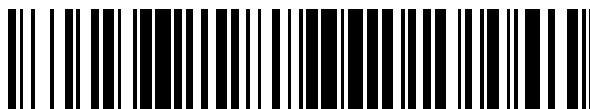


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 999**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2014** **PCT/JP2014/003266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014** **WO14208053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2014** **E 14818277 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** **EP 3015545**

54 Título: **Solución que contiene trehalosa y dextrano para el trasplante celular de mamíferos**

30 Prioridad:

28.06.2013 JP 2013137454

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2019

73 Titular/es:

OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.
(100.0%)
115 Aza Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho
Naruto-shi, Tokushima 7728601, JP

72 Inventor/es:

NISHIMURA, MASUHIRO;
WADA, TAMAKI;
SHIRAKAWA, CHIKAGE y
DOI, MASAOKO

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 708 999 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

Solución que contiene trehalosa y dextrano para el trasplante celular de mamíferos

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para conservar células de mamífero en una solución acuosa fisiológica para el trasplante celular que comprende del 2,0 al 6,0 % (p/v) de trehalosa, o una sal de trehalosa (en adelante, a veces denominada "una trehalosa") y del 4,0 al 7,0 % (p/v) de dextrano, o una sal de dextrano (en adelante, a veces denominado "un dextrano") (en adelante, a veces referido como "la presente solución para trasplante celular"), donde la célula de mamífero se conserva en la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular durante 1 a 14 días.

Antecedentes en la técnica

15 [0002] En los últimos años, el rápido progreso de los estudios con células madre ha aumentado el impulso hacia la medicina regenerativa, y su conocimiento y comprensión se han generalizado no solo en los investigadores sino también en el público. La medicina regenerativa que utiliza células madre es un tratamiento destinado a restablecer la función de las células y tejidos dañados por diversas enfermedades mediante el uso del potencial de auto-renovación y la pluripotencia de las células madre o los factores secretados por las células madre. El trasplante de médula ósea en pacientes con enfermedades hematológicas intratables, como la leucemia y la anemia aplásica, provoca el injerto de progenitores hematopoyéticos en el cuerpo de estos pacientes, lo que permite el mantenimiento de la capacidad hematopoyética durante casi toda la vida. Recientemente, muchos investigadores han apuntado a la aplicación clínica utilizando células madre distintas de las células madre hematopoyéticas, han identificado células madre en nervios centrales, nervios periféricos, médula ósea, intestino delgado y similares, y han comenzado a implementar el tratamiento de trasplante celular madre de tejido de enfermedad traumática y enfermedad de degeneración tisular (Documentos sin patente 1 a 3). Por otro lado, la terapia de células inmunitarias contra el cáncer es el tratamiento celular más avanzado en el que las células inmunitarias que actúan para atacar el cáncer se llevan al exterior del cuerpo, seguidas de la potenciación de su acción y a continuación las células se devuelven al interior del cuerpo y se implementan terapias que utilizan células T, como la terapia con vacunas de células dendríticas, terapia con células T alfa/beta (terapia con células T $\alpha\beta$), terapia con células T delta/delta (terapia con células T $\gamma\delta$), terapia con CTL, y la terapia de células asesinas naturales (terapia de células NK).

[0003] Cuando las células madre o células T utilizadas para el tratamiento de trasplante se conservan durante un largo período de tiempo, la conservación en un líquido no puede mantener satisfactoriamente la tasa de supervivencia de las células. Por ejemplo, se informa que la conservación en frío (a 4 °C) de las células madre de médula ósea humana en solución salina disminuye la tasa de supervivencia celular al 40 % o menos después de 48 horas y al 20 % o menos después de 72 horas (Documento sin patente 4). Por lo tanto, cuando las células madre para trasplante o las células T para trasplante se conservan durante un largo período de tiempo, comúnmente se lleva a cabo la conservación por congelación. Sin embargo, el líquido de conservación por congelación normalmente contiene un agente de conservación por congelación, como DMSO o glicerol; por lo tanto, es necesario eliminar el agente de conservación por congelación para el trasplante antes de realizar el tratamiento de trasplante después de descongelar células madre o células T conservadas por congelación, que ha sido considerado problemático por ser muy laborioso. El líquido de conservación por congelación que contiene un agente de conservación por congelación también se ha considerado problemático porque provoca un daño significativo del citoesqueleto debido a la cristalización del agua durante la congelación y disminuye la tasa de supervivencia celular después de la congelación y descongelación. Por lo tanto, se ha considerado una necesidad urgente para el desarrollo de un líquido de conservación celular excelente en cuanto a la simplicidad de uso y capaz de suprimir una disminución en la tasa de supervivencia celular.

50 [0004] La trehalosa es un tipo de disacárido formado por el enlace 1,1-glucósido de las glucosas. La trehalosa se usa en diversos alimentos y cosméticos porque presenta un sabor dulce y tiene una alta capacidad de retención de agua. La trehalosa también se usa como ingrediente activo de una solución protectora de órganos en el trasplante de órganos porque tiene las propiedades de estabilizar la membrana celular y eliminar el daño celular. Por ejemplo, se han desarrollado excelentes soluciones de conservación de órganos que contienen trehalosa, como la solución ET-Kyoto y la nueva solución ET-Kyoto (documentos de patente 1 y 2 y documento sin patente 5).

[0005] El dextrano es un tipo de polisacárido que consiste en glucosa y se usa ampliamente como espesante, humectante o similar en los campos de la medicina y la cosmética.

60 [0006] Los presentes inventores han informado que el lavado de células madre mesenquimales desprendidas de un recipiente de cultivo celular mediante tratamiento con enzimas proteolíticas con una solución acuosa fisiológica que contiene trehalosa suprimió la muerte de las células madre mesenquimales (Documento de patente 3). Debido a que el daño de las células por el tratamiento con enzimas proteolíticas induce una vía de muerte celular (apoptosis o similar), dicho efecto por la trehalosa se debe probablemente a la supresión de una vía de apoptosis o

la promoción de la función que repara el daño celular. Los presentes inventores también han informado que la adición de un sacárido, como la trehalosa o el dextrano, a una suspensión de células madre mesenquimales puede suprimir la agregación, y una disminución en la tasa de supervivencia, de las células madre mesenquimales cuando se han conservado durante un corto período de tiempo (30 minutos a 6 horas) (Documentos de patente 4 y 5). Sin embargo, no está claro si el uso combinado de trehalosa y dextrano puede suprimir sinérgicamente una disminución en la tasa de supervivencia de células de mamíferos, como las células madre mesenquimales, y aumentar sinérgicamente el porcentaje de células vivas.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

[0007]

- Documento de patente 1: Patente japonesa n.º 3253131
- Documento de patente 2: Publicación Internacional n.º WO 2007/043698
- Documento de patente 3: Publicación Internacional n.º WO 2012/133575
- Documento de patente 4: n.º de publicación de solicitud de patente japonesa no examinada 2012-115253
- Documento de patente 5: Publicación Internacional n.º WO 2012/063870

Documentos sin patente

[0008]

- Documento sin patente 1: Gage, F. H., Science 287: 1433-1438 (2000)
- Documento sin patente 2: Morrison, S. J. et al., Cell 96: 737-749 (1999)
- Non-patente Documento 3: Batle, E. et al., Cell 111: 251-263 (2002)
- Documento sin patente 4: Lane, T. A. et al., Transfusion 49: 1471-1481 (2009)
- Documento sin patente 5: Chem, F. et al., Yonsei Med. J. 45: 1107-1114 (2004)

Resumen de la invención

Objeto para resolver por la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para conservar células de mamífero durante un largo período de tiempo usando una solución para trasplante celular, capaz de suprimir eficazmente la muerte celular cuando las células de mamífero se han conservado, y la solución para trasplante celular.

Medios para resolver el objeto

Los presentes inventores han informado que, como se ha descrito anteriormente, la conservación a corto plazo (de 30 minutos a 6 horas) de las células madre mesenquimales en una solución que contiene un sacárido, como trehalosa o dextrano, puede suprimir una disminución en la tasa de supervivencia de las células (Documentos de patente 4 y 5). Sin embargo, la invención descrita en los Documentos de patente 4 y 5 no demostró un efecto sinérgico por el uso combinado de trehalosa y dextrano. En estudios intensivos para resolver el problema anterior, se ha encontrado que la conservación de células madre mesenquimales humanas de médula ósea (hMSC-BM) o células T de sangre periférica humana (hPBT) en una solución fisiológica acuosa que contiene trehalosa y dextrano a concentraciones particulares del 2,0 al 6,0 % [p/v] y del 4,0 al 7,0 % [p/v], respectivamente, pueden suprimir sinérgicamente una disminución en la tasa de supervivencia de las células durante un largo período de tiempo (1 a 14 días) y aumentar sinérgicamente el porcentaje de células vivas, logrando así la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a (1) un procedimiento para conservar una célula de mamífero en una solución acuosa fisiológica para el trasplante celular que comprende del 2,0 al 6,0 % (p/v) de trehalosa, o una sal de trehalosa, y del 4,0 al 7,00 (p/v) de dextrano, o una sal de dextrano, en el que la célula de mamífero se conserva en la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular durante 1 a 14 días, (2) el procedimiento de acuerdo con (1) anterior, en el que la solución acuosa fisiológica se selecciona del grupo que consiste en solución de lactato de Ringer, solución salina, solución de Ringer y solución de acetato de Ringer, (3) el procedimiento de acuerdo con (1) o (2) anterior, en el que la célula de mamífero se conserva en la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular durante 3 a 14 días, (4) el procedimiento de acuerdo con uno de los puntos (1) a (3) anteriores, en el que la célula de mamífero es una célula madre mesenquimal de mamífero o una célula T de mamífero, y (5) el procedimiento de acuerdo con (4) anterior, en el que la célula madre mesenquimal de mamífero es una célula madre mesenquimal humana de médula ósea y la célula T de mamífero es una célula T de sangre periférica humana.

[0012] En el presente documento también se describe (6) una solución acuosa fisiológica para el trasplante celular que comprende del 2,0 al 6,0 % (p/v) de trehalosa, uno de sus derivados, o una sal de trehalosa o uno de sus derivados, y del 4,0 al 7,0 % (p/v) de dextrano, uno de sus derivados, o una sal de dextrano o uno de sus derivados, (7) la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular de acuerdo con (6) anterior, en el que la solución acuosa fisiológica se selecciona del grupo que consiste en solución de lactato de Ringer, solución salina, solución de Ringer y solución de acetato de Ringer, (8) la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular de acuerdo con (6) o (7) anterior, en el que la célula de mamífero es una célula madre mesenquimal de mamífero o una célula T de mamífero, y (9) la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular de acuerdo con (8) anterior, en el que la célula madre mesenquimal de mamífero es una célula madre mesenquimal humana de médula ósea y la célula T de mamífero es una célula T de sangre periférica humana.

[0013] También se describe (10) una solución acuosa fisiológica que contiene células para trasplante que comprende: una célula de mamífero; del 2,0 al 6,0 % (p/v) de trehalosa, uno de sus derivados, o una sal de trehalosa o uno de sus derivados; y del 4,0 al 7,0 % (p/v) de dextrano, uno de sus derivados o una sal de dextrano o uno de sus derivados, (11) la solución acuosa fisiológica que contiene células para trasplante de acuerdo con (10) anterior, en la que la solución acuosa fisiológica se selecciona del grupo que consiste en la solución de lactato de Ringer, solución salina, solución de Ringer y solución de acetato de Ringer, (12) la solución acuosa fisiológica que contiene células para trasplante según (10) u (11) anterior, en el que la célula de mamífero es una célula madre mesenquimal de mamífero o una célula T de mamífero, y (13) la solución acuosa fisiológica que contiene células para trasplante de acuerdo con (12) anterior, en el que la célula madre mesenquimal de mamífero es una célula madre mesenquimal humana de médula ósea y la célula T de mamífero es una célula T de sangre periférica humana.

[0014] Además, se describe una combinación de una solución acuosa fisiológica y trehalosa, uno de sus derivados, o una sal de trehalosa o uno de sus derivados y dextrano, uno de sus derivados o una sal de dextrano o uno de sus derivados para conservar células de mamíferos, y el uso de una combinación de una solución acuosa fisiológica y trehalosa, uno de sus derivados, o una sal de trehalosa o uno de sus derivados y dextrano, uno de sus derivados o una sal de dextrano o uno de sus derivados para preparar una solución para el trasplante celular de mamíferos; más específicamente, la trehalosa descrita anteriormente, uno de sus derivados, o una sal de trehalosa o uno de sus derivados y el dextrano, uno de sus derivados o una sal del dextrano o uno de sus derivados son ingredientes activos para suprimir una disminución en la tasa de supervivencia de las células.

Efecto de la invención

[0015] De acuerdo con la presente invención, se puede suprimir una disminución en la tasa de supervivencia de las células, incluidas las células madre, como las células madre mesenquimales, y los leucocitos, como las células T, cuando la suspensión de las células se conserva durante un largo período de tiempo (1 a 14 días); por lo tanto, se puede proporcionar una suspensión celular de buena calidad para trasplante en medicina regenerativa o tratamiento contra el cáncer no solo a un área de producción para la suspensión celular y sus áreas periféricas sino también a lugares distantes, y aunque se realiza una prueba de esterilidad para la inspección de garantías de calidad en el envío de un producto farmacéutico y la prueba de esterilidad dura un período de 14 días según la Farmacopea japonesa, la suspensión celular de buena calidad se puede proporcionar incluso después de producir la suspensión celular y realizar la prueba de esterilidad.

Breve descripción de los dibujos

[0016]

[Figura 1] La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 14 días utilizando cada una de las 11 soluciones para trasplante celular de mamíferos (soluciones S, LR, "LR + 1 % D", "LR + 3 % D", "LR + 5 % D", "LR + 7 % D", "LR + 3 % T", "LR + 3 % T + 1 % D", "LR + 3 % T + 3 % D", "LR + 3 % T + 5 % D", y "LR + 3 % T + 7 % D": véase "1-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 1). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas según el número total de células de acuerdo con la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). Como control, se muestra la tasa de supervivencia celular antes de la conservación en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS [-]) (en lo sucesivo, simplemente denominada "PBS") ("P" en el eje de abscisas de la figura).

[Figura 2] La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 3 días, 7 días y 14 días utilizando cada una de las 11 soluciones para trasplante celular de mamíferos (soluciones S, LR, "LR + 1 % D", "LR + 3 % D", "LR + 5 % D", "LR + 7 % D", "LR + 3 % T", "LR + 3 % T + 1 % D", "LR + 3 % T + 3 % D", "LR + 3 % T + 5 % D", y "LR + 3 % T + 7 % D" [2 a 12", respectivamente en el eje de abscisas en la figura]: véase "1-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 1). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas según el número total de células de acuerdo con la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). Como control, se muestra la tasa de supervivencia celular antes de la conservación (0 días después de la conservación) en solución de PBS ("1" en el

eje de abscisas en la figura).

[Figura 3] La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 14 días utilizando cada una de las 13 soluciones para el trasplante celular de mamíferos (soluciones S, LR, "LR + 1 % T", "LR + 3 % T", "LR + 5 % T", "LR + 7 % T", "LR + 10 % T", "LR + 5 % D", "LR + 5 % D + 1 % T", "LR + 5 % D + 3 % T", "LR + 5 % D + 5 % T", "LR + 5 % D + 7 % T" y "LR + 5 % D + 10 % T": véase "2-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 2). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas según el número total de células de acuerdo con la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). Como control, se muestra la tasa de supervivencia celular antes de la conservación en solución de PBS ("P" en el eje de abscisas en la figura).

[Figura 4] La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 3 días, 7 días y 14 días utilizando cada una de las 11 soluciones para trasplante celular de mamíferos (soluciones S, LR, "LR + 1 % T", "LR + 3 % T", "LR + 5 % T", "LR + 7 % T", "LR + 5 % D", "LR + 5 % D + 1 % T", "LR + 5 % D + 3 % T", "LR + 5 % D + 5 % T", y "LR + 5 % D + 7 % T" ["2 a 12", respectivamente en el eje de abscisas en la figura]: véase "2-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 2). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas según el número total de células de acuerdo con la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). Como control, se muestra la tasa de supervivencia celular antes de la conservación (0 días después de la conservación) en solución de PBS ("1" en el eje de abscisas en la figura).

[Figura 5] La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 14 días usando cada una de las 11 soluciones para el trasplante celular de mamíferos (soluciones S, LR, LRD, LRTD, "LRD + GL", "LRD + SR", "LRD + MN", "LRD + LC", "LRD + RF", "LRD + ML" y "LRD + SC": véase "3-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 3). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas según el número total de células de acuerdo con la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). "*" en la figura muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) contra la LRD según la prueba de Dunnett.

[Figura 6] La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 14 días usando cada una de las 11 soluciones para el trasplante celular de mamíferos (soluciones S, LR, LRT, LRTD, "LRT + GL", "LRT + SR", "LRT + MN", "LRT + LC", "LRT + RF", "LRT + ML" y "LRT + SC": véase "4-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 4). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas según el número total de células de acuerdo con la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). "*" en la figura muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) contra LRT según la prueba de Dunnett.

[Figura 7] La Figura 7 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 14 días usando cada una de las 11 soluciones para el trasplante celular de mamíferos (soluciones S [solución salina normal de Otsuka], LR [inyección de Lactec], LRD [5 % (p/v) de inyección de Lactec que contiene dextrano], LRT [3 % (p/v) de inyección de Lactec que contiene trehalosa], "LR + GL" [inyección de Lactec que contiene glucosa], "LR + SR" [inyección de Lactec que contiene sorbitol], "LR + MN" [inyección de Lactec que contiene manitol], "LR + LC" [inyección de Lactec que contiene lactosa], "LR + RF" [inyección de Lactec que contiene rafinosa], "LR + ML" [inyección de Lactec que contiene maltosa], y "LR + SC" [inyección de Lactec que contienen sacarosa]. El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas en función del número total de células como la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). "****" en la figura muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) contra LR según la prueba de Dunnett.

[Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 14 días utilizando cada una de las 10 soluciones para trasplante celular de mamíferos (soluciones LR, LRTD, S, STD, 5 % de glucosa, 5 % de glucosa TD, Ringer TD, Veen y Veen TD: véase "5-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 5). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas según el número total de células de acuerdo con la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 4]). Como control, se muestra la tasa de supervivencia de las células antes de la conservación en solución de PBS ("P" en el eje de abscisas en la figura).

[Figura 9] La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron las hPBT durante 1 día, 3 días, 7 días y 14 días utilizando cada una de las 5 soluciones para trasplante celular de mamíferos (soluciones S, LR, LRT, LRD y LRTD). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de células vivas en función del número total de células según la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica [n = 6]). Como control, se muestra la tasa de supervivencia de las células antes de la conservación (0 días después de la conservación) en solución de PBS ("P" en el eje de abscisas en la figura).

Modo de realización de la invención

[0017] El procedimiento para conservar células de mamíferos de acuerdo con la presente invención es un procedimiento limitado a la aplicación de "para su uso en trasplantes de células", que implica conservar células de mamíferos en una solución acuosa fisiológica que comprende del 2,0 al 6,0 % (p/v) de una trehalosa y del 4,0 al 7,0 % (p/v) de un dextrano (la presente solución para el trasplante celular); más específicamente, la presente solución para el trasplante celular comprende una trehalosa y un dextrano como ingredientes activos para suprimir una

solución para trasplante celular normalmente está en el intervalo de 10^3 a 10^{10} células/ml.

[0018] Para la presente solución para trasplante celular, las células de mamíferos están contenidas en la misma. La presente solución para trasplante celular se puede preparar añadiendo células de mamífero a la presente
5 solución para trasplante celular, o añadiendo una trehalosa del 2,0 al 6,0 % (p/v) y un dextrano del 4,0 al 7,0 % (p/v) a una solución acuosa fisiológica que contiene células de mamíferos.

[0019] Los ejemplos de mamíferos según la presente invención pueden incluir un roedor, como un ratón, una rata, un hámster o un conejillo de indias, un lagomorfo, como un conejo, un ungulado, como un cerdo, una vaca, una
10 cabra, un caballo o una oveja, un carnívoro, como un perro o un gato, y un primate, como un ser humano, un mono, un mono rhesus, un mono cynomolgus, un tití, un orangután o un chimpancé; entre otros, los ejemplos preferibles de los mismos pueden incluir un ratón, un cerdo y un ser humano.

[0020] La solución acuosa fisiológica aplicada a la presente solución para trasplante celular no está
15 particularmente limitada siempre que sea una solución acuosa isotónica en la que las concentraciones de sal y azúcar y similares se ajusten con sodio, potasio y similares para proporcionar casi la misma presión osmótica que la del fluido corporal o celular. Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir solución salina, soluciones salinas que tienen efectos de tamponamiento (solución salina tamponada con fosfato [PBS], solución salina tamponada con Tris [TBS] y solución salina tamponada con HEPES), solución de Ringer, solución de lactato de
20 Ringer, solución de acetato de Ringer, solución de bicarbonato de Ringer, solución acuosa de glucosa al 5 %, medios basales para cultivo de células animales (DMEM, EMEM, RPMI-1640, α -MEM, F-12, F-10, M-199 y similares) y agentes isotónicos (glucosa, D-sorbitol, D-manitol, lactosa, cloruro de sodio y similares); entre otros, se prefiere uno seleccionado del grupo que consiste en solución de lactato de Ringer, solución salina, solución de Ringer y solución de acetato de Ringer; la solución de lactato de Ringer o solución salina son particularmente
25 preferidas. La solución acuosa fisiológica puede estar disponible en el mercado o ser de preparación propia. Los ejemplos disponibles en el mercado pueden incluir solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (solución salina), solución de Ringer "OTSUKA" (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (solución de Ringer), inyección Lactec (R) (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (solución de lactato de Ringer), Veen F Infusion (de Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.) (solución de acetato de Ringer), OTSUKA GLUCOSE
30 INJECTION 5 % (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (solución acuosa de glucosa al 5 %), y Bicanate Infusion (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (solución de bicarbonato de Ringer). Tal como se usa en el presente documento, el término "isotónico" significa que tiene una presión osmótica que oscila de 250 a 380 mOsm/l.

[0021] La presente solución para trasplante celular puede complementarse adecuadamente con aditivos,
35 como un estabilizador (por ejemplo, albúmina de suero humano o polietilenglicol), un tampón (por ejemplo, tampón fosfato o tampón de acetato de sodio), un agente quelante (por ejemplo, EDTA, EGTA, ácido cítrico o salicilato), un aminoácido (por ejemplo, un aminoácido no esencial, como glutamina, alanina, asparagina, serina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, prolina o tirosina), una vitamina (por ejemplo, cloruro de colina, ácido pantoténico, ácido fólico, nicotinamida, clorhidrato de piridoxal, riboflavina, clorhidrato de tiamina, ácido ascórbico, biotina o
40 inositol), un solubilizante, un conservante y un antioxidante.

[0022] El período de conservación cuando las células de mamíferos se conservan en la presente solución para el trasplante celular puede ser un tiempo suficiente para suprimir una disminución en la tasa de supervivencia celular y aumentar el porcentaje de células vivas, y es de 1 día o más, 2 días o más, 3 días o más, o 7 días o más.
45 Debido a que un período demasiado largo para conservar células de mamíferos tiene la posibilidad de afectar negativamente la supervivencia de las células, el período es de 14 días o menos para evitar el efecto adverso sobre la tasa de supervivencia de las células. Por lo tanto, el período de conservación es de 1 a 14 días, de 2 a 14 días, de 3 a 14 días, o de 7 a 14 días, más preferiblemente de 3 a 14 días. La supresión de la muerte de células de mamíferos conservadas en la presente solución para trasplante celular puede confirmarse mediante un
50 procedimiento conocido capaz de detectar la muerte celular, como el procedimiento de tinción con azul de tripano, procedimiento TUNEL, procedimiento Nexin o procedimiento FLICA.

[0023] La temperatura de conservación cuando las células de mamíferos se conservan en la presente solución para trasplante celular puede ser una temperatura a la que la solución para trasplante celular no se congele
55 y las células sean viables, y se encuentren en el intervalo de 0 a 37 °C, preferiblemente de 0 a 25 °C (temperatura ambiente).

[0024] Los ejemplos de trehalosa en forma de una trehalosa como se ha descrito anteriormente pueden incluir α , β -trehalosa como un disacárido en el que las moléculas de α -glucosa y β -glucosa están unidas por enlaces
60 1,1-glucósido y β , β -trehalosa como un disacárido en el que 2 moléculas de β -glucosa están unidas por enlaces 1,1-glucósido, además de α , α -trehalosa como disacárido en el que 2 moléculas de α -glucosa están unidas por enlaces 1,1-glucósido; entre otras, es preferible la α , α -trehalosa. Estas trehalosas pueden producirse por cualquiera de los procedimientos conocidos, tales como síntesis química, producción por un microorganismo y producción por una enzima; sin embargo, también se pueden utilizar las disponibles en el mercado. Sus ejemplos pueden incluir α , α -trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) y α , α -trehalosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.).
65

- [0025]** Los ejemplos de la sal de trehalosa en forma de una trehalosa como se ha descrito anteriormente pueden incluir una sal de adición de ácido, tal como un clorhidrato, un bromhidrato, un yodhidrato, un fosfato, un nitrato, un sulfato, un acetato, un propionato, un toluenosulfonato, un succinato, un oxalato, un lactato, un tartrato, un glicolato, un metanosulfonato, un butirato, un valerato, un citrato, un fumarato, un maleato y un malato; una sal metálica, tal como una sal de sodio, una sal de potasio y una sal de calcio; una sal de amonio; y una sal de alquilamonio. Estas sales se utilizan cada una en forma de solución en el momento de su uso, y su acción tiene preferiblemente la misma potencia que la de la trehalosa. Estas sales pueden formar hidratos o solvatos, y pueden usarse solas o en una combinación adecuada de dos o más de ellas.
- [0026]** El dextrano en forma de un dextrano como se ha descrito anteriormente no está particularmente limitado siempre que sea un polisacárido $(C_6H_{10}O_5)_n$ que consiste en D-glucosa, usando un enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$ como cadena principal, y ejemplos del mismo pueden incluir dextrano 40 (peso molecular promedio en peso (Mw) = 40.000) y dextrano 70 (Mw = 70.000). Estos dextranos pueden producirse por cualquiera de los procedimientos conocidos, como síntesis química, producción por un microorganismo y producción por una enzima; sin embargo, también se pueden utilizar disponibles en el mercado. Los ejemplos de los mismos pueden incluir productos comerciales, tales como la inyección Low Molecular Weight Dextran L Injection (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) y Dextran 70 (de Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.).
- [0027]** Los ejemplos de la sal de dextrano en forma de un dextrano como se ha descrito anteriormente pueden incluir una sal de adición de ácido, como un clorhidrato, un bromhidrato, un yodhidrato, un fosfato, un nitrato, un sulfato, un acetato, un propionato, un toluenosulfonato, un succinato, un oxalato, un lactato, un tartrato, un glicolato, un metanosulfonato, un butirato, un valerato, un citrato, un fumarato, un maleato y un malato; una sal metálica, tal como una sal de sodio, una sal de potasio y una sal de calcio; una sal de amonio; y una sal de alquilamonio. Estas sales se usan cada una en forma de solución en el momento de uso, y su acción tiene preferiblemente la misma potencia que la del dextrano. Estas sales pueden formar hidratos o solvatos, y pueden usarse solas o en una combinación adecuada de dos o más de ellas.
- [0028]** Los ejemplos de células de mamíferos según la presente invención pueden incluir células de islotes pancreáticos de mamíferos administrados por vía intravenosa a pacientes con diabetes tipo I, y células dendríticas de mamíferos, células asesinas naturales (NK), células T (por ejemplo, células T alfa beta ($\alpha\beta$), células T gamma delta ($\gamma\delta$), linfocitos T citotóxicos (CTL) y células T auxiliares), macrófagos y leucocitos (por ejemplo, neutrófilos y eosinófilos) administrados por vía intravenosa a pacientes con cáncer, además de células madre de mamíferos administrados a través de los vasos sanguíneos para medicina regenerativa o similares; se prefieren las células T. Estas células se pueden aislar mediante procedimientos comunes conocidos. Por ejemplo, los leucocitos, células T, células T auxiliares, células T citotóxicas, y células T $\gamma\delta$ pueden aislarse de una muestra de sangre periférica o sangre de cordón tratada con hemólisis usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) usando anticuerpos contra un marcador de superficie de células de leucocitos (CD45), un marcador de superficie de células T (CD3), un marcador de superficie de células T auxiliares (CD4), una célula T citotóxica (CD8) y un marcador de superficie de células T $\gamma\delta$ (CD39) o un aparato automático de separación de células magnéticas (autoMACS) que utiliza anticuerpos contra los marcadores de superficie celular marcados con una sustancia marcadora, como una sustancia fluorescente, biotina o avidina, y un anticuerpo conjugado con perlas MACS (perlas magnéticas) a la sustancia marcadora. Los ejemplos de la sustancia marcadora pueden incluir alofococianina (APC), ficoeritrina (PE), FITC (isotiocianato de fluoresceína), Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 700, PE-Texas Red, PE-Cy5 y PE-Cy7.
- [0029]** Las "células madre" son las células inmaduras que tienen potencial de auto-renovación y potencial de diferenciación/proliferación. Las células madre incluyen una subpoblación, como células madre pluripotentes, células madre multipotentes o células madre unipotentes, según la capacidad de diferenciación. Células madre pluripotentes significa células que, como tales, no pueden convertirse en un organismo individual, pero tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tejidos o células que constituyen un cuerpo vivo. Células madre multipotentes significa una célula que tiene la capacidad de diferenciarse en una pluralidad de tipos de tejidos o células, pero no todos. Células madre unipotentes significa células que tienen la capacidad de diferenciarse en un tejido o célula particular.
- [0030]** Los ejemplos de células madre pluripotentes pueden incluir células madre embrionarias (células ES), células EG y células iPS. Las células ES se pueden producir mediante el cultivo de una masa celular interna en células alimentadoras o en un medio que contiene LIF. El procedimiento para producir células ES se describe, por ejemplo, en los documentos WO 96/22362, WO 02/101057, US 5.843.780, US 6.200.806 o US 6.280.718. Las células EG pueden producirse cultivando células germinales primordiales en un medio que contiene mSCF, LIF y bFGF (Cell, 70: 841-847, 1992). Las células iPS se pueden producir mediante la introducción de factores de reprogramación, como Oct3/4, Sox2, Klf4 (y, opcionalmente, c-Myc o n-Myc), en células somáticas (por ejemplo, fibroblastos o células de la piel) (Cell, 126: p. 663-676, 2006; Nature, 448: p. 313-317, 2007; Nat. Biotechnol, 26: p. 101-106, 2008; Cell 131: p. 861-872, 2007; Science, 318: p 1917-1920, 2007; Cell Stem Cells 1: p. 55-70, 2007; Nat. Biotechnol, 25: p. 1177-1181, 2007; Nature, 448: p. 318-324, 2007; Cell Stem Cells 2: p. 10-12, 2008; Nature 451: p. 141-146, 2008; Science, 318: p. 1917-1920, 2007). También son preferibles como células madre pluripotentes

células madre establecidas mediante el cultivo de embriones tempranos hechos mediante trasplante del núcleo de células somáticas (Nature, 385, 810 (1997); Science, 280, 1256 (1998); Nature Biotechnology, 17, 456 (1999); Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 14984 (1999)), y Rideout III et al. (Nature Genetics, 24, 109 (2000)).

5

[0031] Los ejemplos de células madre multipotentes incluyen células madre mesenquimales capaces de diferenciarse en células, como un adipocito, un osteocito, un condrocito, y un adipocito, progenitores hematopoyéticos capaces de diferenciarse en células hematocíticas, como un leucocito, un eritrocito y una plaqueta, células madre neurales capaces de diferenciarse en células, como una neurona, un astrocito y un oligodendrocito, y células madre somáticas, como una célula madre mieloide y una célula madre germinal. Las células madre multipotentes preferiblemente son células madre mesenquimales. Células madre mesenquimales significa células madre capaces de diferenciarse en todo o parte de un osteoblasto, un condroblasto y un lipoblasto. Las células madre multipotentes se pueden aislar de un cuerpo vivo por procedimientos conocidos per se. Por ejemplo, Las células madre mesenquimales se pueden recoger de la médula ósea, el tejido adiposo, la sangre periférica, la sangre del cordón umbilical y similares de mamíferos por procedimientos generales conocidos. Por ejemplo, las células madre mesenquimales humanas pueden aislarse cultivando y subcultivando células madre hematopoyéticas o similares después de la punción de la médula ósea (Journal of Autoimmunity, 30 (2008) 163-171). Las células madre multipotentes también se pueden obtener cultivando las células madre pluripotentes descritas anteriormente en condiciones de inducción adecuadas. Las células madre mesenquimales preferiblemente son células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana.

[0032] Los ejemplos de células de mamífero según la presente invención pueden incluir células adherentes. Como se usa en este documento, células "adherentes" significa células dependientes de andamios capaces de sobrevivir, proliferar y producir sustancias mediante la adhesión al andamio. Los ejemplos de células madre adherentes pueden incluir células madre pluripotentes, células madre mesenquimales, células madre neurales, células madre mieloides y células madre germinales. Las células madre adherentes son preferiblemente células madre mesenquimales o células madre pluripotentes.

[0033] Las células de mamíferos (población) según la presente invención pueden ser aquellas separadas de un cuerpo vivo o las subcultivadas *in vitro*; sin embargo, preferiblemente son las aisladas o purificadas. Como se usa en este documento, "aislado o purificado" significa que se ha aplicado la operación de eliminar componentes distintos de un componente deseado. La pureza de las células de mamíferos aisladas o purificadas (el porcentaje de células deseadas, como las células madre de mamíferos, en función del número total de células) normalmente es del 30 % o más, preferiblemente del 50 % o más, más preferiblemente del 70 % o más, incluso más preferiblemente del 90 % o más (por ejemplo, del 100 %).

[0034] Las células de mamíferos (población) conservadas en la presente solución para trasplante celular están preferiblemente en un estado de células individuales. Tal como se usa en el presente documento, el "estado de células individuales" significa que las células no se juntan con otras células para formar una masa (en otras palabras, un estado no agregado). Las células de mamífero en un estado de células individuales pueden prepararse sometiendo células de mamífero cultivadas *in vitro* a tratamiento enzimático con tripsina/EDTA o similares. El porcentaje de células de mamífero en un estado individual en las células de mamífero normalmente es del 70 % o más, preferiblemente del 90 % o más, más preferiblemente del 95 % o más, aún más preferiblemente del 99 % o más (por ejemplo, del 100 %). El porcentaje de células en un estado individual puede determinarse dispersando las células de mamíferos en PBS, observando la dispersión bajo un microscopio y examinando una pluralidad de (por ejemplo, 1000) células seleccionadas al azar para la presencia de agregación.

[0035] Las células de mamífero (población) conservadas en la presente solución para trasplante celular son preferiblemente flotantes. Como se usa en este documento, el término "flotante" se refiere a que las células se mantienen en la solución para trasplante sin entrar en contacto con la pared interna de un recipiente que contiene la solución para trasplante.

[0036] Cuando las células de mamífero se conservan en la presente solución para el agregado o el precipitado de trasplante celular, las células se suspenden preferiblemente antes del trasplante por un procedimiento bien conocido en la técnica, tal como pipeteado o extracción.

[0037] La presente invención se describirá más específicamente a continuación con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance técnico de la presente invención.

60 EJEMPLOS

Ejemplo 1

1. La confirmación 1 de la presente solución para trasplante celular tiene un efecto sinérgico de la supresión de la disminución en la tasa de supervivencia celular. (Evaluación de la relación entre el cambio en la concentración de

dextrano y el efecto sinérgico a una concentración de trehalosa fija del 3 % (p/v))

1-1 Material

5 1-1-1 Solución para el trasplante celular

[0038] S: solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

- 10 LR + 1 % D: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 1 % (p/v)
 LR + 3 % D: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 3 % (p/v)
 LR + 5 % D: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v)
 LR + 7 % D: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 7 % (p/v)
 LR + 3 % T: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v)
 15 LR + 3 % T + 1 % D: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y que contiene dextrano al 1 % (p/v)
 LR + 3 % T + 3 % D: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y que contiene dextrano al 3 % (p/v)
 LR + 3 % T + 5 % D: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y que contiene dextrano al 5 % (p/v)
 20 LR + 3 % T + 7 % D: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y que contiene dextrano al 7 % (p/v)

1-1-2 Preparación de la solución para el trasplante celular

25 **[0039]**

- 1) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) (solución "LR + 3 % T") se preparó añadiendo y disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) en la inyección de Lactec (solución LR).
 2) Se preparó una inyección de Lactec que contenía trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 10 % (p/v) ("LR + 3 % T + 10 % D") añadiendo y disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) en inyección Low Molecular Dextran L Injection (inyección de Lactec que contiene dextrano al 10 % [p/v]) (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (solución "LR + 10 % D").
 3) Las inyecciones de Lactec que contienen concentraciones predeterminadas (1, 3, 5 y 7 % [p/v]) de dextrano (soluciones "LR + 1, 3, 5 y 7 % D") se prepararon diluyendo la solución "LR + 10 % D" con la solución LR.
 35 4) Las inyecciones de Lactec que contienen trehalosa al 3 % (p/v) y concentraciones predeterminadas (1, 3, 5 y 7 % [p/v]) de dextrano ("soluciones LR + 3 % T + 1, 3, 5, y 7 % D" se prepararon diluyendo la solución "LR + 3 % T + 10 % D" con la solución "LR + 3 % T".

1-1-3 Preparación de células de mamífero

40

[0040] Se prepararon células madre mesenquimales humanas de médula ósea [hMSC-BM] (de Lonza Co., Ltd.) de acuerdo con los procedimientos descritos en [1] a [8] a continuación y se usaron en el presente experimento.

- 45 [1] Se cultivaron hMSC-BM en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C en presencia de un kit de medio específico para células madre mesenquimales humanas (de Lonza Co., Ltd.) (en lo sucesivo denominado "medio MSC") utilizando un matraz de 75 cm². El estado de las células se observó bajo un microscopio y el cultivo se realizó hasta que se alcanzó un estado confluyente de aproximadamente el 80 %.
 [2] El medio MDC se eliminó utilizando un aspirador, y las hMSC-BM se enjuagaron con 8 ml/matraz de PBS (de Invitrogen Co., Ltd.).
 50 [3] Se eliminó el PBS utilizando un aspirador y se añadieron 3,75 ml/matraz de tripsina-EDTA (de Lonza Co., Ltd.), seguido de reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 [4] La agitación se llevó a cabo de manera lenta, mientras que se observaron hMSC-BM bajo un microscopio hasta que se separó aproximadamente el 90 % de las mismas.
 [5] Se añadieron 3,75 ml/matraz del medio MSC para detener la reacción de tripsina, y se recuperaron las hMSC-BM mediante pipeteo y se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml.
 55 [6] La centrifugación se llevó a cabo a 600 × g y 25 °C durante 5 minutos.
 [7] El medio MSC como sobrenadante se eliminó utilizando un aspirador, y se añadieron 4 ml/matraz de PBS (de Invitrogen Co., Ltd.), seguido de la suspensión de un sedimento de hMSC-BM (precipitado).
 [8] Se tomaron 10 µl de la suspensión de hMSC-BM; el número de células se midió usando un contador de células; y se añadió PBS (de Invitrogen Co., Ltd.) a 5 × 10⁵ células/ml, que luego se enfrió con hielo.
 60

1-2 Procedimiento

[0041] Para confirmar que la presente solución para trasplante celular tenía un efecto sinérgico al suprimir una disminución en la tasa de supervivencia celular, se llevó a cabo un experimento de acuerdo con los

procedimientos descritos en [1] a [3] a continuación.

[1] La suspensión de hMSC-BM preparada en la etapa [7] de la "1-1-3 Preparación de células de mamífero" descrita anteriormente se dispensó en un tubo de centrífuga cónico de 15 ml utilizando FINPIPETTE (100 a 1000 μ l) y se centrifugó a $600 \times g$ y 25°C durante 5 minutos.

[2] El sobrenadante se aspiró/eliminó después del tratamiento de centrifugación, y el resultante se suspendió en cada una de las 11 soluciones para trasplante celular y a continuación se conservó en un refrigerador (bajo condiciones de 4°C) durante 14 días. Para medir la tasa de supervivencia celular antes de la conservación, se aspiró/eliminó el sobrenadante después del tratamiento de centrifugación y a continuación se suspendió el resultante en PBS (de Invitrogen Co., Ltd.), seguido inmediatamente por la toma de una porción (20 μ l) de la suspensión, mezclando la porción con 20 μ l de solución de tinción de azul de tripano (de Gibco Co., Ltd.) y a continuación midiendo el número total de células y el número de células muertas utilizando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la tasa de células vivas (véase "P" en la Figura 1).

[3] Después de conservar las hMSC-BM en la solución para el trasplante celular durante 14 días, la agitación (se pipeteó 5 veces a un volumen de líquido de 500 μ l) se realizó suavemente en un estado en el que el extremo de una punta se insertó visualmente del orden de 5 mm desde la parte inferior para formar células en un estado suspendido, y una porción (20 μ l) de la suspensión se tomó en un microtubo de 1,5 ml, mezclado con 20 μ l de solución de tinción de azul de tripano (de Gibco Co., Ltd.), y a continuación se midió el número total de células y el número de células muertas utilizando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la tasa de células vivas.

1-3 Resultado

[0042] Los resultados de evaluar la tasa de células vivas se muestran en la Tabla 1 y la Figura 1. Cuando las hMSC-BM se conservaron en la solución S y en la solución LR, se observaron pocas hMSC-BM supervivientes (menos del 1 % para la solución S y el 1 % para la solución LR), mientras que cuando las hMSC-BM se conservaron en la solución "LR + 1, 3, 5 y 7 % D", el porcentaje de hMSC-BM supervivientes aumentó al 4 %, 9 %, 12 % y 20 %, respectivamente (Tabla 1 y Figura 1). Cuando las hMSC-BM se conservaron en la solución "LR + 3 % T", el porcentaje de hMSC-BM supervivientes también aumentó al 4 % (Tabla 1 y Figura 1). Estos resultados muestran que, aunque la conservación a largo plazo de células de mamíferos, como hMSC-BM, en solución salina o una solución acuosa fisiológica, tal como solución de lactato de Ringer, resulta en la muerte de la mayoría de las células, el uso de una solución acuosa fisiológica que contiene el dextrano o la trehalosa pueden suprimir la muerte celular y aumentar el porcentaje de células vivas.

[0043] Cuando las hMSC-BM se conservaron en las soluciones "LR + 3 % T + 1, 3, 5 y 7 % D", el porcentaje de hMSC-BM supervivientes fue del 11 %, 33 %, 57 % y 50 %, respectivamente y se incrementó en comparación con cuando se conservaron hMSC-BM en la solución "LR + 3 % T" (Tabla 1 y Figura 1). Además, las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 3 % T" y "LR + 1 % D" fueron cada una del 4 %, totalizando el 8 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se usó una solución de "LR + 3 % T + 1 % D" fue de hasta un 11 % (1,4 veces). De manera similar, los valores de las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 3 % T" y "LR + 3 % D" totalizaron el 13 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se usó una solución de "LR + 3 % T + 3 % D" fue de hasta un 33 % (2,5 veces); los valores de las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 3 % T" y "LR + 5 % D" totalizaron el 16 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se usó la solución "LR + 3 % T + 5 % D" fue de hasta un 57 % (3,6 veces); y los valores de las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 3 % T" y "LR + 7 % D" totalizaron el 24 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se utilizó la solución de "LR + 3 % T + 7 % D" fue de hasta un 50 % (2,1 veces). Estos resultados muestran que el uso combinado del 3 % de trehalosa y alrededor del 5 % (4 a 7 %) de dextrano puede suprimir sinérgicamente una disminución en la tasa de supervivencia celular cuando las células de mamíferos, como hMSC-BM, se conservaron durante un largo período y puede aumentar sinérgicamente el porcentaje de células vivas.

Tabla 1: Tasa de supervivencia (%) de la célula cuando se conserva durante 14 días

Solución para el trasplante celular	Tasa de supervivencia celular (%)
S	0 ± 1
LR	1 ± 1
LR + 1 % D	4 ± 4
LR + 3 % D	9 ± 3
LR + 5 % D	12 ± 2
LR + 7 % D	20 ± 7
LR + 3 % T	4 ± 1
LR + 3 % T + 1 % D	11 ± 3
LR + 3 % T + 3 % D	33 ± 7
LR + 3 % T + 5 % D	57 ± 11
LR + 3 % T + 7 % D	50 ± 17

[0044] Para la "Tasa de supervivencia celular (%)" en la tabla anterior, el porcentaje de células vivas basado en el número total de células se muestra como la tasa de supervivencia celular (%) (media $\pm$ desviación típica, [n = 4]). La tasa de supervivencia antes de la conservación fue del "93 $\pm$ 2 (%)". Para los 11 tipos de "Solución para trasplante celular" en la tabla anterior, véase "1-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 1.

5 **[0045]** Además, se estudió el período de conservación de hMSC-BM en la solución para trasplante celular durante 3 días y 7 días, además de 14 días. Los resultados se muestran en la Figura 2. Al igual que cuando las hMSC-BM se conservaron durante 14 días, se demostró que el uso combinado del 3 % de trehalosa y alrededor del 5 % (4 a 7 %) de dextrano también podría suprimir de manera sinérgica una disminución en la tasa de supervivencia
10 celular cuando las hMSC-BM se conservaron durante un largo período de tiempo y aumenta sinérgicamente el porcentaje de células vivas, incluso cuando las hMSC-BM se conservaron durante 3 días o 7 días.

Ejemplo 2

15 2. La confirmación 2 de la presente solución para trasplante celular tiene un efecto sinérgico de la supresión de la disminución de la tasa de supervivencia (evaluación de la relación entre el cambio en la concentración de trehalosa y el efecto sinérgico a una concentración de dextrano fija del 5 % (p/v)

2-1 Material

20 2-1-1 Solución para el trasplante celular

[0046] S: Solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

[0047] LR: inyección de Lactec (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

25 LR + 1 % T: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 1 % (p/v)
LR + 3 % T: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v)
LR + 5 % T: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 5 % (p/v)
LR + 7 % T: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 7 % (p/v)
LR + 10 % T: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 10 % (p/v)
30 LR + 5 % D: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v)
LR + 5 % D + 1 % T: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y que contiene trehalosa al 1 % (p/v)
LR + 5 % D + 3 % T: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y que contiene trehalosa al 3 % (p/v)
35 LR + 5 % D + 5 % T: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y que contiene trehalosa al 5 % (p/v)
LR + 5 % D + 7 % T: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y que contiene trehalosa al 7 % (p/v)
LR + 5 % D + 10 % T: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y que contiene trehalosa al 10 %
40 (p/v)

2-1-2 Preparación de la solución para el trasplante celular

[0048]

45 1) La inyección de Lactec que contenía dextrano al 5 % (p/v) (solución "LR + 5 % D") se preparó mediante la inyección de Lactec de bajo peso molecular (inyección de Lactec que contiene dextrano al 10 % [p/v]) (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) (solución "LR + 10 % D") con la inyección de Lactec (solución LR).
2) Se preparó la inyección de Lactec que contenía trehalosa al 10 % (p/v) (solución "LR + 10 % T") añadiendo y
50 disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) en la solución LR.
3) La inyección de Lactec que contiene el 5 % (p/v) de dextrano y el 10 % (p/v) de trehalosa ("LR + 5 % D + 10 % T") se preparó añadiendo y disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) en la solución "LR + 5 % D".
4) Las inyecciones de Lactec que contienen concentraciones predeterminadas (1, 3, 5 y 7 % [p/v]) de trehalosa (soluciones "LR + 1, 3, 5 y 7 % T") se prepararon diluyendo la solución de "LR + 10 % T" con la solución LR.
55 5) Las inyecciones de Lactec que contienen el 5 % (p/v) dextrano y concentraciones predeterminadas (1, 3, 5 y 7 % [p/v]) de trehalosa (soluciones de "LR + 5 % D + 1, 3, 5, y 7 % T" se prepararon diluyendo la solución "LR + 5 % D + 10 % T" con la solución "LR + 5 % D".

2-2 Resultado

60 **[0049]** Después de preparar hMSC-BM mediante el procedimiento descrito en "1-1-3 Preparación de células de mamífero" en el Ejemplo 1, se realizó un experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en "1-2 Procedimiento" en el Ejemplo 1 utilizando las 13 soluciones para el trasplante celular. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y la Figura 3. Como en los resultados del Ejemplo 1, cuando las hMSC-BM se conservaron en la solución
65 S y en la solución LR, se observaron pocas o ninguna hMSC-BM supervivientes (1 % para la solución S y 0 % para

la solución LR). Cuando las hMSC-BM se conservaron en las soluciones "LR + 1, 3, 5, 7 y 10 % T", los porcentajes de hMSC-BM vivas fueron del 2 %, 6 %, 7 %, 5 % y 3 %, respectivamente, mientras que cuando las hMSC-BM se conservaron en las soluciones "LR + 5 % D + 1, 3, 5, 7 y 10 % T", los porcentajes de hMSC-BM vivas fueron del 30 %, 48 %, 49 %, 30 % y 14 %, respectivamente, mostrando aumentos sustanciales (Tabla 2 y Figura 3). En particular, las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 5 % D" y "LR + 1 % T" fueron del 11 % y 2 %, respectivamente, totalizando el 13 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se utilizó la solución "LR + 5 % D + 1 % T" fue de hasta un 30 % (2,3 veces). De manera similar, los valores de las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 5 % D" y "LR + 3 % T" fueron del 17 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se utilizó la solución "LR + 5 % D + 3 % T" fue de hasta un 48 % (2,8 veces); los valores de las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 5 % D" y "LR + 5 % T" totalizaron el 18 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se utilizó la solución "LR + 5 % D + 5 % T" fue de hasta un 49 % (2,7 veces); y los valores de las tasas de supervivencia celular cuando se utilizaron las soluciones "LR + 5 % D" y "LR + 7 % T" totalizaron el 16 %, mientras que la tasa de supervivencia celular cuando se utilizó la solución de "LR + 5 % D + 7 % T" fue de hasta un 30 % (1,9 veces). Estos resultados muestran que el uso combinado de alrededor del 3 % (2 a 6 %) de trehalosa y el 5 % de dextrano puede suprimir sinérgicamente una disminución en la tasa de supervivencia celular cuando las células de mamíferos, como hMSC-BM, se conservan durante un largo período de tiempo y puede aumentar sinérgicamente el porcentaje de células vivas.

Tabla 2: Tasa de supervivencia (%) de la célula cuando se conserva durante 14 días

Solución para el trasplante celular	Tasa de supervivencia celular (%)
S	1 ± 1
LR	0 ± 0
LR + 1 % T	2 ± 1
LR + 3 % T	6 ± 2
LR + 5 % T	7 ± 2
LR + 7 % T	5 ± 3
LR + 10 % T	3 ± 2
LR + 5 % D	11 ± 4
LR + 5 % D + 1 % T	30 ± 5
LR + 5 % D + 3 % T	48 ± 3
LR + 5 % D + 5 % T	49 ± 4
LR + 5 % D + 7 % T	30 ± 7
LR + 5 % D + 10 % T	14 ± 5

[0050] Para la "Tasa de supervivencia celular (%)" en la tabla anterior, el porcentaje de células vivas basado en el número total de células se muestra como la tasa de supervivencia celular (%) (media ± desviación típica, [n = 4]). La tasa de supervivencia celular antes de la conservación fue del "95 ± 2 (%)". Para los 13 tipos de "Solución para el trasplante celular" en la tabla anterior, véase "2-1-1 Solución para el trasplante celular" en el Ejemplo 2.

[0051] Además, se estudió el período de conservación de hMSC-BM en la solución para trasplante celular durante 3 días y 7 días, además de 14 días. Los resultados se muestran en la Figura 4. Al igual que cuando las hMSC-BM se conservaron durante 14 días, se demostró que el uso combinado de alrededor del 3 % (2 a 6 %) de trehalosa y el 5 % de dextrano también podría suprimir de forma sinérgica una disminución en la tasa de supervivencia celular cuando las hMSC-BM se conservan durante un largo período de tiempo y aumentan sinérgicamente el porcentaje de células vivas, incluso cuando las hMSC-BM se conservaron durante 3 días o 7 días.

[0052] Al resumir los resultados de los Ejemplos 1 y 2, se demostró que el uso combinado de alrededor del 3 % (2 a 6 %) de trehalosa y alrededor del 5 % (4 a 7 %) de dextrano podría suprimir sinérgicamente una disminución en la tasa de supervivencia celular cuando las células de mamíferos, como las hMSC-BM, se conservaron durante un largo período de tiempo (14 días) y pudieron aumentar sinérgicamente el porcentaje de células vivas.

Ejemplo 3

3. Estudio sobre el efecto de la supresión de la disminución en la tasa de supervivencia celular cuando se usa una solución para trasplante celular que tiene una combinación de dextrano y otro azúcar

3-1 Material

3-1-1 Solución para trasplante celular

[0053] S: solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LR: inyección de Lactec (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

LRD: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v)

LRTD: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)

LRD + GL: una inyección de Lactec que contiene glucosa al 1,6 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)

LRD + SR: una inyección de Lactec que contiene sorbitol al 1,6 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
 LRD + MN: una inyección de Lactec que contiene manitol al 1,6 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
 LRD + LC: una inyección de Lactec que contiene lactosa al 3,0 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
 LRD + RF: una inyección de Lactec que contiene rafinosa al 4,8 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
 5 LRD + ML: una inyección de Lactec que contiene maltosa al 3,0 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
 LRD + SC: una inyección de Lactec que contiene sacarosa al 3,0 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)

3-1-2 Preparación de la solución para el trasplante celular

10 [0054]

- 1) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) (solución "LRD") y la inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) (solución "LRTD") se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en "1-1-2 Preparación de solución para trasplante celular" en el Ejemplo 1.
- 15 2) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y glucosa al 1,6 % (p/v) (solución "LRD + GL") se preparó añadiendo y disolviendo glucosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRD".
- 3) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y sorbitol al 1,6 % (p/v) (solución "LRD + SR") se preparó añadiendo y disolviendo sorbitol (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRD".
- 4) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y manitol al 1,6 % (p/v) (solución "LRD + MN") se preparó añadiendo y disolviendo manitol (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRD".
- 20 5) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y lactosa al 3,0 % (p/v) se preparó añadiendo y disolviendo lactosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRD".
- 6) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y rafinosa al 4,8 % (p/v) (solución "LRD + RF") se preparó añadiendo y disolviendo rafinosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRD".
- 25 7) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y maltosa al 3,0 % (p/v) (solución "LRD + ML") se preparó añadiendo y disolviendo maltosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRD".
- 8) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) y sacarosa al 3,0 % (p/v) (solución "LRD + SC") se preparó añadiendo y disolviendo sacarosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRD". Los 7
- 30 sacáridos (glucosa, sorbitol, manitol, lactosa, rafinosa, maltosa y sacarosa) se sometieron a un ajuste de concentración para que tuvieran la misma presión osmótica que la de trehalosa al 3 % (p/v).

3-2 Resultado

- [0055] Después de preparar hMSC-BM mediante el procedimiento descrito en "1-1-3 Preparación de células de mamífero" en el Ejemplo 1, se realizó un experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en "1-2 Procedimiento" en el Ejemplo 1 utilizando las 11 soluciones para trasplante celular. Los resultados se muestran en la Figura 5. Al igual que en los resultados de los Ejemplos 1 y 2, se demostró que el uso combinado de trehalosa y dextrano suprime de forma sinérgica una disminución en la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron hMSC-BM durante 14 días y aumentó la tasa de células vivas (comparación de "LRTD" con "LRD", "LR" o "S" en la
- 40 Figura 5). Por otro lado, el uso combinado de dextrano con cada uno de los 7 sacáridos (glucosa, sorbitol, manitol, lactosa, rafinosa, maltosa y sacarosa) en lugar de trehalosa cambió poco la tasa de supervivencia celular en comparación con el uso de dextrano solo (comparación de "LRD" con "LRD + GL", "LRD + SR", "LRD + MN", "LRD + LC", "LRD + RF", "LRD + ML" o "LRD + SC" en la Figura 5). Estos resultados muestran que, a diferencia de la trehalosa, los 7 sacáridos no tienen el efecto de suprimir la muerte celular cuando las células de mamíferos, como
- 45 las hMSC-BM, se conservan durante un largo período de tiempo y aumentan la tasa de células vivas en la solución para el trasplante celular.

Ejemplo 4

- 50 4. Estudio sobre el efecto de la supresión de la disminución en la tasa de supervivencia celular cuando se usa una solución para trasplante celular que tiene una combinación de trehalosa y otro sacárido

4-1 Material

- 55 4-1-1 Solución para el trasplante celular

- [0056] S: solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)
 LR: inyección de Lactec (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)
 LRT: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v)
 60 LRTD: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
 LTD + GL: una inyección de Lactec que contiene glucosa al 1,6 % (p/v) y trehalosa al 3 % (p/v)
 LTD + SR: una inyección de Lactec que contiene sorbitol al 1,6 % (p/v) y trehalosa al 3 % (p/v)
 LTD + MN: una inyección de Lactec que contiene manitol al 1,6 % (p/v) y trehalosa al 3 % (p/v)
 LTD + LC: una inyección de Lactec que contiene lactosa al 3,0 % (p/v) y trehalosa al 3 % (p/v)
 65 LTD + RF: una inyección de Lactec que contiene rafinosa al 4,8 % (p/v) y trehalosa al 3 % (p/v)

LTD + ML: una inyección de Lactec que contiene maltosa al 3,0 % (p/v) y trehalosa al 3 % (p/v)
LTD + SC: una inyección de Lactec que contiene sacarosa al 3,0 % (p/v) y trehalosa al 3 % (p/v)

5 4-1-2 Preparación de la solución para el trasplante celular

[0057]

- 1) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) (solución "LRT") y la inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) (solución "LRTD") se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en "1-1-2 Preparación de solución para trasplante celular" en el Ejemplo 1.
- 2) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y glucosa al 1,6 % (p/v) (solución "LRT + GL") se preparó añadiendo y disolviendo glucosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRT".
- 3) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y sorbitol al 1,6 % (p/v) (solución "LRT + SR") se preparó añadiendo y disolviendo sorbitol (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRT".
- 4) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y manitol al 1,6 % (p/v) (solución "LRT + MN") se preparó añadiendo y disolviendo manitol (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRT".
- 5) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y lactosa al 3,0 % (p/v) se preparó añadiendo y disolviendo lactosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRT".
- 6) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y rafinosa al 4,8 % (p/v) (solución "LRT + RF") se preparó añadiendo y disolviendo rafinosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRT".
- 7) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y maltosa al 3,0 % (p/v) (solución "LRT + ML") se preparó añadiendo y disolviendo maltosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRT".
- 8) La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y sacarosa al 3,0 % (p/v) (solución "LRT + SC") se preparó añadiendo y disolviendo sacarosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.) en la solución "LRT". Los 7 sacáridos (glucosa, sorbitol, manitol, lactosa, rafinosa, maltosa y sacarosa) se sometieron a un ajuste de concentración para que tuvieran la misma presión osmótica que la de dextrano al 5 % (p/v).

4-2 Resultado

- [0058] Después de preparar hMSC-BM mediante el procedimiento descrito en "1-1-3 Preparación de células de mamífero" en el Ejemplo 1, se realizó un experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en "1-2 Procedimiento" en el Ejemplo 1 utilizando las 11 soluciones para trasplante celular. Los resultados se muestran en la Figura 6. Como en los resultados de los Ejemplos 1 a 3, se demostró que el uso combinado de dextrano y trehalosa suprime de forma sinérgica una disminución en la tasa de supervivencia celular cuando las células se conservaron durante 14 días y aumenta la tasa de células vivas con "LRT", "LR" o "S" en la Figura 6). Por otro lado, el uso combinado de trehalosa con cada uno de los 7 sacáridos (glucosa, sorbitol, manitol, lactosa, rafinosa, maltosa y sacarosa) cambió la tasa de supervivencia celular en comparación con el uso de trehalosa sola (comparación de "LRT" con "LRT + GL", "LRT + SR", "LRT + MN", "LRT + LC", "LRT + RF", "LRT + ML" o "LRT + SC" en la Figura 6). Estos resultados muestran que, a diferencia del dextrano, los 7 sacáridos no tienen el efecto de suprimir la muerte celular cuando las células de mamíferos, como las hMSC-BM, se conservan durante un largo período de tiempo y aumentan la tasa de células vivas en la solución para el trasplante celular.

- [0059] Además, se realizó un experimento cuando cada uno de los 7 sacáridos (glucosa, sorbitol, manitol, lactosa, rafinosa, maltosa y sacarosa) se usó solo sin combinación con trehalosa o dextrano para confirmar que los 7 sacáridos no tuvieron el efecto de suprimir la muerte celular cuando las células de mamíferos, como las hMSC-BM, se conservaron durante un largo período de tiempo y aumentaron la tasa de células vivas en la solución para el trasplante celular (Figura 7).

50 Ejemplo 5

5. Estudio sobre la solución acuosa fisiológica en la presente solución para trasplante celular

5-1 Material

- 5-1-1 Solución para trasplante celular

- [0060] LR: inyección de Lactec (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)
LRTD: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
S: solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)
STD: solución salina normal de Otsuka que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
5 % de glucosa: INYECCIÓN DE GLUCOSA OTSUKA 5 % (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)
Glucosa 5 % TD: INYECCIÓN DE GLUCOSA OTSUKA 5 % que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
Ringer: Solución de Ringer "OTSUKA" (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)

Ringer TD: solución de Ringer "OTSUKA" que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)
 Veen: Veen F Infusion (de Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.)
 Veen TD: Veen F Infusion que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)

5 5-1-2 Preparación de la solución para el trasplante celular

[0061]

- 1) La inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v) (solución "LDT") y la inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) (solución "LRTD") se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en "1-1-2 Preparación de solución para trasplante celular" en el Ejemplo 1.
- 2) La solución salina normal de Otsuka que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) (solución "STD") se preparó añadiendo y disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) y dextrano 40 (de Meito Sangyo Co., Ltd.) en solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.).
- 3) La INYECCIÓN DE GLUCOSA OTSUKA 5 % que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) (solución "Glucosa TD" al 5 %) se preparó añadiendo y disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) y dextrano 40 (de Meito Sangyo Co., Ltd.) en INYECCIÓN DE GLUCOSA OTSUKA 5 % (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.).
- 4) La solución de Ringer "OTSUKA" (solución "Ringer TD") que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) se preparó añadiendo y disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) y dextrano 40 (de Meito Sangyo Co., Ltd.) en la Solución de Ringer "OTSUKA" (Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.).
- 5) Veen F Infusion que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) se preparó añadiendo y disolviendo trehalosa (de Hayashibara Co., Ltd.) y dextrano 40 (de Meito Sangyo Co., Ltd.) en Veen F Infusion (de Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.).

5-2 Resultado

- [0062]** Después de preparar hMSC-BM mediante el procedimiento descrito en "1-1-3 Preparación de células de mamífero" en el Ejemplo 1, se realizó un experimento de acuerdo con los procedimientos descritos en "1-2 Procedimiento" en el Ejemplo 1 utilizando las 10 soluciones para trasplante celular. Los resultados se muestran en la Figura 8. El uso de Solución Salina Normal Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.), la Solución de Ringer "OTSUKA" (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.), o Veen F Infusion (de Kowa Pharmaceutical Co., Ltd.) como solución acuosa fisiológica en la solución para el trasplante celular se demostró que suprime la muerte celular cuando las hMSC-BM se conservan durante 14 días y aumenta la tasa de células vivas en la solución para el trasplante celular (la comparación de "S" con "STD", la comparación de "Ringer" con "Ringer TD", o la comparación de "Veen" con "Veen TD" en la Figura 8). Por otro lado, con el uso de INYECCIÓN DE GLUCOSA OTSUKA 5 % (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.) no se observó la supresión de la muerte celular cuando las hMSC-BM se conservaron durante 14 días (comparación de "5 % de glucosa" con "5 % de glucosa TD" en la Figura 8). Los resultados anteriores muestran que se observa el efecto de suprimir una disminución en la tasa de células vivas mediante el uso combinado de trehalosa y dextrano cuando se utiliza al menos cada una de la solución salina, la solución de lactato de Ringer, la solución de Ringer y la solución de acetato de Ringer como solución acuosa fisiológica.

Ejemplo 6

6. La confirmación 3 de la presente solución para trasplante celular tiene un efecto sinérgico de la supresión de la disminución en la tasa de supervivencia celular (evaluación utilizando células de mamífero distintas de hMSC-BM)

- [0063]** Se confirmó si el efecto de suprimir una disminución en la tasa de supervivencia celular por la presente solución para el trasplante celular se observaba de manera similar cuando se utilizaron células de mamíferos distintas de hMSC-BM.

6-1 Material

6-1-1 Solución para el trasplante celular

- [0064]** S: solución salina normal de Otsuka (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)
 LR: inyección de Lactec (de Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd.)
 LRT: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v)
 LRD: una inyección de Lactec que contiene dextrano al 5 % (p/v)
 LRTD: una inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v)

6-1-2 Preparación de la solución para el trasplante celular

- [0065]** La inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) (solución "LRT"), la inyección de Lactec

que contiene dextrano al 5 % (p/v) (solución "LRD") y la inyección de Lactec que contiene trehalosa al 3 % (p/v) y dextrano al 5 % (p/v) (solución "LRTD") se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en "1-1-2 Preparación de solución para trasplante celular" en el Ejemplo 1.

5 6-2 Procedimiento

[0066]

- [1] Se añadió medio RPMI (18 ml) (de Gibco Co., Ltd.) a temperatura ambiente a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml.
- [2] La tapa de un contenedor de conservación (vial) en el que se conservaron células T de sangre periférica humana (hPBT) (de CELL APPLICATIONS, INC.) por congelación se aflojaron para liberar la presión, y a continuación se cerró la tapa.
- [3] Las células se descongelaron mientras se agitaban ligeramente en una incubadora a 37 °C.
- [4] Las células descongeladas se transfirieron al tubo de centrifuga cónico al que se añadió el medio RPMI anterior.
- [5] El tratamiento de centrifugación se llevó a cabo a $400 \times g$ y 25 °C durante 5 minutos, y las células se recuperaron aspirando el sobrenadante y se suspendieron en 10 ml/vial de PBS (de Invitrogen Co., Ltd.).
- [6] El número de células se midió utilizando un contador de células y se añadió PBS (de Invitrogen Co., Ltd.) a 5×10^5 células/ml, seguido de enfriamiento con hielo.
- [7] La suspensión celular (0,5 ml) se dispensó en cada uno de 12 tubos de centrifuga cónicos de 15 ml usando FINPIPETTE (100 a 1000 µl) y se sometió a un tratamiento de centrifugación a $400 \times g$ y 25 °C durante 5 minutos para recuperar las células.
- [8] El sobrenadante se aspiró/eliminó, y se suspendieron hPBT en cada una de las 5 soluciones para trasplante celular y a continuación se conservaron en un refrigerador (en condiciones de 4 °C). Para medir la tasa de supervivencia celular antes de la conservación, se aspiró/eliminó el sobrenadante después del tratamiento de centrifugación y a continuación se suspendió el resultante en PBS (de Invitrogen Co., Ltd.), seguido inmediatamente por la toma de una porción (20 µl) de la suspensión, mezclando la porción con 20 µl de solución de tinción de azul de tripano (de Gibco Co., Ltd.) y a continuación midiendo el número total de células y el número de células muertas utilizando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la tasa de células vivas (véase "P" en la Figura 9).
- [9] Después de conservar las hPBT en la solución para trasplante celular, se realizó una agitación suavemente (pipeteo 5 veces a un volumen de líquido de 250 µl) en un estado en el que se insertó el extremo de una punta visualmente en una posición del orden de 5 mm desde el fondo para formar células en estado suspendido el día 1, el día 3, el día 7 y el día 14 de conservación, y se tomó una porción (20 µl) de la suspensión en un microtubo de 1,5 ml, mezclado con 20 µl de solución de tinción de azul de tripano (de Gibco Co., Ltd.), y a continuación se midió el número total de células y el número de células muertas utilizando un contador de células bajo un microscopio para evaluar la tasa de células vivas.

40 6-3 Resultado

- [0067] Los resultados de evaluar la tasa de células vivas se muestran en la Tabla 3 y la Figura 9. Las tasas de supervivencia celular cuando se conservaron las hPBT en la solución S y la solución LR durante 1 día se redujeron al 18 % y al 29 %, respectivamente ("S" y "LR" 1 día después del inicio de la conservación en la Tabla 3 y la Figura 9). Las tasas de supervivencia celular cuando se conservaron las hPBT en la solución LRT y la solución LRD durante 1 día se mejoraron al 37 % y 49 %, respectivamente, sin diferencias significativas ("LRT" y "LRD" 1 día después del inicio de la conservación en la Tabla 3 y la Figura 9). Por otro lado, la tasa de supervivencia celular cuando se conservaron las hPBT en la solución LRTD durante 1 día fue de hasta un 82 % con una diferencia significativa en comparación con la que se conservó en la solución LR ("LRTD" 1 día después del inicio de conservación en la Tabla 3 y la Figura 9). Estos resultados muestran que el uso combinado de trehalosa y dextrano puede suprimir efectivamente una disminución en la tasa de supervivencia celular de hPBT.

- [0068] El efecto del uso combinado de trehalosa y dextrano se hizo más notable cuando las hPBT se conservaron durante 3 días, 7 días y 14 días. Específicamente, el uso combinado de trehalosa y dextrano hizo que la tasa de supervivencia celular fuera dos veces o incluso más alta que el uso de trehalosa o dextrano solo, y se observó que el uso combinado de trehalosa y dextrano tenía un efecto sinérgico ("LRTD" a los 3 días, 7 días y 14 días después del inicio de la conservación en la Tabla 3 y la Figura 9). Particularmente para la conservación de 7 días, los porcentajes de hPBT que sobrevivieron en la solución de LRT y la solución de LRD fueron del 13 % y 17 %, respectivamente, totalizando un 30 %, mientras que el porcentaje de hPBT que sobrevivieron en la solución de LRTD fue del 57 % (1,9 veces), mostrando el alto efecto sinérgico del uso combinado de trehalosa y dextrano. Estos resultados muestran que el efecto de suprimir una disminución en la tasa de células vivas mediante el uso combinado de trehalosa y dextrano también se observa de manera similar cuando se usan células de mamíferos (hPBT) distintas de hMSC-BM.

Tabla 3: Tasa de supervivencia celular (%) cuando se conservaron las hPBT

Solución para el trasplante celular	1 día	3 días	7 días	14 días
S	18 ± 12	4 ± 4	1 ± 1	0 ± 0
LR	29 ± 21	22 ± 15	8 ± 5	4 ± 3
LRT	37 ± 17	22 ± 11	13 ± 7	11 ± 6
LRD	49 ± 13	25 ± 18	17 ± 7	16 ± 7*
LRTD	82 ± 7***	66 ± 19***	57 ± 14***	32 ± 8***

[0069] Para la "Tasa de supervivencia celular (%)" en la tabla anterior, el porcentaje de células vivas basado en el número total de células se muestra como la tasa de supervivencia celular (%) (media ± desviación típica, [n = 5 6]). "*" y "***" en la tabla muestran que existen diferencias estadísticamente significativas (P <0,05 y P <0,001, respectivamente) contra LR según la prueba de Dunnett. La tasa de supervivencia celular antes de la conservación fue del "92 ± 3 (%)". Para los 5 tipos de "Solución para trasplante celular" en la tabla anterior, véase "6-1-1 Solución para trasplante celular" en el Ejemplo 6.

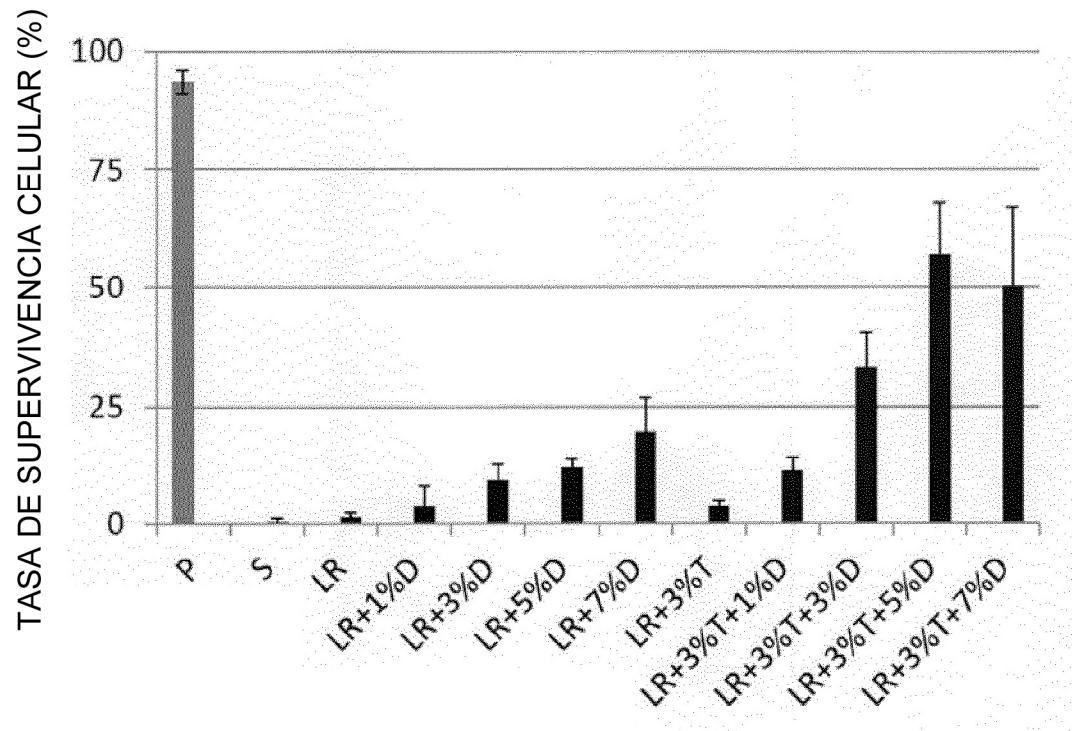
10 Aplicabilidad industrial

[0070] La presente invención puede proporcionar una suspensión celular de buena calidad capaz de suprimir una disminución en la tasa de supervivencia celular cuando la suspensión celular que contiene células madre, como MSC, y leucocitos, como células T, se conserva durante un largo período de tiempo y, por lo tanto, es útil en el 15 campo del trasplante médico en medicina regenerativa o similar y en el campo del tratamiento del cáncer.

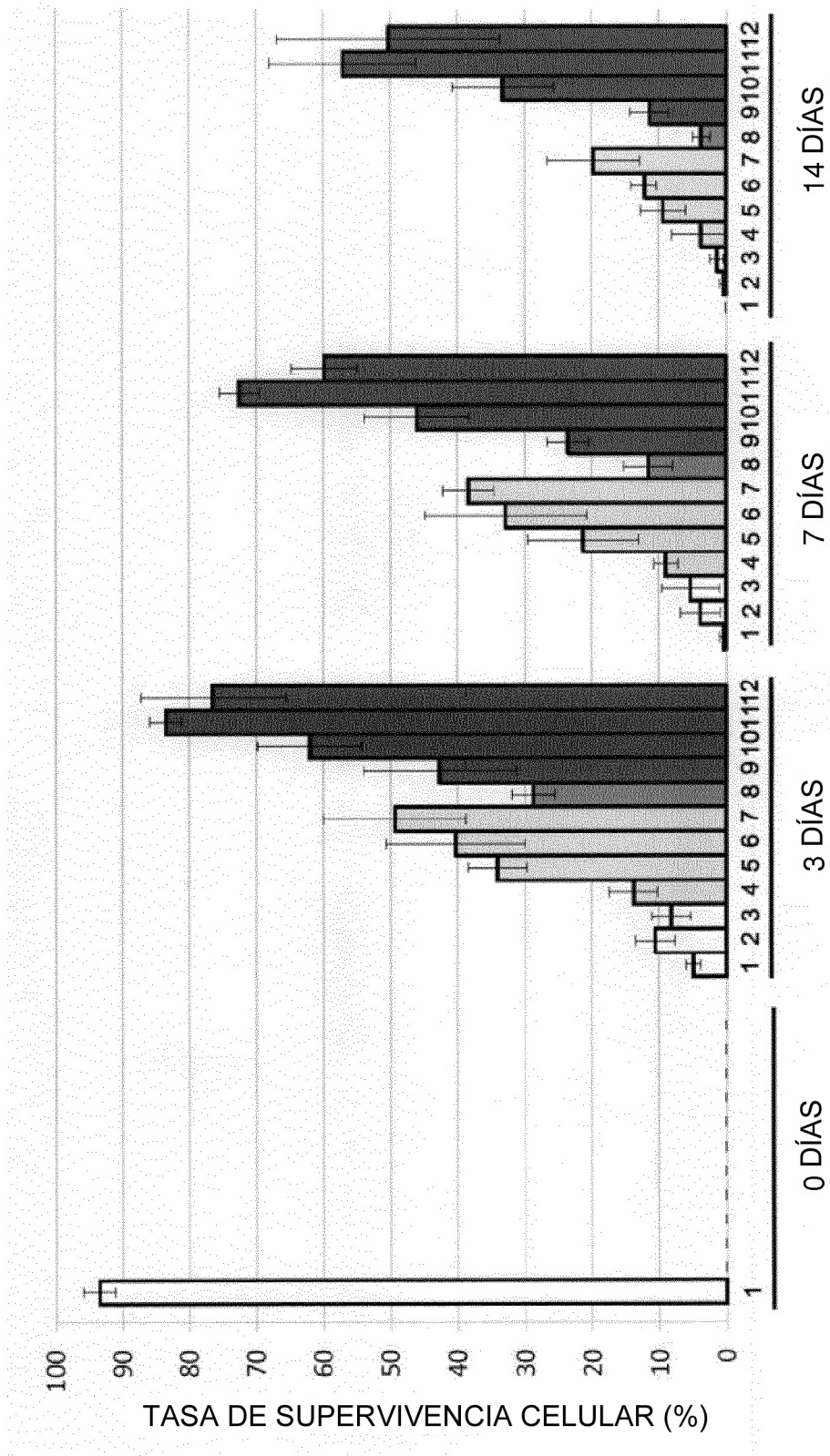
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para conservar una célula de mamífero en una solución acuosa fisiológica para el trasplante celular que comprende del 2,0 al 6,0 % (p/v) de trehalosa, o una sal de la trehalosa, y del 4,0 al 7,0 %
5 (p/v) de dextrano, o una sal del dextrano, en el que la célula de mamífero se conserva en la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular durante 1 a 14 días.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la solución acuosa fisiológica se selecciona del grupo que consiste en solución de lactato de Ringer, solución salina, solución de Ringer y solución de acetato de
10 Ringer.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la célula de mamífero se conserva en la solución acuosa fisiológica para el trasplante celular durante 3 a 14 días.
- 15 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula de mamífero es una célula madre mesenquimal de mamífero o célula T de mamífero.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la célula madre mesenquimal de mamífero es una célula madre mesenquimal humana de médula ósea y la célula T de mamífero es una célula T de sangre
20 periférica humana.

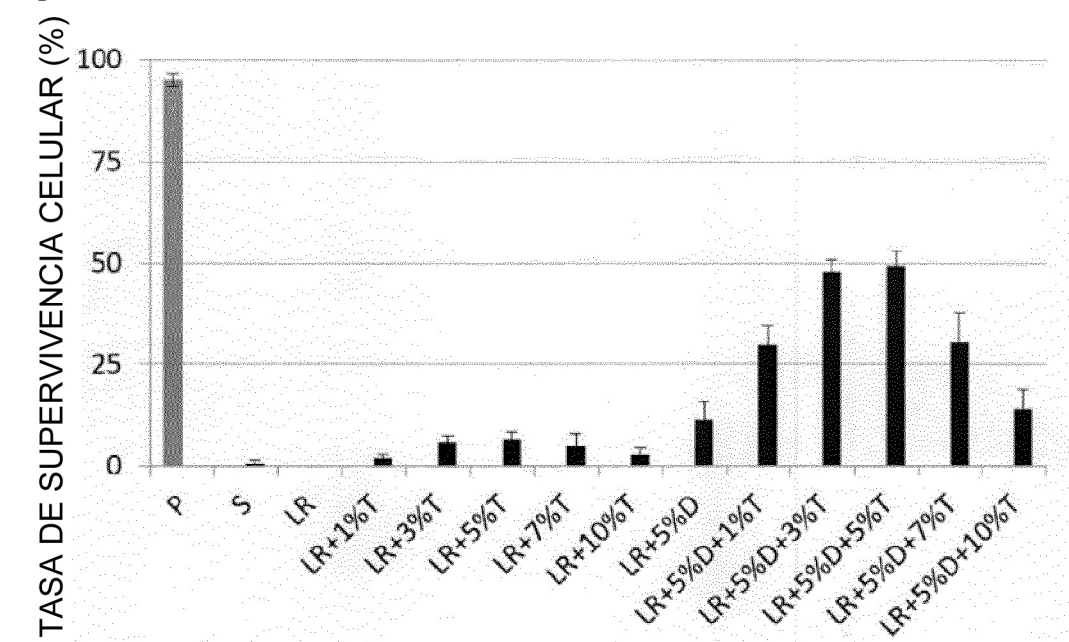
[Figura 1]



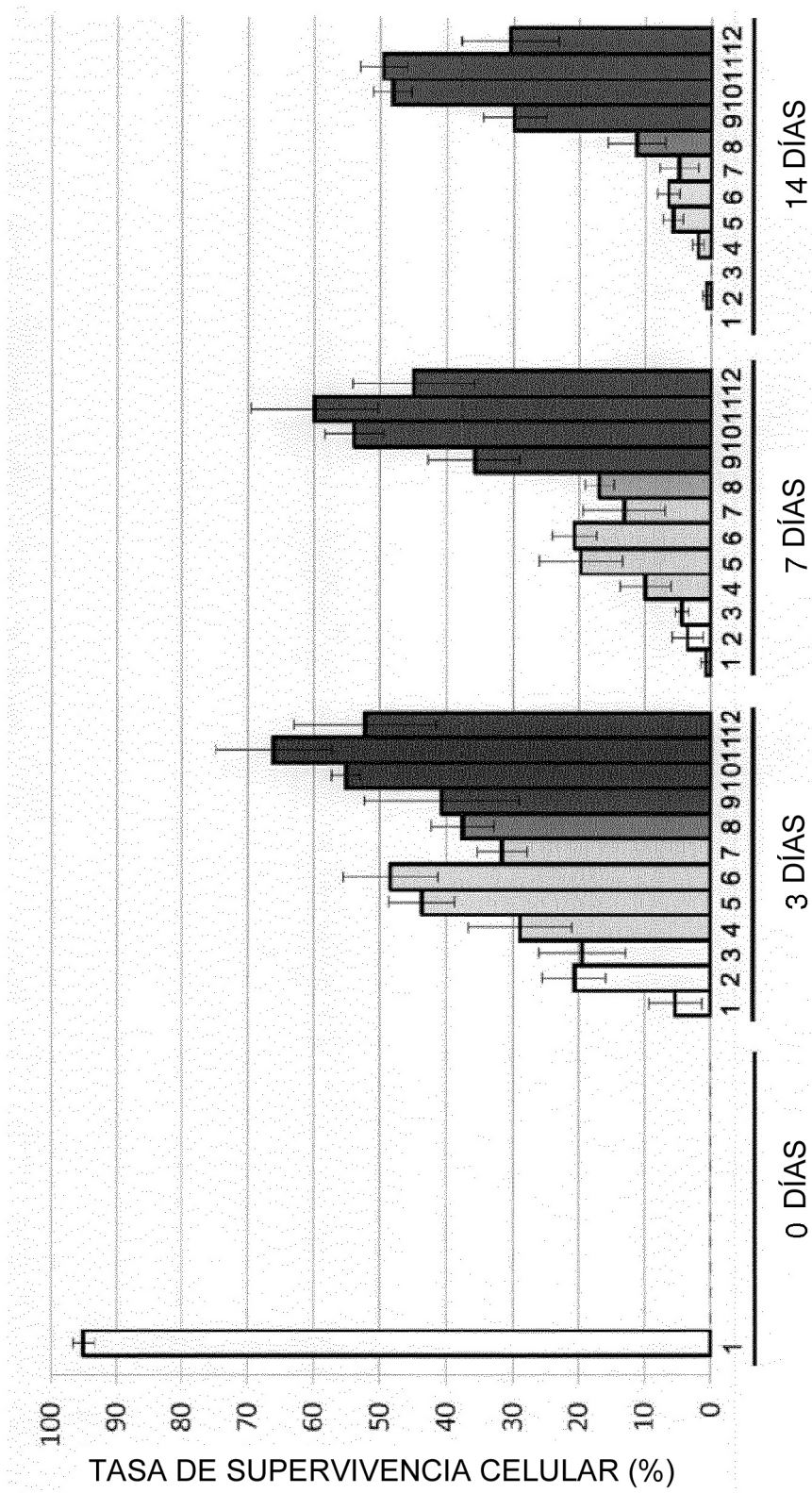
[Figura 2]



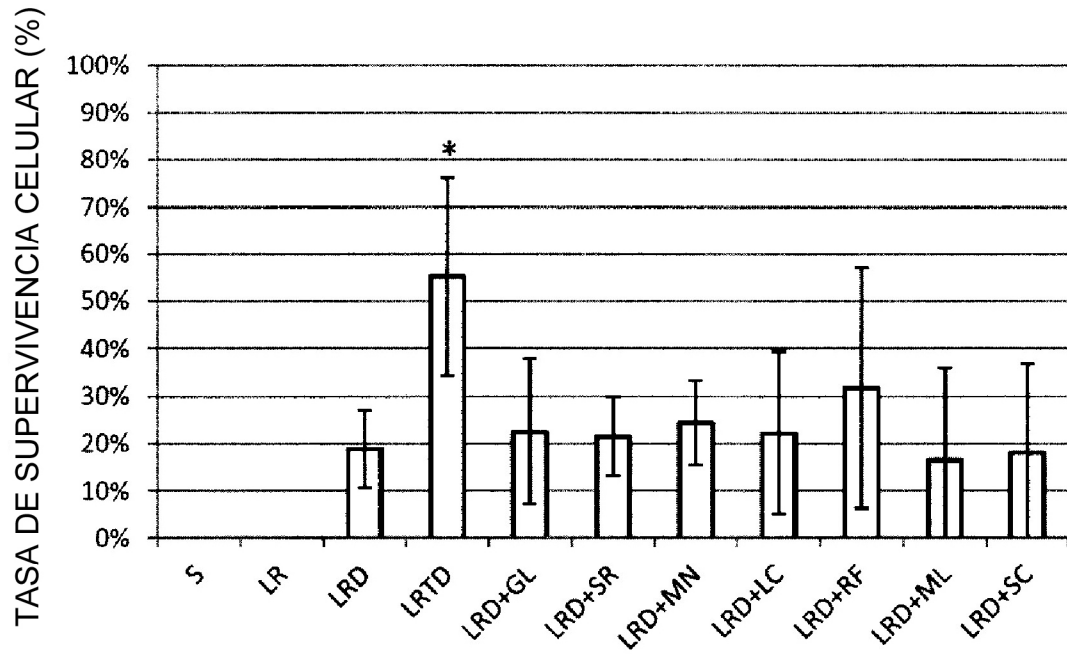
[Figura 3]



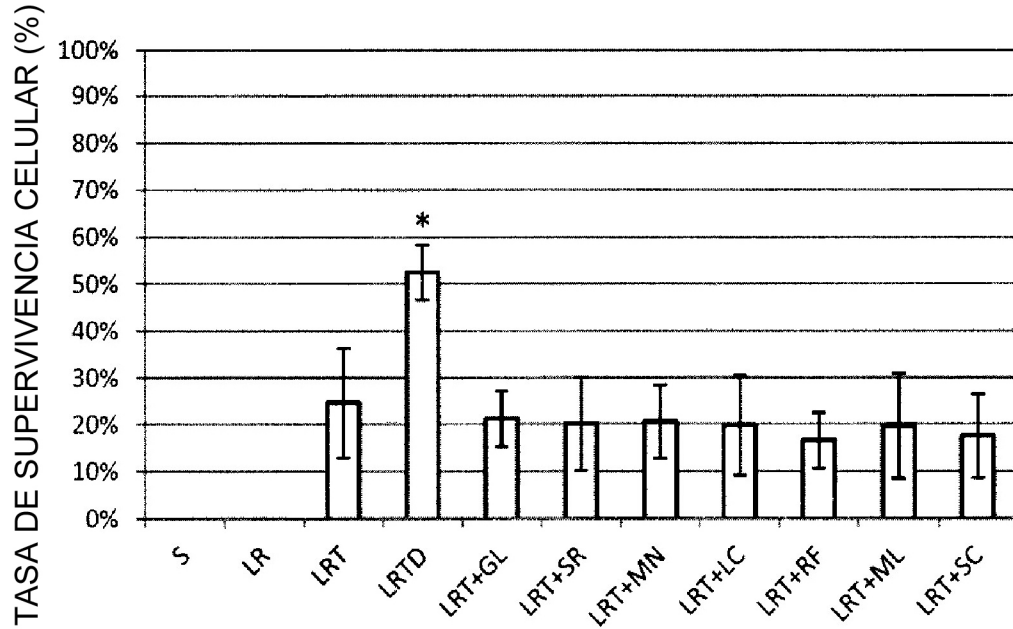
[Figura 4]



[Figura 5]

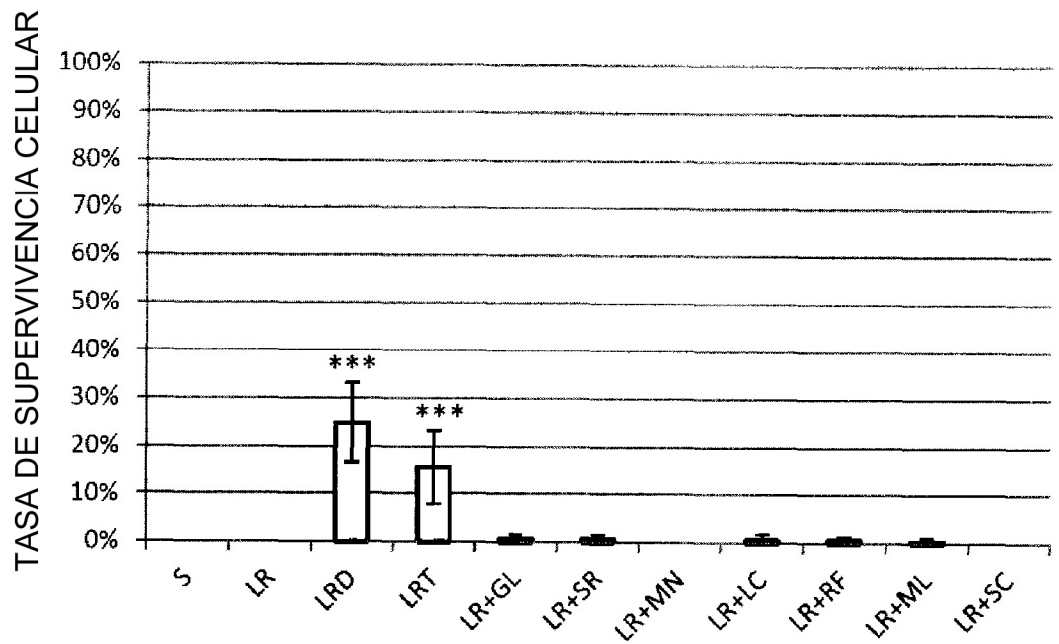


[Figura 6]



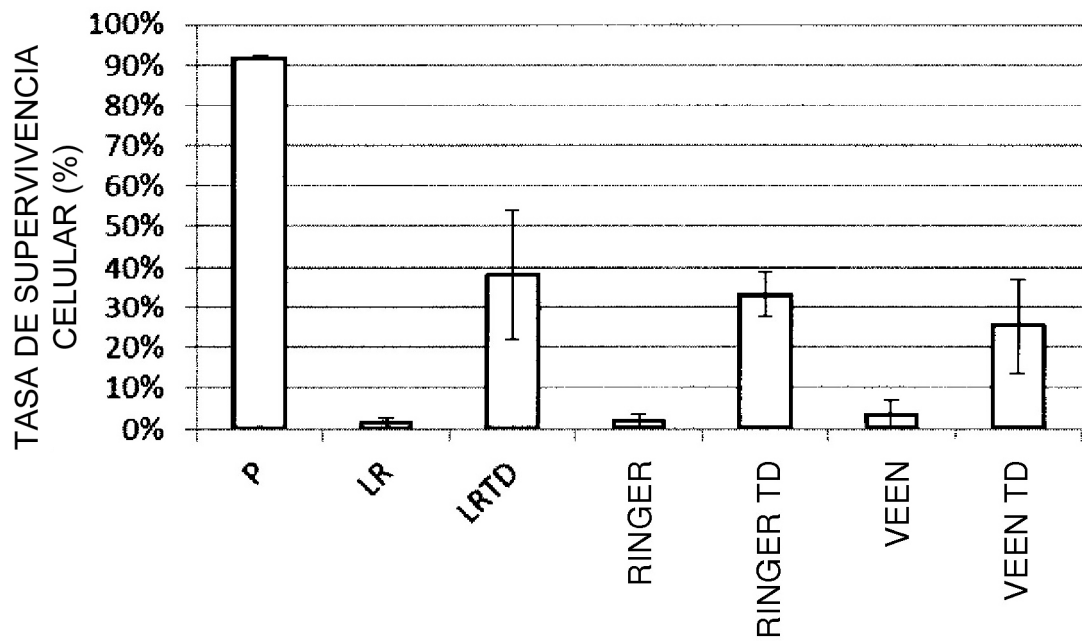
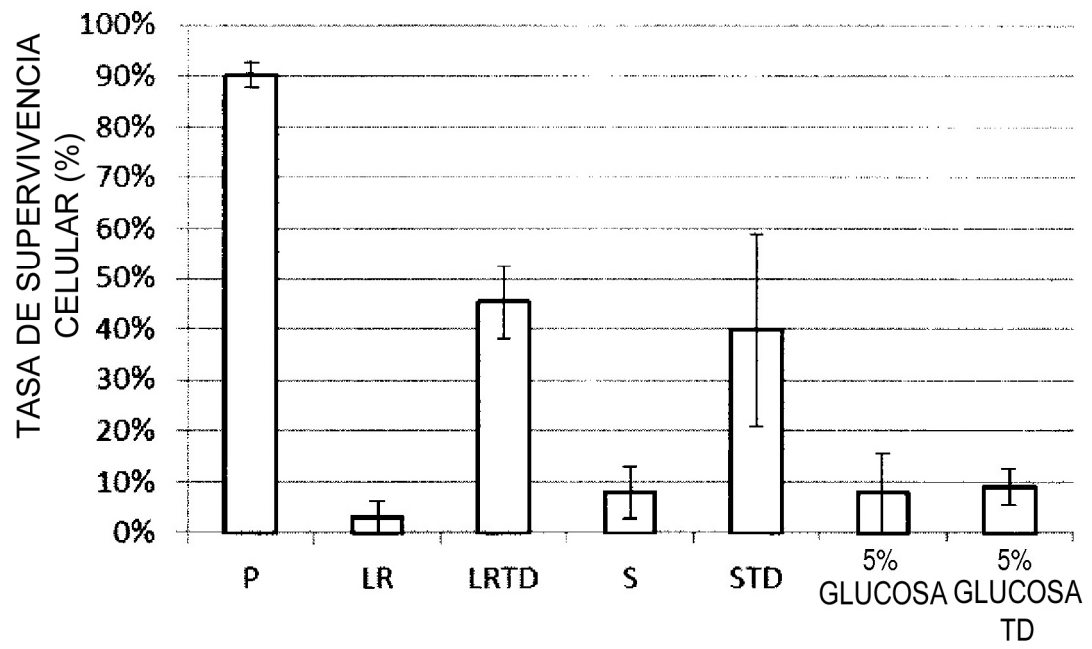
Prueba de Dunnet frente a LRT, *: $p < 0,05$, $N=4$

[Figura 7]



Prueba de Dunnet frente a LRT, ***: $p < 0,001$, $N=4$

[Figura 8]



[Figura 9]

