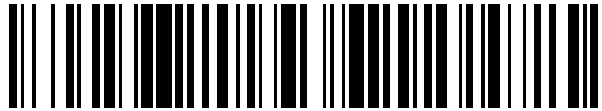


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 786**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2014 PCT/NL2014/050063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14120014**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2014 E 14703931 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2950643**

54 Título: **Composición y procedimiento para conservar, transportar y almacenar materiales biológicos vivos**

30 Prioridad:

01.02.2013 NL 2010225

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2018

73 Titular/es:

**GHO, CONRADUS GHOSAL (100.0%)
41 Sterappelstraat
6241 JL Bunde, NL**

72 Inventor/es:

GHO, CONRADUS GHOSAL

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

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

ES 2 694 786 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

Composición y procedimiento para conservar, transportar y almacenar materiales biológicos vivos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se halla en el campo de la tecnología de bioconservación de tejido vivo. Específicamente, la presente invención proporciona una composición y procedimiento mejorados para conservar células queratinocíticas y/o células foliculares capilares utilizando la composición de la invención. La composición y procedimiento mejorados de la presente invención son particularmente eficientes a la hora de minimizar la pérdida de actividad biológica e integridad física de materiales biológicos vivos, específicamente en el contexto en el que los biomateriales vivos se conservan a temperaturas por encima del punto de congelación. Las composiciones y procedimientos mejorados de la presente invención son particularmente aptos para su uso en la conservación, transporte y/o almacenamiento de células queratinocíticas y/o células foliculares capilares. Las composiciones y procedimiento mejorados de la presente invención son también aptos para su uso en el trasplante de materiales biológicos en un sujeto de ellos necesitado, específicamente para el trasplante de materiales biológicos autólogos o alogénicos.

Antecedentes de la invención

[0002] La emergencia de nuevas tecnologías como la ingeniería de tejidos, la tecnología de trasplante de tejidos, la medicina regenerativa y los procedimientos cosméticos para el rejuvenecimiento de rostro y cuerpo, que dependen enormemente del uso de materiales biológicos vivos como productos basados en células y/o basados en tejidos vivos naturales o desarrollados por bioingeniería, ha creado la necesidad de composiciones y procedimientos para conservar los materiales biológicos vivos naturales o desarrollados por bioingeniería. Las composiciones y procedimientos para conservar los materiales biológicos no sólo son críticos para conservar la integridad funcional y física de los materiales biológicos (vivos) tanto naturales como desarrollados por bioingeniería, sino que también son importantes para el transporte y almacenamiento (vida prolongada) de dichos materiales biológicos.

[0003] Las tecnologías de bioconservación están basadas en dos enfoques principales, es decir, procedimiento de criopreservación (temperaturas por debajo del punto de congelación) y procedimientos hipotérmicos (temperaturas por encima del punto de congelación). Los procedimientos de criopreservación se requieren típicamente para almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, a causa de los daños provocados por la formación de hielo en los tejidos estructurados debido a la congelación tras el derretimiento, los procedimientos de criopreservación pueden ser problemáticos debido a la limitada capacidad de las células y/o tejido vivos de hacer frente a dichos daños.

[0004] Los procedimientos hipotérmicos se emplean comúnmente para la conservación, el transporte y/o el almacenamiento temporal de muchos tipos de células/tejidos entre centros de donación, centros de bioingeniería, laboratorios de procesamiento, bancos de células/tejidos y usuarios finales. En el procedimiento hipotérmico, el material biológico se almacena típicamente en una composición acuosa basada en una solución salina que consiste comúnmente en solución salina isotónica, que se puede modificar con la adición de varios aditivos, entre los que se incluyen sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro, fosfato y bicarbonato, glucosa, lactosa, aminoácidos, vitaminas, agentes vasoactivos/antiagregantes plaquetarios, inhibidores de calmodulina, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de la proteasa y la fosfolipasa, antioxidantes/barredores de radicales libres, quelantes del hierro, estabilizadores de membrana, agentes citoprotectores, agentes antiapoptóticos, sustratos metabólicos, azúcares, precursores de nucleótidos (potenciadores hep), portadores de oxígeno, factores tróficos y otros compuestos, en varias concentraciones.

[0005] Sin embargo, el uso de composiciones convencionales para la conservación, transporte y/o almacenamiento de materiales biológicos vivos está limitado dado que los materiales biológicos vivos sólo se pueden conservar con éxito durante un periodo de tiempo relativamente corto antes de que se inicie la degeneración de las células y/o tejidos (es decir, por necrosis y/o apoptosis). Además, otro gran inconveniente asociado a las composiciones empleadas en los procedimientos hipotérmicos comúnmente usados es que dichas composiciones están diseñadas para mantener la función celular a temperaturas fisiológicas normales (es decir, ~37 °C), pero no a temperaturas reducidas (es decir, por encima del punto de congelación pero por debajo de ~37 °C). Por eso las composiciones existentes son menos que óptimas para la conservación, transporte y/o almacenamiento de materiales biológicos a temperaturas reducidas (es decir, por encima del punto de congelación pero por debajo de ~37 °C). Por eso existe la necesidad en la técnica de composiciones y procedimientos mejorados para conservar materiales biológicos vivos que carezca de estas limitaciones.

[0006] Asimismo, las composiciones para la conservación, transporte y/o almacenamiento generalmente comprenden suero fetal bovino. El suero es una de las principales fuentes de contaminantes virales que, una vez presentes, son difíciles de eliminar de los cultivos. Puede contener virus, priones y micoplasma, que pueden sesgar el resultado de experimentos científicos y pueden transferir enfermedades a la célula cultivada. Asimismo, la producción de suero bovino fetal está rodeada de un intenso debate ético. En la técnica existe la necesidad de composiciones mejoradas para la conservación, transporte y/o almacenamiento y de procedimientos para la conservación de materiales biológicos vivos que estén desprovistos de suero bovino fetal.

10 **[0007]** WO98/47471A1 describe un procedimiento para propagar cabello y proporciona composiciones para usar en dicho procedimiento para cultivar células capilares y proporciona composiciones para cultivar células capilares

[0008] Un objetivo de la presente invención es proporcionar dichas composiciones mejoradas y procedimientos mejorados para conservar materiales biológicos vivos.

15

Resumen de la invención

[0009] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición para la conservación, transporte y/o almacenamiento de material biológico vivo, que comprende al menos un compuesto antiapoptótico, donde dicho agente antiapoptótico es un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, al menos un compuesto antioxidante, al menos un compuesto potenciador de células madre, seleccionado de entre el grupo que consiste en eritropoyetina, células CD34 positivas y ácido retinoico, y al menos un compuesto de matriz extracelular.

[0010] En una realización, el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable se selecciona de entre el grupo que consiste en bis (maltolato) oxovanadio, oxovanadio y ortovanadio. En una realización preferida, el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable es bis (maltolato) oxovanadio.

[0011] En una realización, la composición tal como se enseña en esta invención puede comprender además un segundo o posterior compuesto antiapoptótico seleccionado de entre el grupo que consiste en triyodotironina, estradiol, progesterona, extracto de tejido, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, trifosfato de adenosina-cloruro de magnesio y L-leucina. En una realización, el extracto de tejido es un extracto de pituitaria bovina.

[0012] En una realización, el al menos un compuesto antioxidante de la composición tal como se enseña en esta invención se selecciona de entre el grupo que consiste en quercetina, monohidroxietyl, rutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina y vitamina E. En una realización preferida, el compuesto antioxidante se selecciona de entre el grupo que consiste en quercetina y monohidroxietyl rutósido.

[0013] En una realización, el compuesto potenciador de células madre de la composición tal como se enseña en esta invención se selecciona de entre el grupo de eritropoyetina, célula CD34 positiva y ácido retinoico. En una realización preferida, el compuesto potenciador de células madre se selecciona de entre el grupo de eritropoyetina y célula CD34 positiva. En una realización más preferida, el compuesto potenciador de células madre es eritropoyetina.

[0014] En una realización, la célula CD34 positiva y/o eritropoyetina proviene de la sangre periférica o médula ósea de un sujeto. En una realización preferida, la célula CD34 positiva se obtiene a partir de una línea celular CD34 positiva humana.

[0015] En una realización, el compuesto de matriz extracelular de la composición tal como se enseña en esta invención se selecciona de entre el grupo de: plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina. En una realización preferida, el compuesto de matriz extracelular es plasma rico en plaquetas. En una realización aún más preferida, el plasma rico en plaquetas proviene de la sangre periférica de un sujeto.

[0016] En una realización, la composición de la presente invención comprende además al menos un agente degranulante. En una realización preferida, el agente degranulante es Compuesto 48/80.

55

[0017] En otra realización, la composición tal como se enseña en esta invención comprende además una sal inorgánica. En una realización preferida, la sal inorgánica es CaCl₂.

[0018] En una realización, la composición tal como se enseña en esta invención comprende además una

solución salina fisiológicamente aceptable.

5 **[0019]** En otra realización, la composición tal como se enseña en esta invención comprende además uno o más compuestos seleccionados de entre el grupo de: albúmina, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, oligoelementos, constituyentes orgánicos, sales inorgánicas, albúmina en suero humano, insulina, suplementos del crecimiento y antibióticos.

10 **[0020]** En una realización, la composición de la presente invención está en una forma lista para su uso o en una forma concentrada.

[0021] En otra realización, la composición de la presente invención es estéril.

15 **[0022]** En una realización, la composición de la presente invención se usa para conservar, transportar y/o almacenar células queratinocíticas y/o células foliculares capilares

[0023] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para conservar, transportar y/o almacenar células queratinocíticas y/o células foliculares capilares que comprende los pasos de:

- 20 (a) proporcionar una composición tal como se enseña en esta invención y
 (b) aplicar la composición a las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares.

En una realización dichas células queratinocíticas y/o células foliculares capilares del paso (b) del procedimiento *in vitro* de la presente invención se mantienen a una temperatura en el intervalo de más de 0 °C y menos de 40 °C.

25 **[0024]** En otra realización, la composición de la presente invención se repone a diario en los pasos del procedimiento *in vitro* según la presente invención.

30 **[0025]** En una realización, el biomaterial vivo del paso (b) del procedimiento *in vitro* de la presente invención se mantiene a una temperatura de aproximadamente menos de 25 °C, más preferentemente de aproximadamente menos de 15 °C.

Descripción detallada de la invención

DEFINICIÓN GENERAL

35 **[0026]** Los términos "células neuronales y/o tejido neuronal" y "célula nerviosa y/o tejido nervioso" tal como se usan en esta invención se refieren a células y/o tejido que tiene su origen en el principal componente de las dos partes del sistema nervioso; el cerebro y la médula espinal del sistema nervioso central (SNC) y los nervios periféricos ramificados del sistema nervioso periférico (SNP). El término "célula y/o tejido del sistema nervioso" también se usa
 40 comúnmente como un equivalente de "células neuronales y/o tejido neuronal" y "célula nerviosa y/o tejido nervioso". En la presente invención, estos términos se usan indistintamente.

[0027] Los términos "material biológico vivo" y "biomaterial vivo" se usan indistintamente. Los términos incluyen material biológico tanto natural como desarrollado por bioingeniería e incluyen, por ejemplo, células y tejidos. El
 45 material biológico vivo puede formar parte de un órgano o puede ser un órgano entero, por ejemplo, (parte de) un órgano proveniente de un sujeto donante. Entre los ejemplos no limitantes de material biológico vivo se incluyen células como células neuronales, células oculares como célula del epitelio pigmentario retinal y bastones y conos, células cardíacas como cardiomiocitos y células marcapasos, células dentarias como odontoblasto y otras células pulpaes, células epiteliales, adipocitos, células sanguíneas, células inmunitarias, células musculares, células cutáneas, células
 50 madre foliculares capilares, células madre no embrionarias, células madre embrionarias, células óseas como osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, y células cartilaginosas como condrocitos. También se incluyen en el término, sin limitaciones, tejidos como tejido neuronal, tejido ocular, tejido cardíaco, tejido dentario, tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido adiposo, tejido muscular, tejido cutáneo, tejido capilar, tejido óseo y tejido cartilaginoso. Similarmente, el término "material biológico vivo" incluye órganos como corazón, hígado, riñones, ojos, páncreas, vesícula, vesícula
 55 biliar, intestino, tendones, ligamentos, tráquea, pulmones, estómago, esófago, glándula pituitaria, glándula tiroidea, nariz, orejas, glándulas suprarrenales, ovarios, intestino, placenta, cordón umbilical, testículos, timo, nódulos linfáticos, bazo, vasos sanguíneos, arterias, venas, lengua, médula espinal y médula ósea. El material biológico vivo puede ser de cualquier origen, pero preferentemente será de origen humano.

[0028] El término "viabilidad" se puede definir como la habilidad de conservar, transportar y almacenar células, tejidos y/u órganos para desempeñar sus funciones normales tras su retorno a condiciones fisiológicas. Ejemplos de procedimientos para evaluar la viabilidad celular en tejidos u órganos incluyen el ensayo de absorción de aminoácidos, síntesis de proteínas, contractibilidad, síntesis de ácido ribonucleico, fosforilación de 2-desoxiglucosa y absorción de tinte. Un ejemplo de ensayo de absorción de tinte es el ensayo de tinción con azul de tripano. El ensayo depende del uso de un tinte de azul de tripano para teñir selectivamente células muertas (también células muertas en tejido y/u órganos) de color azul. Mientras que el tinte de azul de tripano es absorbido de inmediato por las células muertas simplemente con pasar a través de la membrana celular, el paso del tinte de azul de tripano a través de la membrana celular de células vivas se bloquea de manera activa. Como resultado, bajo el microscopio sólo se identifican células muertas por tener un distintivo color azul, estando las células vivas libres de tinte. El ensayo de tinción con azul de tripano se usa de manera rutinaria en microscopía para la evaluación de la viabilidad de células y/o tejidos. En el contexto de la presente invención, la ausencia o una reducción en la tinción con azul de tripano se considera un indicador fiable de la no muerte de células y/o tejidos o como un indicador fiable de un aumento en la viabilidad de las células y/o tejidos, respectivamente. **[0029]** El término compuesto 'antiapoptótico' tal como se usa en esta invención se refiere a un compuesto capaz de evitar o reducir la apoptosis. El término compuesto 'antiapoptótico' es comúnmente usado por el experto en la materia para describir compuestos o sustancias que tienen actividad antiapoptótica. Entre los ejemplos no limitantes de compuestos antiapoptóticos se incluyen: compuestos de vanadio fisiológicamente aceptables (por ejemplo, bis (maltolato) oxovanadio, oxovanadio, ortovanadio), triiodotironina, estradiol, progesterona, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, L-leucina, trifosfato de adenosina-cloruro de magnesio, extracto de tejido (por ejemplo, extracto de pituitaria bovina), y otros.

[0030] El término compuesto 'antioxidante' tal como se usa en esta invención se refiere a un compuesto capaz de inhibir o reducir la oxidación de otras moléculas y/o contrarrestar los efectos del estrés oxidativo en una célula y/o tejido. El experto en la materia está bien familiarizado con el significado del término 'antioxidante' y lo reconoce como una categoría bien conocida de compuestos usados en varias composiciones o productos. Entre los ejemplos no limitantes de antioxidante se incluyen: quercetina, monohidroxi-etil rutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina, vitamina E y otros.

[0031] El término 'compuesto potenciador de células madre' tal como se usa en esta invención se refiere a un compuesto capaz de potenciar la reprogramación de una célula madre o la diferenciación de una célula madre en un tipo de tejido deseado. Los compuestos potenciadores de células madre también se usan comúnmente para favorecer la expansión de células madre al tiempo que mantienen su estabilidad genómica y viabilidad en condiciones de cultivo. El experto en la materia está bien familiarizado con el término 'compuesto potenciador de células madre' particularmente en el contexto de la medicina regenerativa y procedimientos cosméticos, donde las células madre se usan para generar varios tipos de tejidos in vitro. Los compuestos potenciadores de células madre incluyen eritropoyetina, células CD34 positivas, ácido retinoico. El término "célula CD34 positiva" se refiere a una célula positiva para el marcador molecular CD34, que es una glucoproteína superficial que funciona como un factor de adhesión célula-célula. CD34 también puede mediar en la unión de células madre a la matriz extracelular de médula ósea o directamente a células estromales. CD34 también es el nombre del gen humano que codifica la proteína. CD34 representa un marcador bien conocido de células progenitoras primitivas provenientes de la sangre y la médula ósea, especialmente para progenitores hematopoyéticos y endoteliales. Las células CD34 positivas pueden aislarse de la sangre periférica o la médula ósea en un sujeto. Las células CD34 positivas son un ejemplo de compuesto potenciador de células madre.

[0032] El término "autólogo" en el contexto de la presente invención significa "proveniente o transferido del cuerpo del mismo individuo" y puede referirse a órganos, tejidos, células, fluidos o proteínas un sujeto y que se van a administrar o trasplantar al mismo sujeto (opcionalmente, a otra parte de su cuerpo). Los órganos, tejido, células o proteínas trasplantados mediante dicho procedimiento "autólogo" se denominan autoinjerto o autotrasplante.

[0033] El término "alogénico" tal como se usa en esta invención se refiere a órganos, tejidos, células, fluidos o proteínas tomados de un sujeto donante y que se van a administrar o trasplantar a un sujeto receptor de la misma especie que es genéticamente no idéntico al sujeto donante. Los órganos, tejido, células, fluidos o proteínas trasplantados mediante dicho procedimiento "alogénico" se denominan aloinjerto o alotrasplante.

[0034] El términos "solución salina fisiológicamente aceptable", tal como se usa en esta invención, es bien conocido para el experto en la materia. Se refiere a una solución salina estéril de cloruro de sodio que es isotónica para los fluidos corporales o células, tejidos y/u órganos corporales, empleada para mantener el tejido vivo temporalmente y como un disolvente para medicamentos administrados por vía parenteral. En la presente invención, una solución salina se define como una solución de aproximadamente 0,90 % masa/vol. de cloruro de sodio, con una

osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm y una osmolaridad de aproximadamente 154 mmol de sodio y aproximadamente 154 mmol de cloruro, en un litro de agua.

- [0035]** El término "solución isotónica", tal como se usa en esta invención, se refiere a una solución en la que su concentración osmolar es la misma que la concentración soluta de otra solución y otra célula y/o tejido con que se compare. Esto ocurre, por ejemplo, cuando la concentración de agua y moléculas solutas totales son iguales en una solución externa y en el contenido celular. Las moléculas de agua se disipan a través de la membrana plasmática en ambas direcciones y dado que la tasa de dispersión del agua es la misma en ambas direcciones, esa célula no perderá ni ganará agua.
- 10 En la presente invención, una composición isotónica se refiere a una solución en la que la concentración de agua y moléculas solutas totales es la misma en una solución externa y en el contenido celular de la célula conservada, transportada o almacenada en la composición de la presente invención o en el contenido celular de las células que forman parte de un tejido y/u órgano conservado, transportado y/o almacenado en la composición de la presente invención.

15

LA COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

- [0036]** La presente invención proporciona una composición que es apta para su uso en la conservación, transporte y/o almacenamiento de material biológico. Específicamente, el presente inventor ha descubierto que la composición de la presente invención es particularmente efectiva a la hora de mantener la integridad funcional y física de materiales biológicos incluidas células, tejidos y/u órganos durante la conservación, transporte y/o almacenamiento de dichos materiales biológicos. Se observó que el nivel de daño apoptótico y/o necrótico disminuyó significativamente en materiales biológicos vivos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención en comparación con aquellos mantenidos en composiciones basadas en soluciones salinas o en un medio con suero de crecimiento básico. Se observó además que el nivel de contaminación viral (por ejemplo, por virus, priones y micoplasma) se redujo en materiales biológicos vivos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención en comparación con aquellos mantenidos en composiciones basadas en soluciones salinas o en un medio con suero de crecimiento básico, particularmente aquellos que contenían suero bovino fetal (también conocido como suero de ternera fetal), o cualquier suero animal, incluido el suero humano.

30

- [0037]** Además, el presente inventor también ha mostrado que la composición de la invención alarga la ventana temporal durante la que se pueden conservar, transportar y/o almacenar materiales biológicos vivos a temperaturas por encima del punto de congelación, es decir, por encima de cero y por debajo de 37 °C. Específicamente, se ha observado que los materiales biológicos vivos se podían conservar, transportar y/o almacenar en la composición de la invención durante periodos de tiempo extensos sufriendo una pérdida mínima de integridad funcional y física.

35

- [0038]** En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición adecuada para la conservación, transporte y/o almacenamiento de materiales biológicos vivos, cuya composición comprende al menos un compuesto antiapoptótico, donde dicho agente antiapoptótico es un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, al menos un compuesto antioxidante, al menos un compuesto potenciador de células madre, seleccionado de entre el grupo que consiste en eritropoyetina, células CD34 positivas y ácido retinoico, y al menos un compuesto de matriz extracelular. Los compuestos antiapoptóticos, compuestos antioxidantes, compuestos potenciadores de células madre y compuestos de matriz extracelular son *per se* bien conocidos en la técnica y están disponibles en comercio. Los protocolos y procedimientos para preparar compuestos antiapoptóticos, compuestos antioxidantes, compuestos potenciadores de células madre y compuestos de matriz extracelular también son bien conocidos en la técnica. En la preparación de la composición de la presente invención se puede usar cualquier compuesto antiapoptótico, compuesto antioxidante, compuesto potenciador de células madre y compuesto de matriz extracelular disponible en comercio o de origen casero.

50

- [0039]** En una realización, el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable se selecciona de entre el grupo de bis (maltolato) oxovanadio, oxovanadio y ortovanadio. En una realización preferida, el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable es bis (maltolato) oxovanadio.

55

- [0040]** Se puede usar cualquier concentración (mg/ml) fisiológicamente aceptable de bis (maltolato) oxovanadio en la composición de la presente invención. Por ejemplo, la concentración de bis (maltolato) oxovanadio puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01-100 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,1-10 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,5-8 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,6-6 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,7-3 mg/ml, de aproximadamente 0,8-2 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,9-1.5 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/ml. El presente inventor ha

descubierto que el uso de un compuesto antiapoptótico como un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, especialmente de bis (maltolato) oxovanadio, era particularmente efectivo como compuesto antiapoptótico básico. Específicamente, se ha descubierto que la incorporación de un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, especialmente de bis (maltolato) oxovanadio, a la composición de la invención potenciaba la eficiencia de otros 5 ingredientes presentes en la composición, por ejemplo, factores de crecimiento.

[0041] En una realización se usa indistintamente bis (maltolato) oxovanadio, oxovanadio y ortovanadio.

[0042] En una realización, la composición de la invención comprende además un segundo o posterior 10 compuesto antiapoptótico seleccionado de entre el grupo que consiste en triyodotironina, estradiol, progesterona, extracto de tejido, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, trifosfato de adenosina-cloruro de magnesio y L-leucina.

[0043] En una realización, el extracto de tejido es un extracto de pituitaria bovina. Los extractos de tejido como los extractos de pituitaria bovina son bien conocidos en la técnica y están disponibles en comercio. Los procedimientos 15 y protocolos para preparar extracto de tejido también son bien conocidos en la técnica. Se puede usar cualquier extracto de tejido disponible en comercio o de origen casero para preparar la composición de la invención pero se prefiere extracto de pituitaria bovina. Puede resultar particularmente ventajoso incorporar un extracto de tejido, particularmente extracto de pituitaria bovina, a la composición de la invención para fines de conservación de células, tejidos y/u órganos para someterse a diferenciación celular y/o de tejidos durante la conservación, transporte y/o 20 almacenamiento en la composición de la invención. Es importante evitar que células, tejidos y/u órganos se sometan a diferenciación para mantener las células, tejidos y/u órganos de manera continua en el estado original, es decir, como cuando entraron originalmente en contacto con la composición, a lo largo de las fases de conservación, transporte y/o almacenamiento.

[0044] En una realización, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más compuestos antiapoptóticos seleccionados de entre el grupo de: un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable (por ejemplo, 25 bis (maltolato) oxovanadio y/u oxovanadio y/u ortovanadio), triyodotironina, estradiol, progesterona, extracto de tejido (por ejemplo, extracto de pituitaria bovina), insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, trifosfato de adenosina-cloruro de magnesio y L-leucina, están presentes en la composición de la invención.

[0045] Específicamente el presente inventor ha descubierto que la incorporación de al menos dos, 30 preferentemente tres, preferentemente cuatro, preferentemente cinco, preferentemente seis, preferentemente siete, preferentemente ocho, preferentemente nueve y más preferentemente diez compuestos antiapoptóticos era particularmente efectivo, es decir, que mejoró el mantenimiento de la integridad funcional y fisiológica de las células, 35 tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención, frente a la una solución en la que sólo hay presente un compuesto antiapoptótico.

[0046] El al menos un compuesto antioxidante de la composición se puede seleccionar de entre el grupo que 40 consiste en: quercetina, monohidroxietil rutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina y vitamina E. En una realización preferida, el compuesto antioxidante se selecciona de entre el grupo que consiste en quercetina y monohidroxietil rutósido, más preferentemente monohidroxietil rutósido. El presente inventor ha descubierto que estos compuestos eran particularmente efectivos, es decir, que potenciaban aún más la integridad funcional y física de las células, tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención. Se puede 45 usar cualquier concentración (mg/ml) fisiológicamente aceptable de monohidroxietil rutósido en la composición de la presente invención, como una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,0025-25 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,025-2,5 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,12-2 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,15-1.5 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,18-1 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,2-0,5 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,21-0,4 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,23-0,3 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,23-0,28 50 mg/ml, y más preferentemente de aproximadamente 0,25 mg/ml.

[0047] En una realización, se incorporan al menos dos, tres, o más compuestos antioxidantes seleccionados de entre el grupo que consiste en: quercetina, monohidroxietil rutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina y vitamina E a la composición de la invención. El presente inventor descubrió que la presencia de más 55 de dos compuestos antioxidantes, como tres compuestos antioxidantes, mejoraba aún más la integridad funcional y fisiológica de las células, tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención frente a una solución en la que solo hay presente un compuesto antioxidante.

[0048] En una realización, el al menos un compuesto potenciador de células madre de la composición de la invención

se selecciona de entre el grupo que consiste en: eritropoyetina, una célula CD34 positiva y ácido retinoico.

[0049] En una realización, el al menos un compuesto potenciador de células madre de la composición de la invención se selecciona de entre el grupo que consiste en eritropoyetina y célula CD34 positiva.

5

[0050] En una realización, el compuesto potenciador de células madre es una célula CD34 positiva. Se puede usar cualquier cantidad fisiológicamente aceptable (células/ml) de células CD34 positivas en la presente invención, pero se prefiere una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1×10^1 - 1×10^5 células/ml, más preferentemente de aproximadamente 1×10^2 - 1×10^4 células/ml, más preferentemente de aproximadamente 5×10^2 - 1×10^4 células/ml, más preferentemente de aproximadamente 5×10^2 - $0,5 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente de aproximadamente 6×10^2 - $0,4 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente de aproximadamente 7×10^2 - $0,3 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente de aproximadamente 8×10^2 - $0,2 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente de aproximadamente 9×10^2 - $0,15 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente de aproximadamente 1×10^3 células CD34 positivas/ml. En una realización, la célula CD34 positiva se puede obtener a partir de una línea celular CD34 positiva. Las líneas celulares CD34 positivas son conocidas en la técnica y están disponibles en comercio, por ejemplo KG-1a, KG-1 y NIH3T3. En otra realización, la célula CD34 positiva se puede obtener o se obtiene a partir de una línea celular CD34 positiva humana, que también está disponible en comercio, como KG-1a, KG-1 y NIH3T3. Sin embargo, en una realización aún más preferida, la célula CD34 positiva proviene de la sangre periférica o de la médula ósea de un sujeto donante. Entre los ejemplos de un sujeto donante se incluye un sujeto mamífero no humano o un sujeto humano. En una realización aún más preferida, el sujeto donante es un sujeto humano. Los procedimientos para aislar e identificar células CD34 positivas de la sangre periférica o la médula ósea de un sujeto donante son conocidos en la técnica.

[0051] En una realización preferida, el compuesto potenciador de células madre es eritropoyetina. Se puede usar cualquier cantidad fisiológicamente aceptable de eritropoyetina en la presente invención pero se usa una cantidad de aproximadamente 0,1 unidades a 10 unidades de eritropoyetina/ml, preferentemente se usan aproximadamente 0,3 unidades a 8 unidades de eritropoyetina/ml, preferentemente se usan aproximadamente 0,5 unidades a 6 unidades de eritropoyetina/ml, se usan aproximadamente 0,7 unidades a 4 unidades de eritropoyetina/ml, se usan aproximadamente 0,9 unidades a 2 unidades de eritropoyetina/ml, se usan aproximadamente 0,95 unidades a 1,5 unidades de eritropoyetina/ml, más preferentemente se usa aproximadamente 1 unidad de eritropoyetina/ml. En una realización, la eritropoyetina se puede obtener de una fuente comercial. En una realización preferida, la eritropoyetina se puede obtener de un sujeto donante, por ejemplo de la circulación sanguínea o de la médula ósea de un sujeto donante. Entre los ejemplos de un sujeto donante se incluye un sujeto mamífero no humano o un sujeto humano. En una realización aún más preferida, el sujeto donante es un sujeto humano. Los procedimientos para obtener eritropoyetina de la sangre periférica o la médula ósea son conocidos en la técnica. El experto en la materia está bien familiarizado con el término "unidad" (abreviado a "U") como unidad de medida para la cantidad de eritropoyetina. Las cantidades de eritropoyetina se expresan en unidades (U) en lugar de en gramos o moles, dado que la eritropoyetina nativa y la eritropoyetina humana recombinante son mezclas de isoformas con bioactividades distintas. En la presente invención una unidad se define como la cantidad de eritropoyetina que se necesita para producir la incorporación de ^3H -timidina en células de bazo de ratones tratados con fenilhidrazina equivalente a aquella expresada de 1 unidad del estándar de referencia de la eritropoyetina de la OMS (2.^a primera preparación de referencia internacional).

[0052] En una realización, al menos dos, o al menos tres, o más compuestos potenciadores de células madre seleccionados de entre el grupo de eritropoyetina, células CD34 positivas y ácido retinoico, están presentes en la composición de la invención. El presente inventor descubrió que la presencia de al menos dos compuestos potenciadores de células madre, preferentemente la presencia de tres compuestos potenciadores de células madre, seleccionados de entre el grupo de: eritropoyetina, célula CD34 positiva y ácido retinoico, derivaba en un aumento de la eficiencia de la composición, es decir, que potenciaba aún más la integridad funcional y física de las células, tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención.

50

[0053] En una realización, la composición de la invención puede comprender además al menos un agente degranulante. En una realización preferida, el agente degranulante es Compuesto 48/80. Los agentes degranulantes, como el Compuesto 48/80, son conocidos en la técnica y están disponibles en comercio. La composición de la invención también puede comprender al menos una sal inorgánica, que puede ayudar a optimizar la acción del agente degranulante. Las sales inorgánicas son conocidas en la técnica y también están disponibles en comercio. En una realización, la sal inorgánica es CaCl_2 . Puede resultar particularmente ventajoso incorporar al menos un agente degranulante como el Compuesto 48/80 y al menos una sal inorgánica como CaCl_2 si hay células CD34 positivas presentes en la composición de la invención.

Se sabe en la técnica que las células CD34 positivas contienen múltiples gránulos dentro de su citoplasma. El agente

degranulante (preferentemente en combinación con una sal inorgánica) se usa para cortar una célula CD34 positiva en partes más pequeñas (es decir, degranulación), que en última instancia deriva en la liberación de factores de crecimiento en la composición de la invención.

Tras la degranulación, los residuos de una célula CD34 positiva opcionalmente pueden eliminarse de la composición, por ejemplo por centrifugado. La composición resultante se puede usar después para conservar, transportar y/o almacenar materiales biológicos vivos. Se puede usar cualquier agente degranulante y sal inorgánica disponible en comercio o de origen casero para la preparación de la composición de la invención. Sin embargo se prefiere el Compuesto 48/80 en combinación con CaCl_2 dado que el presente inventor ha observado que dicha combinación resultaba en una degranulación más eficiente de las células CD34 positivas.

10

[0054] En una realización, el al menos un compuesto de matriz extracelular de la composición de la invención se selecciona de entre el grupo de plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina. El término "componente de matriz extracelular" es un término bien conocido para el experto. Entre los ejemplos no limitantes de compuestos de matriz extracelular están el colágeno, laminina, elastina, fibronectina y similares, ampliamente disponibles en comercio. Los sustitutos de éstos también se conocen en la técnica y están disponibles en comercio. Los procedimientos y protocolos para preparar compuestos de matriz extracelular también son conocidos en la técnica. Se puede usar cualquier compuesto extracelular de origen casero o disponible en comercio en la composición de fertilización de la invención. En una realización preferida el al menos un compuesto de matriz extracelular es plasma rico en plaquetas. Se puede usar cualquier concentración (ml/ml) fisiológicamente aceptable de plasma rico en plaquetas en la presente invención pero se prefiere una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,0005-5 ml/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,005-0,5 ml/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,01-0,25 ml/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,02-0,15 ml/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,03-0,10 ml/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,04-0,08 ml/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,045-0,06 ml/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,05 ml/ml de plasma rico en plaquetas. En otra realización, el plasma rico en plaquetas proviene de la sangre periférica de un sujeto donante, preferentemente un sujeto humano. Los protocolos y procedimientos para obtener plasma rico en plaquetas de la sangre de un sujeto son conocidos en la técnica. El presente inventor mostró que la incorporación de un plasma rico en plaquetas hacia la composición de la invención particularmente efectiva, es decir, que mejoraba aún más la integridad funcional y física de las células, tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención.

[0055] En una realización, hay al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más compuestos de matriz extracelular seleccionados de entre el grupo de plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina presentes en la composición de la invención. El presente inventor descubrió que la incorporación de al menos dos, preferentemente tres, preferentemente cuatro, preferentemente cinco, más preferentemente seis compuestos de matriz extracelular en la composición de la invención derivó en una composición más efectiva, es decir, dotada de una habilidad mejorada para mantener la integridad funcional y física de células, tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición frente a una composición en la que sólo hay presente un compuesto de matriz extracelular.

40

[0056] En una realización, la composición de la invención comprende bis (maltolato) oxovanadio; eritropoyetina; al menos un compuesto antioxidante seleccionado de entre el grupo que consiste en: quercetina, monohidroxietil rutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina y vitamina E, comprendiendo preferentemente al menos monohidroxietil rutósido; y al menos un compuesto de matriz extracelular, preferentemente al menos plasma rico en plaquetas.

45

Se puede usar cualquier concentración fisiológicamente aceptable de bis (maltolato) oxovanadio, eritropoyetina, monohidroxietil rutósido y plasma rico en plaquetas en la presente invención. Sin embargo puede ser adecuado usar aproximadamente 0,01-100 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, preferentemente aproximadamente 0,1-10 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, preferentemente aproximadamente 0,5-8 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, preferentemente aproximadamente 0,6-6 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, preferentemente aproximadamente 0,7-3 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, preferentemente aproximadamente 0,8-2 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, preferentemente aproximadamente 0,9-1,5 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, más preferentemente aproximadamente 1 mg de bis (maltolato) oxovanadio/ml, y una cantidad de aproximadamente 0,1 unidades a 10 unidades de eritropoyetina/ml, preferentemente aproximadamente 0,3 unidades a 8 unidades de eritropoyetina/ml, preferentemente aproximadamente 0,5 unidades a 6 unidades de eritropoyetina/ml, aproximadamente 0,7 unidades a 4 unidades de eritropoyetina/ml, aproximadamente 0,9 unidades a 2 unidades de eritropoyetina/ml, aproximadamente 0,95 unidades a 1,5 unidades de eritropoyetina/ml, más preferentemente aproximadamente 1 unidad de eritropoyetina/ml, y aproximadamente 0,0025-25 mg de monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 0,025-2,5 mg de monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 0,12-2 mg de

55

monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 0,15-1,5 mg de monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 0,18-1 mg de monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 0,2-0,5 mg de monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 0,21-0,4 mg de monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 0,23-0,3 mg de monohidroxietil rutósido/ml, preferentemente aproximadamente 5 0,23-0,28 mg de monohidroxietil rutósido/ml, más preferentemente aproximadamente 0,25 mg de monohidroxietil rutósido/ml, y 0,0005-5 ml de plasma rico en plaquetas/ml, preferentemente aproximadamente 0,005-0,5 ml de plasma rico en plaquetas/ml, preferentemente aproximadamente 0,01-0,25 ml de plasma rico en plaquetas/ml, preferentemente aproximadamente 0,02-0,15 ml de plasma rico en plaquetas/ml, preferentemente aproximadamente 0,03-0,10 ml de plasma rico en plaquetas/ml, preferentemente aproximadamente 0,04-0,08 ml de plasma rico en 10 plaquetas/ml, preferentemente aproximadamente 0,045-0,06 ml de plasma rico en plaquetas/ml, preferentemente aproximadamente 0,05 ml de plasma rico en plaquetas/ml de plasma rico en plaquetas.

[0057] En una realización, la composición de la invención es una solución isotónica. En una realización, dicha solución comprende aproximadamente 0,8-1,0 % masa/volumen, como aproximadamente 0,85-0,95 % masa/volumen, 15 como aproximadamente 90 % masa/volumen de cloruro de sodio. En una realización aún más preferida, la solución tiene una osmolalidad de aproximadamente 200-400 mOsm, como aproximadamente 250-350 mOsm, como aproximadamente 300 mOsm por litro de disolvente. En otra realización, la solución tiene una molaridad de aproximadamente 120-190 mmol, como aproximadamente 130-180 mmol, o aproximadamente 140-170 mmol, o aproximadamente 150-160 mmol, como aproximadamente 154 mmol para sodio por litro de disolvente y 20 aproximadamente 120-190 mmol, como aproximadamente 130-180 mmol, o aproximadamente 140-170 mmol, o aproximadamente 150-160 mmol, como aproximadamente 154 mmol para cloruro por litro de disolvente. En la presente invención, el disolvente es preferentemente agua o una solución acuosa. En una realización, la solución tiene una osmolalidad sustancialmente igual a aquella del material biológico vivo a conservar. Esto es particularmente ventajoso para evitar daño celular, como células que explotan debido a un desequilibrio en la osmolalidad entre el 25 medio interno y el medio externo (es decir, la composición de la invención) de dicha célula. Los protocolos y procedimientos para preparar una solución isotónica son conocidos en la técnica. La solución isotónica es preferentemente estéril aunque no es esencial.

[0058] En una realización, la composición tal como se enseña en esta invención no comprende suero bovino 30 fetal (también conocido como suero de ternera fetal) ni ningún suero animal, incluido suero humano salvo que el suero sea autólogo del sujeto del que deben conservar, transportar y/o almacenar células y/o tejido biológicos vivos en la composición de la invención.

[0059] En una realización, la composición tal como se enseña en esta invención carente de suero bovino fetal 35 (también conocido como suero de ternera fetal) o cualquier suero animal, incluido suero humano salvo que el suero sea autólogo del sujeto del que se conserva, transporta y/o almacena tejido biológico vivo en la composición de la invención, puede ser apto para conservar, transportar y/o almacenar células y tejidos destinados a ser reaplicados en o al cuerpo humano.

[0060] En otra realización, la composición de la invención comprende además uno o más ingredientes 40 seleccionados de entre el grupo de: albúmina, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, oligoelementos, constituyentes orgánicos, sales inorgánicas, albúmina en suero humano, insulina, suplementos del crecimiento y antibióticos. Entre los ejemplos no limitantes de sales inorgánicas se incluyen el cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, fosfato de sodio, cloruro de calcio, glucosa bicarbonato de sodio, lactato de sodio y piruvato de 45 sodio. La adición de uno o más de dichos ingredientes puede ser particularmente ventajosa para mantener aún más la integridad funcional y fisiológica de los materiales biológicos vivos a conservar, transportar y/o almacenar en la composición de la invención al tiempo que se evita la contaminación con patógenos y otros agentes contaminantes. La eliminación de patógenos y otros agentes contaminantes es importante en el contexto en el que las células, tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención están destinados a 50 trasplantes o implantes en un sujeto receptor. Globalmente, dicha acción evitará la aparición de complicaciones relacionadas con inflamaciones y/o rechazos inmunológicos en dicho sujeto.

[0061] En una realización, la composición puede estar en una forma lista para su uso o puede estar en una 55 forma concentrada, por ejemplo, para dilución en agua. El experto ordinario en la materia ya sabe cómo diluir adecuadamente una composición concentrada en agua u otro disolvente acuoso. En otra realización más, la composición de la invención es estéril. Los procedimientos y protocolos para preparar una composición estéril son conocidos en la técnica. Puede resultar particularmente ventajoso esterilizar la composición de la invención en el contexto en el que las células, tejidos y/u órganos conservados, transportados y/o almacenados en la composición de la invención están destinados a trasplantes o implantes en un sujeto receptor. Globalmente, dicha acción también

evitará la aparición de complicaciones relacionadas con inflamaciones y/o rechazos inmunológicos en dicho sujeto.

[0062] En una realización el material biológico vivo es material biológico natural y/o desarrollado por bioingeniería. En otra realización, el material biológico vivo natural y/o desarrollado por bioingeniería se selecciona de entre el grupo de: célula y tejido. También se describe que la célula viva natural y/o desarrollada por bioingeniería se selecciona de entre el grupo de célula neuronal, célula ocular como célula del epitelio pigmentario retinal, bastón y cono, célula cardíaca como cardiomiocito y célula marcapasos, célula dentaria como odontoblasto y otra célula pulpar, célula epitelial, célula queratinocítica, célula fibroblástica, adipocito, célula sanguínea, célula inmunitaria, célula muscular, célula cutánea, célula madre folicular capilar, célula folicular capilar, célula madre no embrionaria, célula madre embrionaria, célula ósea como osteoblasto, osteocito, osteoclasto, y célula cartilaginosa como condrocitos y similares. También se describe que el tejido vivo natural y/o desarrollado por bioingeniería se selecciona de entre el grupo de tejido neuronal, tejido ocular, tejido cardíaco, tejido dentario, tejido epitelial, tejido queratinocítico, tejido fibroblástico, tejido conjuntivo, tejido adiposo, tejido muscular, tejido cutáneo, tejido capilar, tejido óseo y tejido cartilaginoso y similares.

[0063] En una realización, el material biológico vivo es una parte de un órgano, preferentemente un órgano completo obtenido de un sujeto donante. También se describe que el órgano vivo se selecciona de entre el grupo de cerebro, médula espinal, nervios, ojo, corazón, diente, hígado, riñón, páncreas, vesícula, vesícula biliar, intestino, tendón, ligamento, tráquea, pulmón, estómago, esófago, glándula tiroidea, glándula pituitaria, glándula suprarrenal, ovario, placenta, cordón umbilical, nariz, lengua, orejas, testículos, timo, nódulo linfático, bazo, vaso sanguíneo, arteria, vena y médula ósea, y similares. En una realización aún más preferida, el material biológico natural y/o desarrollado por bioingeniería (es decir, célula, tejido y/u órgano) a conservar, transportar y/o almacenar en la composición de la invención es de origen humano.

[0064] En una realización, la temperatura de conservación, transporte y/o almacenamiento de material biológico vivo incluyendo células, tejidos y/u órganos está por encima del punto de congelación, es decir, por encima de 0 °C. La temperatura puede estar por debajo de aproximadamente 40, 39, 38 o 37 °C. La temperatura de conservación, transporte y/o almacenamiento de material biológico vivo incluyendo célula, tejido y/u órgano puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2, 3, 4 o 5 °C hasta aproximadamente 10, 15, 18, 22, 25, 30, 35, 37 o 40 °C.

[0065] El material biológico vivo puede almacenarse en la composición de la invención durante un periodo de tiempo de hasta aproximadamente un año, 11 meses, 10 meses, 9 meses, 8 meses, 7 meses, 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses, 1 mes, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 20 horas, 16 horas, 12 horas, 8 horas, 4 horas, 1 hora, menos de 1 hora al tiempo que la integridad funcional y fisiológica (tal como indica el bajo nivel de muerte celular) de células, tejidos y/u órganos se mantiene en gran medida.

[0066] En una realización, la composición de la invención es particularmente apta para su uso para implantar o trasplantar material biológico vivo en un sujeto receptor de éste necesitado para fines cosméticos y/o para fines médicos, por ejemplo, medicina regenerativa. En una realización de la invención, el material biológico vivo a implantar o trasplantar a un sujeto puede ser material biológico vivo alogénico (es decir, originario de un sujeto no genéticamente idéntico de la misma especie) o material biológico vivo autólogo (originario del mismo sujeto). En una realización, en el caso en que se trasplante o implante biomaterial vivo autólogo en un sujeto, es preferible que la composición de la invención comprenda células CD34 positivas y/o plasma rico en plaquetas originarios de dicho sujeto. En una realización preferida, en el caso en que se trasplante o implante biomaterial vivo autólogo en un sujeto, es preferible que la composición de la invención comprenda eritropoyetina y/o plasma rico en plaquetas originarios de dicho sujeto. Resulta particularmente ventajoso incorporar elementos autólogos originarios de la sangre periférica y/o médula ósea de dicho sujeto en la composición de la invención con el fin de evitar la aparición de complicaciones relacionadas con inflamación y/o rechazo inmunológico en dicho sujeto durante el procedimiento de implante o trasplante.

PROCEDIMIENTO DE LA INVENCION PARA CONSERVAR MATERIAL BIOLÓGICO VIVO

[0067] En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento mejorado para conservar células queratinocíticas y/o células foliculares capilares que comprende los pasos de:

- (a) proporcionar una composición de la invención tal como se enseña en esta invención;
- (b) aplicar la composición de la invención a las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares, por ejemplo, sumergiendo las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares en dicha composición;
- (c) opcionalmente, reponiendo la composición, por ejemplo, a diario, y

(d) opcionalmente, manteniendo las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares del paso (b) a una temperatura

en el intervalo por encima del punto de congelación (0 °C), como por encima de 2 °C, 4 °C, 6 °C, y por debajo de 5 aproximadamente 40 °C, como por debajo de 39 °C, 38 °C, 37 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C, 15 °C o 10 °C.

10 **[0068]** Las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares a conservar y/o almacenar pueden quedar cubiertas por la composición de la invención de manera que se pueda observar al menos una capa fina de la composición sobre dichas células queratinocíticas y/o células foliculares capilares. Por ejemplo, si la composición de la presente invención está en la forma de un gel, un semilíquido o una pasta, se podrá aplicar sobre las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares. Alternativamente, si la composición de la invención está en la forma de un líquido, las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares podrán sumergirse en dicha composición líquida.

15 **[0069]** Se ha descubierto que reponer la composición de manera regular, por ejemplo, a diario, aumentó la eficiencia de la composición, particularmente a la hora de mantener la integridad funcional y fisiológica (tal como indica el bajo nivel de muerte celular) del material biológico a conservar, transportar y/o almacenar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS RELACIONADAS CON LA INVENCION

20

[0070]

25 La **figura 1** muestra fotografías de folículos capilares conservados en la composición de la invención durante 4 horas (panel D) frente a folículos capilares conservados en una solución salina durante 4 horas (panel B). Los resultados muestran que el nivel de muerte celular, evaluado usando el ensayo de tinción con azul de tripano, se reduce significativamente en folículos capilares conservados en la composición de la invención tras 4 horas (panel D) en comparación con folículos capilares conservados en una solución salina durante el mismo periodo de tiempo (panel B). Los paneles A y C muestran los folículos capilares en solución salina y composición de la invención, respectivamente, tras 0 horas de conservación.

30

35 La **figura 2** muestra fotografías de tejido cutáneo conservado en la composición de la invención (panel C) frente a tejido cutáneo conservado en una solución salina (panel A) o una solución láctica de Ringer (panel B). Los resultados muestran que el nivel de muerte celular, evaluado con un ensayo de tinción con azul de tripano, se reduce significativamente en tejido cutáneo conservado en la composición de la invención tras 4 horas (panel C) en comparación con tejido cutáneo conservado bien en una solución salina (panel A) o una solución láctica de Ringer (panel B).

40 La **figura 3** muestra fotografías de tejido adiposo conservado durante 4 horas en la composición de la invención (panel F) frente a tejido adiposo conservado durante 4 horas en una solución salina (panel B) o una solución láctica de Ringer (panel D). Los resultados muestran que el nivel de muerte celular, evaluado usando el ensayo de tinción con azul de tripano, se reduce significativamente en tejido adiposo conservado en la composición de la invención tras 4 horas (panel F) en comparación con tejido adiposo conservado bien en una solución salina (panel B) o una solución láctica de Ringer (panel D). Los paneles A, C y E muestran el tejido adiposo en solución salina, solución láctica de Ringer y composición de la invención, respectivamente, tras 0 horas de conservación.

45

50 La **figura 4** muestra el efecto de los compuestos de vanadio fisiológicamente aceptables oxovanadio (OVAN) y bis (maltolato) oxovanadio (BMOV) en la proliferación de queratinocitos. La proliferación de queratinocitos se expresa como el número de células contadas por cantidad de medio de cultivo (es decir, el número de células x10E4/ml). Los resultados revelan una proliferación potenciada de queratinocitos tras el tratamiento con una composición que comprende un suero de crecimiento medio básico (SFK) suplementado con 1 mg/ml de OVAN o 1 mg/ml de BMOV frente a la situación de control (es decir, medio de crecimiento básico (SFK) sin un compuesto de vanadio). Nótese que el tratamiento con BMOV está asociado con un mayor número de células proliferadas frente al tratamiento con OVAN.

55 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de la composición

[0071] La composición para conservar, transportar y/o almacenar material biológico se preparó nueva

añadiendo los siguientes ingredientes a un medio de crecimiento libre de suero (medio de crecimiento (de queratinocitos) libre de suero definido, adquirido a Gibco, EE.UU.):

- 1 mg/ml de bis (maltolato) oxovanadio (BMOV)
- 5 • 0,25 mg/ml de monohidroxietil rutósido (mono- HER)
- 0,25 mg/ml de succinato ácido de D-tocoferol /a-tocoferol (vitamina E)
- 0,1 mg/ml de ácido lipoico
- 0,1 µmol/ml de trifosfato de adenosina-cloruro de magnesio
- 15 mg/ml de mesilato de deferoxamina
- 10 • 1 x 10³ células/ml de células CD34 positivas
- 0,05 ml/ml de plasma rico en plaquetas
- 1 unidad/ml de eritropoyetina

Ejemplo 2. Conservación de tejido capilar

15

[0072] Procedimiento: Se sumergió tejido capilar en la composición de la invención durante un periodo de 4 horas a temperatura ambiente (alrededor de 21 °C). En paralelo se sumergió tejido capilar en una composición tradicional consistente en una solución salina fisiológicamente aceptable, a la misma temperatura, durante el mismo tiempo. El nivel de muerte celular se evaluó con un ensayo de tinción con azul de tripano. En resumen, se sumergieron 20 25 microinjertos capilares en una solución de azul de tripano al 0,1 % durante 15 minutos y después se aclararon. Las células muertas se tiñeron de azul y se observaron y contaron bajo un microscopio. Se compararon los niveles de células muertas entre el tejido capilar conservado en la composición de la invención y el tejido capilar conservado en la composición tradicional.

25 **[0073]** Resultados: Los resultados muestran que el nivel de muerte celular se redujo significativamente en el tejido capilar conservado en la composición de la invención frente al nivel de muerte celular observado en el tejido capilar conservado en la solución salina (figura 1). En general, estos resultados muestran que la composición de la presente invención es particularmente efectiva a la hora de mantener la integridad funcional y fisiológica de tejido capilar conservado, transportado y/o almacenado en la composición de la invención frente a lo que se puede lograr con una composición tradicional n (por ejemplo, solución salina fisiológicamente aceptable).

30

Ejemplo 3. Conservación de tejido cutáneo

[0074] Procedimiento: Se sumergió tejido cutáneo en la composición de la invención durante un periodo de 4 35 horas a temperatura ambiente (alrededor de 21 °C). En paralelo se sumergió tejido cutáneo bien en una solución salina fisiológicamente aceptable o una solución láctica de Ringer, a la misma temperatura, durante el mismo tiempo. El nivel de muerte celular se evaluó con un ensayo de tinción con azul de tripano. En resumen, se sumergieron 25 microinjertos cutáneos en una solución de azul de tripano al 0,1 % durante 15 minutos y después se aclararon. Las células muertas se tiñeron de azul y se observaron y contaron bajo un microscopio. Se comparó el nivel de células muertas entre el 40 tejido cutáneo conservado en la composición de la invención y el tejido cutáneo conservado en las composiciones tradicionales (es decir, solución salina fisiológicamente aceptable y solución láctica de Ringer).

[0075] Resultados: Los resultados muestran que el nivel de muerte celular se redujo significativamente en el tejido cutáneo conservado en la composición de la invención frente al nivel de muerte celular observado en el tejido 45 cutáneo conservado en las soluciones tradicionales (por ejemplo, solución salina fisiológicamente aceptable y solución láctica de Ringer) (véase la figura 2). En general, estos resultados muestran que la composición de la invención es particularmente efectiva a la hora de mantener la integridad funcional y fisiológica de tejido cutáneo conservado, transportado y/o almacenado en la composición de la invención frente a lo que se puede lograr con composiciones 50 tradicionales (por ejemplo, solución salina fisiológicamente aceptable o solución láctica de Ringer).

50

Ejemplo 4. Conservación de tejido adiposo

[0076] Procedimiento: Se sumergió tejido adiposo en la composición de la invención durante un periodo de 4 55 horas a temperatura ambiente (alrededor de 21 °C). En paralelo se sumergió tejido adiposo bien en una solución salina fisiológicamente aceptable o una solución láctica de Ringer, a la misma temperatura y durante el mismo tiempo. El nivel de muerte celular se evaluó con un ensayo de tinción con azul de tripano. En resumen, se sumergieron 25 microinjertos adiposos en una solución de azul de tripano al 0,1 % durante 15 minutos y después se aclararon. Las células muertas se tiñeron de azul y se observaron y contaron bajo un microscopio. Se compararon los niveles de células muertas entre el tejido adiposo conservado en la composición de la invención y el tejido adiposo conservado

en las composiciones tradicionales (es decir, solución salina fisiológicamente aceptable y solución láctica de Ringer) (véase la figura 3).

[0077] Resultados: Los resultados muestran que el nivel de muerte celular se redujo significativamente en el tejido adiposo conservado en la composición de la invención frente al nivel de muerte celular observado en el tejido adiposo conservado en las soluciones tradicionales (por ejemplo, solución salina fisiológicamente aceptable y solución láctica de Ringer). En general, estos resultados muestran que la composición de la invención es particularmente efectiva a la hora de mantener la integridad funcional y fisiológica de tejido adiposo conservado, transportado y/o almacenado en la composición de la invención frente a lo que se puede lograr con composiciones (por ejemplo, solución salina fisiológicamente aceptable o solución láctica de Ringer).

Ejemplo 5: Efecto de los compuestos de vanadio en la proliferación de queratinocitos.

[0078] Procedimiento: Se transfirieron los folículos capilares a un disco de cultivo de 24 pozos que contenía dSFK con 500 mg/ml de penicilina (Life Technologies B.V. Breda, Países Bajos) y 0,25 µg/ml de estreptomina (Life Technologies B.V. Breda, Países Bajos) y se colocaron durante 14 días en un medio de cultivo a 31 °C en un entorno humidificado que contenía un 5 % de CO₂. Se usaron tres medios de cultivo diferentes:

- Grupo de tratamiento con oxovanadio (OVAN): el medio de cultivo es una composición que comprende un suero de crecimiento SFK básico (adquirido al proveedor SFK, Enschede Países Bajos) suplementado con bien 1 mg/ml de OVAN.

- Grupo de tratamiento con bis (maltolato) oxovanadio (BMOV): el medio de cultivo es una composición que comprende un suero de crecimiento SFK básico (adquirido al proveedor SFK, Enschede Países Bajos) suplementado con bien 1 mg/ml de BMOV.

- Grupo de control: la situación de control consiste en una composición que comprende el suero de crecimiento básico SFK pero sin los compuestos de vanadio (es decir, OVAN o BMOV).

[0079] Cada medio de cultivo se retiraba cuidadosamente cada tres días para reemplazarlo con medio de cultivo nuevo. Las células permanecieron unidas a los folículos capilares durante el periodo de cultivo. Tras 14 días el medio de cultivo se retiró y sustituyó por una solución de 0,5 mg/ml de tripsina, 0,2 mg/ml de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) (Life Technologies B.V. Breda, Países Bajos) y se incubó durante 5 minutos a 37 °C en este medio. Tras este periodo de incubación se procedió a liberar grupos de células de los folículos capilares. Estos fueron recogidos por centrifugado a 300 g a 4 °C durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5804R (VWR International, Países Bajos). El número de células se contó y expresó como la cantidad de células proliferadas por ml de medio de cultivo.

[0080] Resultados: Los resultados muestran que la cantidad de queratinocitos proliferados aumentó significativamente tras el tratamiento con ambos compuestos de vanadio, es decir, OVAN y BMOV, frente a la situación de control. Los resultados muestran además que BMOV parece ser más potente que OVAN. En general, estos resultados muestran que los compuestos de vanadio son particularmente efectivos a la hora de fomentar la proliferación celular así como la supervivencia celular en condiciones de cultivo (véase la figura 4).

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la conservación, transporte y/o almacenamiento de material biológico vivo, que comprende al menos un compuesto antiapoptótico, donde dicho agente antiapoptótico es un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, al menos un compuesto antioxidante, al menos un compuesto potenciador de células madre, seleccionado de entre el grupo que consiste en eritropoyetina, células CD34 positivas y ácido retinoico, y al menos un compuesto de matriz extracelular.
2. Composición según la reivindicación 1, donde el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable se selecciona de entre el grupo que consiste en bis (maltolato) oxovanadio, oxovanadio y ortovanadio.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable es bis (maltolato) oxovanadio.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende además un segundo o posterior compuesto antiapoptótico seleccionado de entre el grupo que consiste en una triyodotironina, estradiol, progesterona, extracto de tejido, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, trifosfato de adenosina-cloruro de magnesio y L-leucina.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto antioxidante se selecciona de entre el grupo que consiste en quercetina, monohidroxietyl rutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina y vitamina E.
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto potenciador de células madre se selecciona de entre el grupo de eritropoyetina y célula CD34 positiva.
7. Una composición según la reivindicación 6, donde la célula CD34 positiva y/o eritropoyetina proviene de la sangre periférica o médula ósea de un sujeto.
8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, donde la célula CD34 positiva se obtiene a partir de una línea celular CD34 positiva humana.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el compuesto de matriz extracelular se selecciona de entre el grupo que consiste en plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina.
10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para conservar, transportar y/o almacenar células queratinocíticas y/o células foliculares capilares.
11. Procedimiento in vitro para conservar, transportar y/o almacenar células queratinocíticas y/o células foliculares capilares que comprende los pasos de:
- (a) proporcionar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y
- (b) aplicar la composición a las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares.
12. Procedimiento in vitro según la reivindicación 11, donde las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares del paso (b) se mantienen a una temperatura en el intervalo por encima de los 0 °C y por debajo de los 40°C.
13. Procedimiento in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 donde la composición se repone a diario.
14. Procedimiento in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde las células queratinocíticas y/o células foliculares capilares del paso (b) se mantienen a una temperatura por debajo de los 25 °C.

Figura 1

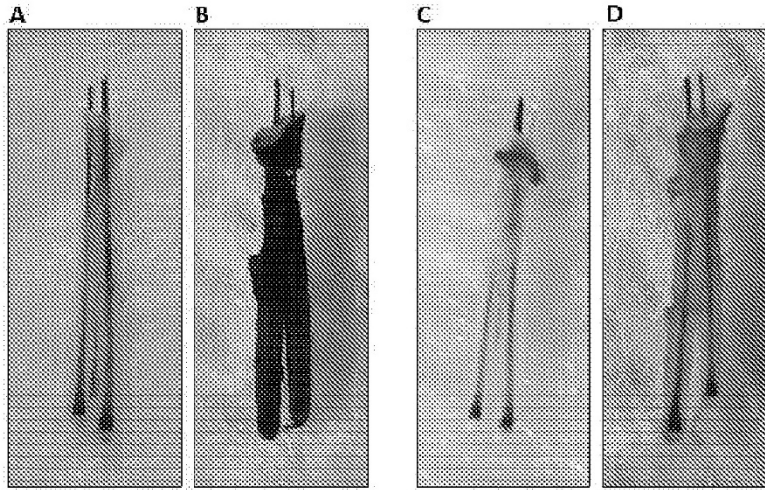


Figura 2

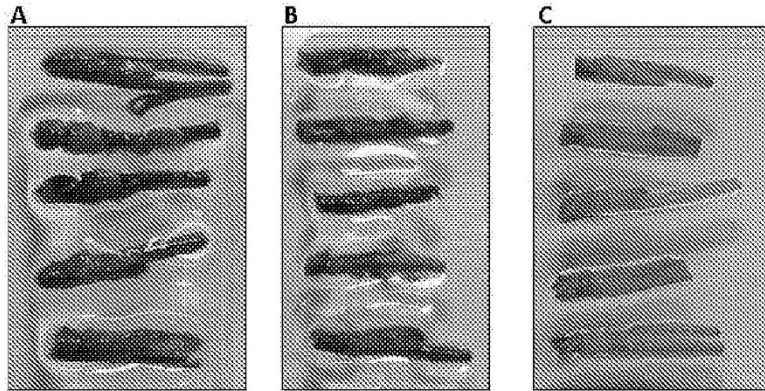


Figura 3

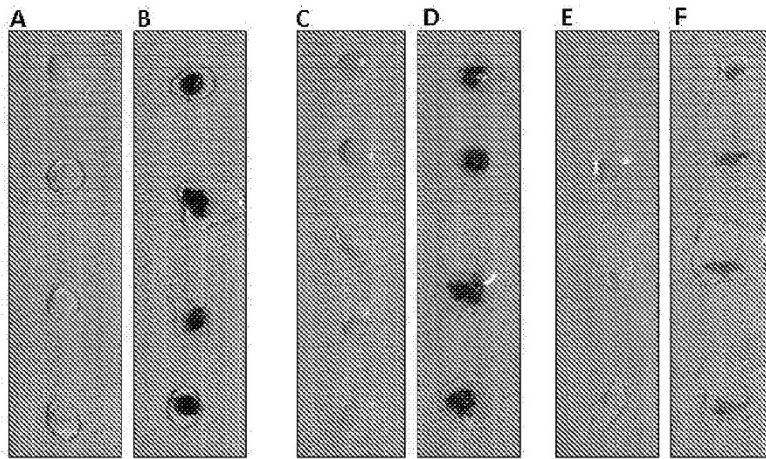


Figura 4

