

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 207**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012 PCT/US2012/035676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12776772 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2702135**

54 Título: **Procedimientos para la crioconservación de células epiteliales de pigmento retiniano derivadas de citoblastos crecidas sobre un sustrato polimérico**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161481015 P

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

08.08.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(100.0%)
1150 South Olive Street, Suite 2300
Los Angeles, CA 90015, US**

72 Inventor/es:

**ZHU, DANHONG;
HINTON, DAVID;
AHUJA, ASHISH y
HUMAYUN, MARK**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 722 207 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

Procedimientos para la crioconservación de células epiteliales de pigmento retiniano derivadas de citoblastos crecidas sobre un sustrato polimérico

ANTECEDENTES

5 Campo de la Invención

La presente solicitud se refiere en general a procedimientos para la crioconservación de citoblastos crecidos sobre un sustrato. En particular, procedimientos para la crioconservación de células epiteliales de pigmento retiniano (RPE) crecidas sobre un sustrato polimérico.

Descripción de la técnica relacionada

10 El alcance de las enfermedades humanas que implican la pérdida de o el daño a células es vasto e incluye, pero sin limitación, enfermedades oculares, neurodegenerativas, endocrinas, cánceres y enfermedades cardiovasculares. La terapia celular implica el uso de células, y en algunos casos citoblastos, para tratar tejidos enfermos o dañados. Está llegando rápidamente a la vanguardia de las tecnologías que están preparadas para tratar muchas enfermedades, en particular aquellas que afectan a los individuos que no responden a las terapias farmacológicas tradicionales.

15 De hecho, muchas enfermedades que son candidatas para la aplicación de terapia celular no son mortales, sino que implican la pérdida de la función fisiológica normal. Por ejemplo, las enfermedades oculares a menudo implican la degeneración funcional de diversos tejidos oculares que afecta a la visión y, por tanto, a la calidad de vida de numerosos individuos.

20 El ojo de los mamíferos es un órgano sensorial especializado capaz de convertir los fotones entrantes enfocados por la óptica anterior (córnea y cristalino) en una señal neuroquímica. Este proceso de fototransducción permite la vista al enviar potenciales de acción a centros corticales superiores a través del nervio óptico. La retina del ojo comprende fotorreceptores que son sensibles a diversos niveles de luz e interneuronas que transmiten señales de los fotorreceptores a las células ganglionares de la retina. Estos fotorreceptores son las células más activas metabólicamente del ojo (si no del cuerpo), y están soportados metabólicamente y funcionalmente por las células epiteliales de pigmento retiniano (RPE). Estas células RPE se colocan en una monocapa en el ojo y son fundamentales para la visión.

25 Numerosas patologías pueden comprometer o eliminar por completo la capacidad de un individuo para percibir imágenes visuales, incluyendo traumatismo ocular, infección, degeneración, irregularidades vasculares y problemas inflamatorios. La porción central de la retina se conoce como la mácula, que es responsable de la visión central, la visualización fina y la diferenciación de color. La función de la mácula puede verse afectada negativamente por la degeneración macular relacionada con la edad (húmeda o seca), el edema macular diabético, la neovascularización coroidea idiopática, la degeneración macular por alta miopía o la retinitis pigmentosa avanzada, entre otras patologías.

30 La degeneración macular relacionada con la edad típicamente causa una pérdida de visión en el centro del campo visual (la mácula) debido al daño en la retina. Es una causa importante de discapacidad visual en adultos mayores (> 50 años). La degeneración macular ocurre en formas "húmeda" y "seca". En la forma seca, los desechos celulares (drusas) se acumulan entre la retina y la coroides, lo que ejerce presión sobre la retina, conduciendo posiblemente al desprendimiento de la retina y la pérdida de visión. En la forma húmeda más grave, los vasos sanguíneos recién formados de la coroides se infiltran en el espacio detrás de la mácula, lo que causa la muerte de los fotorreceptores y sus células de soporte. Junto con la pérdida de células funcionales en el ojo, los vasos sanguíneos recién formados son frágiles y, a menudo, dejan escapar sangre y líquido intersticial, lo que puede dañar aún más la mácula.

35 Si bien las enfermedades que causan daño a células o tejidos específicos son candidatos claros para la terapia celular, sigue existiendo la necesidad en la técnica de procedimientos mejorados de terapia celular que incluyan procedimientos, sustratos y herramientas para mejorar la eficacia de la terapia celular, así como procedimientos y composiciones que permitan el almacenamiento a largo plazo de células funcionales y viables para ser usadas en tales terapias.

40 Katkov et al (2011) Stem Cells International 18: 619-8 divulga la crioconservación de células iPS humanas adherentes en placas usando etilenglicol y un protocolo de congelación de seis etapas.

SUMARIO

50 La invención es como se define en las reivindicaciones. Para abordar la necesidad de un almacenamiento a largo plazo mejorado de composiciones que contienen células para uso en terapia celular, la divulgación proporciona un procedimiento de crioconservación de citoblastos sobre un sustrato que comprende exponer un sustrato sembrado con citoblastos a una fase de descenso gradual de temperatura que tiene una tasa de reducción de la temperatura deseada, transferir el sustrato sembrado de células a un intervalo de temperatura intermedio deseado durante un primer período de tiempo, y mantener los citoblastos en un intervalo de temperatura de almacenamiento deseado

durante un segundo período de tiempo, dando como resultado citoblastos crioconservados sobre un sustrato que son adecuados para el almacenamiento a largo plazo y su uso posterior en terapia celular.

5 La tasa de la fase de descenso gradual de temperatura oscila de aproximadamente 10 °C por 10 segundos a aproximadamente 10 °C por 120 segundos de reducción de la temperatura. La divulgación también proporciona que se pueden usar tasas mayores o menores, dependiendo, al menos en parte, del tipo de célula que se va a crioconservar, el material del sustrato, las dimensiones del sustrato y la durabilidad de las células (por ejemplo, su sensibilidad a la tasa de cambio de temperatura). En varias realizaciones de la divulgación, el intervalo de temperatura intermedio deseado es de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -100 °C, incluyendo de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -10 °C, de aproximadamente -10 °C a aproximadamente -20 °C, de aproximadamente -20 °C a aproximadamente -30 °C, de aproximadamente -30 °C a aproximadamente -40 °C, de aproximadamente -40 °C a aproximadamente -50 °C, de aproximadamente -50 °C a aproximadamente -60 °C, de aproximadamente -60 °C a aproximadamente -70 °C, de aproximadamente -70 °C a aproximadamente -80 °C, de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -90 °C, de aproximadamente -90 °C a -100 °C, e intervalos de solapamiento de los mismos. De acuerdo con la invención, la temperatura intermedia es de -20 °C a -100 °C. La fase de descenso gradual de temperatura se ajusta de manera que el sustrato sembrado con citoblastos alcance una temperatura de alrededor de 0 °C. De nuevo, esto depende, al menos en parte, del tipo de célula, el sustrato y la sensibilidad de cada uno a la tasa de cambio de temperatura. En varias realizaciones, el perfil de reducción de temperatura se adapta para maximizar la similitud de respuesta entre el sustrato y las células. Por ejemplo, el perfil de reducción de temperatura, en algunas realizaciones, es relativamente llano (por ejemplo, menor tasa de reducción a lo largo del tiempo), para acomodar células o materiales de sustrato que son más sensibles a los cambios de temperatura. En tales realizaciones, el perfil de reducción llano permite la "aclimatación" de las células/sustrato a la reducción en serie de la temperatura, lo que en varias realizaciones conduce a un mejor almacenamiento a largo plazo, y aumenta la viabilidad y/o la función después de la descongelación.

15 La duración del almacenamiento a la temperatura intermedia puede oscilar desde un corto período de tiempo (por ejemplo, minutos a horas) hasta una duración más larga (por ejemplo, días a semanas). Por ejemplo, en varias realizaciones, el primer período de tiempo es entre aproximadamente 6 y 48 horas, como por ejemplo, aproximadamente 24 horas.

20 La temperatura de almacenamiento es menor que la temperatura intermedia. En varias realizaciones, la temperatura de almacenamiento oscila de aproximadamente -50 °C a aproximadamente -60 °C, de aproximadamente -60 °C a aproximadamente -70 °C, de aproximadamente -70 °C a aproximadamente -80 °C, de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -90 °C, de aproximadamente -90 °C a aproximadamente -100 °C, e intervalos de solapamiento de los mismos. En algunas realizaciones, se usan temperaturas más bajas para el almacenamiento (por ejemplo, mantenimiento) de las células crioconservadas. En varias realizaciones, se usa nitrógeno líquido (u otro refrigerante líquido similar) para almacenar las células. En varias realizaciones, el segundo período de tiempo (por ejemplo, el tiempo de almacenamiento) es mayor de aproximadamente 6 horas. En varias realizaciones, el segundo período de tiempo es mayor de aproximadamente 72 horas. En varias realizaciones, el segundo período de tiempo es de aproximadamente 48 horas a aproximadamente una semana.

25 El sustrato comprende parileno. En varias realizaciones, el sustrato comprende parileno en combinación con otros materiales, siendo los otros materiales biodegradables o no biodegradables. En varias realizaciones, el sustrato se trata de manera tal que tiene una o más características que potencian la viabilidad de los citoblastos sembrados. Por ejemplo, en varias realizaciones, el sustrato comprende además un recubrimiento para potenciar la adhesión de los citoblastos al sustrato. En algunas realizaciones, el recubrimiento comprende uno o más de Matrigel, vitronectina y retronectina. Se usan otros recubrimientos o modificaciones de la superficie en otras realizaciones, con el fin de conseguir una mejor adhesión celular al sustrato y/o mejorar la durabilidad y/o la viabilidad de las células durante y después del proceso de crioconservación. Por ejemplo, en varias realizaciones, el recubrimiento potencia la viabilidad de los citoblastos durante la crioconservación, después de la crioconservación, o ambas cosas.

30 Las características del sustrato comprenden uno o más del coeficiente de expansión térmica del sustrato, un parámetro de elasticidad del sustrato, o un grosor del sustrato, potenciando dichas características la viabilidad de los citoblastos sembrados. En varias realizaciones, el sustrato comprende parileno y es no poroso y permeable y la característica comprende el grosor del sustrato, y el espesor se selecciona para permitir que los nutrientes pasen a través del sustrato. Por tanto, tras la descongelación y la posterior implantación en un sitio diana, el sustrato permite el paso adecuado de nutrientes a las células y/o el paso adecuado de material de desecho celular lejos del sustrato. En algunas realizaciones, el grosor se selecciona para producir un coeficiente térmico de expansión del sustrato tal que tenga un impacto adverso reducido sobre las células sembradas.

35 En varias realizaciones, los citoblastos sembrados comprenden células hESC-RPE. En algunas de tales realizaciones, los citoblastos sembrados comprenden una monocapa de células hESC-RPE completamente diferenciadas. En varias realizaciones, los citoblastos sembrados comprenden citoblastos embrionarios.

En varias realizaciones, los citoblastos sembrados comprenden citoblastos adultos. En varias realizaciones, los citoblastos sembrados comprenden citoblastos pluripotentes inducidos.

En varias realizaciones, además de la crioconservación de citoblastos, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden además descongelar los citoblastos crioconservados sobre el sustrato mediante un procedimiento que comprende calentar el sustrato sembrado con células a una temperatura diana usando una tasa de calentamiento de ascenso gradual de temperatura para obtener citoblastos descongelados sembrados sobre el sustrato, en el que los citoblastos descongelados retienen la viabilidad y/o la funcionalidad después de la descongelación.

En varias realizaciones, los citoblastos descongelados se cultivan en un medio que comprende suplementos de crecimiento. En varias realizaciones, los suplementos de crecimiento comprenden uno o más de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y un suplemento de FGF. En algunas realizaciones, no se usan suplementos de crecimiento.

En varias realizaciones, los citoblastos descongelados son adecuados para la implantación directa en un ojo de un paciente (por ejemplo, sin la necesidad de un cultivo posterior). En varias realizaciones, la tasa de enfriamiento de descenso gradual predeterminada comprende una tasa de reducción de la temperatura de no más de aproximadamente 20 °C por minuto. En algunas realizaciones, la tasa de enfriamiento de descenso gradual predeterminada comprende una tasa de reducción de la temperatura que está dentro de un intervalo de aproximadamente 7 °C por minuto a aproximadamente 17 °C por minuto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 representa hESC-RPE crecidas sobre un sustrato de parileno después de un ciclo de congelación y descongelación.

La FIG. 2 representa la histología de un ojo de rata una semana después del trasplante de un sustrato de parileno crioconservado sembrado con hESC-RPE. Las células son tanto viables como funcionales, como muestra la monocapa polarizada de RPE formada.

Las FIG. 3A-3F representan la viabilidad celular post-descongelación celular. La FIG. 3A muestra un sustrato sembrado de células previamente crioconservadas) 1 día después de la descongelación. La FIG. 3B muestra un sustrato sembrado de células previamente crioconservadas) 1 día después de la descongelación. Las Figuras 3C-3F representan el análisis de la viabilidad celular in vitro de 4 áreas representativas de un sustrato de 1 día después de la descongelación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La terapia celular, la introducción de nuevas células en un tejido para tratar una enfermedad, representa un posible procedimiento para reparar o reemplazar el tejido enfermo por tejido sano. Muchos enfoques implican la administración de células (p. ej., citoblastos) a un tejido diana, que a menudo produce tasas de retención bajas y una incidencia disminuida de la persistencia a largo plazo de las células trasplantadas (o implantadas). Esto puede deberse a una variedad de factores, incluyendo el lavado de células (del tejido diana) y/o las bajas tasas de supervivencia celular en los medios de suministro (o el tejido diana). Sin embargo, algunas enfermedades no requieren el injerto completo de las células suministradas en sí, sino que requieren factores de crecimiento, señales químicas u otras interacciones con las células suministradas. El tratamiento de tales enfermedades se puede lograr mediante el suministro de células a un tejido diana. En algunas terapias, las células suministradas crecen primero y se suministran entonces posteriormente sobre un sustrato biocompatible. Varias realizaciones de los procedimientos divulgados en el presente documento se refieren a la crioconservación de dichos implantes sembrados con células, de manera que puedan almacenarse a largo plazo y usarse para una terapia celular eficaz en un momento posterior. De manera ventajosa, los procedimientos divulgados permiten la preparación de un producto terapéutico "listo para usar", en el que un cirujano identifica, a partir de una pluralidad de sustratos sembrados con células y crioconservados, un sustrato óptimo para la implantación en el tejido diana de un paciente. Esto evita la necesidad de largos períodos de tiempo intermedios desde el descubrimiento de una dolencia (o la presentación de síntomas o lesiones) que requieren otros enfoques de terapia celular para hacer crecer cantidades suficientes de células para proporcionar un efecto terapéutico.

Varias realizaciones de los procedimientos descritos en este documento posibilitan la crioconservación de células sembradas sobre sustratos para almacenamiento a largo plazo y aumento de escala en la producción a gran escala. A diferencia de las preparaciones individuales de células sembradas en sustrato, la producción a gran escala de células sembradas en sustrato facilita el control de calidad y la facilidad de uso.

Los citoblastos embrionarios y pluripotentes inducidos representan fuentes potencialmente ilimitadas de células diferenciadas para la terapia de reemplazo celular. Las células epiteliales de pigmento retiniano derivadas de citoblastos (RPE) son una fuente de células terapéuticas para la terapia celular de la forma tardía de la degeneración macular relacionada con la edad atrófica (AMD). Las células RPE funcionan como monocapas polarizadas y diferenciadas. La exitosa crioconservación de monocapas de RPE polarizadas y diferenciadas derivadas de citoblastos es beneficiosa para la uniformidad de un producto clínico, la maximización del rendimiento del producto, la garantía de control de calidad dentro de un lote de productos clínicos y la distribución de un producto final similar a sitios clínicos remotos. El aumento de escala que está de acuerdo con los estándares de buenas prácticas de fabricación clínica (cGMP) y prácticas en tejidos (GTP) requiere pruebas de lote y de versión final que sean prácticas para un fabricante. Si bien el proceso criogénico de congelación y descongelación se usa actualmente para líneas

celulares de citoblastos adultos, de sangre del cordón umbilical y derivadas de embriones pluripotentes y el RPE derivado de citoblastos embrionarios no polarizados (hESC-RPE), el solicitante no conoce hasta la fecha ninguna otra conservación exitosa de monocapas polarizadas derivadas de hESC-RPE sembradas sobre sustratos biocompatibles (como se divulga en este documento). Los principales obstáculos que, sin los procedimientos divulgados en este documento, no se han superado son la reducción de la supervivencia y el rendimiento y la incapacidad del RPE derivado para adherirse a los sustratos poliméricos necesarios para el suministro de una monocapa polarizada de células. Por tanto, varias realizaciones de la presente divulgación resuelven esta necesidad desde hace mucho tiempo de células funcionales, viables y sometidas a pruebas de control crecidas, conservadas (y listas para su posterior implantación) sobre sustratos.

10 **Sustratos**

En varias realizaciones, la crioconservación de células sobre un sustrato implantable mejora varios aspectos de la terapia celular. Como se usan en el presente documento, el término "sustrato" tendrá su significado corriente y también se usará indistintamente con el término "implante" y/o "dispositivo", aunque se apreciará que algunas realizaciones descritas en este documento no requieren la implantación en sí (p. ej., aquellos que funcionan como un "parche sobre una superficie de tejido diana"). De acuerdo con la invención, el sustrato comprende parileno.

Se puede usar una variedad de diferentes tipos de sustratos para tratar diversas enfermedades, y como tales pueden someterse a los procedimientos de crioconservación divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los sustratos pueden, en algunas realizaciones, ser tridimensionales, planos, sustancialmente planos o de otras dimensiones, formas, tamaños o características, según sea apropiado. Como se usa en el presente documento, los términos "tridimensional" y "3-D" tendrán sus significados ordinarios e incluyen dispositivos que se parecen a una jaula (por ejemplo, que tienen uno o más lúmenes o cavidades interiores). A la luz de tal variabilidad en el diseño de los sustratos divulgados en el presente documento, la divulgación a continuación, a menos que se especifique lo contrario, se considerará aplicable a cualquier variedad de sustrato. Además, a la luz de la flexibilidad de varias realizaciones de los procedimientos divulgados en el presente documento, las dimensiones, formas, número (por ejemplo, uno o una pluralidad de sustratos unidos o una pluralidad de sustratos separados) no limitan la aplicabilidad de los procedimientos. Por ejemplo, los sustratos sembrados con citoblastos para tratar un área de tejido grande (por ejemplo, un injerto osteopático) se pueden crioconservar según los procedimientos divulgados en el presente documento tan fácilmente como los sustratos sembrados con citoblastos para tratar un área de tejido microscópico (por ejemplo, un sustrato para tratar la degeneración macular que puede tener, por ejemplo, dimensiones que oscilan de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 mm y grosores que oscilan de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 mm). Se apreciará que, en algunas realizaciones, ciertas características del sustrato (por ejemplo, diámetros y densidad de los poros (si el sustrato tiene poros), material del sustrato, grosor del sustrato, permeabilidad del sustrato y similares) pueden afectar a las propiedades termodinámicas del sustrato. Además, dependiendo de la realización, estas mismas características pueden adaptarse a la función del implante. Por tanto, en algunas realizaciones, la selección y/o el ajuste de parámetros tales como el diámetro, longitud, anchura, grosor, porosidad del sustrato (si el sustrato tiene poros) y la formulación de los materiales que comprenden el sustrato se pueden ajustar para adaptarse a las propiedades termodinámicas del sustrato. Además, el perfil de cambio gradual de temperatura (por ejemplo, su tasa de cambio de temperatura y la reacción física a incrementos o disminuciones de temperatura) de un sustrato particular debido a su material, grosor, porosidad, permeabilidad, etc., es fácilmente discernible por un experto en la materia sin experimentación indebida.

La divulgación proporciona que el sustrato sembrado con células que se crioconserva comprende un sustrato poroso, un sustrato que no es poroso o un sustrato que no es poroso y permeable. En varias realizaciones, la permeabilidad del sustrato se define, al menos en parte, por sus dimensiones (por ejemplo, su grosor) en lugar de por cualquier poro o pasaje creado a propósito a través del material del sustrato. El sustrato de parileno puede ser no poroso y permeable. La divulgación proporciona que el sustrato puede ser biodegradable o no biodegradable, o comprender una combinación de partes biodegradables y no biodegradables. A modo de ejemplo, un sustrato biodegradable que no forma parte de la presente invención puede comprender un copolímero de PLGA. La tasa de biodegradación del copolímero de PLGA se puede controlar variando la relación de unidades de ácido láctico a ácido glicólico en el copolímero. La divulgación proporciona un material no biodegradable combinado con un material biodegradable, pudiendo proporcionar el último, por ejemplo, soporte estructural y mecánico adicional que ayuda en el manejo del sustrato durante la siembra y el cultivo de células y/o durante la inserción quirúrgica en un tejido (por ejemplo, espacio subretiniano). El material también puede usarse, en algunas realizaciones, para añadir masa al sustrato para ayudar en el manejo durante la siembra y el cultivo de células y/o durante la inserción quirúrgica en un tejido y/o para ayudar en la orientación del sustrato. La divulgación proporciona que los sustratos que no forman parte de la presente invención pueden estar formados por metales, polímeros, plásticos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el material permite que el sustrato tenga la suficiente elasticidad, flexibilidad y elongación potencial para no solo ajustarse a la anatomía diana durante y después de la implantación, sino también permanecer sin retorcerse, sin romperse y sin daños durante y después de la implantación. Algunas realizaciones del sustrato comprenden modificación de la superficie para mejorar el rendimiento del sustrato sembrado con células, tal como para promover la viabilidad celular y la unión de las células al sustrato. Por ejemplo, la modificación de la superficie se puede conseguir funcionalizando la superficie. En algunas realizaciones, la funcionalización de una superficie de sustrato puede conseguirse aplicando un recubrimiento a la superficie del sustrato, o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. En varias realizaciones, la funcionalización de la superficie proporciona una mejor adherencia celular a la

superficie que, en varias realizaciones, mejora el crecimiento de las células sembradas sobre el sustrato y/o potencia la viabilidad de las células durante y después del proceso de crioconservación. Los ejemplos ilustrativos de materiales adecuados para el sustrato incluyen polipropileno de parileno, poliimida, vidrio, nitinol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, colágeno, colágeno tratado químicamente, polietersulfona (PES), poli(sebacato de glicerol) PGS, poli(estireno-isobutil-estireno), poliuretano, acetato de etilvinilo (EVA), polieteretercetona (PEEK), Kynar (fluoruro de polivinilideno; PVDF), politetrafluoroetileno (PTFE), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), Pebax, acrílico, poliolefina, polidimetilsiloxano (PDMS) y otros elastómeros de silicona, polipropileno, hidroxiapatita, titanio, oro, plata, platino, otros metales y aleaciones, cerámicas, plásticos y mezclas o combinaciones de los mismos. Los materiales adecuados adicionales usados para construir los sustratos incluyen, pero no sin limitación, poli-para-xililenos (por ejemplo, parileno, incluyendo pero sin limitación parileno A, parileno AM, parileno C, parileno tratado con amoníaco, parileno C tratado con polidopamina), poli (ácido láctico) (PLA), polietileno-acetato de vinilo, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(D, L-lactida), poli (D,L-lactida-co-carbonato de trimetileno), colágeno, colágeno heparinizado, colágeno desnaturalizado, colágeno modificado (por ejemplo, silicona con gelatina), otras matrices de crecimiento celular (tales como SYNTHEMAX™), poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) y/u otros polímeros, copolímeros o copolímeros de bloque, poli(caprolactona) que contiene arginina-glicina-asparagina cíclica, arginina-glicina-ácido aspártico lineal o cíclico, combinaciones de policaprolactona y polietilenglicol (PCL-PEG), poliuretanos termoplásticos, polieteruretanos modificados con silicona, poli(carbonato-uretano) o poliimida. Los poliuretanos termoplásticos son polímeros o copolímeros que pueden comprender poliuretanos alifáticos, poliuretanos aromáticos, materiales formadores de hidrogel de poliuretano, poliuretanos hidrófilos, o combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes incluyen elastano (poli(eteruretano)) tales como Elasthane™ 80A, Lubrizol, Tecophilic™, Pellethane™, Carbothane™, Tecothane™, Tecoplast™ y Estane™. Los polieteruretanos modificados con silicona pueden incluir Carbosil™ 20 o Pursil™ 20 80A, y similares. El poli(carbonato-uretano) puede incluir Bionate™ 80A o polímeros similares. Además, en varias realizaciones, el sustrato (y/o las células) comprende materiales (o productos químicos) que permiten la visualización del sustrato in situ, que no se vean afectados por la crioconservación (y descongelación) del sustrato y las células.

Además, en varias realizaciones, se fabrica una pluralidad de sustratos individuales a partir de un único marco de sustrato más grande usando, por ejemplo, técnicas fotolitográficas, moldeo por inyección y similares. Posteriormente, las células pueden sembrarse sobre los sustratos individuales dentro del marco y procesarse según los procedimientos de crioconservación divulgados en el presente documento. En otras realizaciones, se crioconservan sustratos individuales.

Tipos de células

Los citoblastos crioconservados sobre sustratos son útiles para el tratamiento de una variedad de enfermedades. Las células oculares son útiles para tratar enfermedades oculares que incluyen, pero sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad (húmeda o seca), edema macular diabético, neovascularización coroidea idiopática o degeneración macular por alta miopía. Las células oculares adecuadas son células RPE. Los citoblastos cardíacos son útiles para tratar trastornos cardiovasculares, tales como infarto de miocardio, daño al tejido cardíaco isquémico, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma, eventos inducidos por aterosclerosis, accidente cerebrovascular (apoplejía) y enfermedad de las arterias coronarias. Los citoblastos del hígado son útiles para tratar enfermedades hepáticas, tales como hepatitis, cirrosis, cáncer y similares. Las enfermedades en otros tejidos, como el riñón, pulmón, páncreas, intestino, hueso y/o cartilago y tejidos neurales, entre otros, pueden tratarse con los dispositivos divulgados en este documento. Los citoblastos de la médula ósea recolectados pueden ser útiles para repoblar las células hematopoyéticas que se reducen debido a leucemias, cánceres o terapias que reducen el recuento de células sanguíneas.

Dada la amplia variedad de enfermedades que inducen daño celular o muerte celular, se puede sembrar una amplia variedad de tipos de células en o sobre sustratos descritos en el presente documento para conseguir efectos terapéuticos. En algunas realizaciones, se usan células cultivadas. En varias realizaciones, se usan células conservadas en bancos. En algunas realizaciones, las células cultivadas comprenden citoblastos. Los citoblastos son células pluripotentes capaces de diferenciarse en una variedad de diferentes tipos de células. En algunas realizaciones, se usan citoblastos embrionarios, mientras que en otras realizaciones se usan citoblastos adultos. En varias realizaciones, los citoblastos embrionarios son citoblastos embrionarios humanos. Los citoblastos embrionarios tienen el potencial de convertirse en cualquier tipo de célula en el cuerpo. La divulgación proporciona H1, H7, H9, SHEF-1 u otras líneas de citoblastos aprobadas por la FDA similares citadas solo como referencia. Los citoblastos embrionarios se obtienen sin destrucción del embrión. Los citoblastos adultos son típicamente multipotentes y pueden convertirse en un número más limitado de tipos de células, típicamente aquellas que están relacionadas con el tipo de tejido a partir del cual se aislaron las células. En algunas realizaciones, los citoblastos son alogénicos para el receptor (por ejemplo, como es el caso de ciertos citoblastos embrionarios). En algunas realizaciones, los citoblastos son autólogos para el receptor. En otras realizaciones, se usan células singénicas, mientras que en otras realizaciones más, se usan células xenogénicas. En algunas realizaciones, las células recién aisladas se cultivan y se despliegan en o sobre el sustrato adecuado para la implantación en un individuo receptor. En otras realizaciones, se usan células previamente crioconservadas (por ejemplo, células conservadas en bancos que se siembran sobre sustratos y se crioconservan como se divulga en el presente documento). En algunas realizaciones, se usan citoblastos pluripotentes inducidos. En algunas realizaciones, se usan citoblastos fetales, de cordón umbilical, derivados de placenta, adultos, inducidos o embrionarios humanos y/o sus derivados celulares

parcial o totalmente diferenciados. Varias realizaciones emplean células epiteliales de pigmento retiniano (RPE), mezclas de RPE y fotorreceptores, células hESC-RPE, células gliales de Müller, células ganglionares, mezclas de células gliales de Muller y células ganglionares, células endoteliales corneales, mezclas de células endoteliales corneales y colágeno, células epiteliales corneales, mezclas de células epiteliales corneales y colágeno, células endoteliales, pericitos y/o mezclas de células endoteliales y pericitos.

Procedimientos de criopreservación

Los procedimientos actuales de criopreservación se realizan a menudo en suspensiones celulares de citoblastos embrionarios no diferenciados. Los procedimientos para congelar suspensiones de muchos tipos de células (por ejemplo, hESC-RPE) no son adecuados para la criopreservación de los mismos citoblastos cuando se crecen sobre un sustrato. En muchos casos, esto se debe a la presencia requerida de altas concentraciones de suero de mamíferos (p. ej., suero bovino fetal). Paradójicamente, el solicitante ha descubierto que la misma sustancia que ayuda a la congelación de las células en suspensión afecta negativamente a la capacidad de tales células para adherirse a la superficie de un sustrato. Por lo tanto, en varias realizaciones, las condiciones de criopreservación se optimizan para conservar la adhesión celular al sustrato, lo que mejora ventajosamente no solo la supervivencia de las células, sino también la eficacia terapéutica de las células sobre el sustrato.

En varias realizaciones, se mejora la estabilidad de los trasplantes de hESC-RPE sembrando hESC-RPE altamente (o completamente) diferenciado sobre sustratos poliméricos (tales como los divulgados anteriormente) y permitiendo que las células formen una monocapa polarizada. Ventajosamente, la criopreservación en este paso representa un producto clínico final que funciona como una monocapa de RPE normal. En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento permiten el uso terapéutico de sustratos sembrados con células criopreservadas sin sustancialmente ninguna manipulación adicional o alteración de las células sobre el sustrato. Un cirujano puede simplemente seleccionar uno o más implantes sembrados con células que se hayan descongelado y proceder a implantarlos sin demora. En algunas realizaciones, las células sembradas son células hESC-RPE. Varios ejemplos de referencia están dirigidos a la criopreservación de células hESC-RPE sembradas en sustrato de la línea celular H9 ESC.

En varias realizaciones, las células hESC-RPE adheridas al sustrato se congelan (sin efectos adversos sobre la adherencia, función o viabilidad) durante aproximadamente 1-5 horas, 5-12 horas, 12-24 horas, 24-48 horas, 48 horas a una semana, una semana a dos semanas, dos a tres semanas, tres a cuatro semanas o más tiempo, e intervalos superpuestos de los mismos. En algunas realizaciones, los sustratos sembrados con células se criopreservan y almacenan durante más de un mes, durante más de un año o más tiempo. En algunas realizaciones, las células criopreservadas que crecen sobre un sustrato de parileno son adecuadas para la implantación en el espacio subretiniano, o en cualquier otro sitio de implantación diana adecuado, de un sujeto después de la descongelación controlada.

En algunas realizaciones, un sustrato comprende parámetros seleccionados para mejorar la integridad o la funcionalidad de las células adheridas sobre el sustrato. Las características de un sustrato pueden seleccionarse de tal modo que las células adheridas al sustrato mantengan sustancialmente la integridad o la funcionalidad después de la criopreservación. Por ejemplo, las características de un sustrato pueden afectar a las propiedades termodinámicas del sustrato y pueden adaptarse a la función del implante. En algunas realizaciones, la selección y/o el ajuste de parámetros tales como el diámetro, la longitud, la anchura, el grosor, la densidad, la porosidad (de sustratos porosos) del sustrato y la formulación de los materiales del sustrato se ajustan para adaptarse a las propiedades termodinámicas del sustrato (por ejemplo, coeficientes de expansión térmica y elasticidad) para optimizar la criopreservación de citoblastos crecidos sobre un sustrato. De acuerdo con la invención, el sustrato tiene una o más características seleccionadas de un coeficiente de expansión térmica del sustrato, un parámetro de elasticidad del sustrato o un grosor del sustrato. En algunas realizaciones, los parámetros de un sustrato se optimizan de tal manera que las tasas de ascenso gradual y descenso gradual de la temperatura no rompan la integridad de la monocapa celular y no afecten de manera adversa a la viabilidad o la función de las células después de la descongelación. Además, en varias realizaciones, la distorsión física del sustrato debido a los cambios de temperatura se reduce (de nuevo, para reducir la ruptura de la adherencia celular al sustrato y/o la viabilidad de las células después de la descongelación). Por ejemplo, la ruptura de las uniones estrechas entre las células RPE adyacentes por adherencia y la expansión o contracción del sustrato polimérico pueden afectar negativamente a la viabilidad celular después de la descongelación. En algunas realizaciones, un sustrato puede comprender un material polimérico que tiene parámetros tales como el coeficiente de expansión térmica y elasticidad, y especificaciones tales como geometría y grosor, que se controlan para optimizar la criopreservación (y la viabilidad de las células después de la descongelación) de citoblastos crecidos sobre un sustrato. De acuerdo con la invención, el sustrato comprende parileno y tiene una o más características seleccionadas de un coeficiente de expansión térmica del sustrato, un parámetro de elasticidad del sustrato o un grosor del sustrato. En algunas realizaciones, uno o más parámetros seleccionados de un sustrato posibilitan monocapas celulares sustancialmente intactas después de la descongelación del sustrato.

Además, los procedimientos divulgados en el presente documento son ventajosos porque la criopreservación de sustratos sembrados con células facilita el desarrollo de un agente terapéutico al permitir el transporte de un producto final conforme a las GMPc al sitio clínico o sala de operaciones sin riesgo de romper la integridad de la monocapa. En

algunas realizaciones, las células crioconservadas sembradas sobre un sustrato son adecuadas para uso directo como agente terapéutico después de la descongelación. Los procedimientos divulgados en el presente documento también posibilitan ventajosamente que las células crioconservadas mantengan sustancialmente la funcionalidad. Por ejemplo, los procedimientos divulgados en este documento posibilitan que las células mantengan sustancialmente la viabilidad después de la crioconservación, de tal modo que las células pueden implantarse directamente en el sitio diana de un paciente después de que las células/sustrato se descongelen. El sitio de implantación diana puede comprender un segmento anterior del ojo, o un segmento posterior del ojo, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el sitio diana puede incluir uno o más de un espacio subretiniano, un espacio supracoroideo, una cámara anterior, humor vítreo u otro espacio intraocular adecuado, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los procedimientos divulgados en el presente documento posibilitan la implantación directa en un sitio diana de un sustrato crioconservado que tiene una monocapa de células hESC-RPE totalmente diferenciadas unidas a él. Adicionalmente, los procedimientos divulgados en el presente documento posibilitan además la producción controlada en masa de células crioconservadas sembradas sobre un sustrato que mantiene sustancialmente la funcionalidad o la viabilidad después de la descongelación, de tal modo que las células son adecuadas para la implantación directa dentro de un paciente.

Los citoblastos pueden sembrarse sobre un sustrato; cultivarse a una densidad final deseada, lavarse, transferirse a un criovial que contiene medio de congelación (por ejemplo, CryoStem de Stemgen) y someterse a reducción de temperatura controlada. Adicionalmente, las células pueden diferenciarse en cultivo antes de la crioconservación. La divulgación proporciona que las células puedan cultivarse sobre un sustrato que comprende un material polimérico o un material no polimérico, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el sustrato es un parileno. En varias realizaciones, el sustrato está recubierto, en particular sobre una porción del sustrato diseñado para el crecimiento o la unión celular. Por ejemplo, una superficie de unión celular del sustrato puede tratarse para promover la adhesión celular sobre la superficie de unión celular o para potenciar la viabilidad de las células adheridas a la superficie de unión celular. En varias realizaciones, el sustrato está recubierto con MATRIGEL™ u otros agentes similares para promover la unión celular o soportar la viabilidad celular. En algunas realizaciones, el sustrato puede tratarse con un recubrimiento que comprende vitronectina, retronectina o combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, la membrana está recubierta con un compuesto disponible comercialmente (por ejemplo, CellStart (Invitrogen)). En varios ejemplos, el sustrato sembrado con citoblastos se cultiva en presencia de FGF (u otro u otros factores de crecimiento) hasta que las células sean confluentes (o hasta que alcancen una confluencia deseada). En algunos ejemplos, el sustrato sembrado con citoblastos se cultiva en condiciones que promueven la diferenciación de los citoblastos. En algunas realizaciones, las células adheridas al sustrato se crioconservan en un medio de congelación libre de suero y proteínas. En algunas realizaciones, el sustrato sembrado con células se carga en un criovial (u otro recipiente adecuado para congelación/almacenamiento) y se somete entonces a crioconservación.

Las células se enfrían en una fase de descenso gradual de temperatura que tiene una tasa seleccionada de reducción de temperatura. De acuerdo con la invención, la reducción de la temperatura en la fase de descenso gradual de temperatura es de 10 °C por 10 segundos a 10 °C por 120 segundos. En una realización, la tasa de cambio es de aproximadamente 10 °C por minuto. La divulgación también proporciona otras tasas de cambio, tales como aproximadamente 1 °C por minuto, aproximadamente 2 °C por minuto, aproximadamente 5 °C por minuto, aproximadamente 7 °C por minuto, aproximadamente 12 °C por minuto, aproximadamente 15 °C por minuto, aproximadamente 17 °C por minuto, aproximadamente 20 °C por minuto, o tasas dentro de los valores anteriores. La divulgación proporciona que una fase de descenso gradual de temperatura pueda incluir una etapa de congelación instantánea (por ejemplo, reducción máxima de la temperatura). Por ejemplo, una etapa de congelación instantánea puede comprender una tasa de congelación instantánea del cambio de temperatura que tiene una tasa aumentada de reducción de la temperatura, donde la tasa se selecciona para mejorar ventajosamente la integridad celular o la viabilidad celular. En contraste, en varias realizaciones y en contra de la creencia generalizada, no se emplea una etapa de congelación instantánea. Los solicitantes han descubierto, en ciertas realizaciones, que las tasas máximas de reducción de la temperatura son igualmente dañinas que ciertas tasas de reducción más lentas, mientras que ciertas tasas intermedias proporcionan una calidad inesperadamente mejorada de crioconservación y/o viabilidad celular. En algunas realizaciones, una fase de descenso gradual de temperatura puede incluir el enfriamiento de las células adheridas al sustrato a una tasa de aproximadamente 10 °C por 10 segundos, 10 °C por 20 segundos, 10 °C por 30 segundos, 10 °C por 40 segundos, 10 °C por 50 segundos, 10 °C por 60 segundos, 10 °C por 70 segundos, 10 °C por 80 segundos, 10 °C por 90 segundos, 10 °C por 100 segundos, 10 °C por 110 segundos o 10 °C por 120 segundos. La tasa de enfriamiento en una fase de descenso gradual de temperatura está configurada para mejorar la viabilidad celular, en algunas realizaciones. Por ejemplo, ciertas tasas de enfriamiento en una fase de descenso gradual de temperatura mejoran la funcionalidad celular después de la crioconservación. En algunas realizaciones, las tasas de enfriamiento en una fase de descenso gradual de temperatura se configuran para mejorar la integridad o estabilidad celular. En algunas realizaciones, las células crioconservadas mantienen sustancialmente el efecto terapéutico después de la crioconservación. Por ejemplo, las células son adecuadas para la implantación directa en un sitio diana de un paciente después de la descongelación de las células crioconservadas con un rendimiento de eficacia terapéutica aproximadamente equivalente a (o mejor que) las células que no se han crioconservado.

Las células adheridas al sustrato se someten a una temperatura de almacenamiento intermedia durante un período de tiempo deseado. La temperatura de almacenamiento intermedia, en varias realizaciones, oscila entre aproximadamente -50 °C y aproximadamente -60 °C, de aproximadamente -60 °C a aproximadamente -70 °C, de

aproximadamente -70 °C a aproximadamente -80 °C, de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -90 °C, de aproximadamente -90 °C a -100 °C e intervalos de solapamiento de los mismos. En algunas realizaciones, las células pueden almacenarse a una temperatura de almacenamiento intermedia durante un período de tiempo predeterminado antes de transferirlas a un almacenamiento a más largo plazo. Por ejemplo, las células pueden mantenerse a una temperatura de almacenamiento intermedia durante la noche, o cualquier otro período de tiempo adecuado, antes de ser transferidas a nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo. Se pueden usar otras temperaturas en otras realizaciones (por ejemplo, almacenamiento a -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, etc.) Este almacenamiento provisional sirve como una "etapa decreciente" de temperatura que potencia aún más la estabilidad, la viabilidad y la función de las células sembradas sobre el sustrato después de la descongelación. En varias realizaciones, se utiliza un procedimiento "por etapas decrecientes" de varias etapas.

En algunas realizaciones, las células adheridas al sustrato crioconservadas se descongelan para su uso (por ejemplo, la implantación) transfiriendo un criovial que contiene las células adheridas al sustrato crioconservadas a un baño de agua que tiene una temperatura alrededor de la temperatura corporal, por ejemplo una temperatura de alrededor de 37 °C, o cualquier otra temperatura adecuada. En otras realizaciones, se usa un proceso de descongelación "por etapas crecientes" que tiene una tasa de calentamiento por etapas crecientes. Por ejemplo, el criovial puede, en algunas realizaciones, colocarse en entornos de almacenamiento secuencial con temperaturas crecientes antes de ser transferido a una temperatura que esté alrededor de la temperatura corporal, por ejemplo un baño de agua que tenga una temperatura de alrededor de 37 °C, o cualquier otra temperatura adecuada. En varias realizaciones, la incubadora final se localiza en la sala de operaciones, lo que permite que un cirujano seleccione e implante inmediatamente un sustrato sembrado con células. En varias realizaciones, después de descongelar, las células adheridas al sustrato pueden transferirse a un disco de cultivo y cultivarse en condiciones apropiadas durante un período de aproximadamente 30 minutos, una hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 86 horas, 110 horas, una semana, dos semanas o más de tres semanas antes de ser transportadas a la localización deseada (por ejemplo, la sala de operaciones para suministro a un paciente). En algunas realizaciones, las células adheridas al sustrato se cultivan en un medio complementado con FGF2. Como alternativa, en varias realizaciones, el sustrato sembrado con células descongelado es adecuado para la implantación directa en un paciente.

Se proporciona a continuación un ejemplo de referencia.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Dos horas antes de la disociación de un recipiente de cultivo, se cambió el medio de cultivo de células H9-RPE madre por medio X-VIVO 10 reciente. Se lavaron entonces las células H9-RPE diferenciadas con DPBS libre de calcio y magnesio (Mediatech, Inc., VA), pH 7,4, una vez y se disociaron con tripsina al 0,05 % con EDTA 0,53 mM (Mediatech, Inc., VA) Durante 5 minutos a 37 °C. Se disociaron entonces totalmente las células bombeando la solución de tripsina-EDTA hacia arriba y hacia abajo suavemente sobre las células con una pipeta (placa o discos de cultivo) o transfiriendo las células con una pipeta a un matraz de cultivo. Se neutralizó entonces la tripsina con un volumen igual de medio X-VIVO 10 (Lozan) que contenía FBS al 10 % (Hyclone u otros reactivos de neutralización sin xenógenos). Se filtraron las suspensiones celulares a través de un tamiz estéril de 40 µm para retirar las células no disociadas, se sedimentaron las células disociadas con una centrífuga Hirmle Z 300 (RPI Corp., IL) y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos.

Se lavaron entonces los sedimentos celulares con medio X-VIVO 10 dos veces y se contaron con un hemocitómetro. Se sembraron las células sobre membranas de parileno recubiertas con CELLSTART (Invitrogen) o MATRIGEL (BD Biosciences) u otras membranas poliméricas a la densidad de $10^5/cm^2$ en medio X-VIVO 10 suplementado con 10 ng/ml de FGF2 (R&D Systems). Se cultivaron las células sobre las membranas en medio X-VIVO 10 con FGF durante una semana y entonces en medio X-VIVO 10 sin suplementación con FGF durante tres semanas más. Los medios se cambiaron dos veces por semana.

Las células sembradas crecieron hasta confluencia después de una semana en cultivo. Después de dos semanas de cultivo, las células comenzaron a formar la morfología típica del RPE, adquiriendo una forma y una pigmentación de adoquines.

Después de 4 semanas de cultivo, se lavaron las células RPE completamente diferenciadas que crecieron sobre la membrana del sustrato con medio X-VIVO 10 una vez y se transfirieron entonces a un criovial que contenía 1 ml de medio de congelación CryoStem (Stemgen). Los crioviales que contenían células con medio de congelación se colocaron en un envase COOLCELL® (BioCision). La temperatura de las células se redujo a una tasa de 10 °C por minuto, hasta una temperatura final de aproximadamente 0 °C. Las células adheridas al sustrato se almacenaron entonces en un congelador a -80 °C durante la noche. Se transfirieron entonces los crioviales congelados a un CRYOBOX™ (Thermo Fisher Scientific) y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Como se discutió anteriormente, en varias realizaciones, se descongelan los crioviales que contienen células RPE sobre el sustrato para su implantación en un paciente. Se sacaron los implantes crioconservados del envase de nitrógeno líquido y se colocaron inmediatamente en un baño de agua a 37 °C (u otro entorno equivalente). Después de descongelar, se transfirieron cuidadosamente los sustratos sembrados con células RPE del criovial a discos de cultivo de tejidos de 35 mm, se lavaron dos veces en 3 ml de medio X-VIVO 10, se transfirieron a pocillos de cultivo de una placa de 24 pocillos y se cultivaron en medio X-VIVO 10 suplementado con 10 ng/ml de FGF2. Se cultivaron

las células durante una semana con medio cambiado cada dos días. Después de una semana de recuperación en X-VIVO 10 con suplemento de FGF, las células con membrana de sustrato estaban listas para el trasplante en el animal o podían cultivarse continuamente en medio X-VIVO 10 sin suplemento de FGF2. En otras realizaciones, no se requiere ningún cultivo posterior a la descongelación (por ejemplo, la implantación puede realizarse tan pronto como se completa la descongelación). Como se muestra en la FIG. 1, después de "congelar y descongelar", las células de RPE permanecen unidas al sustrato de parileno y tienen monocapas intactas (por ejemplo, las uniones estrechas de RPE no están comprometidas debido al cambio de temperatura). Además, como se muestra en las FIG. 3A-3B, hay una pérdida celular limitada después de la descongelación a 1 día (3A) y 1 semana (3B). Adicionalmente, no solo las células permanecen sobre el sustrato, sino que también permanecen viables después de la descongelación. Las FIG. 3C-3F representan análisis de viabilidad celular que demuestran que el porcentaje de células vivas después de la descongelación es sustancialmente mayor que las células muertas (3C-3F representan 4 campos de visión diferentes). Además, el análisis histológico de 1 semana después de la implantación en el espacio subretinal de rata mostró que las células RPE previamente crioconservadas sobre la membrana del sustrato no solo sobreviven, sino que también retienen la funcionalidad como evidencia su formación y mantenimiento in vivo de una monocapa polarizada (FIG. 2).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para crioconservar citoblastos sobre un sustrato, comprendiendo el procedimiento:
exponer un sustrato sembrado con citoblastos a una fase de descenso gradual de temperatura 5 de 10 °C por 10 segundos a 10 °C por 120 segundos a una temperatura final de aproximadamente 0 °C,
- 5 en el que el sustrato comprende parileno,
en el que el sustrato tiene una o más características seleccionadas de
- (i) un coeficiente de expansión térmica del sustrato.
 - (ii) un parámetro de elasticidad del sustrato, o
 - (iii) un grosor del sustrato, potenciando dichas características la viabilidad de los citoblastos sembrados;
- 10 transferir el sustrato sembrado con células a una temperatura intermedia de -20 °C a -100 °C durante un primer período de tiempo; y,
mantener los citoblastos a una temperatura de almacenamiento que es inferior a la temperatura intermedia durante un segundo período de tiempo, obteniendo así citoblastos crioconservados.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho primer periodo de tiempo está entre 6 y 48 horas.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha temperatura de almacenamiento se consigue usando nitrógeno líquido.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el sustrato comprende además un recubrimiento para potenciar la adhesión de los citoblastos al sustrato, en el que el recubrimiento comprende uno o más de Matrigel, vitronectina y retronectina, y en el que dicho recubrimiento potencia la viabilidad de los citoblastos durante la crioconservación, después de la crioconservación, o ambas.
- 20 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho parileno es parileno C.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que los citoblastos sembrados comprenden células hESC-RPE.
- 25 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que los citoblastos sembrados comprenden una monocapa de células hESC-RPE completamente diferenciadas.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el sustrato de parileno es no poroso y permeable.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además descongelar los citoblastos crioconservados 5 sobre dicho sustrato mediante un procedimiento que comprende:
- 30 calentar el sustrato sembrado con células a una temperatura diana usando una tasa de calentamiento de ascenso gradual de temperatura para obtener citoblastos descongelados sembrados sobre el sustrato, en el que los citoblastos descongelados retienen la viabilidad y/o la funcionalidad después de la descongelación.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los citoblastos descongelados se cultivan en un medio que comprende uno o más de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y un suplemento de FGF.
- 35 11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los citoblastos descongelados se cultivan en un medio sin suplementos de crecimiento.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la fase de descenso gradual de temperatura comprende una tasa de reducción de la temperatura que está dentro de un intervalo de 7 °C por minuto a 17 °C por minuto.

40

FIG. 1

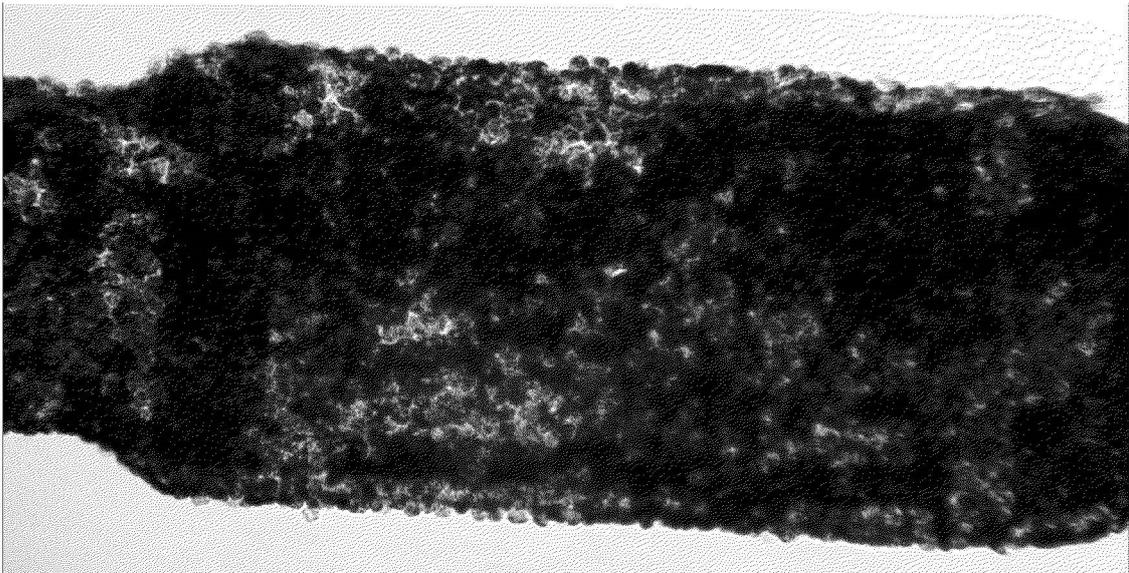
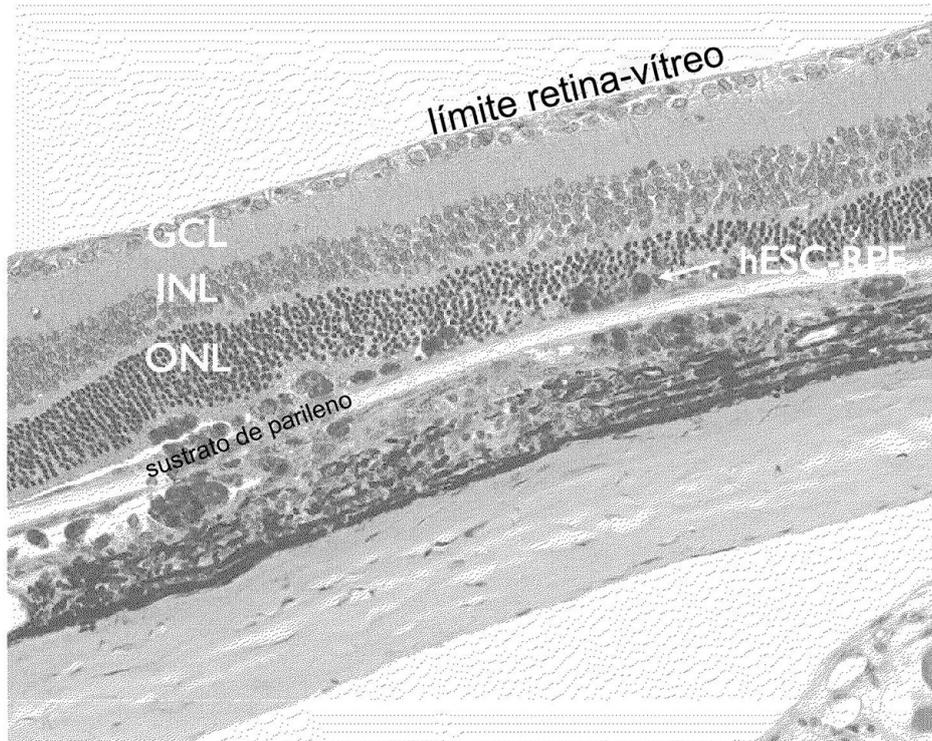
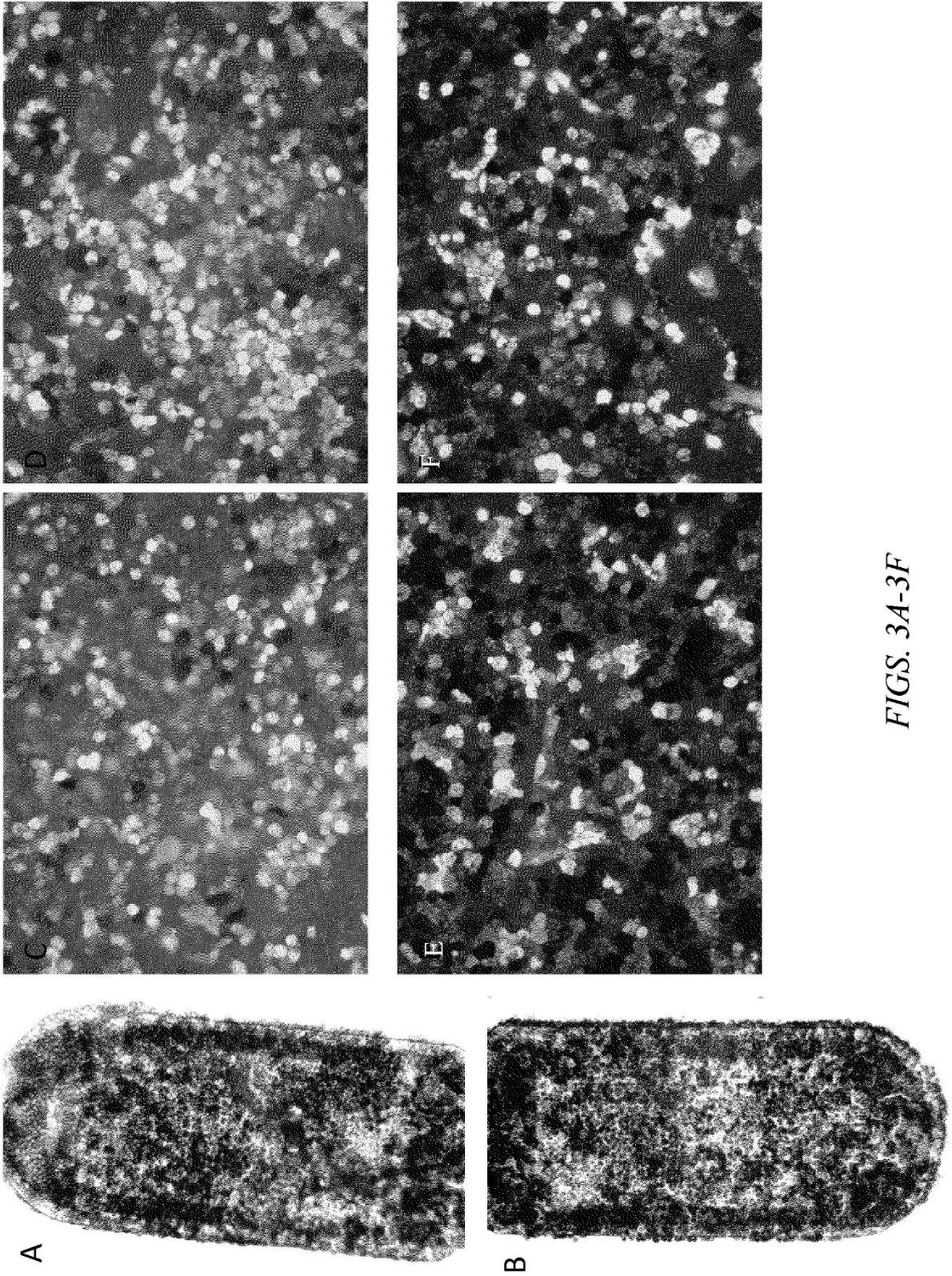


FIG. 2





FIGS. 3A-3F