielo, sino que representan un efecto biológico real y demuestran una atenuación real del mismo.

Además, dado que estas conclusiones pertenecen incluso a tejidos que han sido vitrificados (la temperatura  
45 de transición vítrea estimada para esta solución es de aproximadamente -123°C), de la Figura 3 se desprende que todas las lesiones causadas por la vitrificación y el recalentamiento se pueden atribuir a la combinación de lesión por enfriamiento y toxicidad crioprotectora, ambos abordados por la presente  
50 invención. Esto pone el significado de la presente invención en una perspectiva clara.

#### **EJEMPLO 6**

##### **Intervalo de tonicidad óptima para suprimir la lesión por refrigeración a alta temperatura**

La Figura 3 implica que 1.7X no es la tonicidad óptima para suprimir la lesión por refrigeración, porque la  
45 lesión por enfriamiento ya es aparente a -20°C, en contraste con los efectos informados para 1.5X soluciones en las Tablas 2 y 3. Por lo tanto, resultó útil definir el intervalo de tonicidad óptimo para la protección contra lesiones por enfriamiento a alta temperatura y baja temperatura.

La Figura 4 muestra una recopilación de datos de muchos experimentos en los que se enfriaron muchas  
50 soluciones crioprotectoras diferentes de 0°C a aproximadamente -22°C a diferentes tonicidades. Cada símbolo representa la media de 12 láminas corticales renales de conejo. Para simplificar, se omiten las barras de error, que suelen ser de +/- 5%.

En base a estos experimentos, parece que la tonicidad óptima para la protección es de alrededor de 1.2  
55 veces isotónica a alrededor de 1.5 veces isotónica. La protección neta es visible a tonicidades de 2.2X, pero esta tonicidad parece estar cerca del límite externo de utilidad. Varias soluciones en el intervalo de 2 - 2.2X se excluyeron debido a las bajas relaciones K/Na antes del enfriamiento (exposición a 0°C que produce

relaciones K/Na inferiores al 90% del control); puede ser que las tonicidades más altas puedan tener efectos perjudiciales cuando los niveles de fondo de los crioprotectores son lo suficientemente altos como para ser vitrificables. En cualquier caso, parece que las mejores tonicidades para usar a temperaturas más altas son de 1.2 a 1.5X.

5 En la Figura 4, el triángulo negro grande trazado en 1.2X representa la elevación de la tonicidad al aumentar la concentración de la solución de alimentación. Los cuadrados en 1.2X reflejan experimentos en los que la tonicidad se elevó mediante la inclusión de polímero al 2% p/v (decaglicerol + X1000, 1% de cada uno). Los triángulos blancos corresponden a experimentos en los que la tonicidad se elevó por adición de polímero al 2% p/v a 0°C en una concentración de crioprotector, y las láminas se transfirieron posteriormente a soluciones crioprotectoras más concentradas a la misma tonicidad 1.2X a -22°C. Contrariamente al último experimento de la Tabla 1, en el cual las láminas también se transfirieron a una concentración mayor de crioprotector a una temperatura más baja, pero comenzando en 1X, los triángulos blancos documentan que se retuvo la protección completa cuando la tonicidad de los componentes no permeantes fue efectiva antes del enfriamiento y se mantuvo constante durante el cambio en la concentración de crioprotectores. En todos los demás casos que se muestran en la figura, tanto la tonicidad como la concentración de crioprotector se mantuvieron constantes de 0°C a -22°C.

### EJEMPLO 7

20 **Tonicidades óptimas para suprimir la lesión por enfriamiento lento a temperaturas de -100°C e inferiores, y métodos efectivos que implican dos etapas de exposición hipertónica para la optimización de la supresión de lesiones por refrigeración**

Los resultados presentados anteriormente indican que el óptimo de tonicidad es bastante estrecho tanto a altas como a bajas temperaturas. La Figura 5 proporciona más información sobre el locus del óptimo y sobre una estrategia para ampliar el óptimo. La Figura 5 muestra los resultados de dos tipos de experimentos: Primero, la Figura 5 muestra los resultados de soluciones de enfriamiento que tienen tonicidades de 1.7, 1.8, 2.1 y 2.2 veces isotónicas (círculos grises). Hay una clara tendencia a la baja a medida que aumenta la tonicidad, lo que sugiere que las tonicidades por debajo de 1.7 arrojarán mejores resultados que los ya muy buenos resultados presentados en la Figura 3. En segundo lugar, se informan los resultados de muchos experimentos (puntos blancos y negros) en los que se usó una tonicidad para enfriar a aproximadamente -22°C, y a continuación la tonicidad se elevó antes de un enfriamiento más profundo (permitiendo al menos 20 minutos para que la tonicidad más alta fuera experimentada por las láminas de tejido de 0.5 mm de espesor a -22°C). En un caso extremo, cambiar de 2.0X a 2.7X a -22°C antes de enfriar a -100°C (punto trazado a 2.7X) permitió una buena recuperación, mientras que se prevería una recuperación deficiente utilizando un protocolo en el que 2.7X está presente a todas las temperaturas desde 0°C hasta -100°C, basándose en los puntos grises que se muestran en la figura. En un caso más moderado, las muestras se enfriaron a -22°C en tonicidades que varían de 1.2X a 2X (1.2X a 1.5X en todos los casos menos uno) y a continuación se cambió a 1.7X antes de un enfriamiento adicional (puntos negros trazados a 1.7X) funcionó en promedio mejor que las muestras que fueron enfriadas en 1.7X desde cero grados hasta las temperaturas finales (puntos grises a 1.7X). Esta estrategia puede ser útil para soluciones de vitrificación que pueden requerir mayores tonicidades que las óptimas para la inhibición de la lesión por enfriamiento, ya que algunos de los efectos perjudiciales de estas tonicidades supraóptimas pueden negarse utilizando tonicidades más bajas a temperaturas más altas antes de saltar a la tonicidad final necesaria. En cualquier caso, la utilización del planteamiento de tonicidad en dos pasos (en el que la primera tonicidad fue de 1.2X) arrojó recuperaciones consistentemente superiores al 70% para 1.6X y al 80% para 1.5X, con una única recuperación de casi el 90% para 1.4X, y con una recuperación del 95% para una solución cuya tonicidad final fue de 1.5X. En el último caso, la temperatura final fue de -130°C, y la solución utilizada para enfriar a esta temperatura fue Veg -3% D(1)F + 7% de acetol + 1% X1000 + 4% de decaglicerol en una solución de vehículo LM5. Estos resultados se comparan favorablemente con la recuperación de ~25-30% obtenible después de la vitrificación en VS41A y la recuperación de ~50-60% obtenible con las soluciones descritas en la Patente de Estados Unidos nº US6395467. En base a los datos en las Figuras 3, 4 y 5, resultó evidente que una buena tonicidad para enfriar a aproximadamente -22°C podría estar en el medio del intervalo entre 1.2X y 1.5X. En consecuencia, se realizó el siguiente experimento. En la descripción del experimento a continuación, todos los porcentajes son porcentaje peso/volumen (% p/v, o gramos por decilitro).

### Tratamiento de Grupo

- 1 Controles (solución portadora LM5 solamente)
- 55 2 Exponer a la siguiente solución durante 20 minutos a 0°C:  
Veg-3% D(1)F,  
más 1% X1000 más 2.5% de decaglicerol (1.35 veces tonicidad)
- 3 Exponer a la misma solución como en el grupo 2 de la misma manera, pero a continuación se transfiere a una solución a -22°C que contenga los ingredientes anteriores pero que contenga también un 7% de acetol y un 1.5% de decaglicerol adicional, y mantener esa solución durante 30 minutos para equilibrarla (1.35X salta a 1.5X).
- 60

## ES 2 665 339 T3

4 Igual que el grupo 3, pero utilizando 7% de etilenglicol en lugar de 7% de acetol

5 Igual que el grupo 3, pero frío hasta -110°C.

5 La solución utilizada en los grupos 3 y 5 es virtualmente estable al calentarse a una velocidad de 5°C/minuto (solo el 0.2% de la masa de la solución puede cristalizar a este coeficiente de calentamiento). La solución utilizada en los grupos 4 y 6 es estable al calentarse a una velocidad de 2.9°C/min, basándose en el mismo criterio. En consecuencia, estas soluciones son aplicables a sistemas grandes como órganos y tejidos de ingeniería.

Los resultados del experimento anterior son los siguientes:

**TABLA 5**

10

Grupo	K/Na	% de Control	SEM en % de Control
1	5.60	100	2.23
2	5.86	104.6	2.51
3	4.87	86.9	2.20
4	5.34	95.3	1.25
5	4.89	87.3	1.93

15

Los resultados de la Tabla 5 indican que una solución 1.35X es inocua a 0°C, y que el enfriamiento de la misma en dos soluciones de vitrificación produjo una alta recuperación de -22°C, que en un caso llegó al 95%. El enfriamiento adicional en la solución 1.5X a -110°C no produjo lesión más allá de lo observado a -22°C para la primera solución de vitrificación. Se está llevando a cabo otra variación de este experimento, en la que se mantiene la tonicidad a 1.35X a temperaturas tanto altas como bajas, y se espera que produzca buenos resultados.

### Resumen

20

25

30

35

Estos ejemplos indican que, a diferencia de la técnica anterior, el enfoque de hipertonicidad puede eliminar hasta el 95% de toda lesión asociada con la exposición de tejidos vivos a concentraciones vitrificables, enfriarlas por debajo de la temperatura de transición vítrea, recalentarlas y eliminar el crioprotector, y que la técnica se refiere a los protocolos de enfriamiento rápido y lento. Por lo tanto, la presente invención hace que la perspectiva de la crioconservación de estructuras grandes y delicadas, como por ejemplo órganos y tejidos de ingeniería, se acerque drásticamente a la realización práctica. Además, los protocolos óptimos para el cambio de tonicidad en dos pasos no se han definido con precisión, pero dicho ajuste de precisión se habilita en base a la presente descripción. Además, los ejemplos presentados en este documento pueden no definir con precisión la tonicidad óptima para todos los sistemas vivos. Sin embargo, el método de hipertonicidad puede practicarse para todos los sistemas vivos basándose en la presente descripción, ya que el intervalo óptimo de tonicidad se puede encontrar para cualquier sistema vivo basado en los ejemplos proporcionados en este documento de la capacidad de identificar dicho intervalo para un sistema. De manera similar, los límites osmóticos tolerables para los diversos sistemas vivos pueden variar, pero todos los sistemas pueden someterse al protocolo de simulación de congelación para determinar cuáles son los límites para sistemas específicos. Los límites osmóticos para muchas células son ampliamente conocidos. Además, para combatir la lesión por enfriamiento, se anticipa que, en los ejemplos del presente documento, el nivel más deseable de hipertonicidad será generalmente menor que el límite osmótico superior del sistema. Otras variaciones de las formas de realización preferentes serán evidentes para un experto en la técnica con referencia a las siguientes reivindicaciones.

**Reivindicaciones**

1. Un método para reducir o eliminar la lesión por enfriamiento durante la crioconservación por vitrificación de sistemas vivos, en que dicho método comprende:
  - 5 añadir a un sistema vivo un medio de preservación que comprende una solución de vehículo y uno o más crioprotectores en una concentración suficiente para inducir la vitrificación por refrigeración; y
  - enfriar el sistema vivo a una temperatura por debajo de aproximadamente 0°C;
  - caracterizado porque**
  - 10 el medio de preservación comprende polímeros no penetrantes en concentraciones que aumentan la tonicidad del medio de conservación a 1.2 a 1.7 veces isotónico para reducir o eliminar la lesión por enfriamiento.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en que los polímeros no penetrantes se seleccionan del grupo que consiste en pirrolidol polivinilo de una masa molecular media de 5000 daltons, poliglicerol, copolímero de alcohol polivinilo-acetato polivinilo y mezclas de los mismos.
3. El método de la reivindicación 1, en que la tonicidad es de 1.2 a 1.5 veces isotónica.
- 20 4. Un método para reducir o eliminar la lesión por enfriamiento durante la crioconservación por vitrificación de sistemas vivos, en que dicho método comprende:
  - 25 añadir a un sistema vivo un medio de preservación que comprende una solución de vehículo y uno o más crioprotectores en una concentración suficiente para inducir la vitrificación por refrigeración; y
  - enfriar el sistema vivo a una temperatura por debajo de aproximadamente 0°C;
  - caracterizado porque**
  - 30 el medio de preservación comprende solutos de solución de vehículo en concentraciones que aumentan la tonicidad del medio de conservación a 1.2 a 1.7 veces isotónico para reducir o eliminar la lesión por enfriamiento.

FIG. 1/5

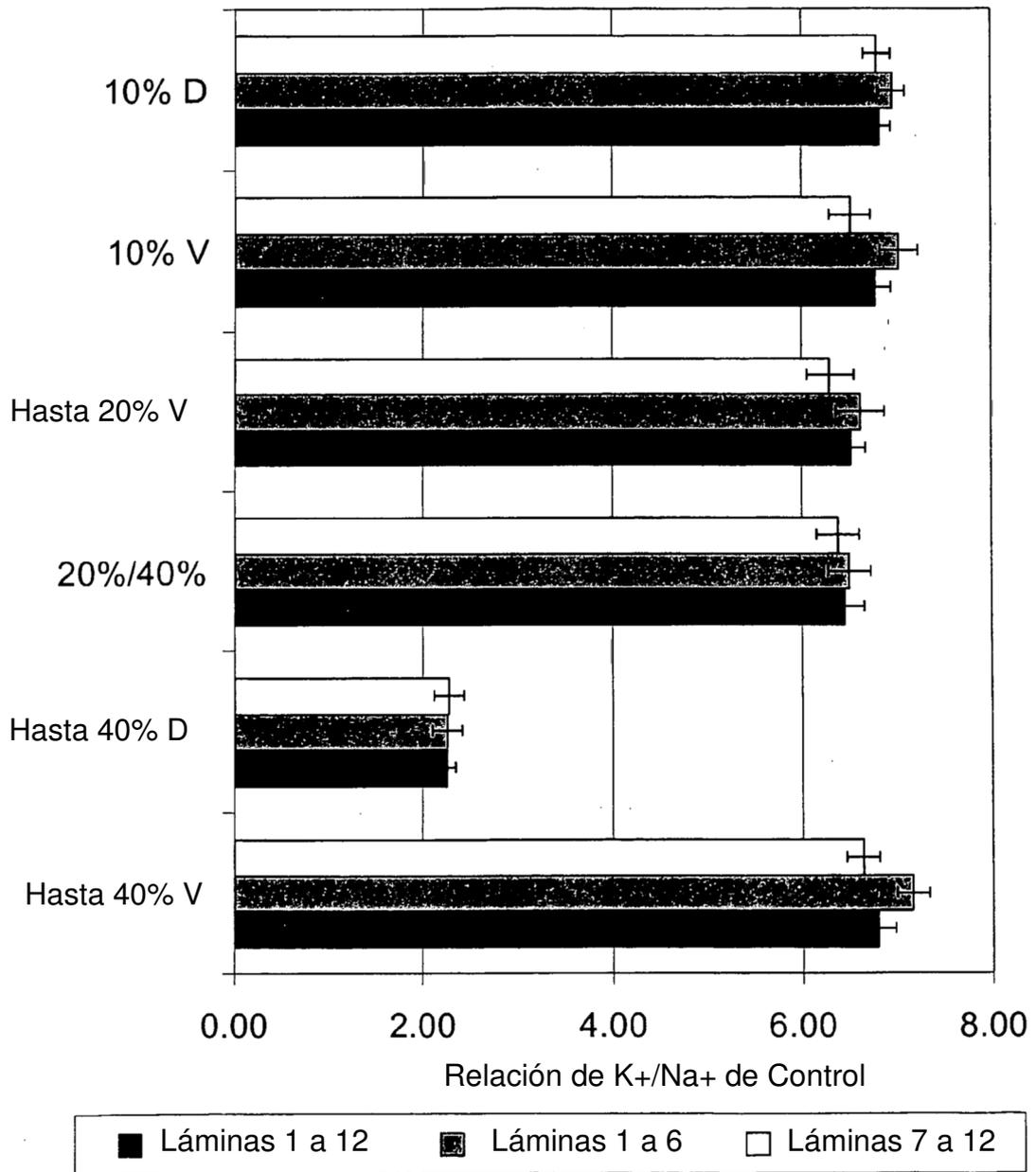


FIG. 2/5

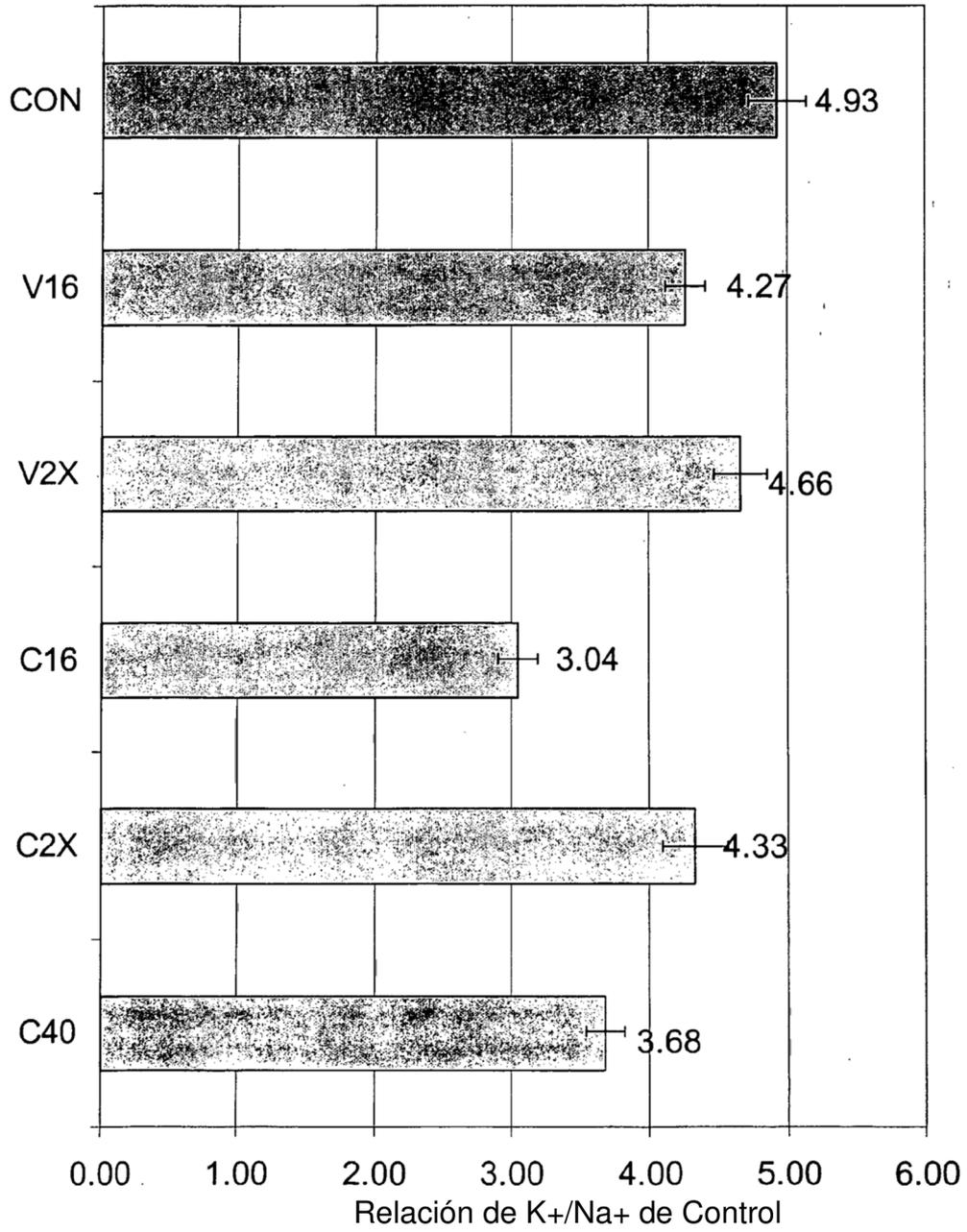


FIG. 3/5

Refrigeración en una Solución de Vitrificación que tiene una Tonicidad de 1.7X

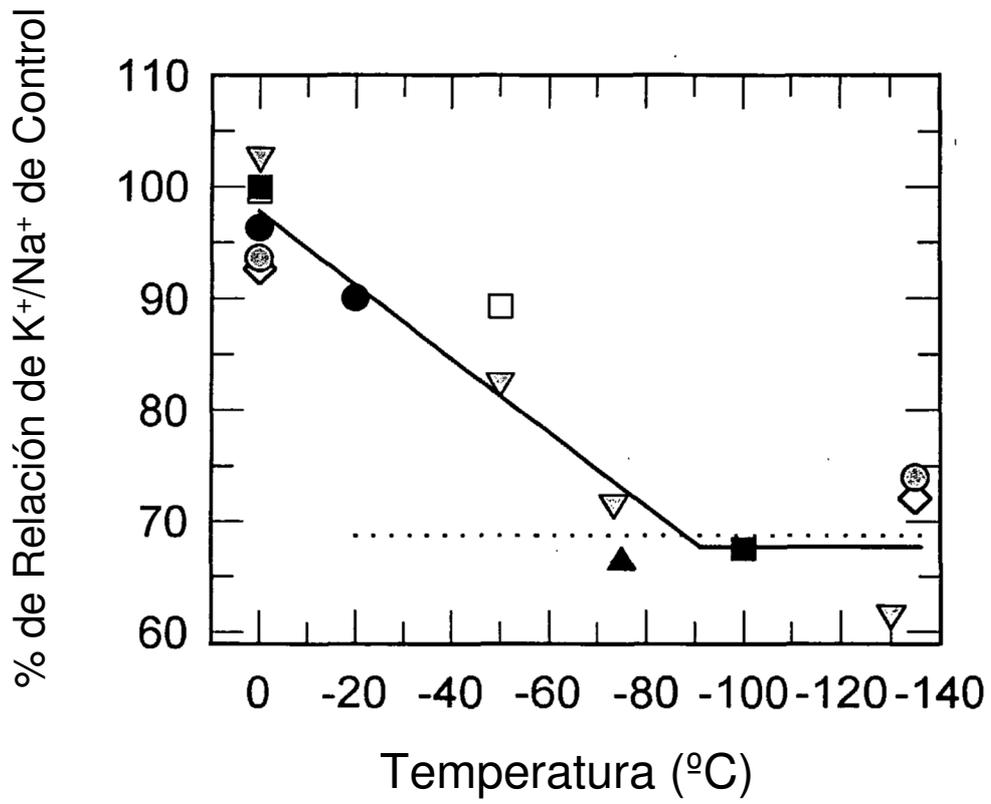


FIG. 4/5

Óptimo de Tonicidad para Reducir la Lesión  
Causada por Enfriamiento a  $-22^{\circ}\text{C}$

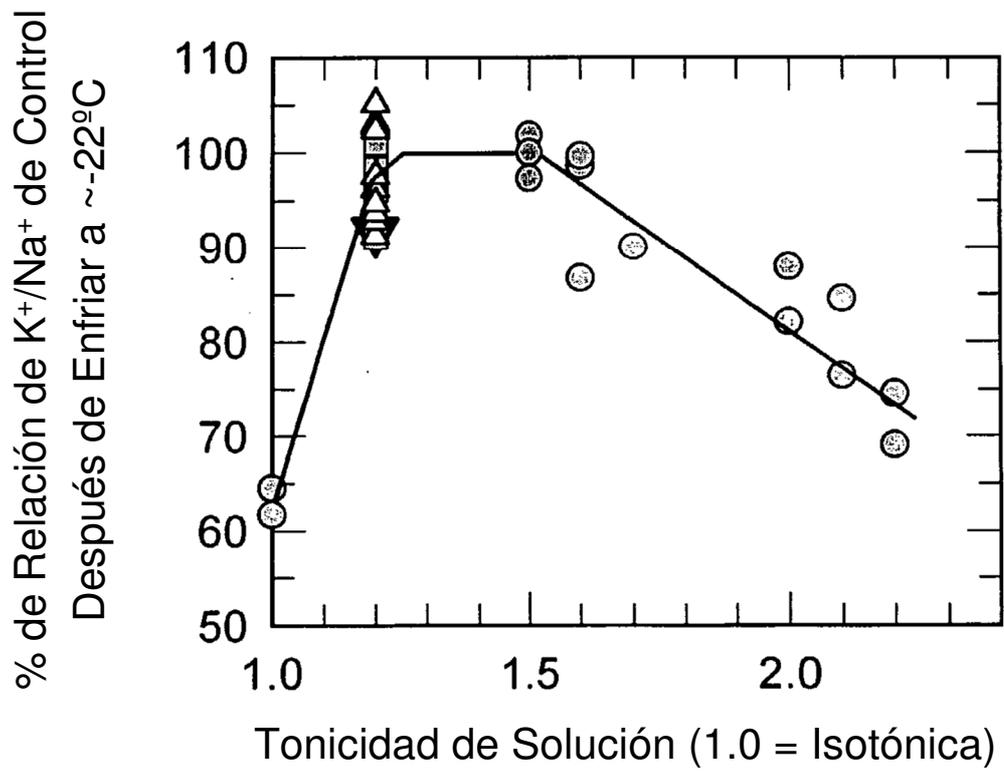


FIG. 5/5

Efectos de Tonicidad en Lesiones Causadas por  
Enfriamiento a  $-100^{\circ}\text{C}$  o Inferior

