

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 223**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2014 PCT/TR2014/000316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15026307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2014 E 14815460 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3035798**

54 Título: **Medio de criopreservación de células con adición de boro**

30 Prioridad:

**20.08.2013 TR 201309923**

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

**02.01.2019**

73 Titular/es:

**YEDITEPE UNIVERSITESI (100.0%)  
Inonu Mahallesi Kayisdagi Caddesi 26 Agustos  
Yerlesimi Atasehir  
34755 Istanbul, TR**

72 Inventor/es:

**SAHIN, FIKRETTIN;  
DEMIRCI, SELAMI y  
DOGAN, AYSEGUL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 695 223 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Medio de crioconservación de células con adición de boro

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un medio de crioconservación (congelación) que se puede usar para el almacenamiento a largo plazo de líneas celulares, muestras de tejidos, espermatozoides, ovocitos y embriones.

## 10 Antecedentes de la invención

El proceso de crioconservación (congelación) consiste en preservar una célula, tejido o un organismo completo a temperaturas bajo cero grados centígrados en condiciones adecuadas y en presencia de productos químicos. Está dirigido a detener las reacciones químicas y enzimáticas en grados de temperatura más bajos y almacenar los materiales sin dañarse. Para detener toda actividad biológica y realizar el proceso de congelación biológica más efectivo, se prefieren el nitrógeno líquido (-196°C) y el vapor. Existen crioconservantes que se desarrollan para este propósito y que protegen el material que se congelará contra el estrés de congelación y descongelación. El efecto perjudicial más importante del proceso de congelación es la acumulación de agua en el sistema vivo en áreas intercelulares e intracelulares en forma de cristales de hielo debido a la disminución de la temperatura (Carpenter y Hansen, 1992). El proceso de congelación y descongelación se realiza deteniendo las actividades biológicas disminuyendo lentamente la temperatura y luego calentando y transfiriendo rápidamente a un medio de cultivo normal. Uno de los eventos que ocurren durante esta aplicación y que se sabe que tienen efectos perjudiciales es el "efecto de disolución" (efecto del medio). Este efecto es causado por los metabolitos que se acumulan en la pequeña cantidad de medio líquido que queda después de la formación de hielo. Tras el lento proceso de congelación, las células se exponen a estos metabolitos durante un período de tiempo prolongado (Stachecki et al., 1998). Otro efecto perjudicial es el líquido intracelular que sale de la célula y forma cristales de hielo en la zona intercelular como consecuencia de una aplicación de congelación lenta. Los productos químicos como el glicerol, el dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO) y el 1,2- propanodiol (PrOH) se utilizan durante el proceso de congelación y reemplazan el agua permitiendo que salga de la célula. Esto se utiliza para eliminar los efectos perjudiciales del proceso de congelación (Stachecki et al., 1998). Ya que el proceso de congelación debe realizarse lentamente, el proceso de descongelación debe realizarse rápidamente. Las células que se descongelan rápidamente deben transferirse rápidamente a un medio de cultivo saludable para eliminar los efectos tóxicos de los químicos utilizados en el proceso de congelación (Buchanan et al., 2004). En este caso, se necesitan medios y métodos de congelación, que no sean tóxicos, puedan aumentar la viabilidad celular y puedan proporcionar una protección efectiva. Se necesita un proceso efectivo de crioconservación celular para embriones, espermatozoides y óvulos y líneas celulares importantes como las células madre. El almacenamiento de células madre y particularmente las células madre mesenquimales y el establecimiento de bancos de células madre son necesarios para aplicaciones terapéuticas (Woods et al., 2009). El almacenamiento de las células madre en condiciones adecuadas es extremadamente importante para poder usarlas de manera efectiva en terapia. La congelación y el almacenamiento a largo plazo son necesarios para que las células mantengan sus propiedades multipotentes, se almacenen en grandes cantidades y se transporten fácilmente (Gonda et al., 2008). El boro es un oligoelemento que se sabe que es importante particularmente en las plantas. En el sistema de los mamíferos, forma glicoproteínas de la membrana celular y complejos de borato de diéster y funciona como un regulador redox y también afecta la estructura y la función de la membrana (Goldbach et al., 2007).

45 El documento de patente europea No. EP0813361B1 se refiere a un medio utilizado para congelar las células, particularmente las células progenitoras eritroides en sangre.

50 El documento de patente de Estados Unidos No. US20130059381A1 se refiere a una solución de crioconservación celular que puede utilizarse para la crioconservación celular no programada.

55 P.N.TaSh, et al., en Biological Trace Element Research (2013) 153: 419-427 divulga el uso de soluciones de pentaborato de sodio pentahidratado con Me<sub>2</sub>SO, PSA y FBS para promover el destino del linaje osteogénico y odontogénico de células madre germinales de diente humano *in vitro*. Además, X. Ying, et al, en Biological Trace Element Research (2011) 144: 306-315 enseña el efecto del boro en las células estromales de la médula ósea. Sin embargo, tampoco se discute la crioconservación de células.

60 D. P. Miller en Pharmaceutical Research (1998), 15 (8), 1215-1221, enseña que el lactato deshidrogenasa se estabiliza en condiciones de congelación y descongelación en presencia de trehalosa y borato.

## Sumario de la invención

65 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un medio que permita congelar las células sin dañar la viabilidad celular.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un medio de crioconservación (congelación) que disminuya la tensión que se produce durante la congelación y reduzca la concentración de dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO).

5 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un medio de crioconservación que aumente la viabilidad celular mediante la reducción de la cantidad de Me<sub>2</sub>SO.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un medio de crioconservación que facilite el almacenamiento, el transporte y el almacenamiento de células.

10 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un medio de crioconservación que permita la congelación y el almacenamiento a largo plazo de las células, la protección de sus propiedades multipotentes y su almacenamiento en grandes cantidades.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un medio de crioconservación que facilite la congelación y el almacenamiento de espermatozoides, óvulos, embriones, células y materiales vegetales, líneas celulares sensibles y cancerosas, células madre (embrionarias y mesenquimales), sangre y células sanguíneas y material biológico y órganos.

20 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un medio de crioconservación que evite que el fluido intracelular fluya fuera de la célula y forme cristales de hielo en la zona intercelular durante la congelación.

Descripción detallada de la invención

25 "El medio de crioconservación de células con adición de boro" desarrollado para cumplir los objetivos de la presente invención se ilustra en las figuras adjuntas, en las que

La Figura 1 es la vista del efecto del pentaborato de sodio pentahidratado en la viabilidad celular durante un período de tres días (nc: control negativo, pc: control positivo \* p <0,05).

30 La Figura 2 es la vista del efecto del pentaborato de sodio pentahidratado que contiene medio de crioconservación sobre la viabilidad celular después de la repetición y la congelación a largo plazo (nc: control negativo, NaB: pentaborato de sodio pentahidratado, FT: proceso de congelación y descongelación \*p <0,05).

35 La Figura 3 es la vista del último estado de las células madre germinales de diente humano después de la tinción con von Kossa (A), azul Alcian (B) y rojo aceite (C). (von Kossa muestra la diferenciación odontogénica, el azul Alcian muestra diferenciación condrogénica y el rojo aceite muestra diferenciación adipogénica). (C(5): Congelación de control con 5% de Me<sub>2</sub>SO, N: NaB + 5% Me<sub>2</sub>SO, C(10): Grupo de control estándar congelado con 10% de Me<sub>2</sub>SO) (escala de aumento: 400 μm).

40 La Figura 4 es la representación de la diferenciación ósea, cartilaginosa y adiposa con análisis de inmunocitoquímica. Col I y Osteocalcina muestran diferenciación ósea, Col II muestra diferenciación del cartílago y FABP4 muestra diferenciación adiposa. (C(5): Congelación de control con 5% de Me<sub>2</sub>SO, N: pentaborato de sodio pentahidratado (NaB) + 5% Me<sub>2</sub>SO, C(10): Grupo de control estándar congelado con 10% de Me<sub>2</sub>SO) (barra de escala: 100 μm).

45 Estudio experimental

Análisis de citotoxicidad

50 Los análisis de viabilidad celular se realizaron con 13 concentraciones diferentes que oscilan entre 5 μg/mL y 700 μg/mL para mostrar si el pentaborato de sodio pentahidratado tiene un efecto tóxico en las células madre germinales de diente humano. La solución madre se disolvió en medio de pentaborato de sodio pentahidratado a 10 mg/mL y se preparó filtrando a través de un filtro de 0,22 μm. Las concentraciones intermedias para aplicar en las células se prepararon en el medio de cultivo celular y se aplicaron en las células madre germinales de diente humano.

55 Procedimiento de congelación

60 Durante el proceso de congelación, a diferencia del protocolo estándar, se añadieron 20 μg/mL de NaB al medio de crioconservación celular. El grupo de control se incubó mediante un medio de crioconservación estándar. Durante la congelación de las células, se agregaron diferentes cantidades de Me<sub>2</sub>SO (10%, 7%, 5% y 3% de Me<sub>2</sub>SO) al medio que contenía 20% de FBS (suero fetal bovino) y 1% de PSA (penicilina, estreptomocina, anfotericina) junto con 20 μg/mL de pentaborato de sodio pentahidratado. Excepto por el grupo que se congeló a largo plazo (6 meses), las otras células se sometieron a 4 procesos repetidos de congelación y descongelación. Durante cada proceso de congelación, un millón de células se colocaron en un tubo de congelación y se congelaron a -80°C utilizando un tanque de congelación. Los tubos de congelación se transfirieron a vapor de nitrógeno líquido a -196°C un día

después. Después de cada proceso de congelación, las células se fundieron rápidamente en un baño de agua a 37°C y se realizaron análisis de viabilidad con azul de tripano.

#### Estudios de diferenciación

5 Las células congeladas a largo plazo se descongelaron y se sometieron a experimentos de diferenciación para determinar si 20 µg/mL de pentaborato de sodio pentahidratado, que se usó durante el proceso de congelación, diferente del procedimiento estándar, tuvo algún efecto sobre la diferenciación de células mesenquimales. Las células que indujeron diferenciación osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas se sometieron a tinción (von Kossa, Azul Alcían y rojo aceite) y los análisis de inmunocitoquímica (Col I, Col II, Osteocalcina, FABP4) para mostrar que no formó ninguna diferencia después de la diferenciación.

#### Análisis estadístico

15 Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba t de Student y el programa Graph-Pad Prism.

#### Resultados experimentales

20 Se completaron las viabilidades celulares para determinar la concentración adecuada de pentaborato pentahidratado a aplicar antes de comenzar los experimentos de congelación. Se observó un efecto tóxico en tres días a concentraciones de 200 µg/mL y superiores (Figura 1). Entre las concentraciones que no tuvieron ningún impacto negativo en la viabilidad celular, se seleccionaron 20 µg/mL de pentaborato de sodio pentahidratado para usar en los experimentos de congelación. Como resultado del análisis de viabilidad celular de las células que fueron congeladas repetidamente y las células que fueron congeladas y almacenadas a largo plazo, se observó que el uso de 20 µg/mL de pentaborato de sodio pentahidratado en presencia de 5% de Me<sub>2</sub>SO disminuyó el efecto tóxico. Por lo tanto, el uso de 5% de Me<sub>2</sub>SO en el medio de crioconservación hizo posible aumentar la viabilidad celular. Se observó que la viabilidad celular comenzó a aumentar durante y después del segundo proceso de congelación y descongelación (Figura 2). Las células en el grupo al que se aplicó 5% de Me<sub>2</sub>SO se descongelaron después de un experimento de congelación a largo plazo y se realizaron pruebas de diferenciación para caracterizar sus propiedades mesenquimales. Después de los experimentos de diferenciación, mientras se observó un aumento en la diferenciación de las células en linajes odontogénicos y condrogénicos, se observó una ligera disminución en la diferenciación de células madre en tejido adiposo. De acuerdo con los análisis de tinción e inmunocitoquímica, se encontró que no hubo un cambio significativo en los potenciales de diferenciación de las células (Figura 3-4).

#### 35 Aplicación de la invención.

La invención es un medio de congelación crioconservante (crioconservación) que evita el daño que podría producirse en las células y tejidos durante el proceso de congelación y descongelación. Dicha invención se utiliza para almacenar tejidos vivos como islotes pancreáticos, piel, córnea, válvulas cardíacas, venas, sangre y células sanguíneas, sangre y tejido del cordón umbilical, órganos y tejidos que son importantes para terapia de trasplante. Además, también se puede usar para el almacenamiento a largo plazo de células madre que pueden usarse en regeneración de tejidos y en terapia génica, tal como células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre embrionarias, células IPS (células madre pluripotentes inducidas). La invención se puede usar para almacenar células cancerosas, líneas celulares primarias (fibroblastos, queratinocitos, etc.) y líneas celulares inmortalizadas, utilizadas en estudios experimentales. Dicha invención se puede usar para el almacenamiento de espermatozoides humanos y animales, óvulos, tejidos de testículo y ovario que se pueden almacenar para uso en propósitos de fertilización *in vitro*.

#### Referencias

- 50 Buchanan, S. S., Gross, S. A., Acker, J. P., Toner, M., Carpenter, J. F., y Pyatt, D. W. (2004). Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem cells and development*, 13(3), 295-305.
- 55 Carpenter, J. F., y Hansen, T. N. (1992). Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 8953-8957.
- 60 Goldbach, H. E., Huang, L., y Wimmer, M. A. (2007). Boron functions in plants and animals: recent advances in boron research and open questions. In *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition* (páginas 3-25). Springer Netherlands.
- Gonda, K., Shigeura, T., Sato, T., Matsumoto, D., Suga, H., Inoue, K., y Yoshimura, K. (2008). Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plastic and reconstructive surgery*, 121(2), 401-410.

65

Stachecki, J. J., Cohen, J., y Willadsen, S. (1998). Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. *Biology of reproduction*, 59(2), 395-400.

5 Woods, E. J., Perry, B. C., Hockema, J. J., Larson, L., Zhou, D., y Goebel, W. S. (2009). Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*, 59(2), 150-157.

**REIVINDICACIONES**

1. Un medio de crioconservación que comprende:

- 5
- 20 µg/mL de pentaborato de sodio pentahidratado,
  - 20% de FBS (suero fetal bovino)
  - 1% de PSA (penicilina, estreptomicina, anfotericina) y 10%, 7%, 5% o 3% de Me<sub>2</sub>SO.

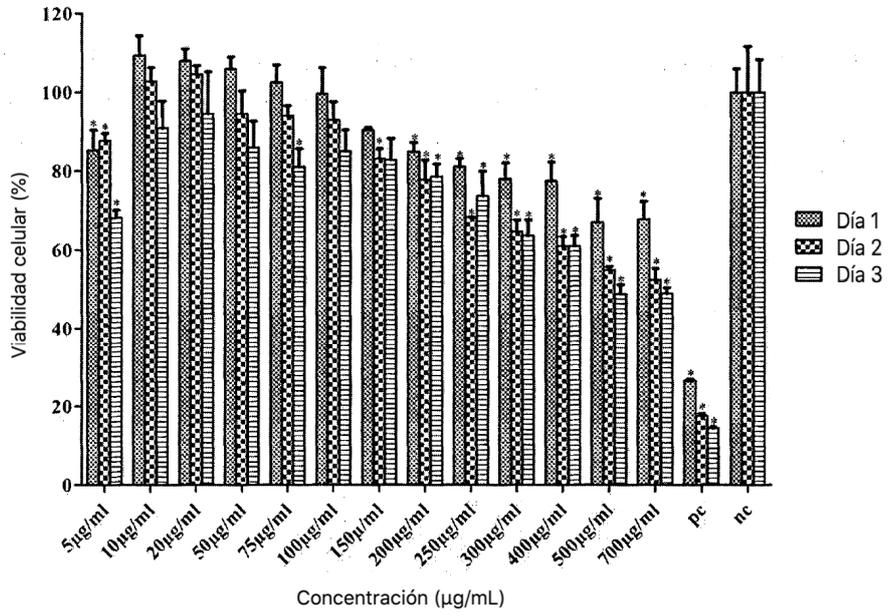


Figura 1.

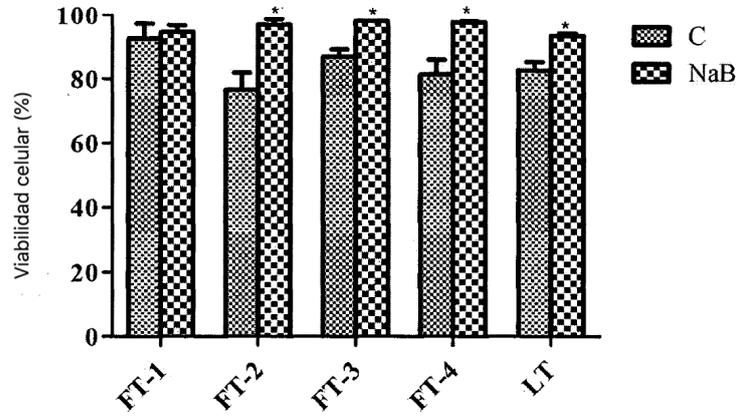


Figura 2

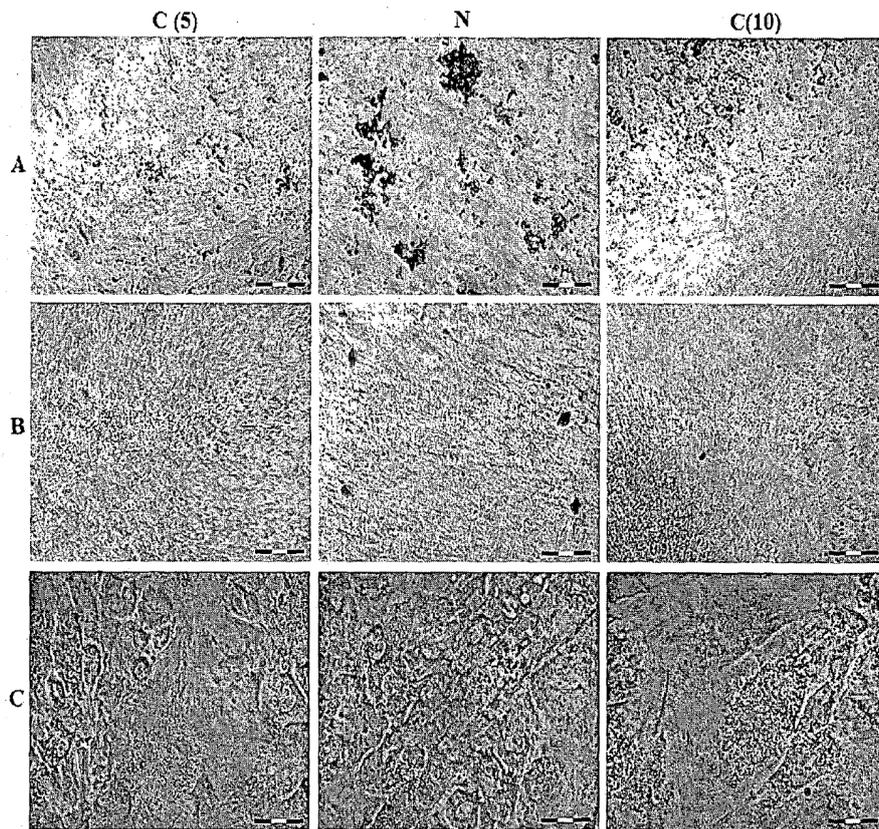


Figura 3

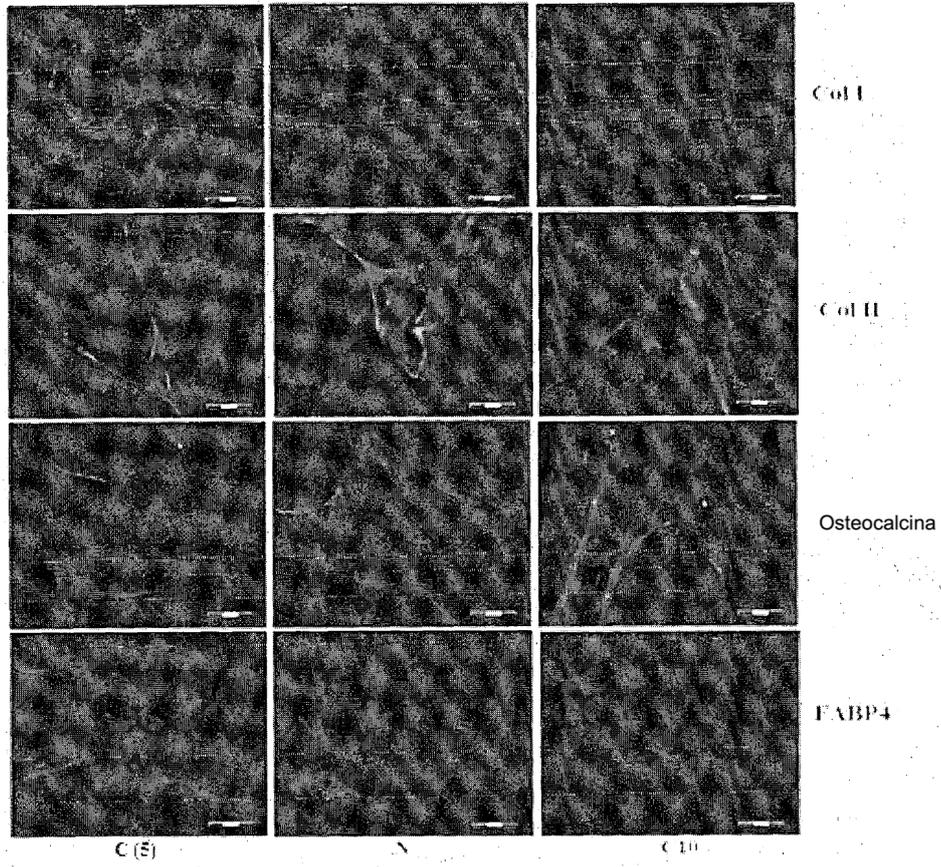


Figura 4