

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 854**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2017 PCT/EP2017/075257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18065491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2017 E 17786853 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3429345**

54 Título: **Usos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura**

30 Prioridad:

04.10.2016 EP 16192276

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

21.05.2020

73 Titular/es:

**ALBUMEDIX LTD. (100.0%)
Castle Court 59 Castle Boulevard
Nottingham NG7 1FD, GB**

72 Inventor/es:

JØRGENSEN, EVA BALSLEV

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 761 854 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

Usos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura

5 **Referencia a un listado de secuencias**

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias en formato de lectura en ordenador.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y usos para proteger las células de los efectos posteriores del choque fisiológico, y a composiciones que comprenden albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura útiles para ello. En particular, la presente invención se refiere a la preservación de células madre en una forma viable, en particular para extender la viabilidad de las células madre criopreservadas después de congelación y descongelación, y durante el almacenamiento después de la descongelación.

15 **Antecedentes de la invención**

20 Durante muchos años las células madre se han usado en un entorno clínico. Las células madre hematopoyéticas se han usado para el tratamiento de enfermedades hematológicas y no hematológicas; aunque que más recientemente las células madre mesenquimales obtenidas a partir de la médula ósea han sido objeto de estudios clínicos de laboratorio y tempranos. Estas células muestran tanto potencial de multipotencia como de expansión. Las células madre embrionarias humanas son células pluripotentes, capaces de formar líneas celulares estables que retienen la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales. Esto hace que tengan especial importancia tanto

25 en medicina regenerativa como en toxicología. Las células madre pluripotentes inducidas (iPS) también pueden proporcionar una amplitud de utilidad similar sin algunos de los problemas éticos confusos que rodean a las células madre embrionarias.

30 El documento US 2013/157356 se publicó el 20 de junio de 2013 y se titula "Métodos y composiciones para mejorar la producción de proteínas". Su divulgación se refiere a composiciones, y usos de las mismas, que son beneficiosas para las células eucariotas en cultivo, y a métodos para su uso en la estimulación del crecimiento celular, viabilidad y expresión de proteínas recombinantes. Se enseña que los métodos que se desvelan en el mismo son útiles, por ejemplo, para mejorar la viabilidad celular y para acelerar la tasa de crecimiento celular de células que crecen en cultivo. En un aspecto, se indica que los suplementos que se describen en el mismo son útiles para mejorar o

35 aumentar el rendimiento de las proteínas recombinantes de los cultivos celulares.

Un requisito previo esencial para la aplicación comercial y clínica de las células madre son los protocolos de criopreservación adecuados para almacenamiento a largo plazo.

40 Este procedimiento de rutina generalmente implica un enfriamiento lento en presencia de un criopreservante para evitar los efectos dañinos de la formación de hielo intracelular. El dimetilsulfóxido (DMSO) es un criopreservante común.

45 Aunque los protocolos actuales de criopreservación son clínicamente eficaces, aún quedan dudas sobre si son óptimos o no. Se sabe que el DMSO es tóxico para tejidos y células, y que la toxicidad depende del tiempo, temperatura y concentración. La toxicidad varía de un tipo de célula a otro, y la práctica aceptada ha sido introducir el criopreservante a bajas temperaturas (+4 °C) durante un periodo tan corto como se considere práctico.

50 Después de descongelar las células, generalmente se usan procedimientos de lavado, por ejemplo, basados en lo desarrollado originalmente por Rubenstein *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92: 10119-10122, para transferir las células descongeladas a un medio sin DMSO.

55 Sin embargo, después de descongelar las células madre criopreservadas, y transferirlas a un medio recién preparado (idealmente sin DMSO), hay un periodo de tiempo muy limitado (habitualmente 24 horas o inferior) en el que las células madre permanecen viables y adecuadas para su uso posterior.

60 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es abordar los desafíos en los métodos de criopreservación para mejorar la capacidad de almacenamiento prolongado de células madre después de la congelación, y mejorar la estabilidad de las células madre de calidad clínico durante y después de la congelación sin comprometer la viabilidad, identidad y multipotencialidad.

Sumario de la invención

65 El solicitante ha encontrado sorprendentemente que las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenidas a partir de levadura son particularmente eficaces (en comparación, por ejemplo, con la albúmina de suero obtenida a partir de plasma) para proteger las células de los efectos posteriores del choque fisiológico. Es decir, se

ha encontrado que las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenidas a partir de levadura, tal como los productos AlbiX®, Recombumin® Alpha y Recombumin® Prime disponibles en Albumedix Ltd., son particularmente eficaces, comparados por ejemplo con otras formas de preparación de albúmina tal como preparaciones de albúmina de suero obtenidas a partir de plasma, para proteger las células (tal como células madre) del movimiento de un estado apoptótico temprano a tardío después de un choque fisiológico, tal como las etapas de congelación/descongelación usadas en la criopreservación.

Por consiguiente, el solicitante ha demostrado que las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenidas a partir de levadura, tal como los productos AlbiX®, Recombumin® Alpha y Recombumin® Prime disponibles en Albumedix Ltd., son componentes particularmente eficaces en medios de criopreservación y/o medios de almacenamiento con el fin de extender básicamente el periodo de viabilidad de las células madre que se han sometido a etapas de congelación/descongelación usadas en criopreservación, y a continuación almacenadas antes de su uso. La extensión del periodo de tiempo en el que las células madre previamente criopreservadas se pueden mantener almacenadas después de la descongelación, y se pueden mantener en un estado viable, proporciona una mejora importante y una mayor flexibilidad.

Específicamente, al aumentar la estabilidad después de la congelación, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura pueden resolver desafíos de almacenamiento y transporte y añadir flexibilidad a los profesionales médicos clínicos y pacientes en el uso de terapias con células madre.

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona un método para la preservación de células madre, comprendiendo el método las etapas de combinar las células madre con un medio de criopreservación para producir una mezcla, y congelar la mezcla para producir un producto de células madre congelado,

opcionalmente, en el que el método además comprende las etapas de descongelar el producto de células madre congelado, transferir las células descongeladas a un medio de almacenamiento, y almacenar las células madre en el medio de almacenamiento, en el que el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

El primer aspecto de la presente invención también proporciona un método para la preservación de células madre, comprendiendo el método almacenar células madre en un medio de almacenamiento,

en el que las células madre se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento antes de su almacenamiento; y

en el que el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

Preferentemente, el método del primer aspecto de la presente invención comprende las etapas de congelar células madre en el medio de criopreservación para producir un producto de células madre congelado, descongelar el producto de células madre congelado, transferir las células descongeladas al medio de almacenamiento, y almacenar las células madre en el medio de almacenamiento, en el que el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

Puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, cuando se mezcla con las células madre, en una cantidad adecuada para proporcionar una concentración de la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que es superior a aproximadamente un 0,01 % (p/v) e inferior a un 10 % (p/v), inferior a aproximadamente un 9 % (p/v), menos de aproximadamente un 8 % (p/v), inferior a aproximadamente un 7 % (p/v) o inferior a aproximadamente un 6 % (p/v), tal como a una concentración de aproximadamente un 0,1 % (p/v) a aproximadamente un 5 % (p/v), preferentemente a aproximadamente un 1 % (p/v), aproximadamente un 2 % (p/v), aproximadamente un 3 % (p/v) o aproximadamente un 4 % (p/v). El término "aproximadamente" en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 50\%$, 40% , 30% , 20% , 10% , 5% , 4% , 3% , 2% o un 1% del valor indicado; por ejemplo, un 10% (p/v) $\pm 10\%$ del valor indicado es de un 9% a un 11% (p/v).

La preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura preferentemente puede estar presente en el medio de criopreservación y también está presente en el medio de almacenamiento.

Opcionalmente, en una realización preferente del primer aspecto de la presente invención, las células madre se almacenan en el medio de almacenamiento a una temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$, tal como aproximadamente 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 7°C o 8°C . El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 0,9$, $0,8$, $0,7$, $0,6$, $0,5$, $0,4$, $0,3$, $0,2$, o $0,1^{\circ}\text{C}$.

Por ejemplo, las células madre se pueden almacenar en el medio de almacenamiento durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente

72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días); y opcionalmente, las células madre se almacenan a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas, o más, y en el que la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más, tal como aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior. El término "aproximadamente" como se usa en el contexto de periodos de tiempo, puede incluir el significado de $\pm$ 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor indicado. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

Preferentemente, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento exhibe una o más de las siguientes propiedades:

(a) menos de un 0,5 % (p/p) se une a la Concanavalina A, preferentemente menos de un 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o un 0,15 %; y/o

(b) un nivel de glicación de menos de un 0,6 moles de hexosa / mol de proteína, y preferentemente menos de 0,10, 0,075 o 0,05 moles de hexosa / mol de proteína.

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usada de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención:

(a) puede ser al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99,5 % monomérica y dimérica, de forma preferente básicamente un 100 % monomérica y dimérica (como se usa en este contexto, el término "aproximadamente", puede incluir el significado de $\pm$ 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,3 %, 0,1 % o inferior);

(b) puede ser al menos aproximadamente un 93 %, 94 %, 95 %, 96 % o un 97 % monomérica (como se usa en este contexto, el término "aproximadamente", puede incluir el significado de $\pm$ 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,3 %, 0,1 % o inferior); y/o

(c) puede tener un contenido de polímero de albúmina no superior, y preferentemente inferior, a aproximadamente un 1,0 % (p/p) 0,1 % (p/p) o un 0,01 % (p/p). Como se usa en este contexto, el término "aproximadamente", puede incluir el significado de $\pm$ 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,3 %, 0,1 % o inferior del valor indicado; por ejemplo, un 1,0 % (p/v) $\pm$ 50 % es el intervalo de un 0,5 a un 1,5 % (p/v). Como se usa en este contexto, el término "polímero" como se aplica a la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura es distinto de las formas monomérica y dimérica.

Opcionalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, puede comprender, consistir básicamente en, o consistir en, proteína de albúmina de suero obtenida a partir de levadura, cationes (tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, preferentemente sodio) y aniones de equilibrio (tal como cloruro, fosfato, sulfato, citrato o acetato, preferentemente cloruro o fosfato), agua, y opcionalmente octanoato y polisorbato 80.

Opcionalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, puede comprender octanoato a menos de 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 18 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 12 mM, 10 mM, 8 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de octanoato, o está libre de octanoato.

Además opcionalmente, el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende octanoato a menos de 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 18 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 12 mM, 10 mM, 8 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de octanoato, o está libre de octanoato.

Opcionalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, puede tener un contenido total de ácidos grasos inferior o igual a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, está básicamente libre de ácidos grasos, o está libre de ácidos grasos.

Además opcionalmente, el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, tiene un contenido total de ácidos grasos inferior o igual a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, está básicamente libre de ácidos grasos, o está libre de ácidos grasos.

Opcionalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, puede comprender detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80) a una concentración inferior a 200 mg.l⁻¹, 150 mg.l⁻¹, 100 mg.l⁻¹, 90 mg.l⁻¹, 80 mg.l⁻¹, 70 mg.l⁻¹, 60 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹, 40 mg.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹, 20 mg.l⁻¹, 15 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹, 4 mg.l⁻¹, 3 mg.l⁻¹, 2 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹, 0,5 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 0,01 mg.l⁻¹, 0,001 mg.l⁻¹, está básicamente libre del detergente, o está libre del detergente.

Además opcionalmente, el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80) a una concentración inferior a 200 mg.l⁻¹, 150 mg.l⁻¹, 100 mg.l⁻¹, 90 mg.l⁻¹, 80 mg.l⁻¹, 70 mg.l⁻¹, 60 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹, 40 mg.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹, 20 mg.l⁻¹, 15 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹, 4 mg.l⁻¹, 3 mg.l⁻¹, 2 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹, 0,5 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 0,01 mg.l⁻¹, 0,001 mg.l⁻¹, está básicamente libre de detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80), o está libre del detergente (preferentemente está libre de polisorbato 80).

Opcionalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, puede comprender un nivel de aminoácido libre total y/o niveles de N-acetil triptófano inferiores a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de aminoácidos y/o N-acetil triptófano en particular, o está libre de aminoácidos y/o de N-acetil triptófano en particular.

Además opcionalmente, el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende un nivel total de aminoácidos libres y/o niveles de N-acetil triptófano inferiores a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de aminoácidos y/o N-acetil triptófano en particular, o está libre de aminoácidos y/o de N-acetil triptófano en particular.

En una realización preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, puede estar básicamente libre de, o completamente libre de, todos de octanoato, aminoácidos libres y/o N-acetil triptófano en particular, y detergente (tal como polisorbato 80).

Además en una realización preferente, el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, está básicamente libre de, o completamente libre de, todos de octanoato, aminoácidos libres y/o N-acetil triptófano en particular, y detergente (tal como polisorbato 80).

Además en una realización preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se puede seleccionar entre: Recombumin® Prime, o una preparación que es similar a esta; Recombumin® Alpha, o una preparación que es similar a esta; o AlbiX®, o una preparación que es similar a esta.

Generalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, está libre de uno o más, o todos, componentes seleccionados entre: hemo, activador de precalicreína, pirógenos, hepatitis C y/o virus humanos. Además, habitualmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, tiene una concentración de aluminio inferior a 200 µg.l⁻¹, tal como inferior a 180 µg.l⁻¹, 160 µg.l⁻¹, 140 µg.l⁻¹, 120 µg.l⁻¹, 100 µg.l⁻¹, 90 µg.l⁻¹, 80 µg.l⁻¹, 70 µg.l⁻¹, 60 µg.l⁻¹, 50 µg.l⁻¹, o 40 µg.l⁻¹, más habitualmente dentro del intervalo de aproximadamente 10 µg.l⁻¹ a aproximadamente un 30 µg.l⁻¹. Como se usa en este contexto, el término "aproximadamente", puede incluir el significado de $\pm$ 10 µg.l⁻¹, 5 µg.l⁻¹, 4 µg.l⁻¹, 3 µg.l⁻¹, 2 µg.l⁻¹, 1 µg.l⁻¹, 0,5 µg.l⁻¹, 0,1 µg.l⁻¹ o inferior del valor indicado.

Además habitualmente, el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, y que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, está libre de uno o más, o todos, componentes seleccionados entre: hemo, activador de precalicreína, pirógenos, hepatitis C y/o virus humanos). El medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento puede tener además o como alternativa una concentración de aluminio inferior a 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$, tal como inferior a 180 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 160 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 140 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 120 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 90 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 80 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 70 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 60 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$, o 40 $\mu\text{g.l}^{-1}$, más habitualmente dentro del intervalo de aproximadamente 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a aproximadamente un 30 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Como se usa en este contexto, el término "aproximadamente", puede incluir el significado de $\pm$ 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 4 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 3 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 0,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ o inferior del valor indicado.

Además habitualmente, el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto (o cualquier otro aspecto de la presente invención) de la presente invención, y que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, está libre de, o básicamente libre de, sustratos energéticos seleccionados entre un grupo que comprende Trehalosa, Hidroxietil Almidón, o una combinación de los mismos y/o está libre de, o básicamente libre de, un agente antienviejecimiento, que puede ser una combinación de L-Glutamina, Poli-L-Lisina y Ectoína. En este contexto, "básicamente libre" de un sustrato energético incluye el significado de inferior a aproximadamente un 0,25 % en v/v, tal como menos de un 0,1 % en v/v, menos de un 0,01 % en v/v, menos de un 0,001 % en v/v, menos de un 0,001 % en v/v, o un 0 % en v/v. "Básicamente libre" de un agente antienviejecimiento incluye el significado de inferior a aproximadamente un 0,0005 % en v/v, tal como menos de un 5×10^{-5} % en v/v, menos de un 5×10^{-6} % en v/v, menos de un 5×10^{-7} % en v/v, o un 0 % en v/v.

Generalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, tiene una secuencia N-terminal intacta o básicamente intacta.

Generalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprende proteína de albúmina que tiene un contenido de grupo tiol libre que es superior a aproximadamente un 62 %, tal como al menos aproximadamente un 69 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %. Como se usa en este contexto, el término "aproximadamente", puede incluir el significado de $\pm$ 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o inferior del valor indicado; por ejemplo, un 80 % $\pm$ 10 % se refiere al intervalo de un 72 a un 88 %.

Generalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), presenta un perfil de SEC que excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 minutos y superior a 19 minutos, y más preferentemente excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 o 15 minutos y superior a 18 minutos.

Generalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), presenta un pico principal único, que corresponde a la albúmina en la forma monomérica nativa.

Generalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de masas, es un producto que presenta menos de aproximadamente 13, aproximadamente 12, aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 11, de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 5, de 1 a aproximadamente 4, de 1 a aproximadamente 3, de 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1 o menos de 1 restos de lisina y/o arginina modificados con hexosa por proteína. Como se usa en este contexto, el término "aproximadamente", puede incluir el significado de $\pm$ 5, 4, 3, 2 o 1 restos de lisina y/o arginina modificados con hexosa por proteína.

Generalmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, comprende proteína de albúmina que no está glicada con azúcares específicos de plantas, tal como α -1,3-fucosa y/o β -1,2-xilosa.

Para evitar las dudas, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto (y todos los otros aspectos) de la presente invención, y los medios, tal como medios de criopreservación y/o los medios de almacenamiento, producidos mediante la misma, estará básicamente libre de, o no contendrá, hidrolizado de proteína de plantas.

La expresión "hidrolizado de proteína de plantas" se refiere a una sustancia que contiene aminoácidos o/y péptidos, en el que una sustancia que contiene aminoácidos o/y péptidos se preparan mediante hidrólisis de proteínas de plantas. Los hidrolizados de proteína de plantas se pueden preparar mediante hidrólisis de proteínas de plantas usando una enzima en particular, etc., pero no se limitan a esto. Los ejemplos de los mismos pueden ser hidrolizados de tabaco, arroz, o judía. Los hidrolizados de proteína de plantas puede ser el producto de la hidrólisis directa de proteínas de plantas usando una enzima, etc., o hidrolizados de proteína de plantas disponibles en el mercado. Un ejemplo más son las proteínas de judía hidrolizada, y ULTRAPEP SOY o ULTRAPEP YE fabricados por Sheffield.

La expresión "básicamente libre de" en este contexto se refiere a que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con el primer aspecto (y todos los otros aspectos) de la presente invención, y los medios, tal como medios de criopreservación y/o los medios de almacenamiento, producidos por los mismos, contienen hidrolizado de proteína de plantas o componentes de los mismos a un nivel que es inferior a 1 parte en peso con respecto a 50 partes en peso, preferentemente menos de un 1 parte en peso con respecto a 100 partes en peso, más preferentemente menos de 1 parte en peso con respecto a 1000 partes en peso, basándose en 100 partes en peso de la composición total, y lo más habitualmente un hidrolizado de proteína de plantas nulo.

Los hidrolizados de proteína de plantas incluyen aminoácidos esenciales y/o aminoácidos no esenciales que se pueden usar como fuente de energía básica de las células, proporcionando de ese modo nutrientes para las células, aumentando su actividad al congelarse y descongelarse. Sin quedar relacionado con la teoría, el solicitante cree que la ausencia de componentes de ese tipo en los medios de criopreservación y medios de almacenamiento para su uso en la presente invención contribuye a la capacidad de la presente invención para mantener la viabilidad de las células madre después de la descongelación, ya que retiene las células en forma inmóvil durante su almacenamiento y reduce la capacidad de las células para progresar hacia la apoptosis en la etapa tardía. Además, se considera probable que la alta pureza de la proteína de albúmina en la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de productos de levadura usada en la presente invención (en comparación con la pureza menor encontrada en las preparaciones de albúmina de otras fuentes) es un factor contribuyente a la protección de las células madre frente al 'ruido' de señalización creado por factores presentes en preparaciones menos puras, y que esto además puede contribuir a minimizar los cambios en las células durante su almacenamiento.

Opcionalmente, el medio de criopreservación para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención comprende una preparación de albúmina de suero recombinante y un criopreservante separado. Además opcionalmente, el medio de criopreservación comprende, consiste básicamente en, o consiste en una solución acuosa de la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, un criopreservante, y un tampón iónico. Preferentemente el tampón iónico comprende, consiste básicamente en, o consiste en, una solución acuosa de electrolitos, por ejemplo en la que los electrolitos se seleccionan entre el grupo que consiste en iones sodio, iones potasio, iones magnesio, iones cloruro, iones acetato, iones fosfato, y/o iones gluconato, y más preferentemente, en el que el tampón iónico posee concentraciones de electrolitos, osmolalidad y/o pH que imita la del plasma fisiológico humano. Por ejemplo, el tampón iónico puede ser una solución isotónica estéril no pirogénica que contiene, por 100 ml, aproximadamente 526 mg de cloruro sódico, USP (NaCl); aproximadamente 502 mg de gluconato sódico ($C_6H_{11}NaO_7$); aproximadamente 368 mg de trihidrato de acetato sódico, USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); aproximadamente 37 mg de cloruro potásico, USP (KCl); y aproximadamente 30 mg de cloruro de magnesio, USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), tal como un tampón isotónico que es sustancialmente equivalente a Plasmalyte®. Lo más preferentemente el tampón iónico es básicamente isotónico para las células madre y/o el tampón iónico es Plasmalyte®.

Para evitar las dudas, se debe indicar que el medio de criopreservación para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre. Preferentemente no favorece el crecimiento de células madre. Por ejemplo, el crecimiento celular observado en condiciones de cultivo convencionales podría ser habitualmente menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o un 0 % del observado para las mismas células, en las mismas condiciones, cuando se cultivan en un medio de crecimiento de cultivo de células madre convencional tal como DMEM.

Más preferentemente el medio de criopreservación para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más (tal como todos) de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual tal como vitaminas, hormonas factores de crecimiento, fuentes de hierro, aminoácidos libres y/o glucosa.

Como se usa en el presente documento, "vitaminas" puede incluir uno o más de cloruro de colina, ácido fólico,

miinositol, niacinamida, ácido d-pantoténico (hemicalcio), piridoxal, piridoxina, riboflavina y/o tiamina.

Como se usa en el presente documento, "hormonas" puede incluir uno o más de triyodotironina, parathormona, hormona liberadora de tirotrófina, somatomedina, estrógenos, prolactina, hormona de crecimiento, testosterona, y/o hidrocortisona.

Como se usa en el presente documento, "fuentes de hierro" puede incluir transferrina.

Como se usa en el presente documento, "factores de crecimiento" puede incluir uno o más de adrenomedulina (AM); angiopoyetina (Ang); factor de motilidad autocrina; proteínas morfogenéticas óseas (BMP); uno o más miembros de la familia del factor neurotrófico ciliar (que incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF) y/o interleuquina-6 (IL-6)); uno o más factores estimuladores de colonias (que incluyen, pero no se limitan a, factor estimulador de colonias de macrófagos (m-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y/o factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)); factor de crecimiento epidérmico (EGF); una o más efrinas (que incluyen, pero no se limitan a, Efrina A1, Efrina A2, Efrina A3, Efrina A4, Efrina A5, Efrina B1, Efrina B2, Efrina B3); eritropoyetina (EPO); factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); somatotrofina bovina fetal (FBS); una o más familias de ligandos GDNF (que incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico obtenido a partir de la línea de células gliales (GDNF), neuriturina, persefina Ibarra o artemina); factor 9 de diferenciación de crecimiento (GDF9); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); factor de crecimiento obtenido a partir de hepatoma (HDGF); insulina; uno o más factores de crecimiento similares a la insulina (que incluyen, pero no se limitan a, factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), y/o factor 2 de crecimiento similar a la insulina (IGF-2)); una o más interleuquinas (que incluyen, pero no se limitan a, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 y/o IL-7); factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); factor estimulante de la migración (MSF); proteína estimuladora de macrófagos (MSP); miostatina (GDF-8); una o más neurregulinas (que incluyen, pero no se limitan a, neurregulina 1 (NRG1), neurregulina 2 (NRG2), neurregulina 3 (NRG3), y/o neurregulina 4 (NRG4)); una o más neurotrofinas (que incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico obtenido a partir del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF); neurotrofina-3 (NT-3) y/o neurotrofina-4 (NT-4)); factor de crecimiento placentario (PGF); factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGF); renalasa (RNLS); factor de crecimiento de linfocitos T (TCGF); trombopoyetina (TPO); uno o más factores de crecimiento transformantes (que incluyen, pero no se limitan a, factor alfa de crecimiento transformante (TGF- α) y/o factor beta de crecimiento transformante (TGF- β)); factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y/o ruta de señalización de Wnt.

Como se usa en el presente documento, "aminoácidos libres" puede incluir uno o más de L-arginina, L-cistina, glicina, L-histidina, L-isoileucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, y/o L-valina.

El criopreservante usado en el medio de criopreservación es distinto de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y se puede seleccionar, por ejemplo, entre el grupo que consiste en dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, polietilenglicol (PEG), etilenglicol (EG), polivinilpirrolidona (PVP), y Trehalosa. El DMSO puede ser particularmente preferente. El criopreservante puede estar presente en el medio de criopreservación, cuando se mezcla con las células madre, a una concentración adecuada para proporcionar un efecto criopreservante. En el caso de DMSO, esta puede ser de aproximadamente un 10 % (p/v) $\pm$ 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o un 1 %. La persona con experiencia puede determinar fácilmente una cantidad adecuada de criopreservante usando ensayo de rutina.

De acuerdo con un método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el medio de almacenamiento puede comprender la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y opcionalmente, el medio de almacenamiento puede comprender, consistir básicamente en, o consistir en una solución acuosa de la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y un tampón iónico, preferentemente en el que el tampón iónico comprende, consiste básicamente en, o consiste en, una solución acuosa de electrolitos, por ejemplo en el que los electrolitos se seleccionan entre el grupo que consiste en iones sodio, iones potasio, iones magnesio, iones cloruro, iones acetato, iones fosfato, y/o iones gluconato, y más preferentemente, en el que el tampón iónico posee concentraciones de electrolitos, osmolalidad y/o pH que imita la del plasma fisiológico humano. Por ejemplo, el tampón iónico puede ser una solución isotónica estéril no pirogénica que contiene, por 100 ml, aproximadamente 526 mg de cloruro sódico, USP (NaCl); aproximadamente 502 mg de gluconato sódico (C₆H₁₁NaO₇); aproximadamente 368 mg de trihidrato de acetato sódico, USP (C₂H₃NaO₂·3H₂O); aproximadamente 37 mg de cloruro potásico, USP (KCl); y aproximadamente 30 mg de cloruro de magnesio, USP (MgCl₂·6H₂O), tal como un tampón isotónico que es sustancialmente equivalente a Plasmalyte®. Lo más preferentemente el tampón iónico es básicamente isotónico para las células madre y/o el tampón iónico es Plasmalyte®.

Para evitar las dudas, se debe indicar que el medio de almacenamiento para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre. Preferentemente no favorece el crecimiento de células madre. Por ejemplo, el crecimiento celular observado en condiciones de cultivo convencionales podría ser habitualmente inferior a la un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o un 0 % del observado para las mismas células, en las mismas condiciones, cuando se cultivan en un medio de crecimiento de cultivo de células madre convencional tal como DMEM.

Más preferentemente el medio de almacenamiento para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más (tal como todos) de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual tal como vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, fuentes de hierro, aminoácidos libres y/o glucosa. Como se usan en el presente documento, los términos "vitaminas", "hormonas", "fuentes de hierro", "factores de crecimiento", "aminoácidos libres" pueden ser como se han definido además anteriormente.

Es particularmente preferente que el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento usado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención individualmente o ambos no comprendan uno o más componentes de una preparación de albúmina obtenida a partir de suero, por ejemplo uno o más componentes (tal como todos) seleccionados entre el listado que consiste en: hemo, activador de precalicreína, pirógenos, hepatitis C virus humanos y/o N-acetil triptófano, y de preferencia está básicamente libre de, o completamente libre de, octanoato y/o detergente (tal como polisorbato 80).

El método del primer aspecto de la presente invención puede comprender almacenar células madre en el medio de almacenamiento, opcionalmente a una temperatura de 2-8 °C (por ejemplo, a aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C, en el que el término "aproximadamente" puede incluir el significado de $\pm 0,9$, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C), y además opcionalmente durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días), y opcionalmente en el que, directa o indirectamente después de la etapa de almacenar células madre en el medio de almacenamiento, el método además comprende una o más etapas, seleccionadas entre las etapas de:

- cultivo de las células madre;
- expansión de un cultivo de las células madre;
- diferenciación de las células madre;
- inmovilización de las células madre, o células cultivadas y/o diferenciadas obtenidas a partir de las mismas, por ejemplo en un tejido o un implante médico;
- formulación de células madre, o células cultivadas y/o diferenciadas u otros productos obtenidos a partir de las mismas, en una composición farmacéuticamente aceptable o composición veterinariamente aceptable; y/o
- administración de las células madre, o células cultivadas y/o diferenciadas u otros productos obtenidos a partir de las mismas, a un paciente.

Opcionalmente, un método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención comprende almacenar células madre en el medio de almacenamiento, y después del almacenamiento, las células madre se diferencian, por ejemplo en un tipo celular seleccionado entre osteocitos, cardiocitos, células beta pancreáticas, neuronas, fibroblastos, cardiomiocitos, osteoblastos y/o condrocitos.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un medio de criopreservación para la criopreservación de células madre, en el que el medio de criopreservación comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y un criopreservante. El criopreservante se puede seleccionar, por ejemplo, entre el grupo que consiste en dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, polietilenglicol (PEG), etilenglicol (EG), polivinilpirrolidona (PVP), y Trehalosa. Preferentemente, el medio de criopreservación comprende, consiste básicamente en, o consiste en una solución acuosa de la preparación de albúmina de suero recombinante, el criopreservante, y un tampón iónico. Preferentemente el tampón iónico comprende, consiste básicamente en, o consiste en, una solución acuosa de electrolitos, por ejemplo en el que los electrolitos se seleccionan entre el grupo que consiste en iones sodio, iones potasio, iones magnesio, iones cloruro, iones acetato, iones fosfato, y/o iones gluconato, y más preferentemente, en el que el tampón iónico posee concentraciones de electrolitos, osmolaridad y/o pH que imita la del plasma fisiológico humano. Por ejemplo, el tampón iónico puede ser una solución isotónica estéril no pirogénica que contiene, por 100 ml, aproximadamente 526 mg de cloruro sódico, USP (NaCl); aproximadamente 502 mg de gluconato sódico ($C_6H_{11}NaO_7$); aproximadamente 368 mg de trihidrato de acetato sódico, USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); aproximadamente 37 mg de cloruro potásico, USP (KCl); y aproximadamente 30 mg de cloruro de magnesio, USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), tal como un tampón isotónico que es sustancialmente equivalente a Plasmalyte®. Lo más preferentemente el tampón iónico es básicamente isotónico para las células madre y/o el tampón iónico es Plasmalyte®.

Para evitar las dudas, se debe indicar que el medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre. Preferentemente no favorece el crecimiento de células madre. Por ejemplo, el crecimiento celular observado en el medio de criopreservación en condiciones de crecimiento convencionales podría ser habitualmente inferior a un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o un 0 % del observado para las mismas células, en las mismas condiciones, cuando se cultivan en un medio de crecimiento de cultivo de células madre convencional tal como DMEM.

Más preferentemente el medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención incluye

básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más (tal como todos) de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual tal como vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, fuentes de hierro, aminoácidos libres y/o glucosa. Como se usan en el presente documento, los términos "vitaminas", "hormonas", "fuentes de hierro", "factores de crecimiento", "aminoácidos libres" pueden ser como se han definido además anteriormente.

El medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención además puede comprender células madre, y opcionalmente las células madre se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en células madre pluripotentes (tal como células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre pluripotentes inducidas), células madre multipotentes (tal como células madre adultas, por ejemplo, células madre mesenquimales que opcionalmente se pueden obtener a partir de grasa, médula ósea, sangre del cordón umbilical, o cordón umbilical; células madre hematopoyéticas, que opcionalmente se pueden obtener a partir de médula ósea o sangre periférica; células madre neuronales; o células madre germinales) o células madre unipotentes (tal como células madre comprometidas para hepatocitos).

Opcionalmente, el medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención, que puede comprender células madre, está en una forma congelada, por ejemplo, en una forma que está por debajo de 0 °C, y más preferentemente en una forma que está entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -196 °C. Como se usa en este contexto, el término "aproximadamente" puede incluir $\pm 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1$ °C. De acuerdo con esta realización, cualquier célula madre presente en la composición congelada está preferentemente en un estado de animación suspendida. El medio de criopreservación que comprende las células madre, en una forma congelada, se puede mantener en una forma congelada durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años o superior.

Alternativamente, el medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención no está en una forma congelada, pero puede comprender una población de células madre que se ha congelado y a continuación descongelado. Las poblaciones de células madre que se han congelado y descongelado se pueden distinguir de las poblaciones de células madre que no han pasado por el proceso de congelación/descongelación. La congelación provoca estrés a la célula e iniciará habitualmente la muerte celular programada (apoptosis). Los datos en los presentes ejemplos muestran cómo las etapas de apoptosis pueden ir seguidas por marcadores específicos, tal como unión a anexina V, e inclusión de PI y/o 7AAD, como se discute en el presente documento. Las poblaciones de células madre que se han congelado y descongelado se pueden distinguir, por ejemplo, de las poblaciones de células madre que no han pasado por el proceso de congelación/descongelación midiendo el nivel de apoptosis en etapas tempranas y tardías dentro de la población celular. Todas las poblaciones celulares tendrán un porcentaje de células en etapa apoptótica, pero después de congelar y descongelar el nivel aumenta, en particular cuando se almacenan en una solución de almacenamiento como se describe en el presente documento a 2-8 °C durante un periodo superior a 24 horas. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$, o 0,1 °C.

Un medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención tendrá preferentemente una o más (tal como todas) las características que se han descrito anteriormente para medios de criopreservación usados con respecto al primer aspecto de la presente invención.

Preferentemente, una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en el medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención, cuando se mezcla con las células madre, en una cantidad adecuada para proporcionar una concentración de la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que es superior a aproximadamente un 0,01 % (p/v) e inferior a un 10 % (p/v), inferior a aproximadamente un 9 % (p/v), inferior a aproximadamente un 8 % (p/v), inferior a aproximadamente un 7 % (p/v) o inferior a aproximadamente un 6 % (p/v), tal como a una concentración de aproximadamente un 0,1 % (p/v) a aproximadamente un 5 % (p/v), preferentemente a aproximadamente un 1 % (p/v), aproximadamente un 2 % (p/v), aproximadamente un 3 % (p/v) o aproximadamente un 4 % (p/v). El término "aproximadamente" en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 50 \%, 40 \%, 30 \%, 20 \%, 10 \%, 5 \%, 4 \%, 3 \%, 2 \%$ o un 1 % del valor indicado; por ejemplo, un 0,1 % (p/v) $\pm 10 \%$ del valor indicado es de un 0,9 a un 0,11 % (p/v).

Preferentemente, el medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención, comprende proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que exhibe una o más de las siguientes propiedades:

- (a) menos de un 0,5 % (p/p) se une a la Concanavalina A, preferentemente menos de un 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o un 0,15 %; y/o
- (b) un nivel de glicación de menos de 0,6 moles de hexosa / mol de proteína, y preferentemente menos de 0,10, 0,075 o 0,05 moles de hexosa / mol de proteína.

Preferentemente, el medio de criopreservación del segundo aspecto de la presente invención, comprende proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que:

(a) es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99,5 % monomérica y dimérica, de forma preferente básicamente un 100 % monomérica y dimérica;
 (b) es al menos aproximadamente un 93 %, 94 %, 95 %, 96 % o un 97 % monomérica; y/o
 (c) tiene un contenido del polímero de albúmina no superior, y preferentemente inferior, a aproximadamente un 1,0 % (p/p), 0,1 % (p/p) o un 0,01 % (p/p). Como se usa en este contexto, el término "polímero" como se aplica a la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura es distinto de las formas monomérica y dimérica.

Preferentemente, de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención:

(a) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación comprende, consiste básicamente en, o consiste en, proteína de albúmina de suero obtenida a partir de levadura, cationes (tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, preferentemente sodio) y aniones de equilibrio (tal como cloruro, fosfato, sulfato, citrato o acetato, preferentemente cloruro o fosfato), agua, y opcionalmente octanoato y polisorbato 80;

(b) el medio de criopreservación que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende octanoato a menos de 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 18 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 12 mM, 10 mM, 8 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de octanoato, o está libre de octanoato;

(c) el medio de criopreservación que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más incluyendo opcionalmente células madre, tiene un contenido total de ácidos grasos inferior o igual a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, está básicamente libre de ácidos grasos, o está libre de ácidos grasos;

(d) el medio de criopreservación que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80) a una concentración inferior a 200 mg.l⁻¹, 150 mg.l⁻¹, 100 mg.l⁻¹, 90 mg.l⁻¹, 80 mg.l⁻¹, 70 mg.l⁻¹, 60 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹, 40 mg.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹, 20 mg.l⁻¹, 15 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹, 4 mg.l⁻¹, 3 mg.l⁻¹, 2 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹, 0,5 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 0,01 mg.l⁻¹, 0,001 mg.l⁻¹, está básicamente libre de detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80), o está libre del detergente (preferentemente está libre de polisorbato 80);

(e) el medio de criopreservación que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende niveles totales de aminoácidos libres y/o niveles de N-acetil triptófano inferiores a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de aminoácidos y/o N-acetil triptófano en particular, o está libre de aminoácidos y/o de N-acetil triptófano en particular;

(f) el medio de criopreservación que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, está básicamente libre de, o completamente libre de, todos de octanoato, aminoácidos libres y/o N-acetil triptófano en particular, y detergente (tal como polisorbato 80);

(g) la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación es una preparación seleccionada entre: Recombumin® Prime, o una preparación que es similar a esta; Recombumin® Alpha, o una preparación que es similar a esta; o AlbiX®, o una preparación que es similar a esta;

(h) el medio de criopreservación que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, está libre de uno o más, o todos, componentes seleccionados entre: hemo, activador de precalicreína, pirógenos, hepatitis C y/o virus humanos) y/o tiene una concentración de aluminio inferior a 200 µg.l⁻¹, tal como inferior a 180 µg.l⁻¹, 160 µg.l⁻¹, 140 µg.l⁻¹, 120 µg.l⁻¹, 100 µg.l⁻¹, 90 µg.l⁻¹, 80 µg.l⁻¹, 70 µg.l⁻¹, 60 µg.l⁻¹, 50 µg.l⁻¹, o 40 µg.l⁻¹, más habitualmente dentro del intervalo de aproximadamente 10 µg.l⁻¹ a aproximadamente 30 µg.l⁻¹;

(i) la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación tiene una secuencia N-terminal intacta o básicamente intacta;

(j) la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación comprende proteína de albúmina que tiene un contenido de grupo tiol libre que es superior a un 62 %, tal como al menos un 69 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %;

(k) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), presenta un perfil de SEC que excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 minutos y superior a 19 minutos, y más preferentemente excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 o 15 minutos y superior a 18 minutos;

(l) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), presenta un pico principal único, que corresponde a la

albúmina en la forma monomérica nativa;

(m) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de masas, es un producto que presenta menos de 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, tal como de aproximadamente 1 a 11, de 1 a 8, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, 1 o menos de 1, restos de lisina y/o arginina modificados con hexosa por proteína; y/o

(n) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación comprende proteína de albúmina que no está glicada con azúcares específicos de plantas, tal como α -1,3-fucosa y/o β -1,2-xilosa.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona un medio de almacenamiento para el almacenamiento de células madre que se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento, en el que el medio de almacenamiento comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura. Preferentemente, el medio de almacenamiento comprende, consiste básicamente en, o consiste en una solución acuosa de la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y un tampón iónico. El tampón iónico comprende, consiste básicamente en, o consiste en, una solución acuosa de electrolitos, por ejemplo en el que los electrolitos se seleccionan entre el grupo que consiste en iones sodio, iones potasio, iones magnesio, iones cloruro, iones acetato, iones fosfato, y/o iones gluconato, y preferentemente, en el que el tampón iónico posee concentraciones de electrolitos, osmolalidad y/o pH que imita la del plasma fisiológico humano. Por ejemplo, el tampón iónico puede ser una solución isotónica estéril no pirogénica que contiene, por 100 ml, aproximadamente 526 mg de cloruro sódico, USP (NaCl); aproximadamente 502 mg de gluconato sódico ($C_6H_{11}NaO_7$); aproximadamente 368 mg de trihidrato de acetato sódico, USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); aproximadamente 37 mg de cloruro potásico, USP (KCl); y aproximadamente 30 mg de cloruro de magnesio, USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), tal como un tampón isotónico que es sustancialmente equivalente a Plasmalyte®. Lo más preferentemente el tampón iónico es básicamente isotónico para las células madre y/o el tampón iónico es Plasmalyte®.

Para evitar las dudas, se debe indicar que el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre. Preferentemente no favorece el crecimiento de células madre. Por ejemplo, el crecimiento celular observado en el medio de almacenamiento en condiciones de crecimiento convencionales podría ser habitualmente inferior a un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o un 0 % del observado para las mismas células, en las mismas condiciones, cuando se cultivan en un medio de crecimiento de cultivo de células madre convencional tal como DMEM.

Más preferentemente el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más (tal como todos) de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual tal como vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, fuentes de hierro, aminoácidos libres y/o glucosa. Como se usan en el presente documento, los términos "vitaminas", "hormonas", "fuentes de hierro", "factores de crecimiento", "aminoácidos libres" pueden ser como se han definido además anteriormente.

Un medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención tendrá preferentemente una o más (tal como todas) las características que se han descrito anteriormente para medios de almacenamiento usados con respecto al primer aspecto de la presente invención.

Preferentemente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención, cuando se mezcla con las células madre, en una cantidad adecuada para proporcionar una concentración de la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que es superior a aproximadamente un 0,01 % (p/v) e inferior a un 10 % (p/v), inferior a aproximadamente un 9 % (p/v), inferior a aproximadamente un 8 % (p/v), inferior a aproximadamente un 7 % (p/v) o inferior a aproximadamente un 6 % (p/v), tal como a una concentración de aproximadamente un 0,1 % (p/v) a aproximadamente un 5 % (p/v), preferentemente a aproximadamente un 1 % (p/v), aproximadamente un 2 % (p/v), aproximadamente un 3 % (p/v) o aproximadamente un 4 % (p/v).

Generalmente, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención exhibe una o más de las siguientes propiedades:

(a) menos de un 0,5 % (p/p) se une a la Concanavalina A, preferentemente menos de un 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o un 0,15 %; y/o

(b) un nivel de glicación de menos de 0,6 moles de hexosa / mol de proteína, y preferentemente menos de 0,10, 0,075 o 0,05 moles de hexosa / mol de proteína.

Generalmente, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención:

(a) es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99,5 % monomérica y dimérica, de forma preferente básicamente un 100 % monomérica y dimérica;

(b) es al menos aproximadamente un 93 %, 94 %, 95 %, 96 % o un 97 % monomérica; y/o

(c) tiene un contenido del polímero de albúmina no superior, y preferentemente inferior, a aproximadamente un 1,0 % (p/p), 0,1 % (p/p) o un 0,01 % (p/p). Como se usa en este contexto, el término "polímero" como se aplica a la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura es distinto de las formas monomérica y dimérica.

Preferentemente, en el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención:

(a) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento comprende, consiste básicamente en, o consiste en, proteína de albúmina de suero obtenida a partir de levadura, cationes (tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, preferentemente sodio) y aniones de equilibrio (tal como cloruro, fosfato, sulfato, citrato o acetato, preferentemente cloruro o fosfato), agua, y opcionalmente octanoato y polisorbato 80;

(b) el medio de almacenamiento que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende octanoato a menos de 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 18 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 12 mM, 10 mM, 8 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de octanoato, o está libre de octanoato;

(c) el medio de almacenamiento que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más incluyendo opcionalmente células madre, tiene un contenido total de ácidos grasos inferior o igual a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, está básicamente libre de ácidos grasos, o está libre de ácidos grasos;

(d) el medio de almacenamiento que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80) a una concentración inferior a 200 mg.l⁻¹, 150 mg.l⁻¹, 100 mg.l⁻¹, 90 mg.l⁻¹, 80 mg.l⁻¹, 70 mg.l⁻¹, 60 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹, 40 mg.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹, 20 mg.l⁻¹, 15 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹, 4 mg.l⁻¹, 3 mg.l⁻¹, 2 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹, 0,5 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 0,01 mg.l⁻¹, 0,001 mg.l⁻¹, está básicamente libre de detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80), o está libre del detergente (preferentemente está libre de polisorbato 80);

(e) el medio de almacenamiento que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, comprende niveles totales de aminoácidos libres y/o niveles de N-acetil triptófano inferiores a 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de aminoácidos y/o N-acetil triptófano en particular, o está libre de aminoácidos y/o de N-acetil triptófano en particular;

(f) el medio de almacenamiento que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, está básicamente libre de, o completamente libre de, todos de octanoato, aminoácidos libres y/o N-acetil triptófano en particular, y detergente (tal como polisorbato 80);

(g) la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento es una preparación seleccionada entre: Recombumin® Prime, o una preparación que es similar a esta; Recombumin® Alpha, o una preparación que es similar a esta; o AlbiX®, o una preparación que es similar a esta;

(h) el medio de almacenamiento que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, incluyendo opcionalmente células madre, está libre de uno o más, o todos, componentes seleccionados entre: hemo, activador de precalicreína, pirógenos, hepatitis C y/o virus humanos) y/o tiene una concentración de aluminio inferior a 200 µg.l⁻¹, tal como inferior a 180 µg.l⁻¹, 160 µg.l⁻¹, 140 µg.l⁻¹, 120 µg.l⁻¹, 100 µg.l⁻¹, 90 µg.l⁻¹, 80 µg.l⁻¹, 70 µg.l⁻¹, 60 µg.l⁻¹, 50 µg.l⁻¹, o 40 µg.l⁻¹, más habitualmente dentro del intervalo de aproximadamente 10 µg.l⁻¹ a aproximadamente 30 µg.l⁻¹;

(i) la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento tiene una secuencia N-terminal intacta o básicamente intacta;

(j) la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento comprende proteína de albúmina que tiene un contenido de grupo tiol libre que es superior a un 62 %, tal como al menos un 69 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %;

(k) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), presenta un perfil de SEC que excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 minutos y superior a 19 minutos, y más preferentemente excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 o 15 minutos y superior a 18 minutos;

(l) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), presenta un pico principal único, que corresponde a la albúmina en la forma monomérica nativa;

(m) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de

masas, es un producto que presenta menos de 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, tal como de aproximadamente 1 a 11, de 1 a 8, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, 1 o menos de 1 restos de lisina y/o arginina modificados con hexosa por proteína; y/o

(n) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de almacenamiento comprende proteína de albúmina que no está glicada con azúcares específicos de plantas, tal como α -1,3-fucosa y/o β -1,2-xilosa.

En una realización preferente, el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención además comprende células madre. Opcionalmente, las células madre se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en células madre pluripotentes (tal como células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre pluripotentes inducidas), células madre multipotentes (tal como células madre adultas, por ejemplo, células madre mesenquimales que opcionalmente se pueden obtener a partir de grasa, médula ósea, sangre del cordón umbilical, o cordón umbilical; células madre hematopoyéticas, que opcionalmente se pueden obtener a partir de médula ósea o sangre periférica; células madre neuronales; o células madre germinales) o células madre unipotentes (tal como células madre comprometidas para hepatocitos).

Opcionalmente, el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención además comprende células madre que se han congelado en un medio de criopreservación (preferentemente, un medio de criopreservación como se define en el primer y/o segundo aspecto de la presente invención), descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento. Como se ha indicado anteriormente, las poblaciones de células madre que se han congelado y descongelado se pueden distinguir de las poblaciones de células madre que no han pasado por el proceso de congelación/descongelación. La congelación provoca estrés a la célula e iniciará habitualmente la muerte celular programada (apoptosis). Los datos en los presentes ejemplos muestran cómo las etapas de apoptosis pueden ir seguidas por marcadores específicos, tal como unión a anexina V, e inclusión de PI y/o 7AAD, como se discute en el presente documento. Las poblaciones de células madre que se han congelado y descongelado se pueden distinguir, por ejemplo, de las poblaciones de células madre que no han pasado por el proceso de congelación/descongelación midiendo el nivel de apoptosis en etapas tempranas y tardías dentro de la población celular. Todas las poblaciones celulares tendrán un porcentaje de células en etapa apoptótica, pero después de congelar y descongelar el nivel aumenta, en particular cuando se almacenan en una solución de almacenamiento como se describe en el presente documento a 2-8 °C durante un periodo superior a 24 horas. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

Opcionalmente, el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención comprende células madre que se han congelado en un medio de criopreservación del primer y/o segundo aspecto de la presente invención, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento.

Generalmente, el medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención, que además comprende células madre almacenadas en el medio de almacenamiento, se almacena en un refrigerador y/o a una temperatura de 2-8 °C. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 0,9$, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

El medio de almacenamiento del tercer aspecto de la presente invención, que además comprende células madre, opcionalmente se puede caracterizar por que las células madre se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento, y las células madre se almacenan en el medio de almacenamiento (habitualmente en un refrigerador y/o a una temperatura de 2-8 °C) durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días). Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

De acuerdo con una realización del tercer aspecto de la presente invención, el medio de almacenamiento además comprende células madre (opcionalmente células madre que se han congelado en un medio de criopreservación descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento, o sometido a otro choque fisiológico antes de ser transferidas al medio de almacenamiento), que se han almacenado en el medio de almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días), y en el que la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %. 10 %. 15 %. 20 %. 25 %. 30 %. 35 %. 40 %. 45 %. 50 %. 55 %. 60 %. 70 %.

75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más, tal como aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 0,9$, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

Por ejemplo, una viabilidad de aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más es preferente después de aproximadamente 48 horas en almacenamiento.

Una viabilidad de aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más es preferente después de aproximadamente 72 horas en almacenamiento.

La viabilidad se puede determinar, por ejemplo, usando marcadores tales como unión a anexina V e inclusión de PI, como se discute a continuación con respecto a la Figura 6 y el ejemplo 1.

Como se ha demostrado sorprendentemente en los presentes ejemplos, la viabilidad después de la descongelación se amplió además cuando se usó una concentración de albúmina de aproximadamente un 2 % (p/v), en lugar de un 5 % (p/v) en los ensayos. Aún así, el beneficio del uso de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, en lugar de albúmina de suero obtenida a partir de plasma, fue incluso más pronunciado cuando se usó un 5 % (p/v) de albúmina.

Por consiguiente, en una realización del tercer aspecto de la presente invención, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en el medio de criopreservación y/o almacenamiento a aproximadamente un 2 % (p/v) $\pm 1,5$, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o un 0,1 % (p/v), cuando se mezcla con las células madre, y el medio de almacenamiento además comprende las células madre (opcionalmente células madre que se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento, o sometido a otro choque fisiológico antes de ser transferidas al medio de almacenamiento), que se han almacenado en el medio de almacenamiento durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días), y en el que la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más, tal como aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior.

En otra realización del tercer aspecto de la presente invención, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en el medio de criopreservación y/o almacenamiento a un 5 % (p/v) $\pm 1,5$, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o un 0,1 % (p/v), cuando se mezcla con las células madre, y el medio de almacenamiento comprende además comprende las células madre (opcionalmente células madre que se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento, o sometido a otro choque fisiológico antes de ser transferidas al medio de almacenamiento), que se han almacenado en el medio de almacenamiento durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas, o más, y en el que la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 % o más, tal como aproximadamente un 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 % o superior.

En la presente invención también se proporcionan usos de los medios de criopreservación y los medios de almacenamiento.

Por consiguiente, en un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un medio de criopreservación de acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención para la preservación de células madre.

El uso del cuarto aspecto de la presente invención puede ser para la preservación de células madre en un estado viable después del almacenamiento de las células madre a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días). Opcionalmente, la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más, tal como aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de

$\pm 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$, o $0,1$ °C.

Opcionalmente, de acuerdo con el uso del cuarto aspecto de la presente invención la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en el medio de criopreservación a aproximadamente un 2 % (p/v) $\pm 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$ o un 0,1 % (p/v), cuando se mezcla con las células madre. En una opción alternativa, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura puede estar presente en el medio de criopreservación a un 5 % (p/v) $\pm 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$ o un 0,1 % (p/v), cuando se mezcla con las células madre.

En una realización, el uso del cuarto aspecto de la presente invención es para la preservación de células madre mediante combinación de las células madre con el medio de criopreservación para producir una mezcla, y congelar la mezcla para producir un producto de células madre congelado (o someter las células madre a otro choque fisiológico), antes de su almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas, o superior. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$, o $0,1$ °C.

- Esto puede comprender opcionalmente las etapas de descongelar el producto de células madre congelado, transferir las células descongeladas a un medio de almacenamiento, y almacenar las células madre en el medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas, o superior.
- Además en una alternativa, esto puede ser opcionalmente para proteger células madre mediante combinación de las células madre con el medio de criopreservación para producir una mezcla, someter las células madre a un choque fisiológico, transferir las células a un medio de almacenamiento, y almacenar las células madre en el medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas, o superior.

Preferentemente con cualquier alternativa, el medio de almacenamiento es un medio de almacenamiento de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona el uso de un medio de almacenamiento de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención para la preservación de células madre, mediante almacenamiento de células madre en el medio de almacenamiento. Opcionalmente, las células madre se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento antes de su almacenamiento. Alternativamente, las células madre se pueden haber mezclado con un medio de criopreservación, sometido a un choque fisiológico, y a continuación transferido al medio de almacenamiento antes de su almacenamiento. Con cualquier alternativa, puede ser preferente que el medio de criopreservación sea un medio de criopreservación de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona el uso de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación. La mejora se compara habitualmente con el nivel de viabilidad después de la descongelación de las células madre criopreservadas observada cuando se usa albúmina de suero obtenida a partir de plasma en lugar de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, en la misma concentración. La mejora se puede observar, por ejemplo, en las células madre después de la descongelación, cuando se almacenan en un medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días). Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$, o $0,1$ °C.

De acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se puede usar formulándola en un medio de criopreservación y mezclando el medio de criopreservación con células madre antes de su congelación, y opcionalmente en el que el medio de criopreservación es un medio como se define en el segundo aspecto de la presente invención.

De acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se puede usar además o alternativamente formulándola en un medio de almacenamiento y mezclando el medio de almacenamiento con células madre después de su descongelación, y opcionalmente en el que el medio de almacenamiento es un medio como se define en el tercer aspecto de la presente invención.

Un séptimo aspecto de la presente invención proporciona el uso de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura para mejorar la viabilidad de células que se someten a choque fisiológico. Las células pueden ser, por ejemplo, células animales, células de mamífero, células humanas, y/o preferentemente células madre o linfocitos.

La mejora se compara habitualmente con el nivel de viabilidad después del choque de las células (por ejemplo, células madre) observada cuando se usa albúmina de suero obtenida a partir de plasma en lugar de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, en la misma concentración. La mejora se puede observar en las células después del choque (por ejemplo, células madre), cuando se almacenan en un medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días). Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

De acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se puede usar formulándola en un medio de criopreservación y mezclando el medio de criopreservación con las células (por ejemplo, células madre) antes del choque fisiológico, y opcionalmente el medio de criopreservación es el medio como se define en el segundo aspecto de la presente invención.

De acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se puede usar además o alternativamente formulándola en un medio de almacenamiento y mezclando el medio de almacenamiento con células (por ejemplo, células madre) después de recibir choque fisiológico, opcionalmente en el que el medio de almacenamiento es un medio como se define en el tercer aspecto de la presente invención.

Los presentes ejemplos también muestran sorprendentemente los beneficios de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura en el mantenimiento de las células estresadas en una fase apoptótica temprana en lugar de una fase apoptótica tardía. Las células en una fase apoptótica temprana no están comprometidas con la apoptosis, y pueden revertir, en condiciones favorables, en una forma rescatada que se pueden usar como células viables. Por ejemplo, como se discutió en Vives *et al.*, 2003, Met. Eng., 5: 124-132, aunque las células pueden responder a varios ataques activando el programa de apoptosis, la viabilidad y el crecimiento de las células protegidas se pueden recuperar cuando se vuelven a exponer a condiciones de apoptosis no inductoras, mientras que las células que nos evita que entren en la fase de apoptosis tardía morirán irremediabilmente. Tintó *et al.*, J. Biotechnol., 95: 205-214 ejemplifica la recuperación del crecimiento celular del hibridoma, usando inhibidores de caspasa para proteger frente a condiciones de cultivo inductoras de apoptosis, y muestra un retorno al crecimiento normal después de la reversión a condiciones de cultivo favorables.

Por consiguiente, un octavo aspecto de la presente invención proporciona un método para prevenir, retrasar o reducir el cambio de células de la apoptosis en etapa temprana a la apoptosis en etapa tardía, comprendiendo el método mezclar las células con un medio que comprende preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

El octavo aspecto de la presente invención también proporciona el uso de preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, por ejemplo en forma de un medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para prevenir, retrasar o reducir el cambio de células de la apoptosis en etapa temprana a la apoptosis en etapa tardía.

Las células que se van a tratar de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención pueden ser cualquier tipo de célula adecuada que pueda experimentar apoptosis y, por ejemplo, se pueden seleccionar entre células animales o células humanas. Preferentemente, las células son células madre. Los ejemplos de células madre de ese tipo incluyen células madre pluripotentes (tal como células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre pluripotentes inducidas), células madre multipotentes (tal como células madre adultas, por ejemplo, células madre mesenquimales que opcionalmente se pueden obtener a partir de grasa, médula ósea, sangre del cordón umbilical, o cordón umbilical; células madre hematopoyéticas, que opcionalmente se pueden obtener a partir de médula ósea o sangre periférica; células madre neuronales; o células madre germinales) o células madre unipotentes (tal como células madre comprometidas para hepatocitos). Opcionalmente, las células que se van a tratar de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención pueden ser células *ex vivo*.

De acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, las células se pueden entrar con el medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura antes y/o después de recibir un choque fisiológico. Puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se presente a las células tanto antes como después del choque fisiológico. Por "choque fisiológico" los investigadores incluyen cambios físicos y químicos en el entorno de las células que pueden inducir apoptosis en la población de células que se van a tratar. Preferentemente, un choque fisiológico, dentro del significado de este aspecto de la invención, inducirá apoptosis en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de las células en la población, en ausencia de la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, cuando se almacena en un medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días), incluso si está en presencia de albúmina de suero obtenida a partir de plasma. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

Los ejemplos de choque fisiológico incluyen, pero no se limitan a, choque en caliente (por ejemplo, superior a la 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 56, 47, 48, 49 o 50 °C), choque en frío (por ejemplo, inferior a 2, 1, 0, -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -20, -80, -100 °C, o inferior), choque osmótico (por ejemplo, exposición a condiciones que básicamente son no quiso tónicas con las células), privación de nutrientes, exposición a compuestos tóxicos, exposición a y/o privación de metabolitos, exposición a y/o privación de enzimas, choque químico, choque por pH, exposición a soluciones orgánicas y otros choques tales como exposición a fuerzas de cizalladura, exposición superficial y/o pérdida de exposición superficial. Opcionalmente, el choque fisiológico puede ser un choque resultante de una o más de las etapas de congelación y/o descongelación durante la criopreservación.

De acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, sin limitación, la apoptosis en fase temprana se puede caracterizar por células que presentan unión a Anexina (tal como Anexina V) pero no a inclusión de yoduro de propidio (PI) y/o 7-aminoactinomicina D (7AAD), por ejemplo como se determina usando citometría de flujo. La apoptosis en etapa temprana puede caracterizarse además por una permeabilidad mitocondrial que es más alta que el nivel observado en el mismo lote de células que no ha recibido un choque fisiológico, en combinación con la unión a anexina pero sin inclusión de PI y/o 7AAD. En la técnica se conocen bien otros elementos que caracterizan la apoptosis en fase temprana (ejemplos de los cuales se discuten en otra parte dentro de la presente solicitud), y también se pueden usar como marcadores adicionales o alternativos.

De acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, sin limitaciones, la apoptosis en fase tardía se puede caracterizar por células que presentan unión a anexina (tal como anexina V) y también presenta inclusión de yoduro de propidio (PI) y/o 7-aminoactinomicina D (7AAD), por ejemplo como se determina usando citometría de flujo. En la técnica se conocen bien otros elementos que caracterizan la apoptosis en fase tardía (ejemplos de los cuales se discuten en otra parte dentro de la presente solicitud), y también se pueden usar como marcadores adicionales o alternativos.

De acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se puede mezclar con las células, en una cantidad adecuada para proporcionar una concentración de la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que es superior a aproximadamente un 0,01 % (p/v) e inferior a un 10 % (p/v), inferior a aproximadamente un 9 % (p/v), inferior a aproximadamente un 8 % (p/v), inferior a aproximadamente un 7 % (p/v) o inferior a aproximadamente un 6 % (p/v), tal como a una concentración de aproximadamente un 0,1 % (p/v) a aproximadamente un 5 % (p/v), preferentemente a aproximadamente un 1 % (p/v), aproximadamente un 2 % (p/v), aproximadamente un 3 (p/v) o aproximadamente un 4 % (p/v). Las concentraciones de aproximadamente un 2 % (p/v) $\pm$ 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o un 0,1 % (p/v), cuando se mezcla con las células madre; o un 5 % (p/v) $\pm$ 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o un 0,1 % (p/v), cuando se mezcla con las células, pueden ser preferentes.

Opcionalmente, de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, las células se pueden almacenar en el medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura a una temperatura de 2-8 °C. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C. El almacenamiento puede ser durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días). La prevención, retraso, o reducción, del intercambio de células de apoptosis en etapa temprana a apoptosis en etapa tardía se puede salvar durante el periodo de almacenamiento.

Por consiguiente, puede ser preferente que las células se almacenen en el medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura durante un periodo de tiempo superior a 24 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas (por ejemplo, al menos, o aproximadamente, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas), o más (tal como hasta 3, 4, 5, 6 o 7 días). Opcionalmente, las células se almacenan a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, tal como hasta aproximadamente 48 horas, por ejemplo hasta aproximadamente 72 horas, o superior, y el porcentaje de células que se encuentran en la etapa temprana de la apoptosis al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior, tal como aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 95 %.

92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior. Opcionalmente, la temperatura de almacenamiento es aproximadamente 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C u 8 °C. El término "aproximadamente" como se usa en este contexto, puede incluir el significado de $\pm$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 °C.

5 Generalmente, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que se usa en el medio de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención exhibe una o más de las siguientes propiedades:

(a) menos de un 0,5 % (p/p) se une a la Concanavalina A, preferentemente menos de un 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o un 0,15 %; y/o

10 (b) un nivel de glicación de menos de un 0,6 moles de hexosa / mol de proteína, y preferentemente menos de 0,10, 0,075 o 0,05 moles de hexosa / mol de proteína.

Generalmente, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que se usa en el medio de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención:

15 (a) es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99,5 % monomérica y dimérica, de forma preferente básicamente un 100 % monomérica y dimérica;

(b) es al menos aproximadamente un 93 %, 94 %, 95 %, 96 % o un 97 % monomérica; y/o

20 (c) tiene un contenido del polímero de albúmina no superior, y preferentemente inferior, a aproximadamente un 1,0 % (p/p), 0,1 % (p/p) o un 0,01 % (p/p). Como se usa en este contexto, el término "polímero" como se aplica a la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura es distinto de las formas monomérica y dimérica.

Generalmente, de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención:

25 (a) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura comprende, consiste básicamente en, o consiste en, proteína de albúmina de suero obtenida a partir de levadura, cationes (tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, preferentemente sodio) y aniones de equilibrio (tal como cloruro, fosfato, sulfato, citrato o acetato, preferentemente cloruro o fosfato), agua, y opcionalmente octanoato y polisorbato 80;

30 (b) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y/o Medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, opcionalmente incluyendo las células, comprende octanoato a menos de 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 18 mM, 16 mM, 15 mM, 14 mM, 12 mM, 10 mM, 8 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de octanoato, o está libre de octanoato;

35 (c) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y/o medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, opcionalmente incluyendo las células, tiene un contenido total de ácidos grasos inferior o igual a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, está básicamente libre de ácidos grasos, o está libre de ácidos grasos;

40 (d) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y/o medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, opcionalmente incluyendo las células, comprende detergente, tal como polisorbato (preferentemente polisorbato 80) a una concentración inferior a 200 mg.l⁻¹, 150 mg.l⁻¹, 100 mg.l⁻¹, 90 mg.l⁻¹, 80 mg.l⁻¹, 70 mg.l⁻¹, 60 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹, 45 40 mg.l⁻¹, 30 mg.l⁻¹, 20 mg.l⁻¹, 15 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹, 4 mg.l⁻¹, 3 mg.l⁻¹, 2 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹, 0,5 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 0,01 mg.l⁻¹, 0,001 mg.l⁻¹, está básicamente libre del detergente, o está libre del detergente;

(e) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y/o medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, opcionalmente incluyendo las células, comprende un nivel total de aminoácidos libres y/o niveles de N-acetil triptófano inferiores a 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de aminoácidos y/o N-acetil triptófano en particular, o está libre de aminoácidos y/o de N-acetil triptófano en particular;

50 (f) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y/o medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, opcionalmente incluyendo las células, está básicamente libre de, o completamente libre de, todos de octanoato, aminoácidos libres y/o N-acetil triptófano en particular, y detergente (tal como polisorbato 80);

(g) la preparación de proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura es una preparación seleccionada entre: Recombumin® Prime, o una preparación que es similar a esta; Recombumin® Alpha, o una preparación que es similar a esta; o AlbiX®, o una preparación que es similar a esta;

60 (h) la preparación de proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y/o medio que comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y uno u otros componentes más, opcionalmente incluyendo las células, está libre de uno o más, o todos, componentes seleccionados entre: hemo, activador de precalicreína, pirógenos, hepatitis C y/o virus humanos y/o tiene una concentración de aluminio inferior a 200 µg.l⁻¹, tal como inferior a 180 µg.l⁻¹, 160 µg.l⁻¹, 140 µg.l⁻¹, 120 µg.l⁻¹, 100 µg.l⁻¹, 90 µg.l⁻¹, 80 µg.l⁻¹, 70 µg.l⁻¹, 60 µg.l⁻¹, 50 µg.l⁻¹, o 40 µg.l⁻¹, más habitualmente dentro del intervalo de aproximadamente 10 µg.l⁻¹ a aproximadamente un 30 µg.l⁻¹;

(i) la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio tiene una secuencia N-terminal intacta o básicamente intacta;

(j) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio comprende proteína de albúmina que tiene un contenido de grupo tiol libre que es superior a un 62 %, tal como al menos un 69 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %;

(k) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), presenta un perfil de SEC que excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 minutos y superior a 19 minutos, y más preferentemente excluye los picos con un tiempo de retención de tipo inferior al 14 o 15 minutos y superior a 18 minutos;

(l) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), presenta un pico principal único, que corresponde a la albúmina en la forma monomérica nativa;

(m) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de masas, es un producto que presenta menos de 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, tal como de aproximadamente 1 a 11, de 1 a 8, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, 1 o menos de 1 restos de lisina y/o arginina modificados con hexosa por proteína;

y/o

(n) la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio comprende proteína de albúmina que no están glicada con azúcares específicos de plantas, tal como α -1,3-fucosa y/o β -1,2-xilosa.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el análisis de espectrometría de masas de productos de albúmina comerciales como se informa en el Ejemplo 5: (a) Recombumin® Prime y Recombumin® Alpha; (b) albúmina 1 comercial (obtenida a partir de plantas); (c) albúmina 2 comercial (obtenida a partir de plantas); (d) albúmina 3 comercial (obtenida a partir de la levadura, *Pichia*).

La **Figura 2** muestra datos comparativos de electroforesis en gel registrados a partir de productos de albúmina comerciales como se describe en el Ejemplo 5: (a) Recombumin® Prime; (b) Recombumin® Alpha; (c) albúmina 1 comercial; (d) albúmina 3 comercial; (e) albúmina 2 comercial.

La **Figura 3** muestra una comparación de la pigmentación de las albúmina recombinantes como se describe en el Ejemplo 5.

La **Figura 4** muestra un esquema de la fase experimental seguida en el estudio que se describe en el Ejemplo 1.

La **Figura 5** muestra la configuración usada en ensayos de estabilidad a 2-8 °C, en el estudio que se describe en el Ejemplo 1.

La **Figura 6** muestra los resultados del ensayo apoptótico en la estabilidad después de la congelación a 2-8 °C, basándose en la unión a anexina V (eje horizontal) e inclusión de PI (eje vertical).

La **Figura 7** muestra % de marcadores superficiales para identidad de hMSC en los tiempos antes de la congelación y después de la descongelación, comparando soluciones de criopreservación de Albutein® (RI) o AlbiX® (TI), como se discute en el Ejemplo 2.

La **Figura 8** muestra **(A)** Análisis de citometría de flujo. % Viabilidad a lo largo de los puntos temporales de estabilidad para los aditivos Albutein® (RI) o AlbiX® (TI) en cultivos celulares expandidos con hSERB (la línea discontinua indica un límite de especificación de viabilidad de un 70 %). Para 72 h se muestra el % de reducción considerando el tiempo 0 como referencia. Se muestran los resultados del ensayo de comparación Múltiple ANOVA Tukey. **(B)** Análisis de citometría de flujo. % Viabilidad a lo largo de los puntos temporales de estabilidad para los aditivos Albutein® (RI) o AlbiX® (TI) en cultivos celulares expandidos con PL (la línea discontinua indica un límite de especificación de viabilidad de un 70 %). Para 72 h se muestra el % de reducción considerando el tiempo 0 como referencia. Se muestran los resultados del ensayo de comparación Múltiple ANOVA Tukey. **(C)** y **(D)** Análisis de citometría de flujo. % de reducción de la viabilidad con respecto al tiempo 0, para las condiciones de criopreservación de Albutein® (RI) y AlbiX® (TI), y para hSERB **(C)**, y PL **(D)**, estrategias de expansión. Para el análisis estadístico se usó el ensayo de comparación múltiple de Sidak no paramétrico con ANOVA.

La **Figura 9** muestra un perfil de ácido graso de una formulación de albúmina de una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de acuerdo con la tercera realización de la invención.

La **Figura 10** muestra un perfil de ion metálico, por ICP-OES, de una formulación de albúmina de una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de acuerdo con la tercera realización de la

invención.

La **Figura 11** muestra % de marcadores superficiales para identidad de hMSC en diferentes puntos temporales de la evaluación de estabilidad comparando las soluciones de criopreservación Albutein® (RI) o AlbiX® (TI) para cultivos celulares expandidos con medios de cultivo hSERB.

La **Figura 12** muestra estados apoptóticos en las etapas temprana y tardía de células hMSC en diferentes puntos temporales de la evaluación de estabilidad comparando las soluciones de criopreservación Albutein® (control) o AlbiX®.

La **Figura 13** muestra el efecto protector de la albúmina de suero recombinante humana obtenida a partir de levadura, inmediatamente después de la descongelación, cuando se usa en el medio de criopreservación, el medio de almacenamiento, o ambos. **(A)** muestra el porcentaje de viabilidad para todos los elementos (RI, TI1, TI2, TI3; n = 3 por elemento) obtenido con citometría de flujo. La línea discontinua corresponde a los criterios de aceptación de rutina para viabilidad después de la descongelación. La comparación se realizó con el ensayo múltiple de Dunnetts, ANOVA unilateral. **(B)** muestra el porcentaje de viabilidad para todos los elementos (RI, TI1, TI2, TI3; n = 3 por elemento) obtenido con NucleoCounter. La línea discontinua corresponde a los criterios de aceptación de rutina para viabilidad después de la descongelación. La comparación se realizó con el ensayo múltiple de Dunnetts, ANOVA unilateral.

La **Figura 14** muestra el efecto protector de la albúmina de suero recombinante humana obtenida a partir de levadura, inmediatamente después de la descongelación a 72 horas después de la descongelación, cuando se usa en el medio de criopreservación, el medio de almacenamiento, o ambos. **(A)** muestra el porcentaje de viabilidad obtenido mediante citometría de flujo. **(B)** muestra el porcentaje de viabilidad obtenido con el nucleocounter. Ambas representaciones muestran la viabilidad a lo largo del estudio de estabilidad asociada con la desviación estándar de todos los elementos (n = 3 por elemento). En ambas Figuras 14A y 14B, ● es el Elemento de Referencia, ■ es el Elemento de Ensayo 1, ▲ es el Elemento de Ensayo 1, y ▼ es el Elemento de Ensayo 3.

La **Figura 15** muestra una comparación de las muestras RI y TI2, evaluadas para viabilidad después de la descongelación (%) cuando se almacenan a 2-8 °C. **(A)** muestra los resultados tal como se determinan mediante citometría de flujo y **(B)** muestra los resultados tal como se determinan con nucleocounter.

La **Figura 16** muestra una comparación de las muestras RI y TI2, evaluadas para reducción de la viabilidad después de la descongelación (%) a lo largo del tiempo, cuando se almacenan a 2-8 °C, y usando datos normalizados, en los que la viabilidad del tiempo en el punto 0 h para cada muestra se consideró como el punto temporal con un 100 % de viabilidad y la reducción de la viabilidad a partir de este punto temporal se evaluó con respecto a este valor. **(A)** muestra los resultados tal como se determinan mediante citometría de flujo y **(B)** muestra los resultados tal como se determinan con nucleocounter.

La **Figura 17** muestra una comparación de las muestras TI1 y TI3, evaluadas para viabilidad después de la descongelación (%) cuando se almacenan a 2-8 °C. **(A)** muestra los resultados tal como se determinan mediante citometría de flujo y **(B)** muestra los resultados tal como se determinan con nucleocounter.

La **Figura 18** muestra una comparación de las muestras RI y TI3, evaluadas para viabilidad después de la descongelación (%) cuando se almacenan a 2-8 °C. **(A)** muestra los resultados tal como se determinan mediante citometría de flujo y **(B)** muestra los resultados tal como se determinan con nucleocounter.

La **Figura 19** muestra una representación del porcentaje de células apoptóticas en fase temprana y células apoptóticas en fase tardía. **(A)** muestra la comparación del Elemento de Referencia (RI) y el Elemento de Ensayo 2 (TI2), **(B)** muestra la comparación del Elemento de Ensayo 1 (TI1) y el Elemento de Ensayo 3 (TI3), y **(C)** muestra la comparación del Elemento de Referencia (RI) y el Elemento de Ensayo 3 (TI3), en cada punto temporal del estudio de estabilidad.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Congelación: El término "congelación" como se usa en la presente solicitud en el contexto de la congelación de preparaciones celulares, incluye exponer las células a una temperatura lo suficientemente baja como para generar cristales de hielo o hacer que la preparación celular se convierta en una forma sólida completamente congelada, por ejemplo, en una forma que está por debajo de 0 °C. El término "congelación" se refiere preferentemente a criopreservación.

Criopreservación: La criopreservación es un método para mantener el material biológico (células, tejidos y microorganismos) en buen estado, mediante congelación a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y

que -196 °C. De esta forma, las funciones vitales se reducen y se pueden mantener en un estado de animación suspendida durante mucho tiempo.

Como se usa en el presente documento, el término "criopreservación" se refiere al mantenimiento estable de las células durante un largo periodo de tiempo mediante congelación. En general, cuando las células se cultivan, se produce una mutación en una proporción de uno a diez mil, y cuando las células pasan por un subcultivo a largo plazo, las poblaciones celulares cambian y se vuelven diferentes de las poblaciones originales. En casos graves, las células pueden perder sus propias funciones particulares por subcultivo. Además, las células se pueden infectar con micoplasma, etc., durante el subcultivo. Debido a problemas de ese tipo, la criopreservación celular se realiza para congelar y preservar las células antes de perder sus características intrínsecas, y usarlas nuevamente cuando sea necesario. En particular, si las células madre se usan para terapia, es necesario poder usar células madre sanas de inmediato cuando sea necesario. Por lo tanto, la criopreservación eficaz se considera especialmente importante para las células madre.

La congelación de células madre que se tratan con un medio de criopreservación de la presente invención se puede realizar mediante cualquier método convencional de congelación de células madre conocido en la técnica, y los ejemplos de los mismos pueden incluir un método de vitrificación y un método de congelación lenta, pero no se limitan a los mismos. El método de vitrificación se realiza, por ejemplo, disminuyendo constantemente la temperatura a una tasa (por ejemplo, de 1 °C por 1 minuto) usando un aparato tal como un congelador de tasa controlada (CRF). Preferentemente, cuando la temperatura alcanza -80 °C, las células se almacenan inmediatamente en un tanque de nitrógeno. El método de congelación lenta se puede realizar colocando un vial que contiene un medio de criopreservación que contiene células en una caja del recipiente del congelador que contiene alcohol isopropílico, y disminuyendo constantemente la temperatura durante un periodo de tiempo específico (por ejemplo, de 12 horas a 24 horas) en un congelador de temperatura ultrabaja a -70 °C o inferior, sin limitarse a ello. Además, las células congeladas se pueden almacenar en un tanque de nitrógeno líquido y usar nuevamente cuando sea necesario.

En los ejemplos también se describen métodos a modo de ejemplo adecuados.

Solución de criopreservación: La congelación de productos celulares se realiza usando uno o más criopreservantes en una solución de criopreservación. El uso de dicha solución se basa generalmente en la protección de la viabilidad celular durante el proceso de congelación por deshidratación celular para evitar la formación de cristales de agua congelada en los compartimentos intracelulares de las células.

Criopreservante: Como se usa en el presente documento, el término "criopreservante" se refiere a una sustancia que se usa para minimizar el daño celular causado por los procesos de congelación y descongelación que inevitablemente van acompañados de formación de cristales de hielo y desequilibrio iónico y osmótico cuando las células, tejidos u órganos se preservan a una temperatura ultrabaja de -80 °C a -200 °C.

Para los fines de la presente invención, el "criopreservante" no es albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura o cualquier otra forma de proteína de albúmina. Por el contrario, el criopreservante no se limita a una determinada sustancia, siempre que pueda reducir el daño celular durante la criopreservación.

Sin limitación, un criopreservante presente en una solución de criopreservación puede incluir: dimetil sulfoxido (DMSO), glicerol, polietilenglicol (PEG), etilenglicol (EG), polivinilpirrolidona (PVP), y Trehalosa. El DMSO puede ser particularmente preferente. El crioprotector puede estar presente en el medio de criopreservación, cuando se mezcla con las células madre, a una concentración adecuada para proporcionar un efecto criopreservante. En el caso de DMSO, esta puede ser aproximadamente un 10 % (p/v) $\pm$ 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o un 1 %. La persona con experiencia puede determinar fácilmente una cantidad adecuada de criopreservante usando ensayo de rutina.

Células madre: Como se usa en el presente documento, el término "célula madre" se refiere a una célula indiferenciada que tiene capacidad de autorrenovación y diferenciación. Las células madre incluyen subpoblaciones de células madre totipotentes, células madre pluripotentes, células madre multipotentes y células madre unipotentes según su capacidad de diferenciación. Las células madre totipotentes se refieren a células que se pueden diferenciar en cualquier célula de un organismo, incluyendo tejido embrionario y células placentarias. Las células madre pluripotentes se refieren a células que tienen potencia para diferenciarse en todos los tejidos o células que constituyen un organismo vivo. Las células madre multipotentes se refieren a células que no tienen potencia para diferenciarse en todo tipo, sino en varios tipos de tejidos o células. Las células madre unipotentes se refieren a células que tienen potencia para diferenciarse en un tejido o célula particular.

Las células madre pluripotentes pueden incluir células madre embrionarias (células ES), células germinales embrionarias (células EG), células madre pluripotentes inducidas (células iPS), etc.

Las células madre multipotentes pueden incluir células madre adultas tal como células madre mesenquimales (obtenidas a partir de grasa, médula ósea, sangre del cordón umbilical, o cordón umbilical, etc.), células madre hematopoyéticas (obtenidas a partir de médula ósea o sangre periférica), células madre neuronales, células madre germinales, etc.

Las células madre unipotentes pueden incluir células madre comprometidas para hepatocitos, que normalmente están inactivas con baja capacidad de autorrenovación, pero se diferencian vigorosamente en hepatocitos bajo ciertas condiciones. En una realización de la presente invención, se usaron células madre mesenquimales de médula ósea y células madre del cordón umbilical para examinar que la composición de la presente invención se puede usar para la criopreservación de células madre con seguridad y estabilidad.

De acuerdo con la presente invención, el término "células madre" habitualmente no incluye células primarias. Como se usa en el presente documento, el término "célula primaria" se refiere a una célula que se aísla de un tejido de un individuo sin ninguna manipulación genética, etc., que representa funciones de un órgano/tejido de un organismo vivo. Las células primarias se aíslan de piel o de endotelio vascular, médula ósea, grasa, cartílago, etc., y se usan para estudiar las funciones de los tejidos y las células correspondientes, o como agentes terapéuticos para restaurar los tejidos perdidos.

Los orígenes de las células madre y las células primarias no están particularmente limitados, siempre y cuando las células se puedan criopreservar de manera estable con la composición de la presente invención. Los ejemplos de las mismas pueden incluir células obtenidas a partir de ser humano, mono, cerdo, caballo, vaca, oveja, perro, gato, ratón o conejo. Las células madre o células primarias son células madre humanas o células primarias, pero no se limitan a las mismas.

Opcionalmente, los métodos y usos de la presente invención (en particular los métodos y usos en los que las células madre usadas son células madre embrionarias humanas (hESC)) excluyen los usos de embriones humanos para cualquier finalidad, incluso para fines industriales o comerciales. Como tal, puede ser preferente que cualquier hESC usada de acuerdo con la presente invención no se obtenga directa o indirectamente mediante la destrucción de un embrión humano. Para decirlo de otra manera, puede ser preferente que cualquier hESC usada de acuerdo con la presente invención se obtenga por medios que no requieran la destrucción previa de embriones humanos o su uso como material base, cualquiera que sea la etapa en la que eso tenga lugar. Por ejemplo, puede ser preferente que cualquier hESC para su uso en la presente invención se obtenga a partir de un partenota y/o otra célula o colección de células que no tenga la capacidad inherente de convertirse en un ser humano.

Apoptosis: la apoptosis es un proceso de muerte celular programada que se produce en organismos multicelulares. Los sucesos bioquímicos conducen a cambios celulares característicos (morfología) y muerte. Estos cambios pueden incluir una o más características seleccionadas entre formación de vesículas, contracción celular, fragmentación nuclear, condensación de cromatina, fragmentación de ADN cromosómico y descomposición global de ARNm. La apoptosis es distinta de la necrosis, la última de las cuales es una forma de muerte celular traumática que resulta de una lesión celular aguda. Por el contrario, la apoptosis es un proceso altamente regulado y controlado. A diferencia de la necrosis, la apoptosis produce fragmentos celulares llamados cuerpos apoptóticos que las células fagocíticas pueden engullir y eliminar rápidamente antes de que el contenido de la célula se pueda derramar sobre las células circundantes y causar daño.

En la técnica se conocen bien métodos para distinguir células apoptóticas y necróticas. Esto puede incluir, por ejemplo, análisis de morfología mediante microscopía de lapso de tiempo, fluorocitometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión. Para el análisis de marcadores de la superficie celular también existen varias técnicas bioquímicas (exposición a fosfatidilserina con respecto a permeabilidad celular por fluorocitometría de flujo), marcadores celulares de fragmentación tal como fragmentación de ADN (fluorocitometría de flujo), activación de caspasa, escisión de Bid y liberación de citocromo c (transferencia de Western). Las células necróticas primarias y secundarias se pueden distinguir mediante análisis de sobrenadante para caspasas, HMGB1 y liberación de citoqueratina 18. Sin embargo, todavía no se han identificado marcadores bioquímicos o de superficie distintos de muerte celular necrótica, y solo hay disponibilidad de marcadores negativos. Estos incluyen la ausencia de marcadores apoptóticos (activación de caspasa, liberación de citocromo c y fragmentación de ADN oligonucleosómico) y cinética diferencial de marcadores de muerte celular (exposición a fosfatidilserina y permeabilización de la membrana celular). Se conoce bien una selección de técnicas que se pueden usar para distinguir la apoptosis de las células necroptóticas.

Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio, que se unen a la fosfatidilserina (PS) para identificar células apoptóticas. En las células sanas, la PS se localiza predominantemente a lo largo del lado citosólico de la membrana plasmática. Al iniciarse la apoptosis, la PS pierde su distribución asimétrica en la bicapa de fosfolípidos y se transloca a la membrana extracelular, que se puede detectar con anexina V marcada con fluorescencia.

- En las primeras etapas de la apoptosis, la membrana plasmática excluye colorantes de viabilidad tal como yoduro de propidio (PI) y 7AAD, por lo tanto, las células que presentan solo tinción de anexina V (PI y/o 7AAD negativa) se encuentran en las primeras etapas de apoptosis. Las células en una fase apoptótica temprana no están comprometidas con la apoptosis, y pueden revertir, en condiciones favorables, en una forma rescatada que se pueden usar como células viables. Como tal, las células en la etapa temprana de la apoptosis se consideran, a efectos de la presente solicitud, "viables".

- Durante la apoptosis en etapa tardía, la pérdida de la integridad de la membrana celular permite la unión de una anexina V a la PS citosólica, así como la absorción celular de PI y/o 7AAD. Las células en la etapa tardía de la apoptosis no se consideran, a efectos de la presente solicitud, "viables".

5 La tinción con anexina V, combinada con 7AAD o PI, se usa ampliamente para identificar etapas apoptóticas, por ejemplo mediante citometría de flujo.

Una medida adicional de la apoptosis en etapa temprana puede incluir, por ejemplo, la determinación de la permeabilidad mitocondrial, tal como el uso del kit Mitoscreen como se describe en Milian *et al.*, 2015, J. Biotech., 209: 58-67 (véase en particular, la sección 2.2 y la Figura 5A de Milian *et al.*). Además, el ensayo de actividad de caspasa 3 se puede realizar, por ejemplo usando el método de Tintó *et al.*, 2002, J. Biotech., 95: 205-214.

Tintó *et al.*, mencionado anteriormente, también describe ensayos útiles adicionales que se pueden aplicar para caracterizar la apoptosis en etapa tardía, incluyendo el análisis de escalera de ADN (véanse las Figuras 3B, E, H de Tintó *et al.*), y la imagen confocal, por ejemplo como se describe en la Figura 1C de Tintó *et al.*

Albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura: La presente invención se refiere a proteína 'albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura' y preparaciones de la misma.

20 Es decir, la proteína de albúmina de suero se obtiene a partir de un medio de cultivo de levadura obtenido por cultivo de una levadura transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica la albúmina en un medio de fermentación, por lo que dicha levadura expresa la proteína de albúmina y la secreta en el medio. Se fabrica preferentemente sin el uso de materiales obtenidos a partir de animales o seres humanos. La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se recupera a continuación de la misma en una forma que está básicamente purificada, para producir la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

La levadura es preferentemente del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), el género *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*) o el género *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*). En la técnica se conocen bien métodos para la producción de proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, por ejemplo en *Kluyveromyces* (Fleer 1991, Bio/technology 9, 968-975), *Pichia* (Kobayashi 1998 Therapeutic Apheresis 2,257-262) y *Saccharomyces* (Sleep 1990, Bio/technology 8, 42-46)). Lo más preferentemente el género es *Saccharomyces*, y lo más preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.

35 Los métodos adecuados para la producción de preparaciones a modo de ejemplo de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y preparaciones de ese tipo *per se*, se describen en los documentos WO 2000/044772 y/o WO 2013/006675.

Los documentos EP1329460 (A1), EP1329461 (A1), EP1329462 (A1) y EP1710250 (A1) también describen métodos adecuados para la producción de preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y preparaciones de ese tipo *per se*, que pueden ser potencialmente adecuadas para su uso en la presente invención.

Como se discute a continuación, la producción de albúmina de suero recombinante en levadura, y su recuperación de la misma, proporciona una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que es físicamente distinta de las composiciones de albúmina de suero obtenidas a partir de otras fuentes (por ejemplo, de plasma o de otras fuentes recombinantes tal como plantas). Esas distinciones son numerosas e incluyen diferencias físicas en la estructura de la propia proteína de albúmina de suero, y en el nivel de identidad y/o de los componentes acompañantes con los que la proteína de albúmina se copurifica en la preparación. Al menos en parte, eso se debe a que, en comparación con la albúmina de suero obtenida de otras fuentes, la proteína de albúmina en la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, la molécula de albúmina original está relativamente desprovista de cambios y alteraciones impuestas a la proteína por la fuente.

La albúmina se ha descrito y caracterizado a partir de una gran cantidad de mamíferos y aves (por ejemplo, albúminas enumeradas en los documentos WO2010/092135 (en particular en la Tabla 1) y PCT/EP11 /055577 publicado, WO 2011/124718 (en particular en la página 9 y las SEQ ID NOS: 2, 4-19 y 31)).

Una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura para su uso en la presente invención puede comprender una o más (varias) albúminas. Preferentemente la composición comprende una albúmina seleccionada entre albúmina humana (por ejemplo, AAA98797 o P02768-1, SEQ ID NO: 2 (madura), SEQ ID NO: 3 (inmadura)), albúmina de primate no humano, (tal como albúmina de chimpancé (por ejemplo, la secuencia predicha XP_517233.2 SEQ ID NO: 4), albúmina de gorila o albúmina de macaco (por ejemplo, NP_001182578, SEQ ID NO: 5), albúmina de roedor (tal como albúmina de hámster (por ejemplo, A6YF56, SEQ ID NO: 6), albúmina de cobaya (por ejemplo, Q6WDN9-1, SEQ ID NO: 7), albúmina de ratón (por ejemplo, AAH49971 o P07724-1 Versión 3, SEQ ID NO: 8, o la secuencia madura SEQ ID NO: 19) y albúmina de rata (por ejemplo, AAH85359 o P02770-1 Versión 2, SEQ ID NO: 9))), albúmina bovina (por ejemplo, albúmina de vaca P02769-1, SEQ ID NO: 10), albúmina equina tal como albúmina de caballo (por ejemplo, P35747-1, SEQ ID NO: 11) o albúmina de burro (por

ejemplo, Q5XLE4-1, SEQ ID NO: 12), albúmina de conejo (por ejemplo, P49065-1 Versión 2, SEQ ID NO: 13), albúmina de cabra (por ejemplo, ACF10391, SEQ ID NO: 14), albúmina de oveja (por ejemplo, P14639-1, SEQ ID NO: 15), albúmina de perro (por ejemplo, P49822-1, SEQ ID NO: 16), albúmina de pollo (por ejemplo, P19121-1 Versión 2, SEQ ID NO: 17) y albúmina de cerdo (por ejemplo, P08835-1 Versión 2, SEQ ID NO: 18). Las formas maduras de albúmina son particularmente preferentes y la persona experta puede identificar formas maduras usando información disponible públicamente tal como bancos de datos de proteínas y/o usando software de reconocimiento de péptidos de señal tal como SignalP (por ejemplo, SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6)). SignalP Versión 4.0 es preferente (Petersen *et al.*, (2011) Nature methods (8): 785-786).

La albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura es preferentemente una proteína que tiene la misma estructura terciaria y/o muy similar a la de la albúmina de suero humano (HSA) o dominios de HSA y tiene propiedades similares de HSA o los dominios relevantes.

Las albúminas humanas que se desvelan en la SEQ ID NO: 2 o cualquier alelo de origen natural de las mismas, es la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura preferente para su uso de acuerdo con la invención. La SEQ ID NO: 2 puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

Las formas particularmente preferentes de preparaciones de albúmina de suero humano recombinante obtenida a partir de de levadura para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen las presentaciones comerciales conocidas de Recombumin® Alpha recombinante obtenido a partir de levadura (anteriormente Albucult®), Recombumin® Prime (anteriormente Recombumin®) y/o AlbiX® (todo de Albumedix Ltd.).

Alternativamente, la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura puede ser una proteína que tiene una secuencia que tiene una estructura terciaria muy similar a la de los dominios HSA o HSA y tiene propiedades similares de HSA o los dominios relevantes.

Las estructuras terciarias similares son, por ejemplo, las estructuras de las albúminas de las especies mencionadas en la albúmina original. Algunas de las principales propiedades de la albúmina son i) su capacidad para regular el volumen plasmático, ii) una vida media plasmática larga de alrededor de 19 días $\pm$ 5 días, iii) unión a ligando, por ejemplo, unión de moléculas endógenas tal como compuestos ácidos, lipofílicos que incluyen ácidos grasos de bilirrubina, hemina y tiroxina (véase también la Tabla 1 de Kragh-Hansen *et al.*, 2002, Biol. Pharm. Bull. 25, 695), iv) unión de compuestos orgánicos pequeños con características ácidas o electronegativas por ejemplo, fármacos tales como warfarina, diazepam, ibuprofeno y paclitaxel (véase también la Tabla 1 de Kragh-Hansen *et al.*, 2002, Biol. Pharm. Bull. 25, 695). Para caracterizar una proteína o fragmento como una albúmina no es necesario satisfacer todas estas propiedades. Si un fragmento, por ejemplo, no comprende un dominio responsable de la unión de ciertos ligandos o compuestos orgánicos, tampoco se esperará que la variante de dicho fragmento tenga estas propiedades. El término albúmina incluye variantes, derivados tal como fusiones y/o conjugaciones de una albúmina o de una variante de albúmina.

El término "precursor" o "albúmina precursora" significa una albúmina a la que se le hace una modificación para producir las variantes de albúmina que se pueden usar en la presente invención. El grosor puede ser un polipéptido o un alelo natural del mismo tipo o una variante del mismo tal como una variante descrita en el documento PCT/EP2010/066572 publicado como documento WO 2011/051489, o una variante o derivado descrito en el documento PCT/EP2011/055577 publicado como documento WO 2011/124718.

El término "variante" se refiere a un polipéptido obtenido a partir de una albúmina precursora que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección, en una o más (varias) posiciones. Una sustitución significa un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. El polipéptido alterado (variante) se puede obtener mediante intervención humana mediante modificación de la secuencia de polinucleótidos que codifica la albúmina precursora.

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, en particular la albúmina humana, puede ser una variante, o un derivado tal como fusión de conjugación de una albúmina o de una variante de albúmina. Es preferente que la albúmina tenga una identidad de al menos un 70 % con HSA (SEQ ID NO: 2), más preferentemente una identidad de al menos un 72, 73, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 % con HSA. La variante de albúmina puede tener una o más mutaciones puntuales (varias), por ejemplo, K573P, K573Y, K573W, K500A en comparación con una albúmina precursora tal como las que se proporcionan en el listado de secuencias, en particular la SEQ ID NO: 2 (las mutaciones se describen en relación a la SEQ ID NO: 2 y la persona experta puede identificar mutaciones equivalentes en otras albúminas alineando una secuencia de albúmina frente a SEQ ID NO: 2 usando el software EMBOSS que se describe en el presente documento). Para una albúmina que tiene una identidad de aproximadamente un 70 a un 80 % con la SEQ ID NO: 2 (tal como albúmina de ratón por ejemplo, SEQ ID NO: 19), es más preferente que el catión esté presente a una concentración de al menos 250 mM.

La variante de albúmina es preferentemente al menos un 70 %, preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, incluso más preferentemente al menos

un 90 %, lo más preferentemente al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y mantiene al menos una de las principales propiedades de la albúmina original o una estructura terciaria similar a la de HSA.

Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferentemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de hueco de 10, penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera: (Restos idénticos x 100)/(Longitud de alineación - Número total de huecos en la alineación).

La variante puede poseer una afinidad de unión alterada con respecto a FcRn y/o una tasa alterada de transcitosis a través de monocapa celular de endotelios, epitelios y/o mesotelios en comparación con la albúmina precursora. La secuencia polipeptídica variante es preferentemente una que no se encuentra en la naturaleza. Una variante incluye un fragmento, por ejemplo, que comprende o que consta de al menos 100, 150, 200, 250, 300, 350, 450, 500, 550 aminoácidos contiguos de una albúmina.

El término albúmina "de tipo silvestre" (WT) significa una albúmina que tiene la misma secuencia de aminoácidos que las albúminas que se encuentran naturalmente en un animal o en un ser humano. La SEQ ID NO: 2 es un ejemplo de una albúmina de tipo silvestre de *Homo sapiens*.

De acuerdo con una realización, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) comprende albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que exhibe una o más de las siguientes propiedades:

(1) menos de un 0,5 % (p/p) se une a la Concanavalina A, preferentemente menos de un 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o un 0,15 %; y/o

(2) un nivel de glicación de menos de 0,6 moles de hexosa / mol de proteína, y preferentemente menos de 0,10, 0,075 o 0,05 moles de hexosa / mol de proteína.

Un ensayo de Concanavalina A adecuado se describe, por ejemplo, en el documento WO 2000/044772.

La preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) puede ser al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, más preferentemente al menos un 99,5 % monomérica y dimérica, preferentemente básicamente 100 % monomérica y dimérica. Un trímero de hasta un 0,5 %, preferentemente un 0,2 % es tolerable pero las formas de albúmina más grandes generalmente están ausentes.

En ciertas realizaciones preferentes, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura puede ser:

i. el producto Recombumin® Prime (anteriormente Recombumin®) disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, como se describe a continuación en una primera realización particularmente preferente;

ii. el producto Recombumin® Alpha (anteriormente Albucult®) disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, como se describe a continuación en una segunda realización particularmente preferente; o

iii. lo más preferentemente, el producto AlbiX® disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, como se describe a continuación en una segunda realización particularmente preferente.

Por consiguiente, en una primera realización particularmente preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de una expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto Recombumin® Prime (anteriormente Recombumin®) disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta que se puede caracterizar por una o más de las siguientes características.

i. Puede tener un nivel de iones níquel inferior a 100 ng, basándose en 1 g de albúmina;

ii. puede tener un nivel de glicación de inferior a 0,6, preferentemente inferior a 0,10, 0,075 o 0,05 moles de hexosa/mol de proteína tal como se mide en el ensayo con el producto Amadori;

iii. puede tener un extremo C-terminal intacto, es decir, homogéneo;

iv. puede tener un contenido de albúmina de unión a conA inferior al un 0,5 % (p/p), preferentemente inferior al un 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o un 0,15 %;

v. puede tener un contenido de tiol libre de al menos 0,85 moles de SH/mol de proteína;

vi. puede contener básicamente nada de C18 o ácidos grasos C20; y/o

vii. al menos un 99 %, preferentemente al menos un 99,9 %, en eso de la proteína en la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura pueden ser la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

Además, o alternativamente, de acuerdo con la primera realización particularmente preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto Recombumin® Prime (anteriormente Recombumin®) disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, y puede comprender, consistir básicamente en, o consistir en los siguientes componentes:

i. Albúmina recombinante humana obtenida a partir de levadura como principio "Activo". Por ejemplo, la levadura obtenida a partir de albúmina humana recombinante obtenida a partir de levadura puede estar presente en la preparación a una concentración de aproximadamente 10 a 400 g/l, tal como aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 g/l.

ii. Sodio (por ejemplo, añadido en forma de NaCl) para ajustar la tonicidad. El sodio puede estar presente, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 145 mM, $\pm$ 100 mM, 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM, 10 mM, o 5 mM.

iii. Octanoato como agente estabilizante. El octanoato puede estar presente, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,6 mM por 10 g/l de concentración de albúmina humana recombinante obtenida a partir de levadura, por ejemplo, aproximadamente 32 mM para una preparación de 200 g/l. En este contexto, el término "aproximadamente" pretende significar $\pm$ 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, o 0,2 mM del valor indicado.

iv. Polisorbato 80 como agente estabilizante, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 15 mg/l para una concentración de albúmina recombinante humana de 200 g/l, o ajustado proporcionalmente para otras concentraciones de albúmina humana recombinante. En este contexto, el término "aproximadamente" pretende significar que se añaden aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/l de polisorbato 80 por 10 g/l de concentración de albúmina humana recombinante.

v. Agua como diluyente/vehículo.

Además, o alternativamente, de acuerdo con la primera realización preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto Recombumin® Prime (anteriormente Recombumin®) disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, y que se puede caracterizar por una o más (tal como todas) de las siguientes características:

(i) Un análisis de masa de la albúmina humana recombinante que muestra una masa teórica $\pm$ 20 Da (66418 a 66458);

(ii) Contenido de endotoxina no superior (preferentemente inferior) a 0,50 EU/ml, por ejemplo como se determina mediante el ensayo LAL;

(iii) Esterilidad que satisface los requisitos del ensayo USP<71>;

(iv) pH de 6,7-7,3, por ejemplo como se determina con un método de control de calidad convencional;

(v) una pureza de proteína de al menos (preferentemente superior a) un 99,0 % (p/p), por ejemplo como se determina mediante PAGE nativa;

(vi) contenido de polímero de albúmina no superior (preferentemente inferior) a un 1,0 % (p/p), por ejemplo como se determina mediante GP HPLC;

(vii) Proteína al 19,0-21,0 % Kjeldahl;

(viii) un contenido de sodio de 130-160 mM, por ejemplo como se determina mediante espectroscopía de absorción atómica;

(ix) una apariencia, en un vial de vidrio antes de la adición al medio de criopreservación y/o almacenamiento, que está libre de defectos, que contiene una solución ligeramente viscosa, de color pajizo claro a ámbar prácticamente libre de contaminación visible, por ejemplo como se determina mediante inspección visual;

(x) contenido de proteína de célula huésped no superior (preferentemente inferior) a 0,15 μ g/g de proteína de albúmina, por ejemplo como se determina mediante ELISA;

(xi) Especies de unión a Con A de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura no superior (preferentemente inferior) a un 0,30 % (p/p) de proteína, por ejemplo como se determina mediante Cromatografía de Con A;

(xii) Contenido de níquel no superior (preferentemente inferior) a 0,5 μ g/g de proteína, por ejemplo como se determina mediante espectroscopía de absorción atómica;

(xiii) Contenido de potasio no superior (preferentemente inferior) a 0,01 mmol/g de proteína, por ejemplo como se determina mediante espectroscopía de absorción atómica a la llama;

(xiv) Fracciones lixiviadas de Matriz Delta Blue (DBA; como se describe en el documento WO 96/37515): Fragmento de Colorante (DAAS) no superior (preferentemente inferior) a 0,1 μ g/g de proteína, base de colorante no superior (preferentemente inferior) a 0,1 μ g/g de proteína, y Colorante + espaciador no superior (preferentemente inferior) a 0,4 μ g/g de proteína, por ejemplo cada uno como se determina mediante RP-HPLC;

(xv) Fracción lixiviada de aminofenilboronato (PBA) no superior (preferentemente inferior) a 0,18 μ g/g de proteína como se determina por RP-HPLC;

(xvi) Contenido de octanoato en el intervalo de aproximadamente 28,8 mM a aproximadamente 35,2 mM, por

ejemplo como se determina mediante cromatografía de gases; y/o

(xvi) Contenido de Polisorbato 80 en el intervalo de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 20 mg/l, por ejemplo como se determina mediante SEC-HPLC.

De acuerdo con una segunda realización particularmente preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto Recombumin® Alpha (anteriormente Albucult®) disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, y que puede comprender, consistir básicamente en, o consistir en los siguientes componentes:

i. Albúmina recombinante humana obtenida a partir de levadura como principio "Activo". Por ejemplo, la levadura obtenida a partir de albúmina humana recombinante obtenida a partir de levadura puede estar presente en la preparación a una concentración de aproximadamente 10 a 400 g/l, tal como aproximadamente 20, 30, 40 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 g/l.

ii. Sodio (por ejemplo, añadido en forma de NaCl) para ajustar la tonicidad. El sodio puede estar presente, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 145 mM, $\pm$ 100 mM, 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM, 10 mM, o 5 mM.

iii. Octanoato como agente estabilizante. El octanoato puede estar presente, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,8 mM por 10 g/l de concentración de albúmina humana recombinante obtenida a partir de levadura, por ejemplo, aproximadamente 8 mM para una preparación de 100 g/l y aproximadamente 16 mM para una preparación de 200 g/l. En este contexto, el término "aproximadamente" pretende significar $\pm$ 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mM del valor indicado.

iv. Polisorbato 80 como agente estabilizante, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 50 mg/l para una concentración de albúmina recombinante humana de 100 g/l, o ajustado proporcionalmente para otras concentraciones de albúmina humana recombinante. En este contexto, el término "aproximadamente" pretende significar que se añaden aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/l de polisorbato 80 por 10 g/l de concentración de albúmina humana recombinante.

v. Agua como diluyente/vehículo.

Además, o alternativamente, de acuerdo con la segunda realización preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto Recombumin® Alpha (anteriormente Albucult®) disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, y se puede caracterizar por una o más (tal como todas) las siguientes características:

(i) Un análisis de masa de la albúmina humana recombinante que muestra una masa teórica $\pm$ 20 Da (66418 a 66458);

(ii) Contenido de endotoxina no superior (preferentemente inferior) a 0,50 EU/ml, por ejemplo como se determina mediante el ensayo LAL;

(iii) Esterilidad que satisface los requisitos del ensayo USP<71>;

(iv) pH de 6,4-7,4, por ejemplo como se determina con un método de control de calidad convencional;

(v) una pureza de proteína de al menos (preferentemente superior a) un 99,0 % (p/p), por ejemplo como se determina mediante PAGE nativa;

(vi) contenido de polímero de albúmina no superior (preferentemente inferior) a un 1,0 % (p/p), por ejemplo como se determina mediante GP HPLC;

(vii) un contenido de sodio de 120-160 mM, por ejemplo como se determina mediante espectroscopía de absorción atómica;

(viii) una apariencia, en un vial de vidrio antes de la adición al medio de criopreservación y/o almacenamiento, que está libre de defectos, que contiene una solución ligeramente viscosa, de color pajizo claro a ámbar prácticamente libre de contaminación visible, por ejemplo como se determina mediante inspección visual;

(ix) contenido de proteína de célula huésped no superior (preferentemente inferior) a menos de aproximadamente 200 ng o 150 ng de proteína de célula huésped por gramo de albúmina medido mediante ELISA, por ejemplo, YA53M inferior o igual a aproximadamente 15 ng/g de albúmina y/o YA53H inferior o igual a aproximadamente 150 ng/g de albúmina; y/o

(x) Especies de unión a Con A de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura no superior (preferentemente inferior) a un 0,30 % (p/p) de proteína, por ejemplo como se determina mediante Cromatografía de Con A.

De acuerdo con una tercera realización, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto AlbiX® disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, que puede comprender, consistir básicamente en, o consistir en proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, un disolvente, cationes a una concentración de al menos 175 mM, que tiene un pH de aproximadamente un 5,0 a aproximadamente un 9,0 y en la que la preparación comprende una concentración de octanoato igual o inferior a 30 mM.

Es preferente que la preparación de la tercera realización contenga aniones para equilibrar los cationes.

El disolvente en la preparación de la tercera realización puede ser un disolvente inorgánico tal como agua o un tampón inorgánico tal como un tampón fosfato tal como fosfato sódico, fosfato potásico, o un tampón orgánico tal como acetato sódico o citrato sódico. El tampón puede estabilizar el pH. El fosfato sódico (por ejemplo, NaH_2PO_4) es un tampón de pH preferente, tal como pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0.

La preparación de la tercera realización comprende niveles bajos de octanoato. Por ejemplo, es preferente que la preparación comprenda una concentración de octanoato inferior a 30 mM, más preferentemente una concentración de octanoato inferior a aproximadamente 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 15, 14, 12, 10, 8 mM, incluso más preferentemente una concentración de octanoato inferior a aproximadamente 6, 5, 4, 3 mM, lo más preferentemente una concentración de octanoato inferior a aproximadamente 2, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,01, o 0,001 mM. es preferente que la preparación esté básicamente libre de octanoato. Lo más preferentemente la preparación está libre de octanoato (0 mM octanoato).

A continuación se proporcionan parámetros preferentes para ácidos grasos en la preparación de la tercera realización. El contenido de ácido graso es preferentemente un promedio de múltiples muestras, por ejemplo 2, 3, 4 o 5 muestras:

Ácido Graso	Intervalo preferente (mM)
C6:0	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C8:0	$\leq 2,5$ mM, más preferentemente $\leq 0,23$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C9:0	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C10:0	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C11:0	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C12:0	$\leq 0,5$ mM, más preferentemente $\leq 0,05$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C13:0	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C14:0	≤ 10 mM, más preferentemente $1 \leq$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C14:1	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C15:0	$\leq 0,4$ mM, más preferentemente $\leq 0,04$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C15:1	$\leq 0,1$, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C16:0	≤ 34 mM, más preferentemente $\leq 3,38$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C16:1n7	$\leq 0,9$ mM, más preferentemente $\leq 0,09$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C16:2n4	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C16:3n4	$\leq 0,5$ mM, más preferentemente $\leq 0,05$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C17:0	$\leq 0,5$ mM, más preferentemente $\leq 0,05$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C17:1	$\leq 0,1$, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:0	≤ 20 mM, más preferentemente $\leq 2,05$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:1n7	$\leq 0,2$ mM, más preferentemente $\leq 0,02$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:1n9c	≤ 8 mM, más preferentemente $\leq 0,8$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:1n9t	$\leq 1,7$ mM, más preferentemente $\leq 0,17$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:2n6c	$\leq 4,2$ mM, más preferentemente $\leq 0,42$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:2n6t	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:3n3	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C18:4n3	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C19:0	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C20:0	≤ 6 mM, más preferentemente $\leq 0,6$ mM, lo más preferentemente 0 mM
C20:1n9	$\leq 0,1$ mM, más preferentemente $\leq 0,01$ mM, lo más preferentemente 0 mM

C20:2n6	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM
C20:3n3	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM
C20:3n6	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM
C20:4n6	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM
C20:5n3	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM
C22:0	≤ 5,7 mM, más preferentemente ≤ 0,57 mM, lo más preferentemente 0 mM
C22:1n11	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM
C22:1n9	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM
C22:2n6	≤ 0,1 mM, más preferentemente ≤ 0,01 mM, lo más preferentemente 0 mM

También es preferente que el contenido global de ácido graso de la preparación de la tercera realización sea inferior o igual a 35 mM, 32,5 mM, 30 mM, 28 mM, 26 mM, 24 mM, 22 mM, 20 mM, más preferentemente inferior o igual a 15, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 mM. Es más preferente que la composición esté básicamente libre de ácidos grasos, más preferentemente libre de ácidos grasos.

Un perfil de ácido graso y un perfil de iones metálicos de una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización que comprende 100 g.l⁻¹ de albúmina, octanoato ≤ 1 mM, Na⁺ 250 mM y tiene un pH de aproximadamente 6,5 se proporcionan en las Figuras 9 y 10, respectivamente. Estos son perfiles particularmente preferentes de una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización. La preparación de albúmina puede satisfacer uno o ambos perfiles de la Figura 9 y la Figura 10.

Es preferente que los cationes estén presentes en la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de la levadura de la tercera realización en al menos aproximadamente 175 mM, por ejemplo de al menos aproximadamente 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 mM. Las concentraciones máximas de cationes preferentes incluyen 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275 y 250 mM. Las concentraciones de cationes preferentes incluyen de 200 a 500 mM. más preferente es una concentración de cationes de aproximadamente 200 a 350 mM. lo más preferente es una concentración de cationes de aproximadamente 250 mM.

El pH de una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización puede estar entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 9,0, por ejemplo de aproximadamente 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25, 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25, u 8,5 a aproximadamente un 5,5, 5,75, 6,0, 6,25, 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25, 8,5, 8,75 o 9,0. es preferente que el pH sea de aproximadamente 5,0 a 8,0, tal como de aproximadamente 6,0 a aproximadamente un 8,0, más preferentemente de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0 o 6,0 a 6,5. el pH más preferente es de aproximadamente 6,5.

Los cationes de una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización pueden ser proporcionados por cualquier catión y pueden ser proporcionados por una o más (varias) clases o especies como se describe a continuación. Por ejemplo, los cationes pueden ser mono o divalentes, monoatómicos o poliatómicos y pueden ser proporcionados por uno o más (varios) de un metal alcalino (tal como sodio, potasio), un metal alcalinotérreo (tal como calcio, magnesio) o amonio. Es preferente que los cationes sean proporcionados por sodio y/o potasio y/o magnesio, lo más preferentemente sodio o magnesio.

Se pueden proporcionar cationes a una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización mediante una sal de un ácido inorgánico (por ejemplo, un metal del grupo 1 o 2 de o sal de amonio tal como cloruro sódico), una sal de un ácido divalente (por ejemplo, un metal del grupo 1 o grupo 2 o sulfato o fosfato de amonio tal como sulfato sódico) o una sal de un ácido orgánico (por ejemplo, un metal del grupo 1 o grupo 2 o sal de amonio de acetato o citrato tal como acetato sódico).

Los cationes y aniones usados para estabilizar la albúmina en una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización pueden ser proporcionados por (i) sales y/o (ii) tampones de pH tal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, puede haber más de una (varias) especies de cationes o aniones, tal como 2 o 3 especies. Puede haber más de una (varias) fuente de un solo catión, por ejemplo Na, que puede ser proporcionado por un tampón de pH (tal como fosfato sódico) y una sal (tal como NaCl).

Los aniones útiles para una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización incluyen aniones inorgánicos tal como fosfato, y haluros tal como cloruro, y aniones orgánicos tal como acetato y citrato. Los aniones pueden ser mono o divalentes, monoatómicos o poliatómicos. Los aniones referentes incluyen sulfato, acetato fosfato y cloruro, en particular cloruro, sulfato y acetato.

Por lo tanto, una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización puede comprender uno o más (varios) de un fosfato o cloruro de metal alcalino (tal como fosfato sódico, fosfato potásico, cloruro sódico o cloruro potásico), un fosfato de metal alcalinotérreo (tal como fosfato cálcico, fosfato de magnesio, cloruro cálcico, cloruro de magnesio) o fosfato de amonio o cloruro de amonio.

La preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización puede tener una fuerza iónica global de al menos 175 mmol.l⁻¹. Por ejemplo, de aproximadamente un 175 to 1000 mmol.l⁻¹ tal como de aproximadamente un 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 mmol.l⁻¹ a aproximadamente 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250 mmol.l⁻¹. Es más preferente una fuerza iónica global de aproximadamente 200 a 350 mmol.l⁻¹. La más preferente es una fuerza iónica de aproximadamente 250 mmol.l⁻¹.

Es preferente que una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización comprenda menos de 20 mg.l⁻¹ detergente (por ejemplo, polisorbato 80), preferentemente menos de un 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,01, 0,001 mg.l⁻¹ detergente (por ejemplo, polisorbato 80). Incluso más preferentemente, la preparación está básicamente libre de detergente (por ejemplo, polisorbato 80). Lo más preferentemente la preparación está libre de detergente (por ejemplo, polisorbato 80). Los niveles de detergente (por ejemplo, polisorbato 80) se pueden evaluar mediante técnicas conocidas por la persona con experiencia por ejemplo, pero no limitadas a, el ensayo que se desvela en el documento WO 2004/099234.

La preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización puede ser una composición de albúmina que tiene niveles bajos de aminoácidos (por ejemplo, N-acetil triptófano), está básicamente libre de aminoácidos (por ejemplo, N-acetil triptófano) o está libre de aminoácidos (por ejemplo, N-acetil triptófano). Puede ser preferente que la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización comprenda una concentración de aminoácidos inferior a 5 mM (por ejemplo, N-acetil triptófano), preferentemente una concentración de aminoácidos inferior a 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,01, 0,005, 0,001 mM (por ejemplo, N-acetil triptófano). Incluso más preferentemente, la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización está básicamente libre de aminoácidos (por ejemplo, N-acetil triptófano). Lo más preferentemente la preparación está libre de aminoácidos (por ejemplo, N-acetil triptófano).

Es incluso más preferente que la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización esté básicamente libre de, o completamente libre de, octanoato, aminoácidos (por ejemplo, N-acetil triptófano) y detergente (por ejemplo, polisorbato 80).

Es preferente que la estabilidad de la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización sea mayor que la de la albúmina equivalente en agua o en Na 150 mM. Un método para comparar la estabilidad, en particular relacionado con la formación de agregados insolubles de albúmina, es:

- i) colocar una alícuota (por ejemplo, 1 ml) de la preparación de albúmina en una cubeta (por ejemplo, una cubeta de poliestireno, tal como Sarstedt 10 x 4 x 45 mm);
- ii) colocar la cubeta en un espectrofotómetro de temperatura controlada que se ha equilibrado previamente y controlado a una temperatura deseada, por ejemplo, 65 °C;
- iii) Monitorizar / medir la absorbancia de la composición a 350 nm, haciendo referencia a una cubeta vacía durante un periodo de tiempo deseado (por ejemplo, 2 horas) tomando una lectura a intervalos definidos (por ejemplo, cada 18 segundos)
- iv) Procesar los datos tomando los primeros puntos de datos (por ejemplo, siete), hacer el promedio de las lecturas de puntos de datos y restar este punto de datos de todos los puntos de datos para proporcionar valores de absorbancia base de aproximadamente 0.
- v) Determinar y/o registrar el tiempo necesario para que los valores de absorbancia procesados aumenten en 0,1 UA (Unidades de Absorbancia) por encima de esta medida inicial.

Es preferente que el análisis de estabilidad se realice por duplicado.

Es preferente que la estabilidad de la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización sea suficientemente elevada para que el tiempo necesario para que la absorbancia medida aumente en 0,1 UA por encima de la medida inicial (de acuerdo con el ensayo descrito anteriormente llevado a cabo a 65 °C), en comparación con una solución de control de albúmina a la misma concentración en un disolvente como Na 150 mM o agua y medido en las mismas condiciones es al menos un 10 % mejor. Es mas preferente que la estabilidad sea al menos un 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o un 100 % mejor.

Un ensayo de estabilidad alternativo o adicional, en particular para la formación de agregados solubles de albúmina, es monitorizar la formación de polímero de albúmina soluble por GP-HPLC a lo largo del tiempo a una temperatura establecida. Una estudio de estabilidad adecuado con medición por GP HPLC incluye:

- i) Colocar 10 ml de forma estéril (por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm) de cada

muestra que se va a investigar en viales estériles (por ejemplo, viales de vidrio de 10 ml horneados) que a continuación se tapan (por ejemplo, con un sello de goma de butilo estéril y opcionalmente sobresellado).

ii) A continuación se toma una muestra a T0 de ~200 µl y el vial se incuba a una temperatura especificada (por ejemplo, se coloca en un baño de agua que se ajusta a una temperatura especificada (por ejemplo, a 40 °C)).

iii) A continuación se toman muestras (~200 µl) de cada uno de los viales después de ciertos puntos temporales (por ejemplo, 14 días).

iv) inyectar una alícuota (por ejemplo, 25 µl) de la muestra de albúmina extraída del vial ($a < 50$ mg/ml) en una columna de GP-HPLC (por ejemplo, columna TSK G3000SWXL de 7,8 mm de id x 300 mm de longitud, (Tosoh Bioscience), con una columna de protección TSK SW con una longitud de 6,0 mm de id x 40 mm de longitud (Tosoh Bioscience));

v) cromatografiar la alícuota en un tampón adecuado (por ejemplo, fosfato sódico 25 mM, sulfato sódico 100 mM, azida sódica al 0,05 % (p/v), pH 7,0) a una velocidad adecuada (por ejemplo, 1 ml/min)

vi) monitorizar el procedimiento de cromatografía, por ejemplo, mediante detección de UV a 280 nm;

vii) cuantificar uno o más (varios), o todos, de monómero, dímero, trímero y contenido de polímero de la alícuota como % (p/p) identificando su área de pico respectiva en relación con el área de pico total.

Es preferente que el ensayo se realice por triplicado.

Por lo tanto, la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización tiene preferentemente estabilidad como se define en uno o ambos de los ensayos mencionados anteriormente.

Una preparación preferente de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura de la tercera realización comprende de 50 a 250 g.l⁻¹ de proteína de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura, Na⁺ de 200 a 300 mM (por ejemplo, Na⁺ de 225 a 275 mM), fosfato de 20 a 30 mM, comprende una concentración de octanoato inferior a 2 mM y tiene un pH entre aproximadamente 6,0 y 7,0 (por ejemplo, aproximadamente pH 6,5). Una preparación particularmente preferente comprende 50 a 150 g.l⁻¹ de proteína de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura, Na⁺ de 225 a 275 mM, fosfato de 20 a 30 mM, comprende una concentración de octanoato inferior a 1 mM y tiene un pH de aproximadamente 6,5.

De acuerdo con la tercera realización particularmente preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto AlblX® disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, y puede comprender, consistir básicamente en, o consistir en los siguientes componentes:

i. Albúmina recombinante humana obtenida a partir de levadura como principio "Activo". Por ejemplo, la levadura obtenida a partir de albúmina humana recombinante obtenida a partir de levadura puede estar presente en la preparación a una concentración de aproximadamente 10 a 400 g/l, tal como aproximadamente 20, 30, 40 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 g/l.

ii. Sodio (por ejemplo, añadido en forma de NaCl) para ajustar la tonicidad. El sodio puede estar presente, por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 150 mM, más habitualmente de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 mM.

iii. Agua o tampón como diluyente/vehículo.

iv. Está básicamente libre de, o completamente libre de, octanoato, aminoácidos (por ejemplo, N-acetil triptófano) y detergente (por ejemplo, polisorbato 80).

Además, o alternativamente, de acuerdo con la tercera realización preferente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (lo más preferentemente obtenida a partir de expresión de ADN recombinante en *Saccharomyces cerevisiae*) es el producto AlblX® disponible en el mercado en Albumedix Ltd., o una preparación que es similar a esta, y se puede caracterizar por una o más (tal como todas) las siguientes características:

(i) Una pureza de proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura de al menos (preferentemente superior a) un 99,0 % (p/p), por ejemplo como se determina mediante PAGE nativa;

(ii) Contenido de endotoxina no superior (preferentemente inferior) a 0,50 EU/ml, y más preferentemente no superior (preferentemente inferior) a 0,01 EU/mg de proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, por ejemplo como se determina mediante el ensayo USP <85>;

(iii) pH de 6,0-7,0, por ejemplo como se determina mediante el ensayo USP <791>;

(iv) un contenido de sodio de 200-300 mM, por ejemplo como se determina mediante espectroscopía de absorción atómica;

(v) una apariencia que es una solución de color pajizo pálido a ámbar, transparente, por ejemplo como se determina mediante inspección visual;

(vi) Especies de unión a Con A de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura no superior (preferentemente inferior) a un 0,30 % (p/p) de proteína, por ejemplo como se determina mediante Cromatografía de Con A.

Para evitar las dudas, la expresión 'preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura'

como se usa en el presente documento excluye específicamente productos de albúmina obtenidos a partir de plasma. También excluye específicamente productos de albúmina recombinante obtenidos a partir de fuentes distintas a la levadura, tal como mediante expresión recombinante en plantas.

5 Históricamente, la forma clásica de obtener albúmina humana para la fabricación de preparaciones de albúmina de suero ha sido purificarla a partir de sangre humana, creando de ese modo una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma. La albúmina humana obtenida a partir de plasma en Estados Unidos se rige por el Título 21 del Código de Regulaciones Federales (CFR), alimentos y fármacos, Capítulo I departamento de administración de alimentos y fármacos de los servicios de salud y humanos, Subcapítulo F Biologías, Parte 640 de estándares adicionales para productos de sangre humana y de sangre, Subparte H Albúmina (Human), Secciones 640.80 a 86. Este estándar tiene muy pocos requisitos, pero especifica, por ejemplo, que (i) la formulación debe contener $0,08 \pm 0,016$ milimoles de caprilato sódico (es decir, octanoato sódico), o $0,08 \pm 0,016$ milimoles de acetiltriptofanato sódico y $0,08 \pm 0,016$ milimoles de caprilato sódico por gramo de proteína, presente como estabilizador(es); (ii) la formulación debe tratarse térmicamente mediante calentamiento continuo durante no menos de 10 o más de 11 horas, a una temperatura alcanzada de $60 \pm 0,5$ grados C; (iii) la composición proteica será de al menos un 96 % de albúmina de la proteína total en el producto final; (iv) el pH será $6,9 \pm 0,5$ cuando se mide en una solución del producto final diluido a una concentración de proteína al 1 por ciento con cloruro sódico 0,15 molar; (v) la concentración de sodio del producto final será de 130 a 160 miliequivalentes por litro; (vi) la concentración de potasio del producto final no excederá de 2 miliequivalentes por litro; (vii) deberá demostrar estabilidad al calor, como se indica cuando una muestra final del recipiente permanece sin cambios, como se determina mediante inspección visual, después de calentar a 57 grados C durante 50 horas, en comparación con su control que consiste en una muestra, del mismo lote, que no ha sufrido este calentamiento.

La Farmacopea de Estados Unidos (USP) se refiere a la entrada de CFR mencionada anteriormente como la base de sus requisitos, y se refiere al producto como una preparación estéril, no pirogénica de albúmina de suero obtenida por fraccionamiento de material (fuente de sangre, plasma, suero o placentas) de donantes humanos sanos, el material fuente que se está sometiendo a ensayo para detectar la ausencia de antígeno de superficie de hepatitis B. Se afirma que contiene acetiltriptofanato sódico con o sin caprilato sódico como agente estabilizante, y un contenido de sodio no inferior a 130 mEq por l y no más de 160 mEq por l. Se afirma que posee un contenido de hemo tal que la absorbancia de una solución, diluida para contener el 1 por ciento de proteína, en una celda de retención de 1 cm, medida a una longitud de onda de 403 nm, no es superior a 0,25.

La monografía de la Farmacopea Europea (EP) 0255 describe soluciones de albúmina humana como una solución acuosa de proteína obtenida a partir del plasma que cumple con los requisitos de la monografía sobre plasma para fraccionamiento, humano (0853). Se especifica que contiene un estabilizador adecuado frente a los efectos del calor, tal como caprilato sódico (octanoato sódico) o N-acetiltriptófano o una combinación de estos dos. Especifica que la preparación se produce mediante un método que implica que la preparación se pase a través de un filtro de retención de bacterias y se distribuya asépticamente en recipientes estériles que a continuación se cierran para evitar la contaminación; en donde después la solución en su recipiente final se calienta a $60 \pm 1,0$ °C y se mantiene a esta temperatura durante no menos de 10 h. A continuación, los recipientes se incuban a 30-32 °C durante menos de 14 días o a 20-25 °C durante menos de 4 semanas y se examinan visualmente en busca de evidencia de contaminación microbiana.

En todos los casos está permitido por CFR, USP y EP para preparaciones de albúmina de suero obtenidas a partir de plasma mostrarla presencia de pequeñas cantidades de otras proteínas plasmáticas y otros contaminantes. Por ejemplo, las preparaciones de albúmina de suero obtenida a partir de plasma habitualmente contienen:

- Hasta un 4 %, o un 5 % de proteína obtenida a partir de fuente que es distinta de la albúmina humana monomérica.
- Contenido de hemo que no es superior a 0,15 (como se determina mediante el método que sigue a continuación),
- Contenido de activador de precalicreína hasta un máximo de 35 IU/ml,
- Aluminio hasta un máximo de 200 µg de Al por litro,
- Potasio hasta un máximo de 0,05 mmoles de K por gramo de proteína, y
- Sodio: máximo 160 mmoles de Na por litro.

El contenido de hemo en una preparación de albúmina se puede someter a ensayo usando el siguiente método. Diluir la preparación que se va a examinar usando una solución de 9 g/l de cloruro sódico R para obtener una solución que contenga 10 g/l de proteína. La absorbancia de la solución se midió a 403 nm usando agua R como líquido de compensación.

El contenido de aluminio en una preparación de albúmina se puede someter a ensayo usando el siguiente método. Espectrometría de absorción atómica: usar un horno como generador atómico. Usar recipientes de plástico para la preparación de las soluciones. Lavar el equipo en ácido nítrico (200 g/l de HNO₃) antes de usar. Solución de ensayo: usar la preparación que se va a examinar. Solución de validación: utilizar albúmina humana para la validación de aluminio BRP. Soluciones de referencia: Preparar una gama adecuada de soluciones de referencia añadiendo

volúmenes adecuados de solución patrón de aluminio (10 ppm de Al) R a volúmenes conocidos de agua R. Diluir las soluciones según sea necesario usando ácido nítrico (10 g/l de HNO₃) que contiene 1,7 g/l de nitrato de magnesio R y un 0,05 por ciento V/V de octoxinol 10 R. Medir la absorbancia a 309,3 nm. El ensayo es válido si el contenido de aluminio determinado para la albúmina humana para la validación de aluminio BRP está dentro de un 20 por ciento del valor indicado en el folleto que acompaña a la preparación de referencia.

El contenido de potasio en una preparación de albúmina se puede someter a ensayo usando espectrometría de emisión atómica, longitud de onda: 766,5 nm.

El contenido de sodio en una preparación de albúmina se puede someter a ensayo usando espectrometría de emisión atómica, longitud de onda: 589 nm.

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, está "libre de suero". Es decir, la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura no contiene suero (por ejemplo, suero humano, suero bovino fetal (FBS), suero de caballo, suero de cabra o cualquier otro suero obtenido a partir de animales conocido por un experto en la materia). La preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura estará, por lo tanto, totalmente libre de contaminantes obtenidos a partir del suero, ya que ninguno está presente en el material de partida.

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, está libre de componentes obtenidos específicamente a partir del material fuente usado en la preparación de albúmina de suero a partir de fuentes biológicas naturales de albúmina de suero, tal como sangre, plasma, suero o placentas. Los componentes obtenidos específicamente a partir del material fuente incluyen hemo, activador de precalicreína y/u otras albúminas, péptidos o aminoácidos no proteicos obtenidos a partir de fuentes biológicas naturales de albúmina de suero, sangre, plasma, suero o placentas. Las preparaciones de albúmina de suero a partir de fuentes biológicas naturales de albúmina de suero, sangre, plasma, suero o placentas también pueden contener pirógenos y/o endotoxina. También pueden contener agentes infecciosos, tal como virus (incluyendo la hepatitis C), que pueden causar enfermedades. Aunque habitualmente, el riesgo de que dichos productos transmitan un agente infeccioso se ha reducido al examinar a los donantes de plasma para la exposición previa a ciertos virus, al analizar la presencia de ciertas infecciones virales actuales y al inactivar y/o eliminar ciertos virus, a pesar de estas medidas, tales productos aún pueden transmitir enfermedades potencialmente. También existe la posibilidad de que en dichos productos puedan estar presentes agentes infecciosos desconocidos.

Por el contrario, por ejemplo, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, puede estar libre de hemo, mientras que el hemo se detectará en una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma, por ejemplo cuando se somete a ensayo mediante la absorbancia de una solución, diluida para que contenga un 1 por ciento de proteína, en una celda de retención de 1 cm, medida a una longitud de onda de 403 nm.

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, puede estar libre de activador de precalicreína, mientras que el activador de precalicreína se detectará en una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma.

Los pirógenos se pueden detectar en una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma, mientras que los pirógenos están habitualmente a niveles mucho menores en la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, para su uso en la presente invención.

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, así como medios (por ejemplo, medios de criopreservación y/o medios de almacenamiento) preparados a partir de la misma y usados de acuerdo con la presente invención, puede estar libre de virus humanos (incluyendo la hepatitis C), mientras que los virus humanos (incluyendo la hepatitis C) se pueden detectar en una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma.

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, así como medios (por ejemplo, medios de criopreservación y/o medios de almacenamiento) preparados a partir de la misma y usados de acuerdo con la presente invención, puede comprender niveles bajos de octanoato. Por ejemplo, puede ser preferente que la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura comprenda una concentración de octanoato inferior a 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,009, 0,008, 0,007, 0,006, 0,005, 0,04, 0,003, 0,002, o 0,001 mM, esté básicamente libre de octanoato, o esté libre de octanoato (octanoato 0 mM). Por el contrario, las preparaciones de albúmina de suero obtenida a partir de plasma habitualmente contienen $0,08 \pm 0,016$ milimoles de caprilato sódico por gramo de proteína (para una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma al 20 % en p/v, esto corresponde a una concentración de caprilato sódico de $16 \text{ mM} \pm 3,2 \text{ mM}$; para una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma al 4 % en p/v, esto corresponde a una concentración de caprilato sódico de $3,2 \text{ mM} \pm 0,64 \text{ mM}$).

La proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y su preparación, así como medios (por ejemplo, medios de criopreservación y/o medios de almacenamiento) preparados a partir de la misma y usados de acuerdo con la presente invención, puede comprender niveles bajos de N-acetil triptófano. Por ejemplo, puede ser preferente que la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura comprenda una concentración de N-acetil triptófano inferior a 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,009, 0,008, 0,007, 0,006, 0,005, 0,04, 0,003, 0,002, o 0,001 mM, esté básicamente libre de N-acetil triptófano, o esté libre de N-acetil triptófano (0 mM N-acetil triptófano). Por el contrario, las preparaciones de albúmina de suero obtenida a partir de plasma habitualmente contienen $0,08 \pm 0,016$ milimoles de N-acetil triptófano por gramos de proteína (para una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma al 20 % en p/v, esto corresponde a una concentración de N-acetil triptófano de $16 \text{ mM} \pm 3,2 \text{ mM}$; para una preparación de albúmina de suero obtenida a partir de plasma al 4 % en p/v, esto corresponde a una concentración de N-acetil triptófano de $3,2 \text{ mM} \pm 0,64 \text{ mM}$).

Es incluso más preferente que una preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura para su uso de acuerdo con la presente invención, así como medios (por ejemplo, medios de criopreservación y/o medios de almacenamiento) preparada a partir de la misma y usada de acuerdo con la presente invención, éste básicamente libre de, o completamente libre de, octanoato y N-acetil triptófano.

Además, habitualmente, la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada en la formación del medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento de acuerdo con la presente invención, así como medios (por ejemplo, medios de criopreservación y/o medios de almacenamiento) preparada a partir de la misma y usada de acuerdo con la presente invención, tiene una concentración de aluminio inferior a $200 \mu\text{g.l}^{-1}$, tal como menos de un $180 \mu\text{g.l}^{-1}$, $160 \mu\text{g.l}^{-1}$, $140 \mu\text{g.l}^{-1}$, $120 \mu\text{g.l}^{-1}$, $100 \mu\text{g.l}^{-1}$, $90 \mu\text{g.l}^{-1}$, $80 \mu\text{g.l}^{-1}$, $70 \mu\text{g.l}^{-1}$, $60 \mu\text{g.l}^{-1}$, $50 \mu\text{g.l}^{-1}$, o $40 \mu\text{g.l}^{-1}$, más habitualmente dentro del intervalo de aproximadamente $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ a aproximadamente un $30 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Por lo tanto, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura para su uso en la presente invención son físicamente distintas de las composiciones de albúmina de suero obtenidas a partir de fuentes biológicas de origen natural de albúmina de suero, tal como sangre, plasma, suero o placentas.

Las preparaciones de albúmina de suero obtenida a partir de levadura recombinante para su uso en la presente invención también son físicamente distintas de las composiciones de albúmina de suero obtenidas a partir de otras fuentes (por ejemplo, por expresión recombinante en plantas). Al menos en parte, eso se debe a que, en comparación con la albúmina de suero obtenida a partir de otras fuentes, la proteína de albúmina en la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está relativamente desprovista de cambios y alteraciones impuestas a la proteína por la fuente.

Por ejemplo, se sabe que las preparaciones de albúmina de suero obtenidas a partir de plasma, y las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenidas a partir de plantas habitualmente pierden uno, o más comúnmente dos, aminoácidos N-terminales de la proteína de albúmina. Sin quedar unidos a la teoría, se cree que esto se debe al uso de calentamiento en los procesos de producción usados en la producción de preparaciones de albúmina de suero obtenidas a partir de plasma y preparaciones de albúmina de suero obtenidas a partir de plantas recombinantes. Por el contrario, la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura habitualmente tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal intacta. Por lo tanto, puede ser preferente que la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y sus preparaciones, para su uso en la presente invención tenga una secuencia N-terminal intacta o básicamente intacta. En este sentido, se puede definir que una proteína tiene una secuencia N-terminal intacta si no se observa una pérdida N-terminal cuando se somete al ensayo usando espectrometría de masa intacta con un nivel de cuantificación de un 1,5 %.

Además, los datos del Ejemplo 5 demuestran claras diferencias físicas en la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas.

Más particularmente, como se muestra en el Ejemplo 5, el perfil de espectrometría de masas de preparaciones de albúmina de suero obtenidas a partir de levadura demuestra una sola especie a aproximadamente 66,4 kDa que es representativa de la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que comprende predominantemente una molécula de albúmina de suero humano intacta nativa, con un resto de Cys34 reducido. Como se muestra en la Figura 1 de la presente solicitud, todas las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura sometidas a ensayo mediante espectrometría de masa intacta demostraron un pico principal único a aproximadamente 66,4 kDa que es representativo de la molécula de albúmina de suero humano intacta nativa, y niveles muy bajos de cualquier otro pico. Por el contrario, las dos preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenidas a partir de plantas sometidas a ensayo demostraron altos números de picos distintos del pico principal a aproximadamente 66,4 kDa que es representativo de la molécula de albúmina de suero humano intacta nativa.

Por lo tanto, puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de

levadura usada de acuerdo con la presente invención sea una preparación que, cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de masas, es un producto que (en comparación con la proteína de albúmina de suero obtenida a partir de plantas, tal como las muestras que se presentan en la Figura 1) presenta básicamente menos picos (tal como inferior a un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, un 5 % o inferior) distintos al pico principal a aproximadamente 66,4 kDa que es representativo de la molécula de albúmina de suero humano intacta nativa.

Además, como se muestra en el Ejemplo 5, diferentes productos de albúmina de suero recombinante demuestran diferentes niveles de pigmentación. Las imágenes presentadas en la Figura 3 demuestran que Recombumin® Prime y Recombumin® Alpha son los productos menos pigmentados evaluados; con ambos productos teniendo un color claro/pajizo. Los productos alternativos mostraron niveles crecientes de pigmentación con la albúmina del Proveedor 1, un producto derivado del arroz, que muestra la mayor pigmentación y el producto final tiene un color naranja/ámbar.

Por lo tanto, puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada de acuerdo con la presente invención sea una preparación que tiene muy poca pigmentación para que presente un color naranja/ámbar, y lo más preferente es un color claro, pajizo o de pajizo a ámbar.

Además, como se muestra en el Ejemplo 5, las preparaciones de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura comprenden proteína de albúmina que tiene un contenido de grupo tiol libre notablemente mayor que las preparaciones de albúmina recombinante obtenidas a partir de plantas. Por lo tanto, puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura comprenda proteína de albúmina que tenga un contenido de grupo tiol libre (específicamente, en Cys34) que sea superior a un 62 %, tal como al menos un 69 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %. En la práctica, el contenido del grupo tiol libre puede ser de aproximadamente un 85 % poco aproximadamente un 97 %. El término "aproximadamente" en este contexto pretende incluir opcionalmente ± 3 , 2, o 1 %.

Además, Frahm *et al.*, 2014, PLOS One, 9 (1): e109893 informaron un estudio en el que las propiedades de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se compararon con los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas y de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas. Específicamente:

- los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura sometidos a ensayo fueron Recombumin® Alpha (anteriormente Albucult®) y Recombumin® Prime (anteriormente Recombumin®) disponibles en el mercado en Albumedix Ltd., que se expresan en *Saccharomyces cerevisiae*, y Albagen, que se expresa en *Pichia pastoris* y se adquirió en Sigma-Aldrich – fueron denominados por Frahm *et al.*, "ScrHSA", "Recombumin®", y "PrPHSA", respectivamente;
- los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas sometidos a ensayo fueron cuatro lotes diferentes de albúmina de suero expresada en *Orzya sativa* (arroz) de Cellastim (denominados por Frahm *et al.*, "OsrHSA-sig-C", "OsrHSA-sig-G", "Osr-sig-H" y "OsrHSA-sig-J"); y otros tres productos diferentes de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de arroz de eEnzyme LLC ("OsrHSA-phy"), ScienCell Research Laboratories ("OsrHSA-sci") y amsbio LLC (OsrHSA-ams"); y
- el producto de albúmina de suero obtenida a partir de plasma era esencialmente albúmina libre de FA de Sigma-Aldrich ("pHSA").

Frahm *et al.*, encontraron numerosas diferencias entre los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, por un lado, y los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas y de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas de otro lado.

Por ejemplo, cuando se evalúan mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), Frahm *et al.*, mostraron que los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura producían un pico único enfocado característico. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla S1: reproducida a partir de Frahm *et al.*, 2014, PLOS One, 9 (1): e109893

Muestra/Pico N.º	Tiempo de retención de pico (min)/Porcentaje de área de cromatograma							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pHSA	13,1/0,1	13,8/0,6	14,3/2,5	15,4/12,2	17,4/84,6			
Recombumin® Prime			14,3/0,2	15,4/4	17,4/95,9			
Recombumin® Alpha				15,3/0,6	17,4/99,4			
PprHSA			14,4/1,6	15,4/9,36	17,4/84,5	18,2/4,3		

OsrHSA-sig-C	13,0/0,6		14,4/5,1	15,3/14,9	17,3/66,6	18,4/8,5	19,8/1,7	20,4/2,5
OsrHSA-sig-G	13,0/1,0		14,4/3,1	15,3/12,1	17,3/69,9	18,4/9,5	19,7/1,9	20,4/2,7
OsrHSA-sig-H	12,9/1,2		14,4/0,9	15,4/6,2	17,3/80,1	18,4/7,7	19,8/1,4	20,5/1,9
OsrHSA-sig-J	12,9/1,2		14,4/0,9	15,4/6,2	17,3/80,6	18,4/7,7	19,8/1,4	20,5/1,9
OsrHSA-sci	12,9/0,5		14,3/3,7	15,4/12,7	17,4/83,1			
OsrHSA-phy	12,9/0,7	13,8/0,9	14,3/3,3	15,4/13,1	17,4/82,0			
OsrHSA-ams	12,9/0,3	13,7/0,2	14,4/1,6	15,4/9,1	17,4/88,8			

Por lo tanto, aunque todas las muestras mostraron un pico principal eluyendo a aproximadamente 17,3-17,4 minutos, solo los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura mostraron un perfil de SEC excluyendo picos correspondientes a contaminantes de alto peso molecular con un tiempo de retención de pico inferior 14 minutos y picos correspondientes a contaminantes de bajo peso molecular con un tiempo de retención máximo de 19 minutos.

Además, los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura obtenida a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y disponibles en el mercado en Albumedix Ltd. (es decir, Recombumin® Alpha y Recombumin® Prime, a los que Frahm *et al.*, denominan "ScrHSA" y "Recombumin®", respectivamente) son los únicos productos sometidos a ensayo que muestran un perfil de SEC excluyendo picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 minutos y superior a 18 minutos (de hecho, el producto ScrHSA muestra un perfil de SEC excluyendo picos con un tiempo de retención de pico inferior a 15 minutos y superior a 18 minutos). También son los únicos productos sometidos a ensayo que muestran un pico principal que representa una cantidad relativa que es superior a un 90 %.

Por lo tanto, puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada de acuerdo con la presente invención sea una preparación que, cuando se somete a ensayo mediante SEC, es un producto que presenta un perfil de SEC que excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 minutos y superior a 19 minutos, y más preferentemente excluye picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 o 15 minutos y superior a 18 minutos. también puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada de acuerdo con la presente invención sea una preparación que, cuando se somete a ensayo mediante SEC, es un producto que presenta un pico principal que representa una cantidad relativa que es superior a un 90 %, tal como superior a un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 % o al menos aproximadamente un 99,4 %.

En la definición anterior, puede ser preferente que la técnica SEC usada para dicha medición sea la metodología de Frahm *et al.*, 2014, PLOS One, 9 (1): e109893. Específicamente, el sistema de cromatografía de exclusión por tamaño puede ser un módulo de separaciones Waters Alliance 2695 equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996 (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La operación del instrumento y la adquisición y manipulación de datos se pueden llevar a cabo con Waters Empower 2 Chromatography Manager (Waters Corporation). Se puede usar una columna YMC-Pack Diol-200 (Producto* DL20S05-5008WT, YMC America, Inc., Allentown, PA, USA) con dimensiones internas de 500 x 8,0 mm a un caudal de 0,8 ml/min. La fase móvil puede contener fosfato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,15 M (pH 7,0) y los picos se pueden detectar a una longitud de onda de 214 nm.

Frahm *et al.*, informaron además que el análisis RP-HPLC mostró que HSA obtenida a partir de del plasma (es decir, "pHSA") era heterogénea y mostraba dos picos principales, 1 y 2, cada uno de los cuales había demostrado previamente que constaba de varios componentes con elución de HSA nativa como parte del pico más hidrofóbico 2. El análisis RP-HPLC de las preparaciones obtenidas a partir de levadura Recombumin® Alpha y Recombumin® Prime (denominadas por Frahm *et al.*, como "ScrHSA" y "Recombumin®", respectivamente) y PprHSA mostraron que el pico principal es el pico 2, lo que sugiere que la mayoría de HSA en las preparaciones obtenidas a partir de levadura estaba presente en formas nativas. La RP-HPLC de OsrHSA de Sigma-Aldrich mostró que el pico principal de todos los lotes era el pico 1, lo que sugiere que la mayoría de OsrHSA de origen vegetal de Sigma-Aldrich estaba presente como formas modificadas. Las otras formas de OsrHSA (OsrHSA-sci, -phy y -ams) también mostraron picos correspondientes al pico 1.

Por lo tanto, puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada de acuerdo con la presente invención sea una preparación que, cuando se somete a ensayo mediante RP-HPLC, es un producto que presenta un pico principal único, correspondiente al pico 2 de pHSA, e indicativo de que la mayoría de la albúmina de suero en la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en forma nativa.

En la definición anterior, puede ser preferente que la técnica de RP-HPLC utilizada para dicha medición sea el

método de Frahm *et al.*, 2014, PLOS One, 9 (1): e109893. Específicamente, el sistema de HPLC puede usar un cromatógrafo Waters Alliance 2695 equipado con un calentador de columna y un inyector automático con un dispositivo de enfriamiento de muestra, acoplado a un detector de matriz de fotiododo de U/V-Vis 2996 de Waters. La adquisición e integración de datos se puede realizar, por ejemplo, con el software Empower Pro de Waters. Las condiciones de separación pueden ser como se describe en Girard *et al.*, Biomed. Chromatogr., 12: 183-184. en resumen, la columna puede ser una Aquapore RP-300, C8, 7 µm, 220 x 2,1 mm de i.d. (Brownlee) y se puede mantener a 50 °C. La fase móvil A (MP A) puede consistir en ácido trifluoroacético al 0,05 % (TFA) en acetonitrilo al 10 %/agua al 90%; la fase móvil B (MP B) puede ser TFA al 0,05 % en acetonitrilo al 90 %/agua al 10 %; la fase móvil C (MP C) puede ser TFA al 0,05 % en acetonitrilo. La columna se puede equilibrar con una mezcla de MP A y MP B (70:30) hasta obtener una medida inicial estable. La elución se puede llevar a cabo usando un gradiente de múltiples etapas que consiste en MP A/MP B (70:30) durante 1 min (a 0,7 ml/min), gradiente lineal para MP A/MP B (65:35) durante 5 min (a 0,7 ml/min), gradiente lineal para MP A/ MP B (61:39) durante 19 min (a 0,7 ml/min), gradiente lineal para MP A/MP B (50:50) durante 10 min (a 0,7 ml/min), gradiente lineal para MP C durante 5 min (a 1,0 ml/min), MP C durante 12 min, gradiente lineal para MP A/MP B (70:30) durante 3 minutos. El efluente se puede controlar a 220 nm.

Frahm *et al.*, también usaron espectrometría de masas para evaluar la glicación diferencial de los restos de lisina/arginina. Los resultados mostraron un menor número de restos de lisina o arginina modificados con hexosa en todas las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura en comparación con la muestra de plasma (pHSA) y todas las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas (OsrHSA). Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 1: reproducida a partir de Frahm *et al.*, 2014, PLOS One, 9 (1): e109893

Muestra	Rendimiento de secuencia %_*	Número de Hex(K) y Hex(R) únicos identificados
pHSA	95	15
Recombunin® Prime	96	8
Recombunin® Alpha	97	5
PprHSA	96	11
OsrHSA-sig-C	95	18
OsrHSA-sig-G	95	23
OsrHSA-sig-H	96	13
OsrHSA-sig-J	95	13
OsrHSA-sci	95	23
OsrHSA-phy	95	21
OsrHSA-ams	95	17
* Excluyendo la secuencia líder.		

El solicitante indica además que, aunque Frahm *et al.*, encuentran 8 hexosas modificadas en Recombunin® Prime y 5 en Recombunin® Alpha, estas se definen en una población completa de moléculas en una preparación, y no todas se modificarán en una molécula de proteína de albúmina. Es más probable que una molécula individual de albúmina Recombunin® Prime solo tenga 1 o 2, tal vez incluso 3, pero no todos los 8 restos de K y R modificados con hexosa.

Por lo tanto, puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada de acuerdo con la presente invención sea una preparación que, cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de masas, es un producto que presenta menos de 13, más preferentemente menos de 12, 11, 10, 9, 8, 7, o 6, tal como de aproximadamente 1 a 11, de 1 a 8, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, 1 o menos de 1, restos de lisina o arginina modificados con hexosa por proteína. En la definición anterior, puede ser preferente que la técnica de espectrometría de masas usada para dicha medición sea el método de Frahm *et al.*, 2014, PLOS One, 9 (1): e109893.

En particular, Frahm *et al.*, también encontraron (Tabla S2 de la misma) que los siguientes restos rara vez se glicaban en la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, en comparación con la albúmina de suero obtenida a partir de plasma y la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas: K51; K64; K73; K137; K159; K174; K181; K225; K233; K240; K262; K466; K525; K545; y K574.

Por el contrario, Frahm *et al.*, encontraron (Tabla S2 de la misma) que los siguientes restos estaban comúnmente más glicosilados en la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, en comparación con la albúmina de suero obtenida a partir de plasma y la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas: R485; K500.

Por lo tanto, puede ser preferente que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura usada de acuerdo con la presente invención sea una preparación que muestre niveles de glicación en cualquiera, o más (tal como todos), de K51; K64; K73; K137; K159; K174; K181; K225; K233; K240; K262; K466; K525; K545; K574, R485; y/o K500 que son básicamente idénticos a los niveles observados para Recombumín® Alpha o Recombumín® Prime (denominados por Frahm *et al.*, como "ScrHSA" y "Recombumín®", respectivamente) o PprHSA, como se informa en Frahm *et al.* El nivel medido de glicación se puede basar en un promedio de múltiples muestras, tal como 2, 3, 4, 5, 10 o más.

Frahm *et al.*, concluyeron que existen claras diferencias en la glicación entre la albúmina de suero recombinante expresada en los sistemas de expresión de levadura en comparación con la albúmina de suero obtenida a partir de plasma y la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas. Se cree que la glicación se produce a través de una reacción lenta de Maillard no enzimática en la que los restos con grupos amino libres se modifican con azúcares. Se cree que hasta un 10 % de las HSA obtenidas a partir del plasma están glicosiladas en individuos sanos y hasta un 30 % en individuos con hiperglucemia. Se cree que la modificación de la hexosa de los restos de lisina y arginina en la albúmina obtenida a partir de plasma se produce durante la vida útil de circulación larga (26-31 días) de la proteína, mientras que se considera que la glicación *in vitro* de lisina y arginina requiere temperaturas y concentraciones de azúcar elevadas, así como una escala de tiempo en el orden de días o semanas. Por el contrario, la albúmina de suero recombinante expresada en levadura se secreta habitualmente durante la expresión y, posteriormente, los azúcares en los medios de crecimiento (que pueden estar en aproximadamente un 2 % de glucosa) podrían proporcionar un entorno adecuado para la glicación de la proteína secretada. Sin embargo, se ha sugerido que los mecanismos de glicación en las plantas pueden involucrar ciclos de luz/oscuridad o estrés leve para las plantas y la glicación de las proteínas vegetales no es inesperada ya que las plantas de orden superior poseen homólogos de enzimas animales que reparan los aductos de glicación temprana. Frahm *et al.*, también indicaron que la OsrHSA usada en sus experimentos se expresaba en el endospermo de *O. sativa*, que contiene hasta 19 mg de glucosa por g de peso total, y se sugirió que la presencia de este monosacárido podría permitir la glicación de la proteína durante el periodo de crecimiento de la planta (aproximadamente 30 días para la maduración del grano) y las variaciones en las condiciones de crecimiento de la planta pueden explicar la variabilidad de lote a lote observada. Además, se observó que la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas se puede glicosilar con azúcares específicos de plantas, tal como α -1,3-fucosa y/o β -1,2-xilosa. Esta puede ser una distinción física adicional entre proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas y proteína de albúmina de suero obtenida a partir de otras fuentes, tal como plasma o mediante expresión recombinante en levadura.

Detergente: los detergentes se pueden clasificar en cuatro grupos, dependiendo de la carga eléctrica: detergentes aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes no iónicos y detergentes zwitteriónicos.

Los detergentes aniónicos habituales incluyen alquilbencenosulfonatos. La parte alquilbenceno de estos aniones es lipófila y el sulfonato es hidrófilo. Los ejemplos de tipos de detergentes aniónicos incluyen dodecylbencenosulfonato sódico ramificado, dodecylbencenosulfonato sódico lineal y jabón.

Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender menos de un 0,01, preferentemente menos de un 0,001, más preferentemente menos de un 0,0001 % (p/v) de detergente aniónico.

Los detergentes catiónicos son similares a los detergentes aniónicos, con un componente hidrófobo, pero, en lugar del grupo sulfonato aniónico, los tensioactivos catiónicos tienen amonio cuaternario (es decir, grupo con carga positiva) como resto polar.

Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender menos de un 0,01, preferentemente menos de un 0,001 %, más preferentemente menos de un 0,0001 (p/v) de detergente catiónico.

Los detergentes zwitteriónicos poseen una carga neta cero que surge de la presencia de números iguales de grupos químicos con carga +1 y -1. Un ejemplo de un detergente zwitteriónico es CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato). En una realización, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden

comprender menos de un 0,001 % (p/v) de detergente zwitteriónico detergente y pueden estar básicamente libres de detergentes zwitteriónicos.

Los detergentes no iónicos se caracterizan por sus grupos principales hidrófilos sin carga. Los detergentes no iónicos habituales se basan en polioxietileno o un glucósido. Los ejemplos comunes de los primeros incluyen polisorbato 80 (por ejemplo, Tween®), 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol, t-octilfenoxipolietoxietanol (por ejemplo, Triton® X-100) y la serie Brij®. Estos materiales también se conocen como etoxilatos o PEGilatos. Los glucósidos tienen un azúcar como su grupo principal hidrófilo sin carga. Los ejemplos incluyen octil-tioglucoído y maltósidos. Los detergentes de la serie hidroxietilglucamida (HEGA) y metilglucamida (MEGA) son similares y poseen un alcohol de azúcar como grupo principal.

En una realización preferente, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender menos de un 0,01, preferentemente menos de un 0,001, más preferentemente menos de un 0,0001 % (p/v) de detergente no iónico.

Además en una realización, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender menos de un 0,01, preferentemente menos de un 0,001 %, más preferentemente menos de un 0,0001 % (p/v) de polisorbato 80 y pueden estar básicamente libres de polisorbato 80. Por ejemplo, la composición puede comprender una cantidad inferior o igual a un $3,325 \times 10^{-4}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $2,85 \times 10^{-4}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $2,375 \times 10^{-4}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $1,425 \times 10^{-4}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un 9×10^{-5} % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $6,625 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $5,7 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un 5×10^{-5} % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $4,75 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $4,5 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $4,75 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $2,85 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $2,5 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $1,9 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $1,8 \times 10^{-5}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un 1×10^{-5} % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un $9,5 \times 10^{-6}$ % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un 9×10^{-6} % (p/v) de polisorbato 80 o 20, tal como una cantidad inferior o igual a un 5×10^{-6} % (p/v) de polisorbato 80 o 20, lo más preferentemente básicamente libre de polisorbato 80 o 20. En otra realización, la composición de la presente invención comprende menos de un 0,01, preferentemente menos de un 0,001, más preferentemente menos de un 0,0001 % (p/v) de polisorbato 20 y puede estar libre de polisorbato 20. En otra realización, la composición puede comprender menos de un 0,01, preferentemente menos de un 0,001, más preferentemente menos de un 0,0001 % (p/v) de poloxámero y puede estar libre de poloxámero.

En una realización, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender de un 0,001, tal como de 0,002, tal como de 0,003, tal como de 0,004, tal como de 0,005, tal como de 0,006, tal como de 0,007, tal como de 0,008, tal como de 0,009, tal como de 0,01, tal como de 0,02, tal como de 0,03, tal como de 0,04, tal como de 0,05, tal como de 0,06, tal como de 0,07, tal como de 0,08, tal como de 0,09, tal como de 0,1, tal como de 0,2, tal como de 0,3, tal como de 0,4, tal como de 0,5, tal como de 0,6, tal como de 0,7, tal como de 0,8, tal como de 0,9 % (p/v) de detergente no iónico a un 0,002, tal como a 0,003, tal como a 0,004, tal como a 0,005, tal como a 0,006, tal como a 0,007, tal como a 0,008, tal como a 0,009, tal como a 0,01, tal como a 0,02, tal como a 0,03, tal como a 0,04, tal como a 0,05, tal como a 0,06, tal como a 0,07, tal como a 0,08, tal como a 0,09, tal como a 0,1, tal como a 0,2, tal como a 0,3, tal como a 0,4, tal como a 0,5, tal como a 0,6, tal como a 0,7, tal como a 0,8, tal como a 0,9, tal como a un 1 % (p/v) de detergentes no iónicos.

En una realización, el detergente no iónico se seleccionan entre polisorbato 80, polisorbato 20 y poloxámero.

En una realización, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender hasta 0,01, preferentemente hasta 0,001, más preferentemente hasta un 0,0001 % (p/v) de detergentes no iónicos tales como, pero no limitados a, polisorbato 80, polisorbato 20 y poloxámero.

En una realización, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los

medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden estar básicamente libres de detergente.

5 Ácidos grasos: Generalmente las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de ácidos grasos inferior o igual a 25 mM. El ácido graso puede ser cualquier ácido graso tal como ácidos grasos saturados o
10 insaturados así como sales de los mismos. Preferentemente el ácido graso es uno o más ácidos grasos saturados tal como un ácido graso seleccionado entre el grupo que consiste en ácido propanoico, ácido butanoico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico, ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecanoico, ácido nonadecanoico, ácido eicosanoico, ácido heneicosanoico, ácido heneicosanoico, ácido docosanoico, ácidotricosanoico, ácido tetracosanoico, ácido pentacosanoico, ácido hexacosanoico, ácido heptacosanoico, ácido octacosanoico, ácido nonacosanoico, ácido triacontanoico, ácido henatriacontanoico, ácido dotriacontanoico, ácido tritriacontanoico, ácido tetratriacontanoico, ácido pentatriacontanoico y ácido hexatriacontanoico.

20 En una realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de ácidos grasos inferior o igual a 25 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior o igual a 20 mM, tal como una
25 concentración de ácidos grasos inferior o igual a 15 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior o igual a 10 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior o igual a 5 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior o igual a 2 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior o igual a 1 mM.

En una realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de ácidos grasos inferior a 25 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 20 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 15 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 15 mM, tal como una
35 concentración de ácidos grasos inferior a 14 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 13 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 12 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 11 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 10 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 9 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 8 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 7 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 6 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 5 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 4 mM, tal como una
40 concentración de ácidos grasos inferior a 3 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 2 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 1 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 0,5 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 0,1 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 0,05 mM, tal como una concentración de ácidos grasos inferior a 0,01 mM, tal como en la que la composición está básicamente libre de ácidos grasos.

En una realización preferente, el ácido graso es octanoato (ácido octanoico). En una realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de octanoato inferior o igual a 25 mM, tal como una concentración de octanoato inferior o igual a 20 mM, tal como una concentración de octanoato inferior o igual a 15 mM, tal como una concentración de octanoato inferior o igual a 10 mM, tal como una concentración de octanoato inferior o igual a 5 mM, tal como una concentración de octanoato inferior o igual a 2 mM, tal como una concentración de octanoato inferior o igual a 1 mM.

En una realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de octanoato inferior a 25 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 20 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 15 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 15 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 14 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 13 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 12 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 11 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 10 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 9 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 8 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 7 mM, tal como una concentración

de octanoato inferior a 6 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 5 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 4 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 3 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 2 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 1 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 0,5 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 0,1 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 0,05 mM, tal como una concentración de octanoato inferior a 0,01 mM, tal como en la que la composición está básicamente libre de octanoato.

Por ejemplo, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 25 mM, una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 20 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 15 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 10 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 5 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 2,28 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 2,16 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 2 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 1,52 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 1,44 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 1,2 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 1 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 800 uM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 720 uM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 456 uM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 400 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 304 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 288 mM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 240 uM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 160 uM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 152 uM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 144 uM, tal como una concentración de octanoato o ácidos grasos totales inferior o igual a 80 uM.

Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una proporción molar de octanoato con respecto a albúmina que es inferior o igual a 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 o 1:1. Es preferente una proporción molar inferior o igual a 16:1, 11:1 o 5:1.

En una realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 25 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 20 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 15 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 14 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 13 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 12 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 11 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 10 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 9 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 8 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 7 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 6 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 5 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 4 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 3 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 2 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 1 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 0,5 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 0,1 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 0,05 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como una concentración de moléculas hidrófobas inferior a 0,01 mM por ejemplo, fosfolípidos, tal como en la que la composición está básicamente libre de moléculas hidrófobas por ejemplo, fosfolípidos.

En una realización, la expresión moléculas hidrófobas incluye ácidos grasos tal como octanoato, pero excluye detergentes tales como detergentes no iónicos, tal como polisorbato 80.

Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de

albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden incluir o excluir diversos compuestos anfífilos. Por ejemplo, un tipo de compuesto anfílico puede estar incluido pero se puede excluir otro.

Alternativamente, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden excluir básicamente todos los compuestos anfífilos tales como detergentes, ácidos grasos y/o fosfolípidos.

En una realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender una concentración de compuestos anfífilos inferior o igual a 25 mM.

En otra realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden estar básicamente libres de compuestos anfífilos.

Aminoácidos libres: Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, habitualmente comprende una concentración de aminoácidos libres inferior a 5 mM tal como una concentración de aminoácidos libres inferior a 4 mM, tal como una concentración de aminoácidos libres inferior a 3 mM, tal como una concentración de aminoácidos libres inferior a 2 mM, tal como una concentración de aminoácidos libres inferior a 1 mM, tal como una concentración de aminoácidos libres inferior a 0,5, tal como inferior a 0,1, tal como inferior a 0,01, tal como inferior a 0,005, tal como inferior a 0,001 mM o básicamente sin aminoácidos libres.

Los aminoácidos libres pueden incluir uno o más aminoácidos libres, incluyendo aminoácidos naturales seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano, fenilalanina, tirosina, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina, o aminoácidos modificados y no naturales. Uno cualquiera de los aminoácidos de la composición de la presente invención puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido.

En una realización las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, está básicamente libre de aminoácidos libres.

Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, habitualmente comprende una concentración de triptófano o N-acetil triptófano inferior a 5, tal como inferior a 4, tal como inferior a 3, tal como inferior a 2, tal como inferior a 1, tal como inferior a 0,5, tal como inferior a 0,1, tal como inferior a 0,01, tal como inferior a 0,005, tal como inferior a 0,001 mM, o básicamente sin triptófano o N-acetil triptófano. Preferentemente no comprende triptófano o N-acetil- triptófano libres.

Sal: Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden incluir cualquier sal adecuada tal como, pero no limitada a, sales de bromuro, cloruro, fluoruro, hidruro, yoduro, nitrato, óxido, fosfato, sulfato, peróxido, borato, bromato, hipobromito, carbonato, hidrogenocarbonato, bicarbonato, clorato, perclorato, clorito, hipoclorito, cromato, yodato, nitrato, nitrito, fosfato, hidrógeno fosfato, dihidrógeno fosfato, fosfito, sulfato, tiosulfato, hidrogenosulfato, disulfato, sulfito, hidrogenosulfito, bisulfito, acetato, formiato, oxalato, hidrogenooxalato, dioxalato, hidrogenosulfuro, disulfuro, telurio, amida, tiocianato, muriato (HCl), succinato y maleato o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente las sales de la composición de la presente invención también pueden incluir derivados de ácidos inorgánicos no tóxicos tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fluorhídrico, fosforoso y similares, así como las sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc. Tales sales incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, trifluoroacetato, propionato, caprilato, isobutirato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato,

maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, fenilacetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato y similares.

Las sales de la invención pueden incluir sales de metales, tal como metales monovalentes (por ejemplo, Grupo 1) y metales divalentes (por ejemplo, Grupo 2 y elementos de transición), y sales de amonio. Las sales incluyen NaCl, y KCl.

Iones metálicos: Además en una realización, las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden estar básicamente libres de iones metálicos, tal como básicamente libre de iones Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y/o Ni^{2+} .

Consideraciones Ácido/Base: Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden tener un pH entre 4 y 9; tal como entre 4 y 8; tal como entre 4 y 7; tal como entre 5 y 8; tal como entre números seis y 8; preferentemente un pH de 6,4 a 7,4; de 6,0 a 7,0; de 6,7 a 7,3 o entre 6,5 y 7,5 tal como en las que dicha composición tiene un pH de aproximadamente 7.

Tampón: Las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, y los medios (tales como medios de criopreservación, medios de almacenamiento, y otros medios) que comprenden las preparaciones de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, para su uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención, pueden comprender un tampón tal como un tampón citrato, un tampón fosfato o un tampón de histidina. El tampón fosfato o el tampón de histidina son preferentes. La concentración del tampón puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 mM, tal como de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 mM, tal como de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, o 140 a aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o aproximadamente 150 mM.

La presente invención se describe además con los siguientes ejemplos que no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Las células madre se criopreservan para acondicionamiento en su formulación final. En la actualidad, una solución de criopreservación convencional usada consiste en una combinación de DMSO, al 10 %, y una solución de albúmina de suero humano (HSA, Albutein® de Grifols, S.A) al 2 %. Un objeto de interés en el campo de la terapia celular, en particular en el contexto alogénico, es la búsqueda de nuevos agentes que criopreservantes que mejoren la recuperación de células después de ciclos de congelación-descongelación y que amplíen la estabilidad de la suspensión celular.

La finalidad de este estudio fue evaluar el uso potencial de dos albúminas recombinantes diferentes (AlbIX® y Recombumin® Alpha) desarrolladas por Novozymes A/S, y que en la actualidad están disponibles como productos comerciales en Albumedix Ltd., en combinación con Células del Estroma Mesenquimal humano (hMSC).

Albutein®, la solución de albúmina obtenida a partir de sangre humana comercializada por Grifols, S.A., se usó como el elemento de referencia.

ELEMENTOS DE ENSAYO:

Nombre Composición	ENSAYO 1: AlbIX® A) Para evaluación de estabilidad: las células se acondicionaron con Plasmalyte® + 2 % (p/v) y 5 % (p/v) de AlbIX®. B) Para evaluación de estabilidad después de descongelación: las células se criopreservaron usando dos soluciones de criopreservación con una concentración de un 2 % (p/v) y un 5 % (p/v) de AlbIX® durante 21 días.
Nombre Composición	ENSAYO 2: Recombumin® Alpha A) Para evaluación de estabilidad: las células se acondicionaron con Plasmalyte® + 2 % (p/v) and 5 % (p/v) Recombumin® Alpha. B) Para evaluación de estabilidad después de descongelación: las células se criopreservaron usando dos soluciones de criopreservación con una concentración de un 2 % (p/v) y un 5 % (p/v) de Recombumin® Alpha durante 21 días.

ELEMENTO DE REFERENCIA

Nombre REFERENCIA: Albutein®

Composición A) Para evaluación de estabilidad: las células se acondicionaron con Plasmalyte® + 2 % (p/v) and 5 % (p/v) Albutein®.
B) Para evaluación de estabilidad después de descongelación: las células se criopreservaron usando dos soluciones de criopreservación con una concentración de un 2 % (p/v) y un 5 % (p/v) de Albutein® durante 21 días.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

La fase experimental del estudio se realizó como se muestra en la Figura 4.

Para expansión y acondicionamiento celular, las células hMSC se descongelaron, se sembraron y se expandieron durante 27 días primero en un CellStack de un nivel y luego en un CellStack de cinco niveles. Las células se recogieron y distribuyeron en tres tubos Falcon de 50 ml (llenos con 52 ml de suspensión celular) y tres tubos Falcon de 15 ml (llenos con 13 ml de suspensión celular). Después de centrifugar los tubos, los sobrenadantes se eliminaron por decantación, y las células se resuspendieron en Plasmalyte + cada albúmina estudiada para lograr una concentración celular de 15 M/ml (como se muestra en la Figura 4).

PROTOCOLO DE CONGELACIÓN:

Equipo

- Cabina de flujo laminar de clase IIA
- Sistema de tubos para congelación no programada
- Ultracongelador biológico -80 °C
- Cilindro de nitrógeno líquido (si fuera aplicable)
- Pipeteador automático
- Centrifugadora
- Pipetas de 1, 2, 5, 10, 25 y 50 ml
- Tubos de 15:50 mililitros
- Tubos de criopreservación de 1, 1,5 o 2 ml
- Cronómetro
- Paquetes de hielo (sustituible con hielo)

Reactivos

- Plasmalyte®
- albúmina de plasma humano Albutein® de Grifols., S.A al 20 %
- AlbiX® al 10 % y Recombumin® Alpha al 20 % desarrollados por Novozymes Biopharma DK A/S y/o Delta Biotechnology Ltd., y ahora disponibles como productos comerciales en Albumedix Ltd.,
- DMSO
- Isopropanol

Procedimiento

1. Preparación de la solución de criopreservación:

A. Preparar el volumen requerido de solución de criopreservación, como se muestra en la Figura 4. Si no se conoce con exactitud el volumen requerido, preparar un volumen en exceso superior al que se considera necesario (generalmente 5 o 10 ml). A continuación se muestran los volúmenes para preparar 10 ml de solución de criopreservación, así como la concentración final de los reactivos usados:

Volúmenes y concentración de los reactivos usados en la preparación de la solución de criopreservación:

Reactivo	Concentración inicial (Ci) (reactivo de reserva)	Concentración final (Cf) en la solución de criopreservación
Plasmalyte	100 %	NA
Albúmina	10 % o 20 % (p/v))	2 % o 5 % en p/v
DMSO	100 %	20 % en v/v
		Volumen Final (Vf):

B. Para encontrar el volumen inicial requerido para cada reactivo, se recomienda realizar estos cálculos usando la

siguiente ecuación (Ec) 1:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \rightarrow \text{Ec 1.}$$

C. La solución de criopreservación se almacena en el intervalo de 2-8 °C hasta el momento de su uso; como máximo, se puede almacenar en el intervalo de 2-8 °C durante un día.

2. Obtención y preparación de la suspensión celular:

D. Las células mesenquimales que se van a congelar provienen de una suspensión celular de volumen y concentración conocidos y se recogen en un tubo estéril correctamente etiquetado, mediante centrifugación de células cultivadas, eliminación de sobrenadantes y resuspensión en Plasmalyte + cada albúmina estudiada para lograr una célula concentración de 15 M/ml (como se muestra en la Figura 4).

E. El número de células que se van a congelar por criotubo, el número de criotubos, la concentración celular para congelación (C_c) y el volumen por criotubo, se deciden en función de la cantidad de células disponibles, o el uso para el que están destinadas.

F. Calcular el volumen final para congelación (V_c) a partir de la ecuación 2:

$$V_c = \frac{\text{Volumen}}{\text{criotubo}} \times \text{número de criotubos} \rightarrow \text{Ec 2.}$$

G. El proceso de congelación comprende la dilución 1:1 de la suspensión celular (es decir, células resuspendidas en Plasmalyte + cada albúmina estudiada) con la solución de criopreservación (es decir, Plasmalyte + cada albúmina estudiada + DMSO al 20 % en p/v). Por esta razón, tanto el volumen de suspensión celular que se va a preparar para la congelación, como el volumen de solución de criopreservación que se va a añadir, será V2 del volumen calculado en la ecuación 2.

3. Adición de la solución de criopreservación:

H. Teniendo en cuenta que el volumen total de la solución de criopreservación y se va a añadir (V_{ca}) es $\frac{1}{2}$ del volumen calculado en la ecuación 2, y que dicho volumen corresponde exactamente al volumen de suspensión celular que se va a congelar, calcular el porcentaje de solución de criopreservación a añadir en cada etapa, para generar la rampa de congelación que se muestra en la siguiente tabla.

Rampa a la adición de solución de criopreservación:

Etapas	Porcentaje de solución de criopreservación a añadir	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	10 % de V_{ca}	2	2-8
2	10 % de V_{ca}	2	2-8
3	10 % de V_{ca}	2	2-8
4	20 % de V_{ca}	2	2-8
5	25 % de V_{ca}	2	2-8
6	25 % de V_{ca}	Hasta máx. 30 min	2-8

I. Añadir lentamente la solución de criopreservación (enfriada previamente) a la suspensión celular siguiendo la rampa de adición especificada en el esquema de 'rampa' que se ha mostrado en la tabla anterior. La incorporación gradual de la solución de criopreservación evita el posible choque osmótico celular.

4. División en alícuotas de la suspensión celular:

J. La división en alícuotas de la suspensión celular es un procedimiento que se debe realizar lo más rápido posible, ya que el DMSO es un componente tóxico para las células. El proceso de división de alícuotas comienza una vez que se ha añadido el volumen de solución de criopreservación especificado en la etapa 6 del esquema de 'rampa' (que se ha mostrado en la tabla anterior).

K. Distribuir el volumen final de la muestra celular en tubos de criopreservación previamente etiquetados (de acuerdo con el volumen por criotubo estipulado en la sección E).

5. Congelación

L. Poner los tubos de criopreservación con la suspensión celular en el sistema de tubos para congelación no programada (el "sistema"), que contiene isopropanol en el nivel correcto. Idealmente, es preferente equilibrar el recipiente del sistema a una temperatura en el intervalo de 2-8 °C antes de cada uso, aunque también se puede usar si se ha equilibrado a temperatura ambiente.

M. Colocar el recipiente del sistema en el congelador a -80 °C para congelarlo y mantenerlo allí al menos durante la noche y durante un máximo de un mes.

N. Una vez que los tubos se han retirado del recipiente del sistema, se colocan en la caja correspondiente del congelador a -80 °C o del cilindro de nitrógeno líquido.

PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN:

Equipo

- Cabina de flujo laminar de clase IIA
- Baño termostático con agua destilada o fuente de calor alternativa
- Pipeteador automático
- Incubadora
- Centrifugadora
- Cronómetro

Material percedero y reactivos

- Pipetas de 1, 2, 5, 10, 25 and 50 mL
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Plasmalyte + cada albúmina estudiada
- Paquetes de hielo si fuera aplicable (si no hubiera disponibilidad, se puede usar hielo)

Procedimiento

i. Preparación de la solución de descongelación

A. Preparar el volumen requerido de solución de descongelación, que consiste en Plasmalyte + cada albúmina estudiada.

B. La solución de descongelación se debe almacenar en el intervalo de 2-8 °C hasta el momento de su uso.

e.ii. Descongelación

C. Seleccionar el criotubo(s) que se descongelará y extraer del congelador a -80 °C o del cilindro de nitrógeno líquido.

D. Transferir los criotubos congelados al baño termostático (o fuente de calor equivalente), calentado previamente a 37 °C. Es importante que la descongelación se realice rápidamente. El criotubo se debe retirar de la fuente de calor en el momento preciso en el que se transforma en el estado líquido (sin embargo, se puede retirar mientras una proporción muy pequeña todavía está en estado sólido, granular).

E. Una vez que la suspensión celular se ha descongelado, transferir el contenido del criotubo a un tubo de 15 ml o 50 ml, según corresponda. Si se descongela más de un criotubo obtenido para la misma suspensión celular original, se recomienda combinar todas las fracciones descongeladas, en lugar de llevar a cabo el proceso de descongelación para cada criotubo.

F. Diluir la suspensión celular a 1:1 con la solución de descongelación, añadiendo el mismo volumen de solución de descongelación que el volumen de la suspensión celular recuperada. La solución de descongelación se añade lentamente, siguiendo la estrategia que se muestra en la tabla que sigue a continuación.

Estrategia para añadir la solución de descongelación:

Etapa	Porcentaje (v/v) de solución de descongelación	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	25 % del volumen que se va a añadir	2	2-8
2	25 % del volumen que se va a añadir	2	2-8
3	50 % del volumen que se va a añadir	2	2-8

G. Diluir la suspensión celular con la solución de descongelación hasta que la dilución sea 1:10 del volumen inicial de suspensión descongelada. A continuación se muestra un ejemplo de cálculo:

Si el volumen inicial de la suspensión celular descongelada es de 1 ml:

$$1 \text{ ml} \times 10 = 10 \text{ ml (volumen final para dilución a 1:10)}$$

Como previamente se ha diluido con 1 ml de solución de descongelación (de acuerdo con las instrucciones de la sección F), el volumen que se añadirá en esta etapa será:

$$10 \text{ ml} - 1 \text{ ml (volumen inicial de suspensión)} - 1 \text{ ml (volumen de solución añadido para dilución a 1:1)} = 8 \text{ ml}$$

En esta etapa, para un volumen inicial de 1 ml, será necesario añadir 8 ml de solución de descongelación.

H. Al pipetear, determinar el volumen total de la solución descongelada y a continuación homogeneizar la suspensión minuciosamente (para evitar la aparición de burbujas, lo que puede dificultar la medición del volumen).

ENSAYO DE ESTABILIDAD:

Se congelaron un total de 6 crioviales siguiendo el protocolo de congelación discutido anteriormente, como se muestra en la Figura 4 y se almacenaron durante 21 días a -196 °C en un tanque de nitrógeno líquido. A continuación se descongelaron siguiendo el protocolo de descongelación discutido anteriormente, usando la solución de albúmina correspondiente en cada caso.

Durante la estabilidad celular después de la descongelación a 2-8 °C, cada albúmina se sometió a ensayo a dos concentraciones: 2 % (p/v) y 5 % (p/v).

Para evaluar la estabilidad celular a 2-8 °C, se evaluaron las suspensiones celulares acondicionadas con un 2 % (p/v) de cada albúmina (AlbIX®, Recombumin® Alpha o Albutein®). Se prepararon tres jeringas usando en cada caso una de las suspensiones celulares que se van a probar como se muestra en la Figura 4. Para lograr la concentración celular deseada de 6,5 M/ml, se cargaron jeringas tapadas en la parte superior con 0,87 ml de la solución de células madre correspondiente (15 M/ml) y 1,13 ml de la solución de acondicionamiento análoga (Plasmalyte + 2 % de la albúmina correspondiente). A continuación los símbolos se ensamblaron y los volúmenes de la jeringa se ajustaron a 2,8 ml (2 ml de líquido y 0,8 ml de aire) como se muestra en la Figura 5. Por último, las jeringas se almacenaron en un refrigerador durante el ensayo para mantener la temperatura objetivo.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

El software NucleoView NC-3000™ (Chemometec) se usó para la interpretación y el análisis de los resultados de NucleoCounter (Chemometec) del recuento celular, viabilidad celular y agregación celular así como para determinar la apoptosis en la población celular.

Para el análisis de los resultados y la generación de representaciones que usaron Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Corporation) y GraphPad Prism v5 para Windows (GraphPad Software Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

La proteína de albúmina humana se usa ampliamente en el campo de la terapia avanzada. Garantiza la estabilidad de los productos basados en células al proteger las células de los daños asociados a los ciclos de congelación-descongelación. Por lo tanto, se debe demostrar que la estabilidad celular confirma la utilidad de diferentes formas de albúmina y su concentración óptima de trabajo. En este caso, la estabilidad celular se evaluó mediante recuento celular, viabilidad celular, agregación celular y poblaciones celulares no apoptóticas, apoptóticas y muertas usando el NucleoCounter® NC-3000™ y los protocolos e instrucciones de su fabricante.

RESULTADOS DE ESTABILIDAD A 2-8 °C:

(a) Estabilidad sin tratamiento previo con congelación y descongelación:

Las células hMSC que se habían expandido, se centrifugaron, los sobrenadantes se retiraron, y las células se resuspendieron en Plasmalyte + cada albúmina estudiada para lograr una concentración celular de 15 M/ml se sometieron a ensayo, sin congelación y descongelación, para estabilidad a 2-8 °C. No se observaron diferencias significativas entre las diferentes soluciones de albúmina sometidas a ensayo en términos de concentración celular y viabilidad celular (los datos no se muestran) cuando se sometió a ensayo después de 0 horas, 23,7 horas, 44 horas, 51,5 horas y 93,5 horas de almacenamiento. Las concentraciones celulares permanecieron constantes y la viabilidad celular fue superior a un 97 % hasta las 52 horas.

Los resultados obtenidos con el ensayo de apoptosis durante 44 horas (los datos no se muestran) identificaron dos poblaciones celulares diferentes en todos los casos: células viables y células muertas. No se observó población apoptótica; por lo tanto, se considera que las células se volvieron necróticas sin sufrir previamente apoptosis. No hubo diferencias significativas entre las albúminas evaluadas; se observó el mismo patrón en los tres casos de acuerdo con los resultados obtenidos para concentración celular y viabilidad celular.

(b) Estabilidad después del tratamiento previo con congelación y descongelación:

Las células hMSC que se habían expandido, se centrifugaron, los sobrenadantes se retiraron, y las células se resuspendieron en Plasmalyte + cada albúmina estudiada para lograr una concentración celular de 15 M/ml se sometieron a ensayo, a la estabilidad a 2-8 °C.

Las muestras se retiraron después de 20 ciclos de homogeneización por inversión en los siguientes puntos temporales: 0 horas, 23,5 horas, 45,5 horas y 72 horas.

Como se muestra en la Figura 6, las células sometidas a ensayo en las tres albúminas mostraron una disminución progresiva de sus viabilidades con el tiempo, con la preparación de albúmina recombinante obtenida a partir de levaduras proporcionando la mayor protección para las células.

Los datos de la Figura 6 se pueden resumir como sigue a continuación:

Albúmina	Concentración	Parámetro	0 horas	23,5 horas	45,5 horas
AlbIX®	2 %	Células apoptóticas	4,9 %	6,8 %	5,6 %
	2 %	Células viables	92,6 %	90,3 %	92,9 %
Recombunin® Alpha	2 %	Células apoptóticas	9,0 %	16,7 %	37,6 %
	2 %	Células viables	87,3 %	81,2 %	59,1 %
Albutein®	2 %	Células apoptóticas	14,6 %	12,2 %	56,0 %
	2 %	Células viables	83,6 %	85,6 %	40,7 %

Albúmina	Concentración	Parámetro	0 horas	23,5 horas	45,5 horas
AlbIX®	5 %	Células apoptóticas	8,6 %	22,2 %	37,4 %
	5 %	Células viables	88,5 %	76,3 %	63,2 %
Recombunin® Alpha	5 %	Células apoptóticas	21,9 %	47,3 %	61,1 %
	5 %	Células viables	76,6 %	51,1 %	34,5 %
Albutein®	5 %	Células apoptóticas	17,4 %	33,4 %	79,9 %
	5 %	Células viables	79,0 %	63,4 %	4,5 %

Los datos muestran que:

- Con albúmina al 2 %, después de 45,5 horas de almacenamiento a 2-8 °C, el nivel de células viables fue mejor para AlbIX® (92,9 %), a continuación para Recombunin® Alpha (59,1 %), y el peor para Albutein® obtenido a partir de plasma (40,7 %).
- Aunque las viabilidades fueron más bajas en general cuando se usó albúmina al 5 %, la diferencia entre el nivel de células viables después de 45,5 horas de almacenamiento a 2-8 °C fue incluso más pronunciada, con el mejor resultado para AlbIX® (63,2 %), a continuación para Recombunin® Alpha (34,5 %), y de nuevo peor para Albutein® obtenido a partir de plasma (solo un 4,5 %).

Por lo tanto, se concluye que las preparaciones de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura proporcionan la mayor protección para las células durante su almacenamiento, en comparación con los productos de albúmina obtenidos a partir de plasma, cuando se usan para proteger las células durante y/o después de un choque fisiológico, tal como congelación y descongelación. Se observa que las diferencias no son necesariamente aparentes después de 23,5 horas de almacenamiento a 2-8 °C. Se considera que esto se debe al hecho de que, después de ese corto periodo de tiempo, las células han tenido un tiempo inadecuado para reaccionar completamente al choque fisiológico de congelación y descongelación.

También se concluye que una concentración de albúmina al 2 % es preferente a una concentración de albúmina al

5 % para maximizar la viabilidad celular durante el almacenamiento, después de un choque fisiológico, tal como congelación y descongelación.

Ejemplo 2

Además el ensayo se realizó para confirmar el efecto beneficioso de AlbiX® como aditivo para la criopreservación de hMSC, y la comparación con Albutein® (una solución comercial de albúmina obtenida a partir de plasma fabricada por Grifols S.A.).

Se realizó un análisis exhaustivo en diferentes cultivos celulares de diferentes donantes expandidos usando dos estrategias: la convencional, hSERB al 10 % (Sueros B humanos), y la de investigación, PL al 5 % (Lisado de Plaquetas) y evaluando la eficiencia del proceso de descongelación y congelación y la estabilidad de la suspensión celular, en términos de viabilidad, identidad y multipotencialidad.

Las células madre se criopreservaron antes del acondicionamiento en su formulación final. Una solución de criopreservación patrón usada consistió en una combinación de DMSO, al 10 %, y una solución de albúmina de suero humano (HSA, Albutein® de Grifols., S.A) al 2 %.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Los reactivos y soluciones fundamentales usados en las fases experimentales del estudio se enumeran a continuación:

- AlbiX® (Albumedix Ltd, lote: AK190201)
- Albutein® (Grifols S.A., lote: MPAB5HA001)
- Plasmalyte® + Albutein® al 2 % en p/v
- Plasmalyte® + AlbiX® al 2 % en p/v

ELEMENTO DE REFERENCIA (RI):

Nombre	HSA-MSC (Albutein®)
Composición	BM-hMSC expandidas <i>ex vivo</i> criopreservadas en una solución de Plasmalyte® al 2 % de Albutein® en p/v y DMSO al 10 % en v/v.
Presentación	2 crioviales para cada lote celular para expansión con hSERB al 10 %; 1 criovial por cada lote celular para expansión con PL al 5 %.
Criterios de aceptación	Concentración de células en criovial: $7,5 \times 10^6$ hMSC viables/ml $\pm$ 20 % ($6,0 \times 10^6$ - $9,0 \times 10^6$ hMSC/ml viables).
	hSERB al 10 % (Sueros B humanos): XCC14040: $7,50 \times 10^6$ hMSC viables/ml XCO15048: $7,10 \times 10^6$ hMSC viables/ml XCO13008: $7,50 \times 10^6$ hMSC viables/ml
	PL al 5 % (Lisado de Plaquetas): XCC14040: $8,01 \times 10^6$ hMSC viables/ml XCO15048: $7,50 \times 10^6$ hMSC viables/ml XCO15054: $8,65 \times 10^6$ hMSC viables/ml

ELEMENTO DE ENSAYO (TI)

Nombre	AlbiX®-MSC
Composición	BM-hMSC expandidas <i>ex vivo</i> criopreservadas en una solución de Plasmalyte® al 2 % de AlbiX en p/v y DMSO al 10 % en v/v..
Presentación	2 crioviales para cada lote celular para expansión con hSERB al 10 %; 1 criovial por cada lote celular para expansión con PL al 5 %.
Nombre	AlbiX®-MSC
Criterios de aceptación	Concentración de células en criovial: $7,5 \times 10^6$ hMSC viables/ml $\pm$ 20 % ($6,0 \times 10^6$ - $9,0 \times 10^6$ hMSC/ml viables).
	hSERB al 10 % (Sueros B humanos): XCC14040: $7,50 \times 10^6$ hMSC viables/ml

XCO15048: 7,10x10⁶ hMSC viables/ml
XCO13008: 7,50x10⁶ hMSC viables/ml

PL al 5 % (Lisado de Plaquetas):
XCC14040: 8,30x10⁶ hMSC viables/ml
XCO15048: 7,50x10⁶ hMSC viables/ml
XCO15054: 7,76x10⁶ hMSC viables/ml

DISEÑO EXPERIMENTAL

Expansión Celular

Cuatro sistemas de ensayo de cultivo de células hMSC primarias diferentes se descongelaron, se sembraron y se expandieron, para producir un número de células suficiente para realizar los experimentos para la evaluación de AlbiX® y su comparación con Albutein®.

Se realizaron seis expansiones diferentes siguiendo diferentes estrategias. Para la primera, los cultivos de células primarias llamados XCC14040, XCO15048 y XCO13008 se cultivaron usando la formulación de medio patrón: DMEM + Sueros B humanos al 10 % (hSERB); mientras que para la segunda, los cultivos de células primarias llamados XCC14040, XCO15048, XCO15054 se cultivaron con DMEM + Lisado de Plaquetas al 5 % (PL).

Los parámetros cinéticos obtenidos durante la expansión de los diferentes cultivos de células primarias, con las diferentes condiciones: hSERB al 10 %, y al PL 5 %, se evaluaron y se muestran en la tabla que sigue a continuación:

Id del lote	Pase	CPD	Tiempo de duplicación (días)*
hSerB al 10 %			
XCC14040	02	9,8	2,3
XCO15048	03	14,9	3,1
XCO13008	05	21,6	5,3
PL al 5 %			
XCC14040	03	6,1	3,6
XCO15048	01	9,9	9,1
XCO15054	01	9,5	2,8
*Tiempo de duplicación para la última etapa del subcultivo antes de criopreservación.			

La tabla anterior muestra las características cinéticas de las líneas celulares usadas durante el estudio (CPD: Duplicaciones de Poblaciones Acumuladas). Las CPD se calcularon teniendo en cuenta que las células ya se habían expandido antes del estudio actual. Por lo tanto, se añadió un factor estándar de 3 para cada etapa o fase del subcultivo anterior a la CPD calculada.

El pase inicial considerado para estas hMSC fue -02, que es el punto de partida en el aislamiento de hMSC de muestras de médula ósea (BM). Para todas las expansiones, las CPD fueron más bajas que el límite de Hayflick de 50 CPD.

En la comparación de los cultivos celulares primarios que son comunes para ambas estrategias de cultivo, XCC14040 y XCO15048, se detectaron diferencias en el tiempo de duplicación, lo que muestra que la tasa de crecimiento fue más lenta para un 5 % de PL y a continuación esto se consideró como una condición de cultivo subóptima para las células. La información obtenida en esta condición de cultivo menos favorable contribuyó a una mejor comparación entre los agentes criopreservantes.

Se realizaron inspecciones visuales periódicas con un microscopio invertido durante la expansión celular para descartar la presencia de contaminación bacteriana o cambios en la morfología celular. En el caso de la condición de expansión de PL, se realizó un análisis complementario de detección de *Mycoplasma*, que mostró un resultado negativo y esto se descartó como causa del crecimiento más lento (los datos no se muestran).

Congelación y descongelación celular

Las células se trataron con tripsina una vez que la confluencia se había alcanzado (aproximadamente un 70 %), y el

recuento celular, la viabilidad y el fenotipo se determinaron mediante técnicas de citometría de flujo antes de la congelación. Teniendo en cuenta la cantidad de células viables determinadas en los análisis citométricos, las células de las diferentes expansiones se dividieron en dos partes diferentes, se centrifugaron, los sobrenadantes de los medios se descartaron y los sedimentos celulares de cada parte se reconstituyeron a una concentración de 15×10^6 hMSC viables/ml $\pm 20\%$. Las soluciones para la reconstitución de sedimento fueron: Plasmalyte® al 2 % en p/v Albutein®, para la condición RI, y Plasmalyte® al 2 % en p/v AlbiX®, para la condición TI.

Estas suspensiones celulares se congelaron siguiendo el procedimiento y las etapas detalladas en el Protocolo de congelación que se proporciona en el Ejemplo 1, añadiendo, durante la etapa de enfriamiento, soluciones específicas de criopreservación. La concentración final alcanzada en cada criovial fue de $7,5 \times 10^6$ hMSC viables/ml $\pm 20\%$, y la composición de la suspensión celular criopreservada final fue DMSO al 10 % en v/v y Albutein® al 2 % en p/v en Plasmalyte, para RI, y DMSO al 10 % en v/v y AlbiX® al 2 % en p/v en Plasmalyte, para TI.

Después de un periodo mínimo de 7 días, las células se descongelaron siguiendo el Protocolo de descongelación dado en el Ejemplo 1 pero usando diferentes soluciones de descongelación específicas: Albutein® al 2 % en p/v en Plasmalyte® para RI, y AlbiX® al 2 % en p/v en Plasmalyte para TI.

El estudio de las soluciones de albúmina se dividió en dos partes: el proceso de criopreservación y la estabilidad.

Protección de Criopreservación

Para la evaluación del efecto criopreservante que las soluciones de albúmina podrían proporcionar a hMSC, el análisis citométrico se repitió después de la descongelación y se comparó con los resultados de congelación previa. En el caso de las células cultivadas con PL, que es la evaluación complementaria, solo se realizó el recuento celular y la viabilidad.

Los análisis de citometría de flujo posteriores a la criopreservación realizados constituyeron el tiempo 0 de la evaluación de estabilidad.

Evaluación de estabilidad: viabilidad celular e identidad celular

La suspensión de hMSC se empaquetó en jeringas de 10 o 20 ml, para células expandidas con PL o hSERB respectivamente, manteniendo una proporción de 0,4 de volumen de aire con respecto a líquido. Las muestras se almacenaron a $-2-8^\circ\text{C}$ y se realizaron diversas evaluaciones en diferentes puntos temporales: 0 h, 24 h 48 h y 72 h dependiendo de la estrategia de cultivo usada.

Cultivos expandidos con PL

La evaluación de estabilidad para las células expandidas con PL consistió en determinaciones de viabilidad a lo largo de los puntos temporales mencionados usando dos metodologías diferentes:

- Citometría de flujo: las determinaciones de viabilidad realizadas consideraron tanto necróticas como apoptóticas usando los marcadores 7AAD y anexina V, respectivamente.
- Tecnología NC3000™ NucleoCounter (Chemometec) basada en el análisis de células fluorescentes mediante la adquisición de imágenes múltiples: se siguieron dos protocolos diferentes, el primero o el convencional permite la determinación de la concentración, agregación y viabilidad celulares; el segundo protocolo se usó para un estudio más completo del proceso apoptótico dado que las células apoptóticas tempranas y tardías se midieron usando unión a anexina V e inclusión de PI.

Cultivos expandidos con hSERB:

La evaluación de la estabilidad para las células expandidas con hSERB consistió en la evaluación no solo de la viabilidad sino también de la identidad. Para las determinaciones de viabilidad, de la misma manera que para el cultivo expandido con PL, se realizaron dos métodos diferentes:

- Citometría de flujo a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h.
- Determinaciones de NucleoCounter con el procedimiento convencional que solo implica el recuento, la agregación y la viabilidad celulares a las 0 h, 24 h y 72 h.

Las determinaciones de identidad también se evaluaron mediante citometría de flujo, en los puntos temporales: 0 h, 24 y 72 h. La expresión del marcador de superficie considerada fue adaptada a partir de la ISCT (International Society for Cellular Therapy) y los criterios de aceptación también se establecieron de acuerdo con la experiencia: al menos un 95,0 para los antígenos CD105, CD73 y CD90; no superior a un 5 % para CD45 y CD31; y no superior a un 20 % para HLA-DR.

Evaluación de Estabilidad: Multipotencia

La potencia celular solo se evaluó para las muestras obtenidas a partir de cultivos celulares expandidos con medios suplementados con hSerB al 10 %, y en los puntos temporales: 0 h, 24 h y 72 h. Se evaluó la capacidad de las células para diferenciarse en los tres linajes diferentes (adipogénico, osteogénico y condrogénico).

Se sembraron 48 placas de formato de pocillo, una para la condición basal y otra para la diferenciada para cada protocolo de tinción realizado. La condición basal se tiñó 0-2 días después de la siembra, mientras que la diferenciada se tiñó después de cultivar las células en los medios de diferenciación específicos, en condiciones de cultivo convencionales (37 °C, CO₂ al 5 % y 95 % de Humedad Relativa (HR)), y los medios se sustituyeron cada 3-4 días.

Para ambos ensayos de diferenciación osteogénica y adipogénica, el tiempo que las células estuvieron expuestas a los estímulos de diferenciación y las densidades celulares usadas, fueron 1-4 semanas y 3×10^3 - 1×10^5 células/cm².

En el caso de la diferenciación condrogénica, esta densidad de siembra usada fue de $8,0 \times 10^4 \pm 12,5$ % de células/micromasa a las 72 h y para algunos cultivos celulares debido al bajo número de células viables no fue posible.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

Para el análisis de los resultados y la generación de representaciones se usaron Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) y GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software Inc.).

Para la interpretación y análisis de los resultados de NucleoCounter (Chemometec) del recuento celular, viabilidad celular y agregación celular, así como para determinar la apoptosis en la población celular se usó el software NucleoView NC-3000™ (Chemometec).

BD Cell Quest v5.2.1 se usó para análisis citométricos de recuento celular y evaluación de identidad celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**Protección de criopreservación de AlbiX® con respecto a Albutein®**

El efecto crioprotector de las soluciones de albúmina estudiadas, AlbiX® (TI) y Albutein® (RI), en hMSC se evaluó en términos de viabilidad e identidad por citometría de flujo. La evaluación de la viabilidad se realizó en ambas estrategias de expansión de cultivo, hSERB y PL, mientras que la identidad solo se evaluó para la expansión de hSERB.

El % de viabilidad se evaluó para congelamiento previo e inmediatamente después de la descongelación en cada condición, Albutein® o AlbiX®, para cada cultivo de células primarias y estrategia de expansión usada.

La variabilidad proporcionada por los cultivos de células primarias estudiados y las estrategias de expansión usadas se redujeron después de la normalización de los datos dado que solo se consideró la reducción de la viabilidad. Los resultados después de esta normalización (los datos no se muestran) mostraron que no hubo diferencias estadísticas significativas entre ambas soluciones de criopreservación (análisis estadístico con el ensayo t no pareado usado). En conjunto, todos los resultados anteriores confirmaron que, *justo después de la descongelación*, el efecto crioprotector de ambos aditivos evaluados Albutein® y AlbiX® es comparable.

Fenotipo antes y después de la congelación

La identidad de hMSC se comparó antes de congelar y después de descongelar, verificando el % de expresión de los diferentes marcadores de superficie considerados (véase la Figura 7).

Para todas las condiciones exploradas, congelación previa y descongelación posterior con los protocolos de criopreservación de Albutein® o AlbiX®, se cumplieron los criterios aceptados en la actualidad para la identidad de hMSC: al menos un 95,0 % para los antígenos CD105, CD73 y CD90; no superior a un 5 % para CD45 y CD31; y no superior a un 20 % para HLA-DR. Además, el análisis estadístico realizado (ensayo de comparación múltiple de ANOVA Tukey usado) no encontró diferencias estadísticamente significativas entre los agentes crioprotectores evaluados.

Por lo tanto, el proceso de criopreservación no alteró la identidad de los marcadores de superficie y las soluciones AlbiX® o Albutein® mantuvieron el fenotipo original de hMSC.

Efecto de estabilidad de AlbiX con respecto a Albutein

El efecto de estabilización de las soluciones de albúmina estudiadas, AlbiX® (TI) y Albutein® (RI), en hMSC después de la criopreservación se evaluó en términos de viabilidad, identidad y multipotencia.

(a) Viabilidad:

La viabilidad se evaluó mediante citometría de flujo. Para ambas estrategias de expansión del cultivo hSERB y PL, la viabilidad se evaluó en los diferentes puntos temporales 0,24, 48 y 72 h, con un protocolo de doble tinción que consideraba tanto células necróticas (7AAD) como apoptóticas (anexina V).

En la Figura 8A (para células expandidas hSERB), y en la Figura 8B (para células expandidas PL), el % de viabilidad se muestra a lo largo de los diferentes puntos temporales y condiciones de criopreservación, AlbiX® y Albutien®.

En el momento $t = 0$ h, directamente después de la descongelación, todas las células cumplían con los criterios de liberación (Viabilidad = 70 %) independientemente de la estrategia de cultivo celular seguida (hSERB o PL) y la condición de criopreservación (AlbiX® o Albutein®).

Para la estrategia de cultivo celular hSerB y la condición AlbiX (Figura 8A), todas las células mostraron viabilidades superiores al 70 % a lo largo de los diferentes puntos temporales, excepto XC013008 que quedó fuera de especificación (OOS) desde $t = 24$ h. Este hecho podría ser consecuencia de un incidente que se produce durante la descongelación en la que las células estuvieron expuestas por más tiempo a DMSO, y esto puede haber dado como resultado una viabilidad más baja ya en $t = 0$ h. Para la condición de Albutein®, desde $t = 24$ h hasta el final de la evaluación de estabilidad, dos cultivos de células primarias de tres eran OOS, y a las 72 h todos los cultivos de células primarias no cumplían los requisitos. Los análisis estadísticos (ANOVA, ensayo de comparación múltiple de Tukey) mostraron que la disminución de la viabilidad era significativa para Albutein® entre los puntos temporales 0 h y 72 h ($p < 0,05$), mientras que para la condición de AlbiX® la reducción de la viabilidad no era estadísticamente significativa. Los valores de reducción de la viabilidad y los resultados del análisis estadístico demuestran una estabilidad extendida para la condición AlbiX® en las células expandidas con hSERB.

Para la estrategia de cultivo celular subóptimo con PL (Figura 8B), la condición de AlbiX® también mostró mejores resultados que Albutein® pero en este caso los resultados eran más evidentes. De 24 h a 72 h, todas las células criopreservadas con Albutein® eran OOS, mientras que la viabilidad del tratamiento con AlbiX® se volvió inferior a un 70 % para un solo cultivo de células primarias y no hasta el último momento. Los análisis estadísticos (ANOVA, ensayo de comparación múltiple de Tukey) mostraron resultados similares a los obtenidos para las células expandidas hSERB: diferencias no significativas para la condición de AlbiX® a lo largo de los puntos temporales de estabilidad, mientras que Albutein® mostró diferencias a 24, 48 y 72 h ($p < 0,05$). Estos resultados están de acuerdo con las células expandidas con hSERB y fortalecieron la conclusión de que el tratamiento con AlbiX® proporciona un mejor rendimiento que el tratamiento con Albutein®.

Los datos que combinan ambas estrategias de cultivo celular para la comparación de los estudios de criopreservación (no se muestran) demostraron que los valores medios de viabilidad de 24 a 72 h eran OOS para la solución de Albutein®, mientras que los resultados cumplían con la especificación a lo largo de todos los puntos temporales de para la solución AlbiX®.

Para comparar mejor el % de viabilidad para las condiciones de tratamiento de AlbiX® y Albutein®, la variabilidad observada se normalizó en las diferentes líneas de células primarias y estrategias de expansión. La normalización consistió en considerar el $T = 0$ de la estabilidad como el 100 % de la viabilidad y calcular el porcentaje de reducción a lo largo del tiempo con respecto a este valor. Las representaciones gráficas de estos porcentajes de reducción de viabilidad se muestran en las Figuras 8C y 8D.

La reducción de la viabilidad después de la normalización de los datos fue siempre mayor para la condición de Albutein® que para AlbiX™ en todas las líneas celulares y estrategias de cultivo sometidas a ensayo. Las reducciones en la viabilidad aumentaron progresivamente a lo largo del tiempo, alcanzando valores del 60-80 % a las 72 h para las células PL o del 45-85 % para las células hSERB. El análisis estadístico (ensayo de comparación múltiple de Sidak no paramétrica con ANOVA usado) se realizó en la comparación entre condiciones de criopreservación y dio como resultado la detección de diferencias significativas a las 72 h ($p < 0,05$) para la estrategia de cultivo hSERB, y en $t = 24$ ($p < 0,05$), 48 y 72 h ($p < 0,001$) para la estrategia de expansión del cultivo PL.

En conjunto, estos resultados corroboraron la conclusión previa y confirmaron que AlbiX™ mejora la estabilidad del producto después de la descongelación con respecto a la viabilidad en comparación con Albutein®.

Fenotipo

La identidad de hMSC se comparó a lo largo de los diferentes puntos temporales de estabilidad (0, 24 y 72 h) para las líneas celulares expandidas con hSERB comprobando el % de expresión de los diferentes marcadores de superficie considerados (véase la Figura 11).

Para los puntos temporales 0 y 24 h, y para los protocolos de criopreservación de Albutein® o AlbiX®, se cumplieron los criterios aceptados en la actualidad para identificar hMSC: al menos un 95,0 para los antígenos CD105, CD73 y CD90; no superior a un 5 % para CD45 y CD31; y no superior a un 20 % para HLA-DR. En el caso del punto temporal de 72 h, los cultivos de células primarias XCO13008, para ambas condiciones de criopreservación estudiadas Albutein® y AlbiX®, fueron OOS para los marcadores de superficie positivos: CD105, CD73 y CD90. La expresión de los antígenos mencionados estaba por debajo del límite aceptado de al menos un 95,0. Este resultado fue consecuencia de la baja viabilidad de este cultivo celular primario: 10 %. De hecho, cuando las células están muertas, liberan una serie de proteínas o componentes intracelulares en el medio ambiente que podrían estar unidos por los conjugados de anticuerpos monoclonales, lo que podría llevar a conclusiones erróneas, en particular cuando las frecuencias celulares son bajas, como fue este caso.

El análisis estadístico realizado (se usó el ensayo de comparación múltiple de ANOVA y Tukey) no reveló diferencias significativas entre los agentes crioprotectores evaluados para la evaluación de la estabilidad. La estabilidad de la suspensión celular después de la criopreservación fue equivalente a las soluciones de AlbiX® y Albutein® en términos de identidad.

Protección de multipotencia de AlbiX® con respecto a Albutein®

La multipotencia de hMSC, en otras palabras, su capacidad para diferenciarse en diferentes linajes mesodérmicos (adipogénico, osteogénico y condrogénico) se estudió después de la descongelación y a lo largo de los diferentes puntos temporales de estabilidad (0, 24 y 72 h) para los cultivos de células primarias expandidos con hSERB y criopreservados con condiciones de Albutein® o AlbiX®.

Los datos obtenidos (no se muestran) indicaron que la multipotencialidad de hMSC era estable después de la crioconservación y durante 72 horas después de la descongelación para las condiciones de AlbiX® y Albutein®. La falta de potencial de diferenciación se detectó en algunas condiciones y esto se asoció a un bajo número de células viables o al cultivo celular dependiente pero no relacionado con la solución de criopreservación usada.

CONCLUSIONES

Efecto crioprotector

No se detectaron diferencias significativas entre las soluciones de criopreservación AlbiX® (TI) y Albutein® (RI) en términos de viabilidad e identidad cuando se compararon las suspensiones celulares congeladas previamente y con una descongelación posterior inmediata.

Estabilidad después del efecto de criopreservación

Después de descongelar y a lo largo de los puntos temporales de estabilidad evaluados, AlbiX® garantizó los mejores resultados de viabilidad celular:

- El cultivo celular expandido con hSERB mostró OOS (viabilidad = 70 %) a 48 h para Albutein®, mientras que los primeros OOS se detectaron a 72 h para AlbiX®. Solo se detectaron diferencias estadísticas significativas para Albutein® en la comparación de $t = 0$ con respecto a $t = 72$ h.
- El cultivo de células primarias expandido con la condición subóptima PL fortaleció el mejor rendimiento de AlbiX® con respecto a Albutein®. La viabilidad OOS ya se detectó a las 24 h para Albutein®, mientras que la primera OOS se detectó a las 72 h para AlbiX®. Se detectaron diferencias estadísticas significativas a las 24 h para Albutein® en comparación con el tiempo 0, y no se detectaron para AlbiX®.
- Después de la normalización de los datos, el porcentaje en la reducción de la viabilidad confirmó los datos anteriores: se detectaron reducciones más bajas en la condición AlbiX®, y se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó con Albutein® a las 72 h, para las células expandidas hSERB, y para todos los puntos temporales estudiados 24, 48 y 72 h, para células PL expandidas.

Con respecto a la identidad y multipotencia de hMSC, las soluciones AlbiX® y Albutein® mostraron resultados comparables a lo largo de los diferentes puntos temporales de estudio manteniendo el resultado obtenido en el tiempo 0.

Ejemplo 3

Las células tratadas con Albutein® (control) y tratadas con AlbiX® del Ejemplo 2 se evaluaron para la apoptosis en etapa temprana y tardía después del almacenamiento posterior a la descongelación para los puntos temporales $T = 0, 24, 48$ y 72 horas después de la descongelación, cuando se almacenan en los medios de almacenamiento relevantes a $2-8^{\circ}\text{C}$. La apoptosis en etapa temprana y tardía se evaluaron usando un NC3000™ NucleoCounter.

Los resultados se muestran en la Figura 12.

La Figura 12A muestra que AlbiX® es eficaz para reducir el número de células que entran en apoptosis en etapa tardía después de almacenamiento durante periodos superiores a 24 horas, mostrando claras diferencias a las 48 y 72 horas.

La Figura 12B muestra que AlbiX® es eficaz para aumentar el número de células retenidas en la apoptosis en etapa temprana en todos los puntos temporales evaluados.

El estudio apoptótico puede explicar el modo de acción de AlbiX® al evitar que las células progresen a la apoptosis tardía en comparación con el control.

Ejemplo 4

Los ejemplos previos demostraron el efecto beneficioso de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, AlbiX®, cuando está presente tanto en los medios de criopreservación como en los medios de almacenamiento, en las células madre durante un ciclo de congelación/descongelación de criopreservación.

En este ejemplo, el papel de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura además el estudio para determinar si ejerce sus efectos beneficiosos como estabilizador después de la descongelación, o como crioprotector durante la congelación, o ambos.

Para ello, se configuraron cuatro condiciones diferentes. Tres elementos de ensayo emplearon una albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura representativa (AlbiX®), que se usó solo como crioprotector, solo como estabilizador, o como crioprotector y estabilizador. La cuarta condición, proporcionada como elemento de referencia (R1), fue el uso de Albutein®, una solución de albúmina obtenida a partir de sangre humana y comercializada por Grifols, en la que se incluyó Albutein® como un crioprotector y un estabilizador.

Esto se puede resumir como sigue a continuación:

Muestra	Solución de criopreservación	Solución de almacenamiento después de la descongelación
Elemento de Referencia (RI)	Plasmalyte®, Albutein® al 2 % y solución de DMSO al 10 %	Plasmalyte® y Albutein® al 2 %
Elemento de Ensayo 1 (TI1)	Plasmalyte®, AlbiX® al 2 % y solución de DMSO al 10 %	Plasmalyte® y Albutein® al 2 %
Elemento de Ensayo 2 (TI2)	Plasmalyte®, Albutein® al 2 % y solución de DMSO al 10 %	Plasmalyte® y AlbiX® al 2 %
Elemento de Ensayo 3 (TI3)	Plasmalyte®, AlbiX® al 2 % y solución de DMSO al 10 %	Plasmalyte® y AlbiX® al 2 %

La viabilidad se evaluó antes de la congelación, inmediatamente después de la descongelación y durante un estudio de estabilidad, según lo recomendado por las regulaciones de GMP al realizar cambios de fabricación. También se realizó un estudio de apoptosis para investigar además un posible mecanismo de acción de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

Cultivos de MSC:

Las MSC de calidad clínica obtenidas a partir de médula ósea (BM) se produjeron después de un bioproceso que satisfacía las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) con el consentimiento informado del donante apropiado, como se describe en cualquier parte (Codinach *et al.*, 2016, Cytotherapy, 18 (9): 1197-1208). Las MSC se expandieron aún más *in vitro* usando "medio de expansión", que se compone de Medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM; Gibco, Grand Island, Nueva York; USA) que contenía glutamina 2 mM y suplementado con Suero B humano al 10 % (v/v) (hSerB; Banc de Sang i Teixits, Barcelona, España). Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C y CO₂ al 5 % en incubadoras humidificadas y se realizó un reemplazo completo de los medios cada 3-4 días.

Formulación de congelación/descongelación posterior:

Después de la expansión a gran escala, las células se criopreservaron en una solución formada por solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Gibco, Grand Island, Nueva York; USA) suplementada con dimetil sulfoxido al 10 % (v/v) (DMSO; OriGen Biomedical, Austin, Texas, USA) y un 2 % (p/v) de Albutein® o AlbiX®. Dependiendo de las condiciones, las células se descongelaron con una solución de un 2 % de Albutein® o AlbiX® (p/v) en Plasmalyte® (Baxter). A continuación las células se acondicionaron en una jeringa de 10 ml para reproducir

la dosis clínica y se almacenaron a 2-8 °C para el estudio de estabilidad.

Evaluación de estabilidad:

La concentración y la viabilidad celulares se evaluaron con dos técnicas: citometría de flujo y con un aparato de recuento celular automatizado NucleoCounter™ 3000™ (ChemoMetec, Allerød, Dinamarca). La concentración celular se evaluó mediante citometría de flujo usando Perfect-Count Microsphere™ (Cytognos). El ensayo de viabilidad del aparato de recuento nuclear y el recuento celular se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad celular se determinó con citometría de flujo mediante una doble tinción usando 7-aminoactinomicina D (7AAD; BD Biosciences, San Diego, California, USA) y ANEXINA V. Aunque 7AAD se une específicamente al ADN cuando la membrana celular se daña por procesos necróticos, la ANEXINA V se une a la fosfatidilserina, que normalmente se expresa en el interior de la membrana plasmática y se transloca externamente durante la etapa temprana de la apoptosis.

Ensayo de apoptosis:

El porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías se evaluó usando un aparato de recuento celular automatizado NucleoCounter NC-3000™ (ChemoMetec, Allerød, Dinamarca) como se describe en las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se tiñeron con Hoechst 33342 para seleccionar la población celular total, la unión de ANEXINA V se usó para la tinción específica de células apoptóticas tempranas y por último las células se incubaron con PI para cuantificar las células necróticas. El software NucleoView NC3000 (ChemoMetec A / S, Allerød, Dinamarca) se usó para analizar e interpretar los resultados del NucleoCounter™.

Referencias:

Nota de la solicitud N.º 3017 Rev. 1.4 titulada "Ensayo de anexina V usando el sistema NucleoCounter® NC-3000™", publicada por ChemoMetec A/S, de Gydevang 43, DK-3450 Allerød, Dinamarca, y disponible en línea, por ejemplo, en <https://chemometec.com/wp-content/uploads/2015/04/994-3017-Annexin-V-Assay.pdf>.

Resultados:

Análisis de viabilidad:

La viabilidad de la congelación previa y la congelación posterior se comparó para todos los elementos con dos dispositivos: citómetro de flujo y Nucleocounter.

Los resultados de ambas técnicas se muestran en la **Figura 13**. Con ambos dispositivos se observaron tendencias similares. Inmediatamente después de la descongelación, todos los elementos de ensayo (TI1, TI2 y TI3) cumplían los criterios de aceptación (viabilidad > 70 %) mientras que 2 de cada tres de los elementos de referencia (RI) ya estaban fuera de especificación. Esto demuestra que todos los elementos de ensayo con AlbiX® mostraban una mejor viabilidad inmediatamente después de la descongelación, en comparación con el elemento de referencia (RI) que usó Albutein® en los medios tanto de criopreservación como de almacenamiento.

Es notable que el porcentaje de viabilidad de TI3, como se determina mediante la técnica de nucleocounter, no es significativamente diferente al nivel de viabilidad en la muestra de congelamiento previo, lo que indica un grado particularmente alto de protección celular cuando la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, se usa en los medios tanto de criopreservación como de almacenamiento.

Estos datos indican que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, mejora la viabilidad después de la descongelación. El efecto beneficioso se observó cuando la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se incluyó en el medio de criopreservación solo, el medio de almacenamiento solo, o en ambos para el efecto máximo.

Es interesante observar la diferencia mensurable en la viabilidad inmediatamente después de la descongelación (t = 0 h) observada en los datos de la Figura 13. Por el contrario, en el Ejemplo 2, los investigadores informan que la viabilidad inmediatamente después de la descongelación era comparable entre el uso de Albutein® y AlbiX® en los medios de criopreservación y de almacenamiento. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que esta diferencia se puede atribuir a diferencias en las estrategias de expansión usadas para proporcionar las células para el ensayo en los Ejemplos 2 y 4. El uso de medios y condiciones óptimas para la expansión celular, como en el Ejemplo 2, parece conducir a la equivalencia en la viabilidad detectada inmediatamente después de la descongelación (aunque las diferencias se hicieron evidentes después de periodos de almacenamiento más largos, tal como 24 horas o más), mientras que las células se expandieron en condiciones de estrés subóptimas y/o antes de la criopreservación parecen demostrar diferencias más notables de la viabilidad inmediatamente después de la descongelación, dependiendo del uso de AlbiX® o Albutein®.

La viabilidad también se evaluó durante un periodo de tiempo más largo de almacenamiento después de la

descongelación a 2-8 °C, desde inmediatamente después de la descongelación hasta 72 horas. Los resultados se proporcionan en la **Figura 14**.

Los resultados en las Figuras 13 y 14 indican que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura proporcionó el mayor efecto protector beneficioso cuando se incluyó tanto en el medio de criopreservación como en el medio de almacenamiento, aunque también se observó un efecto protector beneficioso cuando la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se incluyó en el medio de criopreservación solo, o el medio de almacenamiento solo, en comparación con el elemento de referencia.

Una comparación directa de RI y TI2 muestra el beneficio de proporcionar albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura únicamente en el medio de almacenamiento. La viabilidad se evaluó en el siguiente punto temporal después de la descongelación: 0 h, 24 h, 48 h y 72 h con un protocolo de doble tinción que consideraba tanto las células necróticas (7AAD) como las apoptóticas (ANEXINA V) para la citometría de flujo. Para el nucleocounter se usó una tinción triple que consideraba también las células necróticas (PI) y las células apoptóticas (ANEXINA V). Aunque la citometría de flujo seleccionó las células de acuerdo con su tamaño y morfología, el nucleocounter seleccionó las células con una tercera tinción de Hoechst. Los resultados se muestran en la **Figura 15**.

Los resultados muestran que, después de la descongelación, solo una línea celular de tres de la muestra R1 cumplía los criterios de aceptación de rutina (viabilidad > 70 %). Por el contrario, todas las líneas celulares de TI2 mostraron una viabilidad superior al 70 %. TI2 descongelado y acondicionado con AlbiX® mostró un mayor porcentaje de viabilidad en todos los puntos temporales sometidos a ensayo.

Los datos para RI y TI2 se normalizaron, para evaluar la variación de la viabilidad en el tiempo sin verse afectada por el % inicial de viabilidad observado inmediatamente después de la descongelación, en t = 0 h. Para los fines de este ensayo, el punto temporal 0 h se consideró como el punto temporal con un 100 % de viabilidad para cada muestra, y la reducción de la viabilidad desde este punto temporal se evaluó con respecto a este valor. Los datos se representaron para cada línea celular como se muestra en la **Figura 16**.

Se observaron tendencias similares en las reducciones de viabilidad tanto con citometría de flujo como con nucleocounter. Para ambos dispositivos, se observó una diferencia significativa en la reducción de viabilidad normalizada de t = 48 h, para lo cual la reducción de viabilidad fue menor para TI2 descongelado con AlbiX® que RI descongelado con Albutein™. Mientras que la reducción de viabilidad para el elemento de referencia ya era significativa en t = 24 h, la reducción de viabilidad se volvió significativa desde t = 48 h (los datos no se muestran).

Los datos muestran que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, aumentaba de forma significativa la estabilidad del producto en comparación con la albúmina obtenida a partir de plasma, tal como Albutein®, disminuyendo la reducción de la viabilidad que se produce a 2-8 °C.

Se realizaron ensayos adicionales para determinar si los efectos beneficiosos de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, en el medio de almacenamiento se modifican al incluir adicionalmente la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura en el medio de criopreservación. Los resultados de un ensayo de apoptosis que compara T1 y T13 se proporcionan en la **Figura 17**.

Como se ha indicado anteriormente, TI1 se caracteriza por usar AlbiX® en el medio de criopreservación pero Albutein™ en el medio de almacenamiento; mientras que TI3 se caracteriza por usar AlbiX® tanto en el medio de criopreservación como en el medio de almacenamiento.

Los resultados muestran que TI3 tenía una viabilidad más elevada a lo largo de todos los puntos temporales. Después de la normalización de datos (no se muestra), los datos indicaron que la reducción de viabilidad fue menor para TI3 que para TI1 en cada punto temporal. Estos resultados demuestran los efectos beneficiosos de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, en el medio de almacenamiento. El efecto beneficioso no se limita únicamente a su inclusión en el medio de criopreservación, y tampoco depende de la identidad específica del medio de criopreservación (aunque los mejores resultados se obtuvieron con AlbiX® tanto en los medios de criopreservación como de almacenamiento).

Una comparación de RI y TI3 muestra directamente el beneficio de incluir albúmina de suero recombinante, tal como AlbiX®, tanto en el medio de criopreservación como en el medio de almacenamiento (TI3), en comparación con el uso de Albutein™ en ambos medios (RI). Los resultados se muestran en la **Figura 18**, que indica que la viabilidad fue significativamente mayor en el estudio de estabilidad para la TI3, en cada punto temporal. Estas diferencias tendieron a aumentar durante periodos más largos de almacenamiento después de la descongelación.

Después de la normalización de los datos comparando RI y TI3 (los datos no se muestran), se observó que la reducción de viabilidad en cada punto temporal era mayor para RI que para TI3, la última de las cuales parecía ser la mejor condición con la menor reducción de viabilidad en el tiempo comparado no solo con RI sino también con los otros elementos evaluados.

Se concluye que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, mejora la estabilidad del producto. Se pueden obtener efectos beneficiosos cuando la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se incluye en el medio de criopreservación solo, el medio de almacenamiento solo, o en ambos.

Análisis apoptótico:

Los resultados de la comparación de las muestras R1 y TI2 con el ensayo de apoptosis se proporcionan en **Figura 19A**. A partir de $t = 24$ h, se observó una clara diferencia significativa entre los dos elementos (ensayo de comparación múltiple de ANOVA y Sidak). Después de la normalización de datos, de $t = 0$ h a 72 h, se observó una disminución significativa de las células apoptóticas tempranas para ambos elementos, lo que indica un proceso general de cambio de apoptosis temprana a tardía durante el periodo de almacenamiento. Sin embargo, hubo una clara diferencia entre R1 y TI2 en $t = 24$ y $t = 48$ h. Los datos mostraron una reducción en el cambio a la apoptosis tardía para TI2, en comparación con la muestra R1, lo que respalda la conclusión de que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, puede ralentizar el proceso de las células que entran en la apoptosis tardía.

A partir de estos resultados, los investigadores llegan a la conclusión de que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, apoya el mantenimiento de células madre criopreservadas en el almacenamiento después de la descongelación en el estado apoptótico temprano, reduce el cambio a apoptosis en etapa tardía y aumenta la estabilidad de los productos celulares cuando se usa como estabilizador en el medio de almacenamiento.

Los resultados de la comparación de las muestras TI1 y TI3 con el ensayo de apoptosis se proporcionan en la **Figura 19B**. Los datos además apoyan la conclusión de que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, como un estabilizante en el medio de almacenamiento, puede disminuir el intercambio de las células hacia una etapa apoptótica tardía, independientemente de la identidad de la albúmina en el medio de criopreservación.

Los resultados de la comparación de las muestras R1 y TI3 con el ensayo de apoptosis se proporcionan en **Figura 19C**. Los resultados muestran que el porcentaje de células apoptóticas tempranas era significativamente diferente entre las muestras R1 y TI3 en cada punto temporal durante el ensayo de estabilidad. De manera similar, la diferencia en el porcentaje de células apoptóticas tardías entre estos dos elementos también era significativa. Estos datos confirman además que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, tal como AlbiX®, tiene la capacidad de ralentizar la entrada de las células en la apoptosis tardía durante el almacenamiento posterior a la descongelación.

Ejemplo 5

Comparación de Recombumin® Prime y Recombumin® Alpha con productos de Albúmina recombinante obtenida a partir de plantas

Como se ha indicado anteriormente, en la descripción de la presente solicitud, Frahm *et al.*, 2014, PLOS One, 9 (1): e109893 informaron un estudio en el que las propiedades de la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura (en particular, Recombumin® Prime y Recombumin® Alpha) se compararon con otro producto de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas, con productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas y de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de plantas.

Los productos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presentaban numerosas diferencias físicas con respecto a las composiciones de albúmina de suero obtenida a partir de otras fuentes (por ejemplo, de plasma, o de otras fuentes recombinantes tal como plantas). Además, los productos Recombumin® Prime y Recombumin® Alpha mostraron algunas diferencias claras con respecto a la otra albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura obtenida a partir de *Pichia*.

El presente ejemplo demuestra más diferencias.

Un resumen de los productos se presenta en la tabla que sigue a continuación. Todas las albúminas recombinantes descritas están destinadas al uso biofarmacéutico.

Albúmina	Fuente	Pureza Etiquetada
Recombumin® Prime	Levadura - <i>Saccharomyces</i>	≥ 99 %
Recombumin® Alpha	Levadura - <i>Saccharomyces</i>	≥ 99 %

Albúmina Comercial 1	Arroz - <i>Oryza</i>	≥ 99 %
Albúmina Comercial 2	Arroz - <i>Oryza</i>	≥ 95 %
Albúmina Comercial 3	Levadura - <i>Pichia</i>	≥ 98 %

La columna titulada "pureza etiquetada" se refiere al nivel de pureza indicado por el fabricante en la hoja del producto.

5 Pureza y homogeneidad

La comprensión de la pureza de un excipiente proteico tal como una albúmina recombinante es compleja. Además de comprender la presencia de otros componentes en la formulación final, los niveles de proteína y los excipientes de la célula huésped, también se debe prestar atención a la homogeneidad de la proteína misma. La presencia de formas modificadas de la proteína, en cantidades significativas, proteína tal como glicosilada o parcialmente degradada puede tener un efecto significativo en la funcionalidad de la proteína, así como disminuir la aceptabilidad del material a las autoridades reguladoras.

Todas las albúminas recombinantes comerciales sometidas a ensayo en este ejemplo tienen una especificación de pureza de proteína indicada por el fabricante de un 95-99 %, basándose en electroforesis. Aunque se trata de una técnica convencional para la determinación de este parámetro, resolverá notoriamente la heterogeneidad de la proteína. Los investigadores han realizado un análisis detallado de las albúminas recombinantes comerciales mediante espectrometría de masas y los datos se presentan en la Figura 1. Estos datos se presentan junto con los datos comparativos de electroforesis en gel en la Figura 2.

A pesar de las afirmaciones de pureza marcadas de forma relativamente similar mediante electroforesis en gel, el análisis de espectrometría de masas revela una imagen más interesante. Tanto Recombumin® Prime como Recombumin® Alpha (Figura 1 (a)) mostraron una especie predominantemente única a 66,4 kDa que es representativa de la molécula de albúmina de suero humano nativa. En comparación, todas las otras muestras comerciales de albúmina recombinante evaluadas contenían múltiples picos que eran indicativos de formas de la proteína parcialmente degradadas o glicosiladas en la formulación final. Quizás el espectro de masas más llamativo se registró para el producto obtenido a partir del arroz del Proveedor 1 (Figura 1 (b)). Este producto mostró 40 picos en el intervalo de masas evaluado. Basándose en este análisis, es evidente que solo una pequeña proporción de la proteína presente es albúmina de suero humano nativa. Esto a pesar de la afirmación de pureza marcada de > 96 % (p/p).

Apariencia visual:

La apariencia visual a menudo es uno de los primeros ensayos analíticos realizados para examinar el color y la claridad del producto. Este parámetro es importante ya que a menudo se considera una indicación directa de la calidad y pureza del producto. En los casos en que es probable que el material esté presente en cantidades relativamente grandes, un aumento significativo en la pigmentación del producto debido al excipiente puede ser indeseable.

Las imágenes presentadas en la Figura 3 demuestran que Recombumin® Prime y Recombumin® Alpha son los menos pigmentados de los productos evaluados; con ambos productos teniendo un color claro/pajizo. Los productos alternativos mostraron niveles crecientes de pigmentación con la albúmina del Proveedor 1, un producto obtenido a partir del arroz, que muestra la mayor pigmentación y el producto final tiene un color naranja/ámbar.

Caracterización funcional:

La molécula de albúmina contiene un grupo tiol libre natural que es un antioxidante natural para la estabilización de la formulación. Aunque este grupo es intrínseco a la molécula de albúmina nativa, se puede oxidar y desactivar debido al mal almacenamiento o procesamiento.

El contenido de tiol libre de las albúminas recombinantes comerciales descritas en este Ejemplo se presenta en la siguiente tabla.

Albúmina	Contenido de Tiol libre (%)
Recombumin® Alpha	97
Recombumin® Prime	85
Albúmina Comercial 3	69
Albúmina Comercial 2	62

Albúmina Comercial 1	2
----------------------	---

Es evidente que los niveles de tiol libre varían entre productos, con productos de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura mostrando los niveles más altos de contenido de tiol libre. Recombumin® Prime y Recombumin® Alpha mostraron los niveles más altos de todas las albúminas analizadas. La albúmina 1 comercial, obtenida a partir de arroz, estaba casi completamente bloqueada.

Ejemplo 6

Comparación del cultivo de células madre en presencia de albúmina recombinante obtenida a partir de levadura, producto de albúmina recombinante obtenida de plantas o albúmina obtenida a partir de plasma

El objeto de este estudio fue evaluar la idoneidad de 6 muestras diferentes de albúmina de suero humano (HSA) para su uso como suplemento de cultivo celular en aplicaciones de cultivo de células madre embrionarias humanas (hESC).

Las muestras sometidas a ensayo fueron:

- Muestras 1, 3, 4 y 5: diferentes lotes de HSA recombinante obtenida a partir de levadura (AlbIX®).
- Muestra 2: HSA obtenida a partir de plasma disponible en Sigma (A 9080).
- Muestra 6: HSA recombinante obtenida a partir de plantas, Cellastim™, disponible en Sigma (A9731).

Dos líneas diferentes de hESC (SA121 y SA181), cultivadas previamente en un sistema de cultivo celular sin xeno para 8 pases, a continuación se transfirieron a medio sin xeno que contenía cada una de las diferentes muestras de ensayo y se cultivaron durante otros 7 pases antes de analizar la expresión de marcadores de pluripotencia por inmunocitoquímica y QPCR. DEF-CS™ (un medio de cultivo celular iPS humano definido químicamente disponible en el mercado) y medio sin xeno que contiene AlbIX® se usaron como controles en el estudio.

En cada pase se hizo el recuento de las células y el tiempo de duplicación se calculó usando la fórmula $T_d = t \times [\log 2 / \log (\text{densidad de células en la recogida} / \text{densidad en la siembra})]$, en la que t = tiempo entre pases (horas). El tiempo medio de duplicación se calculó para cada uno de los medios de ensayo y los datos se analizaron por ANOVA unidireccional con comparación por pares de Tukey.

Resultados

Se encontró que HSA recombinante obtenida a partir de levadura (muestras 1, 3, 4 y 5) era adecuada para su uso como suplemento de medio para las hESC ya que apoyaba el crecimiento indiferenciado de las líneas celulares SA121 y SA181 durante 7 pases. Los análisis de QPCR e inmunocitoquímicos demostraron la expresión uniforme de marcadores de pluripotencia en estos cultivos con bajos niveles de expresión de marcadores de diferenciación que se examinaron. Los resultados obtenidos con las muestras 1, 3, 4 y 5 se comparan favorablemente con ambos controles.

Se encontró que HSA obtenida a partir de plasma (muestra 2) no era adecuada, ya que no podía soportar el crecimiento indiferenciado de la línea celular SA181, sin embargo, las células SA121 crecieron bien en un medio que contiene esta HSA.

También se encontró que la HSA recombinante obtenida a partir de plantas, Cellastim™ (Muestra 6) era inadecuada para aplicaciones de cultivo de hESC ya que no podía soportar el crecimiento de las líneas celulares SA121 o SA181, con cultivos que fallaban antes del primer pase en cada caso.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AlbumedixA/S

<120> Usos de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura

<130> ALBBE/P64407PC

<140> DESCONOCIDO

<141> 04-10-2017

<150> 16192276.0

<151> 04-10-2016

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1758

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1758)

<223> ADNc que codifica HSA

<400> 1

gatgcacaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa	60
gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta	120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa	180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt	240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa	300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaaccca aacctcccc gattggtgag accagaggtt	360
gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaataa atacttatat	420
gaaattgccg gaagacatcc ttacttttat gcccgggaac tccttttctt tgctaaaagg	480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctgttgcca	540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt	600
gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc tcgcctgagc	660
cagagatttc ccaaagctga gtttgcagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa	720
gtccacacgg aatgctgccg tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggccggacctt	780
gccaaagtata tctgtgaaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa	840
aaacctctgt tggaaaaatc ccactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct	900
gaattgcctt cattagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct	960
gaggcaaagg atgtcttcct gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcatcctgat	1020

tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc 1080
 tgtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt 1140
 gtggaagagc ctcagaattt aatcaaacaa aattgtgagc tttttgagca gcttgagag 1200
 tacaaattcc agaatgcgct attagtctgt tacaccaaga aagtacccca agtgtcaact 1260
 ccaactcttg tagaggtctc aagaaaccta ggaaaagtgg gcagcaaagtg ttgtaaacat 1320
 cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct gaaccagtta 1380
 tgtgtgttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaaagctg cacagaatcc 1440
 ttggtgaaca ggcgaccatg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaaa 1500
 gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag 1560
 agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca 1620
 aaagagcaac tgaagctgt tatggatgat ttgcgagctt ttgtagagaa gtgctgcaag 1680
 gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttgttgc tgcaagtcaa 1740
 gctgccttag gcttataa 1758

<210> 2
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

ES 2 761 854 T3

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210> 3
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255

Lys Lys Val Thr Asp Lys Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Len Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Len Leu Glu Lys Ser 'lis Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Net Phe Len Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Len Arg Len Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Len
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr 14U Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys Bis
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu las Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe

ES 2 761 854 T3

500	505	510
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala		
515	520	525
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu		
530	535	540
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys		
545	550	555
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
565	570	575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe		
580	585	590
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly		
595	600	605

Leu

5
 <210> 4
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*
 <400> 4

ES 2 761 854 T3

Met Asn Glu Ser Ser Cys Cys Ser Thr Ser Leu Pro Ala Phe Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Leu Asp Ser Gly His Ser Ser Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly
20 25 30

Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
35 40 45

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Val Ala Phe Ala
50 55 60

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
65 70 75 80

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
85 90 95

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr

ES 2 761 854 T3

100					105					110					
Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Lys	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cya	Cya	Ala
		115					120					125			
Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp
	130					135					140				
Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys
145					150					155					160
Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Gly	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr
				165					170					175	
Glu	Val	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe
			180					185					190		
Phe	Ala	Glu	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala
	195						200					205			
Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Aap	Glu
	210					215					220				
Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln
225					230					235					240
Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser
				245					250					255	
Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr
			260					265					270		
Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	Mis	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu
	275						280					285			
Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln
	290					295					300				
Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu
305					310					315					320
Glu	Lys	Ser	His	Cys	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala
				325					330					335	
Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Glu	Val	Cys
			340					345					350		

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 355 360 365

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 370 375 380

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 385 390 395 400

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 405 410 415

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 420 425 430

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 435 440 445

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 450 455 460

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 465 470 475 480

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 485 490 495

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 500 505 510

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 515 520 525

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 530 535 540

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 545 550 555 560

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 565 570 575

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 580 585 590

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 595 600 605

ES 2 761 854 T3

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
610 615 620

5
<210> 5
<211> 608
<212> PRT
<213> *Macaca mulatta*

<400> 5

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Asp	Thr	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	20	25	30	
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	35	40	45	
Val	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Glu	His	Val	50	55	60	
Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	65	70	75	80
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	85	90	95	
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	100	105	110	
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	115	120	125	
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Pro	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	130	135	140	
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Ala	Thr	Phe	Leu	Lys	145	150	155	160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Val	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	165	170	175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Ala	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Ala	Glu	Cys	180	185	190	
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	195	200	205	

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Asp Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp
 290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Leu Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Tyr Val Glu Ser
 325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Met
 355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Ala Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400

Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Val Lys Gln Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ala Lys Cys Cys Lys Leu
 450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Leu Asp Glu Ala Tyr Val Pro Lys Ala Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Met Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Lys Gln Val Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Gly Val Met Asp Asn Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Ala Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Pro Lys Phe Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Ala
595 600 605

<210> 6

<211> 608

<212> PRT

<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 6

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Val Ser Asp Ser Ala
1 5 10 15

Phe Ser Arg Gly Leu Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln Phe Leu Gln Lys Cys Pro Tyr Glu Glu His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Thr Leu Arg Asp Ser Tyr Gly Glu Leu Ala
 100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Lys Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Lys
 115 120 125

His Lys Asp Asp His Pro Asn Leu Pro Pro Phe Val Arg Pro Asp Ala
 130 135 140

Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Gln Glu Asn Ala Val Thr Phe Met Gly
 145 150 155 160

His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175

Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Lys Tyr Ser Ala Ile Met Thr Glu Cys
 180 185 190

Cys Gly Glu Ala Asp Lys Ala Ala Cys Ile Thr Pro Lys Leu Asp Ala
 195 200 205

Leu Lys Glu Lys Ala Leu Ala Ser Ser Val Asn Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220

Ser Ser Leu Gln Arg Phe Gly Gln Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240

Ala Arg Met Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr
 245 250 255

Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Leu Thr Glu Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Ala Ser Ile Ser Ser Lys Leu Gln Ala Cys Cys Asp
 290 295 300

Lys Pro Val Leu Lys Lys Ser His Cys Leu Ser Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320

Asp Leu Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp

ES 2 761 854 T3

325										330					335				
Lys	Glu	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly				
			340					345					350						
Thr	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Ala				
		355					360					365							
Leu	Leu	tau	Arg	Leu	Ala	Lys	Lys	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys				
	370					375					380								
Cys	Ala	Glu	Ala	Asp	Pro	Ser	Ala	Cys	Tyr	Gly	Lys	Val	Leu	Asp	Glu				
385					390					395					400				
Phe	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Lys	Asn	Tau	Val	Lys	Ala	Asn	Cys				
				405					410					415					
Glu	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Ile				
			420					425					430						
Val	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val				
		435					440					445							
Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Val	Leu				
	450					455					460								
Pro	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Pro	Cys	Val	Glu	Asp	Tyr	Ile	Ser	Ala	Ile				
465					470					475					480				
Leu	Asn	Arg	Val	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Gln				
				485					490					495					
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Gly	Ser	Val	Val	Glu	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe				
			500					505					510						
Ser	Ala	LERJ	Pro	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Lys	Ala				
		515					520					525							
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Ser	Leu	Pro	Glu	Lys	Glu				
	530					535					540								
Lys	Gln	Met	Lys	Lys	Gln	Ala	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys				
545					550					555					560				
Pro	Lys	Ala	Thr	Gly	Pro	Gln	Leu	Arg	Thr	Val	Leu	Gly	Glu	Phe	Thr				
				565					570					575					

Ala Phe Leu Asp Lys Cys Cys Lys Ala Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe
580 585 590

Ser Glu Asp Gly Pro Lys Leu Val Ala Ser Ser Gln Ala Ala Leu Ala
595 600 605

<210> 7
<211> 608
<212> PRT
<213> *Cavia porcellus*

<400> 7

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Val
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Asn Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Thr Leu Ser Gln His Leu Gln Lys Ser Pro Phe Glu Glu His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Ala Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Gln Asn Cys Gly Lys Ala Ile Ala Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Val Cys Ala Ile Pro Ser Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Leu Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Glu Asp Pro Asp Arg Val Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Pro
130 135 140

Glu Ala Leu Cys Thr Ala Phe Lys Glu Asn Asn Asp Arg Phe Ile Gly
145 150 155 160

His Tyr Leu Tyr Glu Val Ser Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Lys Tyr Lys Asn Ala Leu Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Glu Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Ala
 195 200 205
 Ile Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Ala Gln Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ser Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Ile Ser
 245 250 255
 Thr Ile Val Thr Ser Leu Thr Lys Val Thr Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Gln Glu Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285
 Cys Glu His Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Val
 290 295 300
 Lys Pro Thr Leu Gln Lys Ala His Cys Ile Leu Glu Ile Gln Arg Asp
 305 310 315 320
 Glu Leu Pro Thr Glu Leu Pro Asp Leu Ala Val Asp Phe Val Glu Asp
 325 330 335
 Lys Glu Val Cys Lys Asn Phe Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Glu Tyr Ser Ile Gly
 355 360 365
 Met Leu Leu Arg Ile Ala Lys Gly Tyr Glu Ala Lys Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Glu Ala Asp Pro His Ala Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Leu Gln Pro Leu Ile Asp Glu Pro Lys Lys Leu Val Gln Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Asp Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ala
 420 425 430
 Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

ES 2 761 854 T3

Glu Tyr Ala Arg Lys Leu Gly Ser Val Gly Thr Lys Cys Cys Ser Leu
 450 455 460
 Pro Glu Thr Glu Arg Leu Ser Cys Thr Glu Asn Tyr Leu Ala Leu Ile
 465 470 475 480
 Leu Asn Arg Leu Cys Ile Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu His Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Pro Phe His Ala
 515 520 525
 Asp Ser Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu
 530 535 540
 Lys Gln Val Lys Lys Gln Met Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Ser Glu Glu Gln Met Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Leu Lys Lys Cys Cys Asp Ala Asp Asn Lys Glu Ala Cys Phe
 580 585 590
 Thr Glu Asp Gly Pro Lys Leu Val Ala Lys Cys Gln Ala Thr Leu Ala
 595 600 605

<210> 8
 <211> 608
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 8

ES 2 761 854 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala
1 5 10 15

Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala
50 55 60

Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala
 130 135 140
 Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly
 145 150 155 160
 His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys
 180 185 190
 Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly
 195 200 205
 Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys
 210 215 220
 Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr
 245 250 255
 Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp
 305 310 315 320

Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp
325 330 335

Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu
385 390 395 400

Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys
405 410 415

Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu
450 455 460

Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile
465 470 475 480

Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu
530 535 540

Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala

ES 2 761 854 T3

565

570

575

Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe
580 585 590

Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala
595 600 605

<210> 9

<211> 608

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 9

5

ES 2 761 854 T3

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Ser	Ala
1				5					10					15	
Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Glu	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala
			20					25					30		
His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Gln	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu
		35				40						45			
Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Lys	Cys	Pro	Tyr	Glu	Glu	His	Ile
	50					55					60				
Lys	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp
65					70					75					80
Glu	Asn	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Ile	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
				85					90					95	
Lys	Leu	Cys	Ala	Ile	Pro	Lys	Leu	Arg	Asp	Asn	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ala
			100					105					110		
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln
		115					120					125			
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Pro	Phe	Gln	Arg	Pro	Glu	Ala
	130					135					140				
Glu	Ala	Met	Cys	Thr	Ser	Phe	Gln	Glu	Asn	Pro	Thr	Ser	Phe	Leu	Gly
145					150					155					160
His	Tyr	Leu	His	Glu	Val	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro
				165					170					175	
Glu	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Lys	Tyr	Asn	Glu	Val	Leu	Thr	Gln	Cys

ES 2 761 854 T3

[illegible]

Val	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
		435					440					445			
Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Leu
	450					455					460				
Pro	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Pro	Cys	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ile
465					470					475					480
Leu	Asn	Arg	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Lys
			485						490					495	
Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Glu	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe
			500					505					510		
Ser	Ala	Leu	Thr	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Lys	Ala
		515					520					525			
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Pro	Asp	Lys	Glu
	530					535					540				
Lys	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys
545					550					555					560
Pro	Lys	Ala	Thr	Glu	Asp	Gln	Leu	Lys	Thr	Val	Met	Gly	Asp	Phe	Ala
				565					570					575	
Gln	Phe	Val	Asp	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Ala	Asp	Lys	Asp	Asn	Cys	Phe
			580					585					590		
Ala	Thr	Glu	Gly	Pro	Asn	Leu	Val	Ala	Arg	Ser	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala
		595				600						605			

<210> 10
 <211> 607
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

 <400> 10

ES 2 761 854 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Leu Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Ile Ala
 20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu His Phe Lys Gly Leu Val Leu
 35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val
 50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Leu Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80

Glu Ser His Ala Gly Cys Glu Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95

Glu Leu Cys Lys Val Ala Ser Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Asp Met Ala
 100 105 110

Asp Cys Cys Glu Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Ser
 115 120 125

His Lys Asp Asp Ser Pro Asp Leu Pro Lys Leu Lys Pro Asp Pro Asn
 130 135 140

Thr Leu Cys Asp Glu Phe Lys Ala Asp Glu Lys Lys Phe Trp Gly Lys
 145 150 155 160

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
 165 170 175

Leu Leu Tyr Tyr Ala Asn Lys Tyr Asn Gly Val Phe Gln Glu Cys Cys
 180 185 190

Gln Ala Glu Asp Lys Gly Ala Cys Leu Leu Pro Lys Ile Glu Thr Met
 195 200 205

Arg Glu Lys Val Leu Ala Ser Ser Ala Arg Gln Arg Leu Arg Cys Ala
 210 215 220

Ser Ile Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Leu Lys Ala Trp Ser Val Ala
 225 230 235 240

Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Val Glu Val Thr Lys
 245 250 255

Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly Asp
 260 265 270

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 275 280 285

Asp Asn Gln Asp Thr Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp Lys
 290 295 300

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Lys Asp Ala
 305 310 315 320

Ile Pro Glu Asn Leu Pro Pro Leu Thr Ala Asp Phe Ala Glu Asp Lys
 325 330 335

Asp Val Cys Lys Asn Tyr Gln Glu Ala Lys Asp Ala Phe Leu Gly Ser
 340 345 350

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Glu Tyr Ala Val Ser Val
 355 360 365

Leu Leu Arg Leu Ala Lys Glu Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Glu Cys Cys
 370 375 380

Ala Lys Asp Asp Pro His Ala Cys Tyr Ser Thr Val Phe Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Lys His Leu Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Asp
 405 410 415

Gln Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val
 420 425 430

Arg Tyr Thr Arg Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 435 440 445

Val Ser Arg Ser Leu Gly Lys Val Gly Thr Arg Cys Cys Thr Lys Pro
 450 455 460

Glu Ser Glu Arg Met Pro Cys Thr Glu Asp Tyr Leu Ser Leu Ile Leu
 465 470 475 480

Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val
 485 490 495

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 500 505 510

Ala Leu Thr Pro Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Ala Phe Asp Glu Lys
 515 520 525

Leu Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Thr Glu Lys
 530 535 540

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro
 545 550 555 560

Lys Ala Thr Glu Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala
565 570 575

Phe Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala Asp Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala
580 585 590

Val Glu Gly Pro Lys Leu Val Val Ser Thr Gln Thr Ala Leu Ala
595 600 605

<210> 11
<211> 607
<212> PRT
<213> *Equus caballus*

<400> 11

Met Lys Trp Val Thr Phe Val Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Leu Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Asn Asp Leu Gly Glu Lys His Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Val Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Lys Cys Ala Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Ala Thr Tyr Gly Glu Leu Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Glu Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Thr
115 120 125

His Lys Asp Asp His Pro Asn Leu Pro Lys Leu Lys Pro Glu Pro Asp
130 135 140

Ala Gln Cys Ala Ala Phe Gln Glu Asp Pro Asp Lys Phe Leu Gly Lys
145 150 155 160

Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Gly Pro Glu
165 170 175

Leu	Leu	Phe	His	Ala	Glu	Glu	Tyr	Lys	Ala	Asp	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys		
			180					185					190				
Pro	Ala	Asp	Asp	Lys	Leu	Ala	Cys	Leu	Ile	Pro	Lys	Leu	Asp	Ala	Leu		
		195					200					205					
Lys	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Ser	Ser	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Lys	Cys	Ser		
	210					215					220						
Ser	Phe	Gln	Asn	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Val	Lys	Ala	Trp	Ser	Val	Ala		
225					230					235					240		
Arg	Leu	Ser	Gln	Lys	Phe	Pro	Lys	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys		
			245						250					255			
Ile	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Lys	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp		
			260					265					270				
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys		
		275					280					285					
Glu	His	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Gly	Lys	Leu	Lys	Ala	Cys	Cys	Asp	Lys		
	290					295					300						
Pro	Leu	Leu	Gln	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Lys	Glu	Asp	Asp		
305					310					315					320		
Leu	Pro	Ser	Asp	Leu	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu	Asp	Lys		
				325					330					335			
Glu	Ile	Cys	Lys	His	Tyr	Lys	Asp	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Thr		
			340					345					350				
Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Ser	Leu		
		355					360					365					
Leu	Leu	Arg	Ile	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys		
		370				375					380						
Ala	Glu	Ala	Asp	Pro	Pro	Ala	Cys	Tyr	Arg	Thr	Val	Phe	Asp	Gln	Phe		
385					390					395					400		
Thr	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Lys	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Asn	Cys	Asp		
				405					410					415			

ES 2 761 854 T3

420	425	430
Arg Tyr Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu		
435	440	445
Ile Gly Arg Thr Leu Gly Lys Val Gly Ser Arg Cys Cys Lys Leu Pro		
450	455	460
Glu Ser Glu Arg Leu Pro Cys Ser Glu Asn His Leu Ala Leu Ala Leu		
465	470	475
Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Ile		
485	490	495
Thr Lys Cys Cys Thr Asp Ser Leu Ala Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser		
500	505	510
Ala Leu Glu Leu Asp Glu Gly Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu		
515	520	525
Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Asp Glu Lys		
530	535	540
Gln Ile Lys Lys Gln Ser Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro		
545	550	555
Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Thr Val Leu Gly Asn Phe Ser Ala		
565	570	575
Phe Val Ala Lys Cys Cys Gly Arg Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala		
580	585	590
Glu Glu Gly Pro Lys Leu Val Ala Ser Ser Gln Leu Ala Leu Ala		
595	600	605

<210> 12
 <211> 607
 <212> PRT
 <213> *Equus asinus*

 <400> 12

ES 2 761 854 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Val Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Phe Arg Gly Val Leu Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Ile Ala
 20 25 30

His Arg Phe Asn Asp Leu Gly Glu Lys His Phe Lys Gly Leu Val Leu

ES 2 761 854 T3

35	40	45
Val Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp Mis Val		
50	55	60
Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Lys Cys Ala Ala Asp		
65	70	75 80
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp		
	85 90	95
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Ala Thr Tyr Gly Glu Leu Ala		
	100 105	110
Asp Cys Cys Glu Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Thr		
	115 120	125
His Lys Asp Asp His Pro ASEI Leu Pro Lys Leu Lys Pro Glu Pro Asp		
	130 135	140
Ala Gln Cys Ala Ala Phe Gln Glu Asp Pro Asp Lys Phe Leu Gly Lys		
145	150 155	160
Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg Mis Pro Tyr Phe Tyr Gly Pro Glu		
	165 170	175
Leu Leu Phe Mis Ala Glu Glu Tyr Lys Ala Asp Phe Thr Glu Cys Cys		
	180 185	190
Pro Ala Asp Asp Lys Ala Gly Cys Leu Ile Pro Lys Leu Asp Ala Leu		
	195 200	205
Lys Glu Arg Ile Leu Leu Ser Ser Ala Lys Glu Arg Leu Lys Cys Ser		
	210 215	220
Ser Phe Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ser Val Ala		
225	230 235	240
Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Asp Phe Ala Glu Val Ser Lys		
	245 250	255
Ile Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly Asp		
	260 265	270
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Thr Lys Tyr Ile Cys		
	2 7 5 2 8 0	2 8 5

Glu His Gln Asp Ser Ile Ser Gly Lys Leu Lys Ala Cys Cys Asp Lys
 290 295 300

Pro Leu Leu Gln Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Lys Glu Asp Asp
 305 310 315 320

Leu Pro Ser Asp Leu Pro Ala Leu Ala Ala Asp Phe Ala Glu Asp Lys
 325 330 335

Glu Ile Cys Lys His Tyr Lys Asp Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr
 340 345 350

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu
 355 360 365

Leu Leu Arg Ile Ala Lys Thr Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys
 370 375 380

Ala Glu Ala Asp Pro Pro Ala Cys Tyr Ala Thr Val Phe Asp Gln Phe
 385 390 395 400

Thr Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Ser Leu Val Lys Lys Asn Cys Asp
 405 410 415

Leu Phe Glu Glu Val Gly Glu Tyr Asp Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val
 420 425 430

Arg Tyr Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 435 440 445

Ile Gly Arg Thr Leu Gly Lys Val Gly Ser Arg Cys Cys Lys Leu Pro
 450 455 460

Glu Ser Glu Arg Leu Pro Cys Ser Glu Asn His Leu Ala Leu Ala Leu
 465 470 475 480

Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Ile
 485 490 495

Thr Lys Cys Cys Thr Asp Ser Leu Ala Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 500 505 510

Ala Leu Glu Leu Asp Glu Gly Tyr Ile Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu
 515 520 525

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Asp Glu Lys
 530 535 540

Gln Ile Lys Lys Gln Ser Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro
545 550 555 560

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Thr Val Leu Gly Asn Phe Ser Ala
565 570 575

Phe Val Ala Lys Cys Cys Gly Ala Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala
580 585 590

Glu Glu Gly Pro Lys Leu Val Ala Ser Ser Gln Leu Ala Leu Ala
595 600 605

<210> 13

<211> 608

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 13

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Asn Asp Val Gly Glu Glu His Phe Ile Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Thr Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Pro Tyr Glu Glu His Ala
50 55 60

Lys Leu Val Lys Glu Val Thr Asp Leu Ala Lys Ala Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Asp Ile Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Ile Cys Ala Leu Pro Ser Leu Arg Asp Thr Tyr Gly Asp Val Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Glu Lys Lys Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu His
115 120 125

His Lys Asp Asp Lys Pro Asp Leu Pro Pro Phe Ala Arg Pro Glu Ala
130 135 140

Asp Val Leu Cys Lys Ala Phe His Asp Asp Glu Lys Ala Phe Phe Gly
145 150 155 160

5

10

His Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Gln Lys Tyr Lys Ala Ile Leu Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Glu Ala Ala Asp Lys Gly Ala Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Ala
 195 200 205
 Leu Glu Gly Lys Ser Leu Ile Ser Ala Ala Gln Glu Arg Leu Arg Cys
 210 215 220
 Ala Ser Ile Gln Lys Phe Gly Asp Arg Ala Tyr Lys Ala Trp Ala Leu
 225 230 235 240
 Val Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Asp Phe Thr Asp Ile Ser
 245 250 255
 Lys Ile Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285
 Cys Glu His Gln Glu Thr Ile Ser Ser His Leu Lys Glu Cys Cys Asp
 290 295 300
 Lys Pro Ile Leu Glu Lys Ala His Cys Ile Tyr Gly Leu His Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Thr Pro Ala Gly Leu Pro Ala Val Ala Glu Glu Phe Val Glu Asp
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Glu Glu Ala Lys Asp Leu Phe Leu Gly
 340 345 350
 Lys Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Gly Lys Ala Tyr Glu Ala Thr Leu Lys Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Thr Asp Asp Pro His Ala Cys Tyr Ala Lys Val Leu Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Gln Pro Leu Val Asp Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Gln Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Tyr Glu Gln Leu Gly Asp Tyr Asn Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460

Pro Glu Ala Glu Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

Leu Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Ser Glu Ser Leu Val Asp Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Gly Pro Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Thr Glu
 530 535 540

Arg Lys Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro His Ala Thr Asn Asp Gln Leu Lys Thr Val Val Gly Glu Phe Thr
 565 570 575

Ala Leu Leu Asp Lys Cys Cys Ser Ala Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe
 580 585 590

Ala Val Glu Gly Pro Lys Leu Val Glu Ser Ser Lys Ala Thr Leu Gly
 595 600 605

<210> 14
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> *Capra hircus*

<400> 14

ES 2 761 854 T3

Asp Thr His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Phe Asn Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Gln Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val Lys Leu Val Lys Glu Leu Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala /kap Glu Ser His Ala Gly Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Glu Leu Cys Lys Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Asp Met Ala Asp Cys Cys Glu Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Lys His Lys Asp Asp Ser Pro Asp Leu
100 105 110

Pro Lys Leu Lys Pro Glu Pro Asp Thr Leu Cys Ala Glu Phe Lys Ala
115 120 125

Asp Glu Lys Lys Phe Trp Gly Lys Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg
130 135 140

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Asn Lys Tyr
145 150 155 160

Asn Gly Val Phe Gln Glu Cys Cys Gln Ala Glu Asp Lys Gly Ala Cys
165 170 175

Leu Leu Pro Lys Ile Glu Thr Met Arg Glu Lys Val Leu Ala Ser Ser
180 185 190

Ala Arg Gln Arg Leu Arg Cys Ala Ser Ile Gln Lys Phe Gly Glu Arg
195 200 205

Ala LOU Lys Ala Trp Ser Val Ala Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys
210 215 220

Ala Asp Phe Thr Asp Val Thr Lys Ile Val Thr Asp AOU Thr Lys Val
225 230 235 240

His Lys Glu Cys Cys Mis Gly Asp Leu Tau Glu Cys Ala Asp Asp Arg
245 250 255

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys /kap Sis Gln Asp Thr Leu Ser Ser
260 265 270

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp Lys Pro Val Leu Glu Lys Ser His Cys

275					280					285						
Ile	Ala	Glu	Ile	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Pro	Glu	Asn	Leu	Pro	Pro	Leu	
290						295					300					
Thr	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu	Asp	Lys	Glu	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Gln	Glu	
305					310					315					320	
Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Ser	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg	Arg	
				325					330					335		
His	Pro	Glu	Tyr	Ala	Val	Ser	Val	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Glu	Tyr	
			340					345					350			
Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Glu	Asp	Pro	His	Ala	Cys	
		355					360					365				
Tyr	Ala	Thr	Val	Phe	Asp	Lys	Leu	Lys	His	Leu	Val	Asp	Glu	Pro	Gln	
	370					375					380					
Asn	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Lys	His	Gly	Glu	Tyr	
385					390					395					400	
Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Ile	Val	Arg	Tyr	Thr	Arg	Lys	Ala	Pro	Gln	
				405					410					415		
Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Ile	Ser	Arg	Ser	Leu	Gly	Lys	Val	
			420					425					430			
Gly	Thr	Lys	Cys	Cys	Ala	Lys	Pro	Glu	Ser	Glu	Arg	Met	Pro	Cys	Thr	
		435					440					445				
Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Asn	Arg	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	
	450					455					460					
Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	
465					470					475					480	
Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Glu	Thr	Tyr	
				485					490					495		
Val	Pro	Lys	Pro	Phe	Aap	Gly	Glu	Ser	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	
			500					505					510			
Cys	Thr	Leu	Pro	Asp	Thr	Glu	Lys	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	
	5	1	5				5	2	0				5	2	5	

ES 2 761 854 T3

Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Asp Glu Gln Leu Lys
530 535 540

Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala Phe Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala
545 550 555 560

Asp Asp Lys Glu Gly Cys Phe Leu Leu Glu Gly Pro Lys Leu Val Ala
565 570 575

Ser Thr Gln Ala Ala Leu Ala
580

5

<210> 15
<211> 607
<212> PRT
<213> *Ovis aries*

<400> 15

ES 2 761 854 T3

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1				5				10						15	
Tyr	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Asp	Thr	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala
			20					25					30		
His	Arg	Phe	Asn	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Gln	Gly	Leu	Val	Leu
		35					40					45			
Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Val
	50					55					60				
Lys	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp
65					70					75					80
Glu	Ser	His	Ala	Gly	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
				85					90					95	
Glu	Leu	Cys	Lys	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Asp	Met	Ala
			100					105					110		
Asp	Cys	Cys	Glu	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Asn
		115					120					125			
His	Lys	Asp	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Pro	Asp
	130					135					140				
Thr	Leu	Cys	Ala	Glu	Phe	Lys	Ala	Asp	Glu	Lys	Lys	Phe	Trp	Gly	Lys
145					150					155					160

Tyr Leu Tyr Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
 165 170 175
 Leu Leu Tyr Tyr Ala Asn Lys Tyr Asn Gly Val Phe Gln Glu Cys Cys
 180 185 190
 Gln Ala Glu Asp Lys Gly Ala Cys Leu Leu Pro Lys Ile Asp Ala Met
 195 200 205
 Arg Glu Lys Val Leu Ala Ser Ser Ala Arg Gln Arg Leu Arg Cys Ala
 210 215 220
 Ser Ile Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Leu Lys Ala Trp Ser Val Ala
 225 230 235 240
 Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Asp Phe Thr Asp Val Thr Lys
 245 250 255
 Ile Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly Asp
 260 265 270
 Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 275 280 285
 Asp His Gln Asp Ala Leu Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp Lys
 290 295 300
 Pro Val Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Asp Lys Asp Ala
 305 310 315 320
 Val Pro Glu Asn Leu Pro Pro Leu Thr Ala Asp Phe Ala Glu Asp Lys
 325 330 335
 Glu Val Cys Lys Asn Tyr Gln Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Ser
 340 345 350
 Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Glu Tyr Ala Val Ser Val
 355 360 365
 Leu Leu Arg Leu Ala Lys Glu Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Asp Cys Cys
 370 375 380
 Ala Lys Glu Asp Pro His Ala Cys Tyr Ala Thr Val Phe Asp Lys Leu
 385 390 395 400
 Lys His Leu Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Lys Asn Cys Glu
 405 410 415

Leu Phe Glu Lys His Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val
 420 425 430
 Arg Tyr Thr Arg Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 435 440 445
 Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys Val Gly Thr Lys Cys Cys Ala Lys Pro
 450 455 460
 Glu Ser Glu Arg Met Pro Cys Thr Glu Asp Tyr Leu Ser Leu Ile Leu
 465 470 475 480
 Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val
 485 490 495
 Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 500 505 510
 Asp Leu Thr Leu Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Pro Phe Asp Glu Lys
 515 520 525
 Phe Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Thr Glu Lys
 530 535 540
 Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro
 545 550 555 560
 Lys Ala Thr Asp Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala
 565 570 575
 Phe Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala Asp Asp Lys Glu Gly Cys Phe Val
 580 585 590
 Leu Glu Gly Pro Lys Leu Val Ala Ser Thr Gln Ala Ala Leu Ala
 595 600 605

<210> 16
 <211> 608
 <212> PRT
 <213> *canis lupus familiaris*

<400> 16

ES 2 761 854 T3

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Phe Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Leu Val Arg Arg Glu Ala Tyr Lys Ser Glu Ile Ala
 20 25 30

His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Glu His Phe Arg Gly Leu Val Leu
 35 40 45
 Val Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Ala Lys Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Ala Cys Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Ser Leu Arg Asp Lys Tyr Gly Asp Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Glu Lys Gln Glu Pro Asp Arg Asn Glu Cys Phe Leu Ala
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Gly Phe Pro Pro Leu Val Ala Pro Glu Pro
 130 135 140
 Asp Ala Leu Cys Ala Ala Phe Gln Asp Asn Glu Gln Leu Phe Leu Gly
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Gln Gln Tyr Lys Gly Val Phe Ala Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Gly Pro Lys Ile Glu Ala
 195 200 205
 Leu Arg Glu Lys Val Leu Leu Ser Ser Ala Lys Glu Arg Phe Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Asp Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ser Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Asp Phe Ala Glu Ile Ser
 245 250 255
 Lys Val Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Met
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Thr Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp
 290 295 300

Lys Pro Val Leu Glu Lys Ser Gln Cys Leu Ala Glu Val Glu Arg Asp
 305 310 315 320

Glu Leu Pro Gly Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp
 325 330 335

Lys Glu Val Cys Lys Asn Tyr Gln Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Glu Tyr Ser Val Ser
 355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Glu Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Thr Asp Asp Pro Pro Thr Cys Tyr Ala Lys Val Lea Asp Glu
 385 390 395 400

Phe Lys Pro Lea Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys
 405 410 415

Glu Lea Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Val Ser Arg Lys Leu Gly Lys Val Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys
 450 455 460

Pro Glu Ser Glu Arg Met Ser Cys Ala Glu Asp Phe Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

Leu Aen Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Arg
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Ser Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Gly Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Aun Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Leu Cys Thr Leu Pro Glu Ala Glu

ES 2 761 854 T3

530		535		540
Lys Gln Val Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys				
545		550		555 560
Pro Lys Ala Thr Asp Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Gly Asp Phe Gly				
		565		570 575
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Ala Ala Glu Asn Lys Glu Gly Cys Phe				
		580		585 590
Ser Glu Glu Gly Pro Lys Leu Val Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Val				
		595		600 605

5
 <210> 17
 <211> 615
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 17

ES 2 761 854 T3

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Leu	Ile	Ser	Phe	Ile	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1				5					10					15	
Thr	Ser	Arg	Asn	Leu	Gln	Arg	Phe	Ala	Arg	Asp	Ala	Glu	His	Lys	Ser
			20					25					30		
Glu	Ile	Ala	His	Arg	Tyr	Asn	Asp	Leu	Lys	Glu	Glu	Thr	Phe	Lys	Ala
		35					40					45			
Val	Ala	Met	Ile	Thr	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Arg	Cys	Ser	Tyr	Glu
	50					55					60				
Gly	Leu	Ser	Lys	Leu	Val	Lys	Asp	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Lys	Cys
65					70					75					80
Val	Ala	Asn	Glu	Asp	Ala	Pro	Glu	Cys	Ser	Lys	Pro	Leu	Pro	Ser	Ile
				85					90					95	
Ile	Leu	Asp	Glu	Ile	Cys	Gln	Val	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp	Ser	Tyr	Gly
			100					105					110		
Ala	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ser	Lys	Ala	Asp	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys
		115					120					125			
Phe	Leu	Ser	Phe	Lys	Val	Ser	Gln	Pro	Asp	Phe	Val	Gln	Pro	Tyr	Gln
	130					135					140				
Arg	Pro	Ala	Ser	Asp	Val	Ile	Cys	Gln	Glu	Tyr	Gln	Asp	Asn	Arg	Val

ES 2 761 854 T3

145		150		155		160
Ser Phe Leu Gly His Phe Ile Tyr Ser Val Ala Arg Arg His Pro Phe		165		110		175
Leu Tyr Ala Pro Ala Ile Leu Ser Phe Ala Val Asp Phe Glu His Ala		180		185		190
Leu Gln Ser Cys Cys Lys Glu Ser Asp Val Gly Ala Cys Leu ASID Thr		195		200		205
Lys Glu Ile Val Met Arg Glu Lys Ala Lys Gly Val Ser Val Lys Gln		210		215		220
Gln Tyr Phe Cys Gly Ile Leu Lys Gln Phe Gly Asp Arg Val Phe Gln		225		230		235
Ala Arg Gln Leu Ile Tyr Leu Ser Gln Lys Tyr Pro Lys Ala Pro Phe		245		250		255
Ser Glu Val Ser Lys Phe Val His Asp Ser Ile Gly Val His Lys Glu		260		265		270
Cys Cys Glu Gly Asp Met Val Glu Cys Met Asp Asp Met Ala Arg Met		275		280		285
Met Ser Asn Leu Cys Ser Gln Gln Asp Val Phe Ser Gly Lys Ile Lys		290		295		300
Asp Cys Cys Glu Lys Pro Ile Val Glu Arg Ser Gln Cys Ile Met Glu		305		310		315
Ala Glu Phe Asp Glu Lys Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Val Glu Lys		325		330		335
Tyr Ile Glu Asp Lys Glu Val Cys Lys Ser Phe Glu Ala Gly His Asp		340		345		350
Ala Phe Met Ala Glu Phe Val Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Glu		355		360		365
Phe Ser Ile Gln Leu Ile Met Arg Ile Ala Lys Gly Tyr Glu Ser Leu		370		375		380
Leu Glu Lys Cys Cys Lys Thr Asp Asn Pro Ala Glu Cys Tyr Ala Asn		385		390		395
						400

Ala Gln Glu Gln Leu Asn Gln His Ile Lys Glu Thr Gln Asp Val Val
405 410 415

Lys Thr Asn Cys Asp Leu Leu His Asp His Gly Glu Ala Asp Phe Leu
420 425 430

Lys Ser Ile Leu Ile Arg Tyr Thr Lys Lys Met Pro Gln Val Pro Thr
435 440 445

Asp Leu Leu Leu Glu Thr Gly Lys Lys Met Thr Thr Ile Gly Thr Lys
450 455 460

Cys Cys Gln Leu Gly Glu Asp Arg Arg Met Ala Cys Ser Glu Gly Tyr
465 470 475 480

Leu Ser Ile Val Ile His Asp Thr Cys Arg Lys Gln Glu Thr Thr Pro
485 490 495

Ile Asn Asp Asn Val Ser Gln Cys Cys Ser Gln Leu Tyr Ala Asn Arg
500 505 510

Arg Pro Cys Phe Thr Ala Met Gly Val Asp Thr Lys Tyr Val Pro Pro
515 520 525

Pro Phe Asn Pro Asp Met Phe Ser Phe Asp Glu Lys Leu Cys Ser Ala
530 535 540

Pro Ala Glu Glu Arg Glu Val Gly Gln Met Lys Leu Leu Ile Asn Leu
545 550 555 560

Ile Lys Arg Lys Pro Gln Met Thr Glu Glu Gln Ile Lys Thr Ile Ala
565 570 575

Asp Gly Phe Thr Ala Met Val Asp Lys Cys Cys Lys Gln Ser Asp Ile
580 585 590

Asn Thr Cys Phe Gly Glu Glu Gly Ala Asn Leu Ile Val Gln Ser Arg
595 600 605

Ala Thr Leu Gly Ile Gly Ala
610 615

<210> 18
<211> 607
<212> PRT
<213> *Sus scrofa*

<400> 18

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Gln Tyr Phe Lys Gly Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln His Leu Gln Gln Cys Pro Tyr Glu Glu His Val
50 55 60

Lys Leu Val Arg Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Ile His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Ser Leu Arg Glu His Tyr Gly Asp Leu Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Glu Lys Glu Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asn Asp Asn Pro Asp Ile Pro Lys Leu Lys Pro Asp Pro Val
130 135 140

Ala Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Glu Gln Lys Phe Trp Gly Lys
145 150 155 160

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
165 170 175

Leu Leu Tyr Tyr Ala Ile Ile Tyr Lys Asp Val Phe Ser Glu Cys Cys
180 185 190

Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Ile Glu His Leu
195 200 205

Arg Glu Lys Val Leu Thr Ser Ala Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
210 215 220

Ser Ile Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ser Leu Ala
225 230 235 240

Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Asp Phe Thr Glu Ile Ser Lys
245 250 255

Ile Val Thr Asp Leu Ala Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly Asp
 260 265 270

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 275 280 285

Glu Asn Gln Asp Thr Ile Ser Thr Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp Lys
 290 295 300

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Ala Lys Arg Asp Glu
 305 310 315 320

Leu Pro Ala Asp Leu Asn Pro Leu Glu His Asp Phe Val Glu Asp Lys
 325 330 335

Glu Val Cys Lys Asn Tyr Lys Glu Ala Lys His Val Phe Leu Gly Thr
 340 345 350

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu
 355 360 365

Leu Leu Arg Ile Ala Lys Ile Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Asp Cys Cys
 370 375 380

Ala Lys Glu Asp Pro Pro Ala Cys Tyr Ala Thr Val Phe Asp Lys Phe
 385 390 395 400

Gln Pro Leu Val Asp Glu Pro Lys Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
 405 410 415

Leu Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val
 420 425 430

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 435 440 445

Val Ala Arg Lys Leu Gly Leu Val Gly Ser Arg Cys Cys Lys Arg Pro
 450 455 460

Glu Glu Glu Arg Leu Ser Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Leu Val Leu
 465 470 475 480

Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val
 485 490 495

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 500 505 510

Ala Leu Thr Pro Asp Glu Thr Tyr Lys Pro Lys Glu Phe Val Glu Gly
515 520 525

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Leu Cys Thr Leu Pro Glu Asp Glu Lys
530 535 540

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro
545 550 555 560

His Ala Thr Glu Glu Gln Leu Arg Thr Val Leu Gly Asn Phe Ala Ala
565 570 575

Phe Val Gln Lys Cys Cys Ala Ala Pro Asp His Glu Ala Cys Phe Ala
580 585 590

Val Glu Gly Pro Lys Phe Val Ile Glu Ile Arg Gly Ile Leu Ala
595 600 605

<210> 19
<211> 584
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 19

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu
65 70 75 80

Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu
100 105 110

Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys
115 120 125

Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu Hi8 Glu Val Ala Arg
 130 135 140
 Arg Bis Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln
 145 150 155 160
 Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lya Glu Ser
 165 170 175
 Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser
 180 185 190
 Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro
 210 215 220
 Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His
 275 280 285
 Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala
 290 295 300
 Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Sar Leu Leu Leu Arg Lau Ala Lys Lys
 340 345 350
 Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Aan Pro Pro Ala
 355 360 365
 Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro

370		375		380
Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu				
385		390		395
				400
Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro				
	405		410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg				
	420		425	430
Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys				
	435		440	445
Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His				
	450		455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser				
	465		470	475
				480
Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr				
	485		490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp				
	500		505	510
Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala				
	515		520	525
Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu				
	530		535	540
Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys				
	545		550	555
				560
Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val				
	565		570	575
Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala				
	580			

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preservación de células madre, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (i) combinar las células madre con un medio de criopreservación para producir una mezcla, y congelar la mezcla para producir un producto de células madre congelado,
 (ii) combinar las células madre con un medio de criopreservación para producir una mezcla, y congelar la mezcla para producir un producto de células madre congelado, en el que el método además comprende las etapas de
 10 descongelar el producto de células madre congelado, transferir las células descongeladas a un medio de almacenamiento, y almacenar las células madre en el medio de almacenamiento, o
 (iii) almacenar las células madre en un medio de almacenamiento, en el que las células madre se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento antes de su almacenamiento
 en el que el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento comprende una preparación de
 15 albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende las etapas de congelar células madre en el medio de criopreservación para producir un producto de células madre congelado, descongelar el producto de células madre congelado, transferir las células descongeladas al medio de almacenamiento, y almacenar las células
 20 madre en el medio de almacenamiento,
 en el que el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura.

3. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura está presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento, cuando se mezcla con las células madre, en una cantidad adecuada para proporcionar una concentración de la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura que es una concentración seleccionada entre: (i) superior a aproximadamente un 0,01 % (p/v) e inferior a un 10 % (p/v), (ii) de aproximadamente un 0,1 % (p/v) a aproximadamente un 5 % (p/v), o (iii) aproximadamente un 2 % (p/v).
 30

4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que:

- (a) las células madre se almacenan en el medio de almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C; y/o
 35 (b) en el que las células madre se almacenan en el medio de almacenamiento durante un periodo de tiempo seleccionado entre: superior a 24 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas; o más de aproximadamente 72 horas; o
 (c) en el que las células madre se almacenan en el medio de almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de tiempo seleccionado entre: superior a 24 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas; o más de aproximadamente
 40 72 horas, y en el que la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior.

5. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento exhibe una o más de las siguientes propiedades:

- (a) menos de un 0,5 % (p/p), 0,4 % (p/p), 0,3 % (p/p), 0,2 % (p/p) o un 0,15 % (p/p) se une a la Concanavalina A; y/o
 50 (b) un nivel de glicación de menos de 0,6, 0,10, 0,075 o 0,05 moles de hexosa/mol de proteína.

6. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la proteína de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento:

- (a) es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99,5 %, o básicamente un 100 % monomérica y dimérica;
 (b) es al menos aproximadamente un 93 %, 94 %, 95 %, 96 % o un 97 % monomérica; y/o
 (c) tiene un contenido de polímero de albúmina no superior, o inferior, a aproximadamente un 1,0 % (p/p), 0,1 % (p/p) o un 0,01 % (p/p),
 60 en el que el polímero de albúmina es distinto a las formas monoméricas y diméricas de la albúmina.

7. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento:

- (a) comprende, consiste básicamente en, o consiste en, proteína de albúmina de suero obtenida a partir de levadura, cationes y aniones de equilibrio, agua, y opcionalmente octanoato y polisorbato 80;

- (b) tiene una secuencia N-terminal intacta o básicamente intacta;
- (c) cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de masas, presenta básicamente menos picos distintos al pico principal a aproximadamente 66,4 kDa que es representativo de la molécula de albúmina de suero humano intacta nativa, en comparación con la proteína de albúmina de suero obtenida a partir de plantas;
- 5 (d) comprende proteína de albúmina que tiene un contenido de grupo tiol libre que es superior a un 62 %, o tiene un contenido de grupo tiol libre que es de al menos un 69 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %;
- 10 (e) comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), presenta un perfil de SEC que excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 minutos y superior a 19 minutos, o un perfil de SEC que excluye los picos con un tiempo de retención de pico inferior a 14 o 15 minutos y superior a 18 minutos;
- 15 (f) comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), presenta un pico principal único, que corresponde a la albúmina en la forma monomérica nativa;
- (g) comprende proteína de albúmina que, cuando se somete a ensayo mediante espectrometría de masas, es un producto que presenta menos de 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, o 6 restos de lisina y/o arginina modificados con hexosa por proteína, o presenta aproximadamente de 1 a 11, de 1 a 8, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, 1 o menos de 1, restos de lisina y/o arginina modificados con hexosa por proteína;
- 20 y/o
- (h) comprende proteína de albúmina que no está glicada con azúcar específico de plantas, o comprende proteína de albúmina que no está glicada con un azúcar específico de plantas seleccionado entre α -1,3-fucosa y/o β -1,2-xilosa.
- 25 8. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento, y/o el medio de criopreservación y/o el propio medio de almacenamiento:
- 30 (a) comprende octanoato a menos de 35 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de octanoato, o está libre de octanoato;
- (b) tiene un contenido total de ácidos grasos inferior o igual a 35 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM, está básicamente libre de ácidos grasos, o está libre de ácidos grasos;
- (c) comprende detergente a una concentración inferior a 200 mg.l⁻¹, 100 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 0,01 mg.l⁻¹, 0,001 mg.l⁻¹, está básicamente libre del detergente, o está libre del detergente;
- 35 (d) comprende un nivel total de aminoácidos libres y/o niveles de N-acetil triptófano inferiores a 35 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,005 mM, 0,001 mM, está básicamente libre de aminoácidos y/o N-acetil triptófano en particular, o está libre de aminoácidos y/o de N-acetil triptófano en particular;
- (e) está básicamente libre de, o completamente libre de, la totalidad de octanoato, aminoácidos libres y/o N-acetil triptófano en particular, y detergente; y/o
- 40 (f) está libre de uno o más, o la totalidad de, componentes seleccionados entre: hemo, activador de precalicreína, pirógenos, hepatitis C y/o virus humanos y/o tiene una concentración de aluminio inferior a 200 μ g.l⁻¹, 100 μ g.l⁻¹, 50 μ g.l⁻¹, o dentro del intervalo de aproximadamente 10 μ g.l⁻¹ a aproximadamente 30 μ g.l⁻¹.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en el que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento, y/o el medio de criopreservación y/o el propio medio de almacenamiento, comprende detergente a una concentración inferior a 200 mg.l⁻¹, 100 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 0,01 mg.l⁻¹, 0,001 mg.l⁻¹, está básicamente libre del detergente, o está libre del detergente,
- 50 en el que el detergente es polisorbato o polisorbato 80.
10. El método de la reivindicación 8 o 9, en el que la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura presente en el medio de criopreservación y/o el medio de almacenamiento, y/o el medio de criopreservación y/o el propio medio de almacenamiento, está básicamente libre de, o completamente libre de, la totalidad de octanoato, aminoácidos libres y/o N-acetil triptófano en particular, y detergente,
- 55 en el que el detergente es polisorbato 80.
11. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que:
- 60 (a) el medio de criopreservación comprende la preparación de albúmina de suero recombinante y un criopreservante, o
- (b) el medio de criopreservación comprende, consiste básicamente en, o consiste en una solución acuosa de la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, un criopreservante, y un tampón iónico; y en el que:
- 65 (i) el medio de criopreservación no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre,
- (ii) el medio de criopreservación no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre, y no favorece el

crecimiento de células madre, o

(iii) el medio de criopreservación no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre, no favorece el crecimiento de células madre, e incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más, o la totalidad, de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el medio de criopreservación no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre, no favorece el crecimiento de células madre, e incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más, o la totalidad, de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual, y

en el que los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual incluyen vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, fuentes de hierro, aminoácidos libres y/o glucosa.

13. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que:

(a) el medio de almacenamiento comprende la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura, o

(b) el medio de almacenamiento comprende, consiste básicamente en, o consiste en una solución acuosa de la preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y un tampón iónico, y en el que:

(i) el medio de almacenamiento no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre,

(ii) el medio de almacenamiento no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre y no favorece el crecimiento de células madre, o

(iii) el medio de almacenamiento no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre, no favorece el crecimiento de células madre, e incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más, o la totalidad, de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual.

14. El método de la reivindicación 13, en el que el medio de almacenamiento no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre, no favorece el crecimiento de células madre, e incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más, o la totalidad, de los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual, y

en el que los componentes de un medio de cultivo de células madre habitual incluyen vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, fuentes de hierro, aminoácidos libres y/o glucosa.

15. El método de cualquier reivindicación precedente, método que comprende:

(i) almacenar células madre en el medio de almacenamiento,

(ii) almacenar células madre en el medio de almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C, o

(iii) almacenar células madre en el medio de almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de tiempo seleccionado entre superior a 24 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas; o superior a 72 horas, y

en el que, directa o indirectamente después de la etapa de almacenar células madre en el medio de almacenamiento de acuerdo con el método como se define en cualquiera de las partes (i), (ii) o (iii) de la presente reivindicación, a continuación el método además comprende una o más etapas, seleccionadas entre las etapas de: cultivo de las células madre; expansión de un cultivo de las células madre; diferenciación de las células madre; inmovilización de las células madre, o células cultivadas y/o diferenciadas obtenidas a partir de las mismas; inmovilización de las células madre, o células cultivadas y/o diferenciadas obtenidas a partir de las mismas en un tejido o un implante médico; y/o formulación de células madre, o células cultivadas y/o diferenciadas u otros productos obtenidos a partir de las mismas, en una composición farmacéuticamente aceptable o composición veterinariamente aceptable.

16. Un medio de criopreservación para la criopreservación de células madre, en el que;

(i) el medio de criopreservación comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y un criopreservante, o en el que el medio de criopreservación comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y un criopreservante y es un medio de criopreservación como se define mediante cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

(ii) el medio de criopreservación es un medio de criopreservación como se define en la parte (i) de la presente reivindicación, que además comprende células madre, o

(iii) el medio de criopreservación es un medio de criopreservación que comprende células madre como se define en la parte (ii) de la presente reivindicación y en el que el medio de criopreservación está congelado, o es un medio de criopreservación que comprende células madre como se define en la parte (ii) de la presente reivindicación que se ha congelado y a continuación descongelado.

17. Un medio de almacenamiento para el almacenamiento de células madre que se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento:

(i) en el que el medio de almacenamiento comprende una preparación de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura y en el que el medio de almacenamiento no es un medio de crecimiento de cultivo de células madre, o en el que el medio de almacenamiento es un medio de almacenamiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y no es un medio de crecimiento del cultivo de células madre,
 (ii) en el que el medio de almacenamiento es un medio de almacenamiento como se define en la parte (i) de la presente reivindicación y además comprende células madre,
 (iii) en el que el medio de almacenamiento es un medio de almacenamiento como se define en la parte (ii) de la presente reivindicación y en el que las células madre se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento, o
 (iv) en el que el medio de almacenamiento es un medio de almacenamiento como se define en la parte (iii) de la presente reivindicación y el medio de criopreservación es un medio de criopreservación como se define en la reivindicación 16.

18. El medio de almacenamiento de la reivindicación 17, en el que el medio de almacenamiento:

(a) no favorece el crecimiento de células madre; y/o
 (b) incluye básicamente ninguno, o ninguno, niveles de uno cualquiera o más de vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, fuentes de hierro, aminoácidos libres y/o glucosa.

19. El medio de almacenamiento de la reivindicación 17 o 18, que además comprende células madre:

(i) que se han: (a) congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento, o (b) sometido a otro choque fisiológico antes de ser transferidas al medio de almacenamiento,
 (ii) que se han almacenado en el medio de almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de tiempo seleccionado entre superior a 24 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas; superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas; o superior a 72 horas, y
 (iii) en el que la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior.

20. El uso de un medio de criopreservación de acuerdo con la reivindicación 16:

(i) para la preservación de células madre,
 (ii) para la preservación de células madre en un estado viable después del almacenamiento de las células madre a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas, o superior a 72 horas; o
 (iii) para el uso como se define en la parte (i) o (ii) de la presente reivindicación en el que la viabilidad de las células madre al final del periodo de almacenamiento es superior a un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o superior.

21. El uso de la reivindicación 20:

(a) para la preservación de células madre combinando las células madre con el medio de criopreservación para producir una mezcla, y congelando la mezcla para producir un producto de células madre congelado, o sometiendo las células madre a otro choque fisiológico, antes de su almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas, o superior a 72 horas;
 (b) para la preservación de células madre mediante un método que además comprende las etapas de descongelar el producto de células madre congelado, transferir las células descongeladas a un medio de almacenamiento, y almacenar las células madre en el medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas, o superior a 72 horas; o
 (c) para la preservación de células madre combinando las células madre con el medio de criopreservación para producir una mezcla, sometiendo las células madre a un choque fisiológico, transfiriendo las células a un medio de almacenamiento, y almacenando las células madre en el medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas, o superior a 72 horas.

22. El uso de un medio de almacenamiento de acuerdo con la reivindicación 17, 18 o 19:

(i) para la preservación de células madre, almacenando células madre en el medio de almacenamiento,
 (ii) para la preservación de células madre, almacenando células madre en el medio de almacenamiento, en el que las células madre se han congelado en un medio de criopreservación, descongelado, y a continuación transferido al medio de almacenamiento antes de su almacenamiento,
 (iii) para la preservación de células madre de acuerdo con la parte (ii) de la presente reivindicación en la que el

medio de criopreservación es un medio de criopreservación de acuerdo con la reivindicación 16;

(iv) para la preservación de células madre, almacenando células madre en el medio de almacenamiento, en el que las células madre se han mezclado con un medio de criopreservación, sometido a choque fisiológico, y a continuación transferido al medio de almacenamiento antes de su almacenamiento, o

5 (v) para la preservación de células madre de acuerdo con la parte (iv) de la presente reivindicación en la que el medio de criopreservación es un medio de criopreservación de acuerdo con la reivindicación 16.

23. El uso de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura:

10 (i) para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación,
(ii) para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación de acuerdo con la parte (i) de la presente reivindicación, en la que la mejora se compara con la albúmina de suero obtenida a partir de plasma que se usa en la misma concentración;

15 (iii) para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación de acuerdo con la parte (i) o (ii) de la presente reivindicación, en la que la mejora es observable en las células madre después de la descongelación, cuando se almacenan en un medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas, o superior a 72 horas;

20 (iv) para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación de acuerdo con cualquiera de las partes (i), (ii) o (iii) de la presente reivindicación, en la que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se usa formulándola en un medio de criopreservación y mezclando el medio de criopreservación con células madre antes de su congelación,

25 (v) para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación de acuerdo con la parte (iv) de la presente reivindicación, en la que el medio de criopreservación es un medio de criopreservación como se define en la reivindicación 16;

(vi) para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación de acuerdo con cualquiera de las partes (i) a (v) de la presente reivindicación, en la que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se usa formulándola en un medio de almacenamiento y mezclando el medio de almacenamiento con células madre después de su descongelación, o

30 (vii) para mejorar la viabilidad de las células madre criopreservadas después de la descongelación de acuerdo con la parte (vi) de la presente reivindicación, en la que el medio de almacenamiento es un medio como se define en la reivindicación 17, 18 o 19.

24. El uso de albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura:

35 (i) para mejorar la viabilidad de las células madre que se someten a choque fisiológico,
(ii) para mejorar la viabilidad de las células madre que se someten a choque fisiológico de acuerdo con la parte (i) de la presente reivindicación, en la que la mejora se compara con el uso de albúmina de suero obtenida a partir de plasma que se usa en la misma concentración;

40 (iii) para mejorar la viabilidad de las células madre que se someten a choque fisiológico de acuerdo con la parte (i) o (ii) de la presente reivindicación, en la que la mejora es observable en las células madre después del choque, cuando se almacenan en un medio de almacenamiento a 2-8 °C durante un periodo de tiempo superior a 24 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 48 horas, superior a 24 horas y hasta aproximadamente 72 horas, o superior a 72 horas;

45 (iv) para mejorar la viabilidad de las células madre que se someten a choque fisiológico de acuerdo con cualquiera de las partes (i), (ii) o (iii) de la presente reivindicación, en la que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se usa formulándola en un medio de criopreservación y mezclando el medio de criopreservación con células madre antes del choque fisiológico,

50 (v) para mejorar la viabilidad de las células madre que se someten a choque fisiológico de acuerdo con la parte (iv) de la presente reivindicación, en la que el medio de criopreservación es un medio de criopreservación como se define en la reivindicación 16;

55 (vi) para mejorar la viabilidad de las células madre que se someten a choque fisiológico de acuerdo con cualquiera de las partes (i) a (v) de la presente reivindicación, en la que la albúmina de suero recombinante obtenida a partir de levadura se usa formulándola en un medio de almacenamiento y mezclando el medio de almacenamiento con las células madre después de recibir el choque fisiológico, o

(vii) para mejorar la viabilidad de las células madre que se someten a choque fisiológico de acuerdo con la parte (vi) de la presente reivindicación, en la que el medio de almacenamiento es un medio de almacenamiento como se define en la reivindicación 17, 18 o 19.

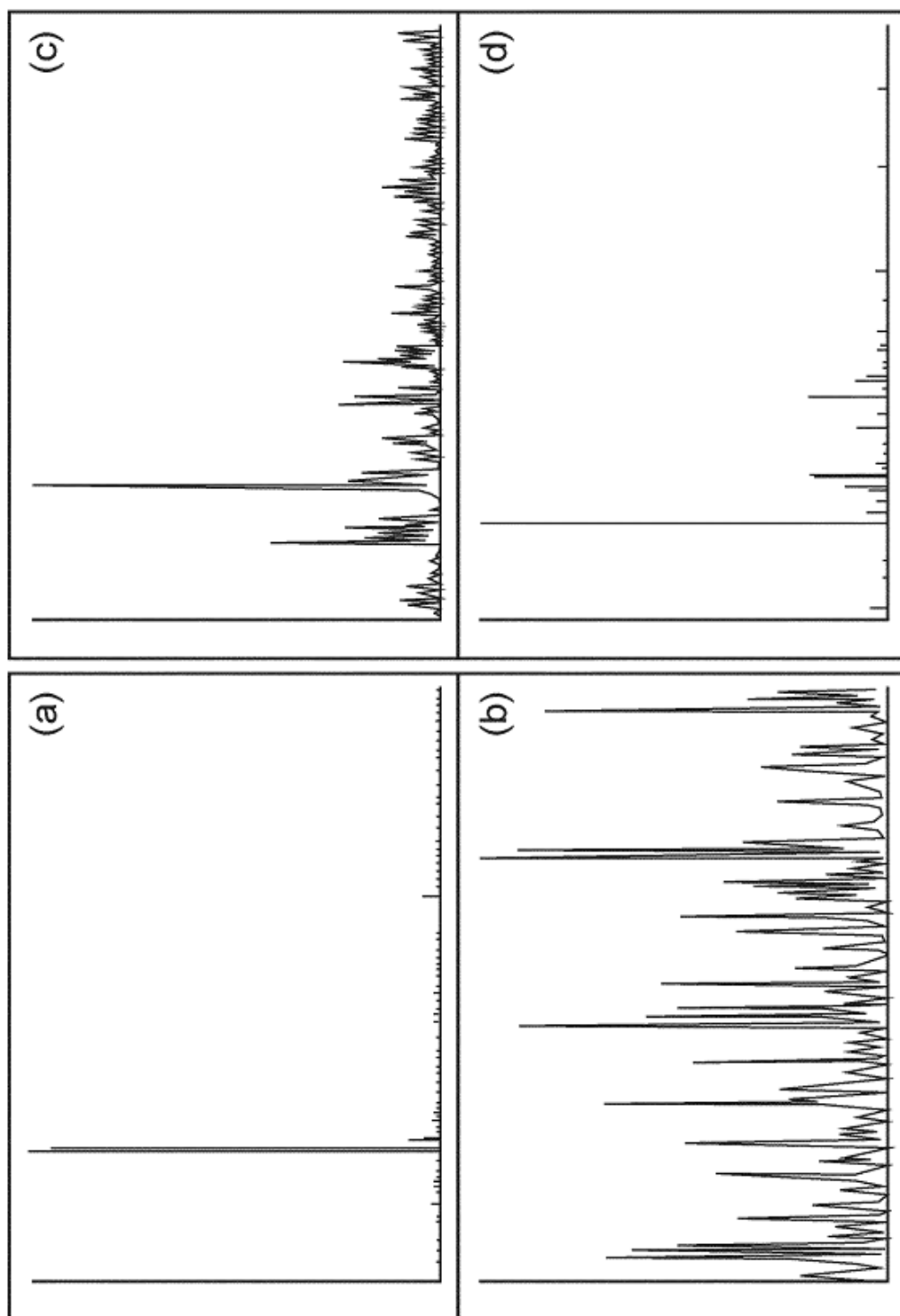


FIG. 1

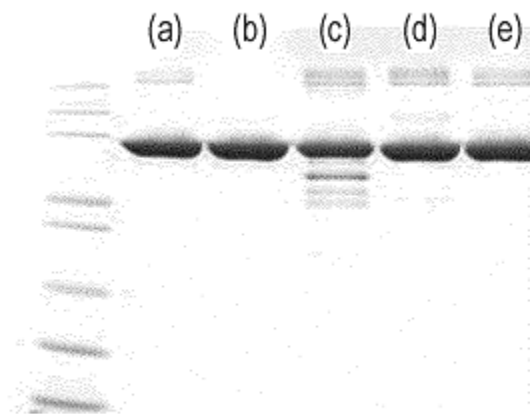


FIG. 2

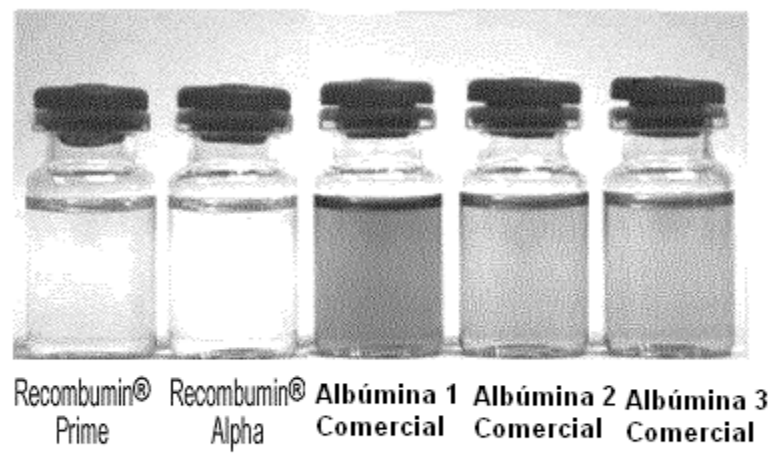


FIG. 3

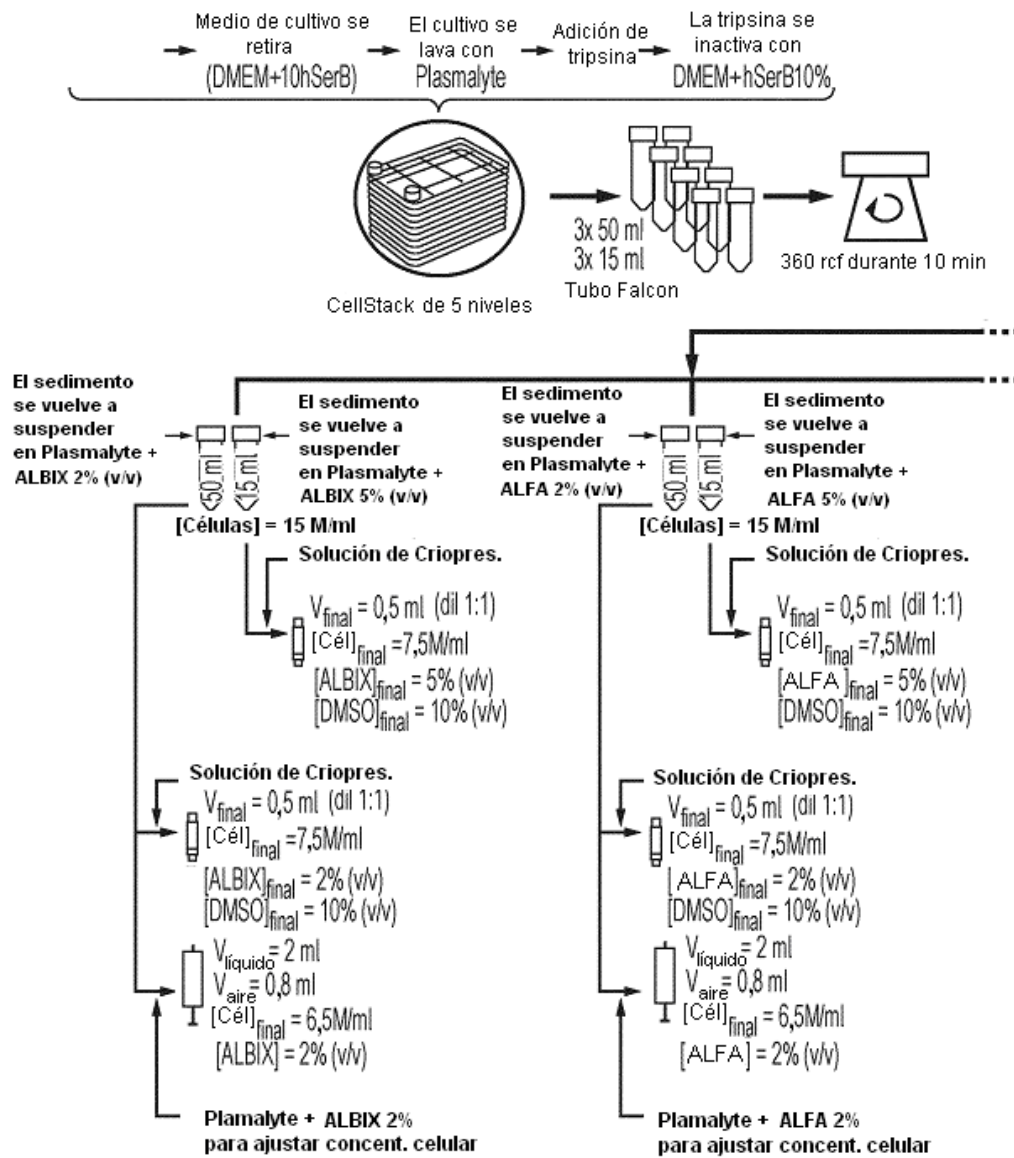


FIG. 4

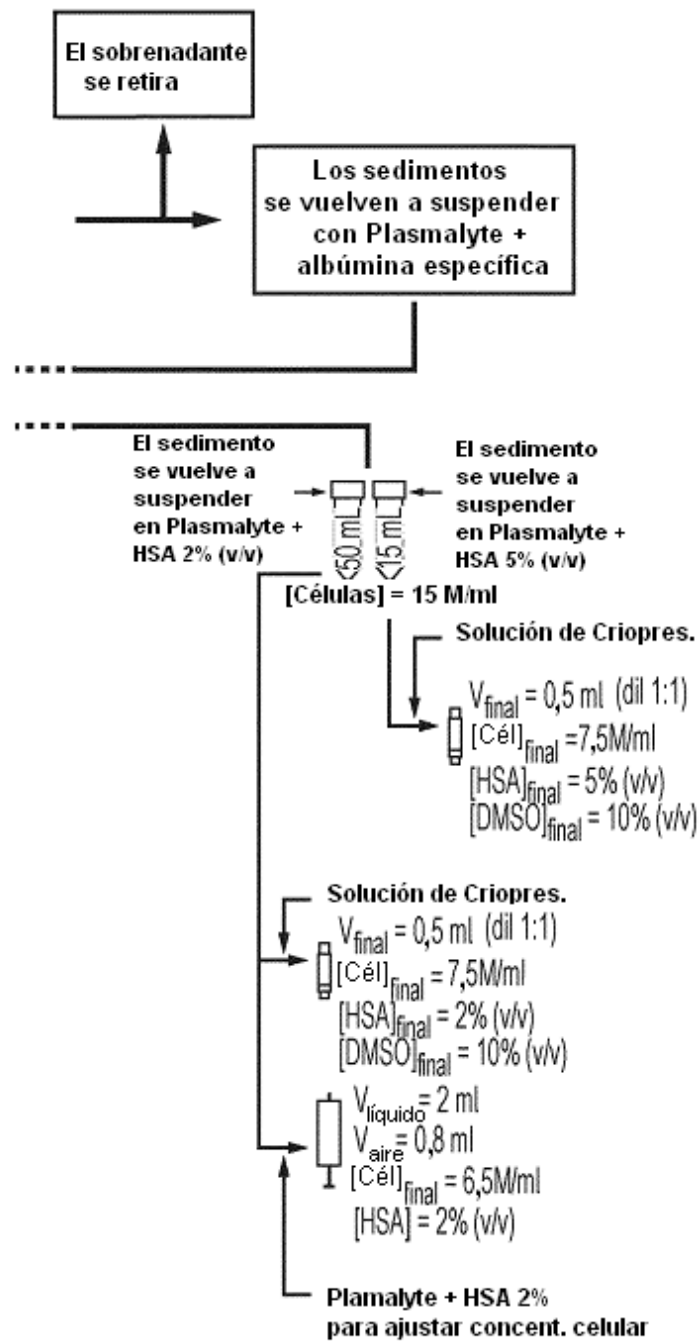


FIG. 4 (Continuación)



FIG. 5

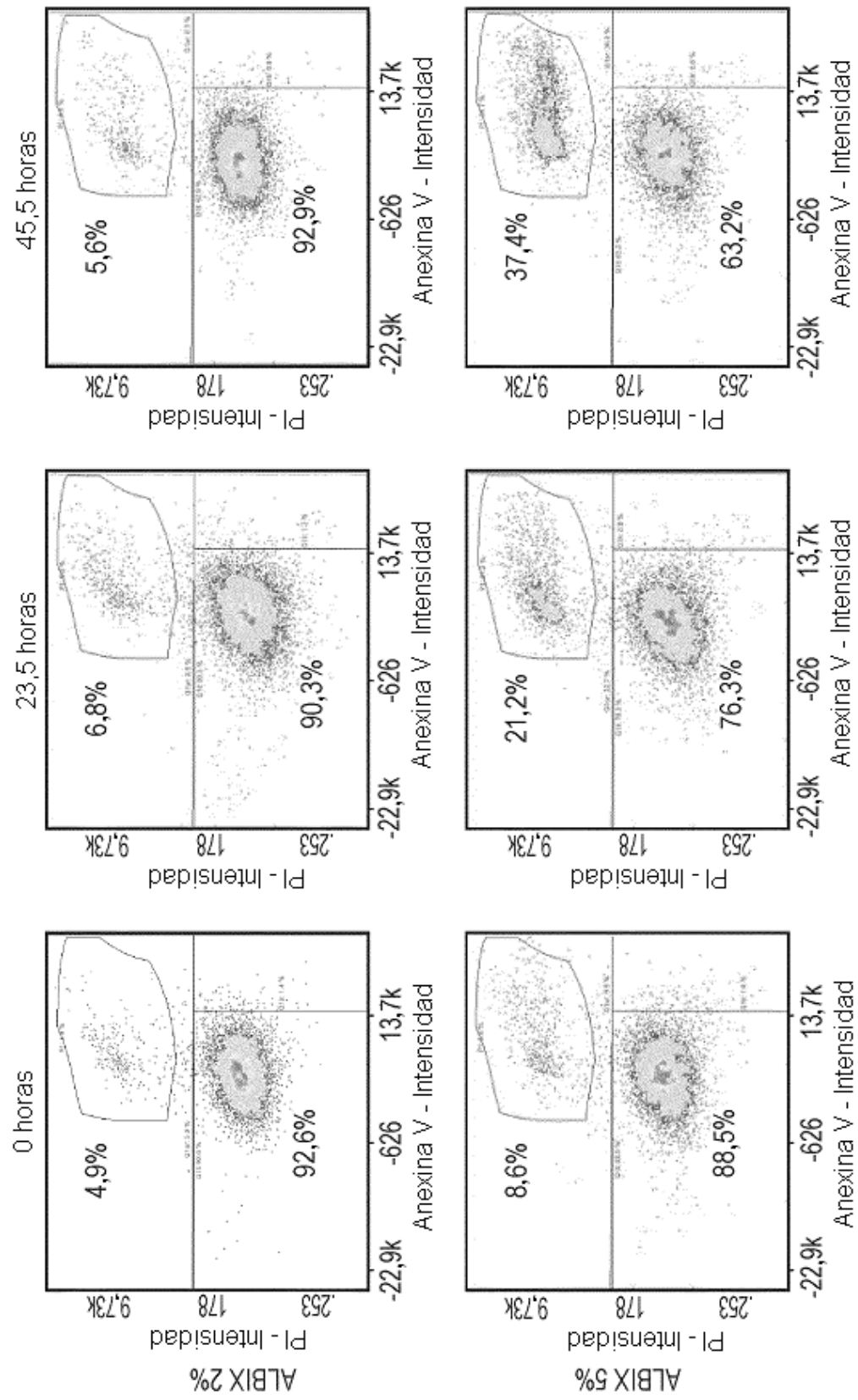


FIG. 6

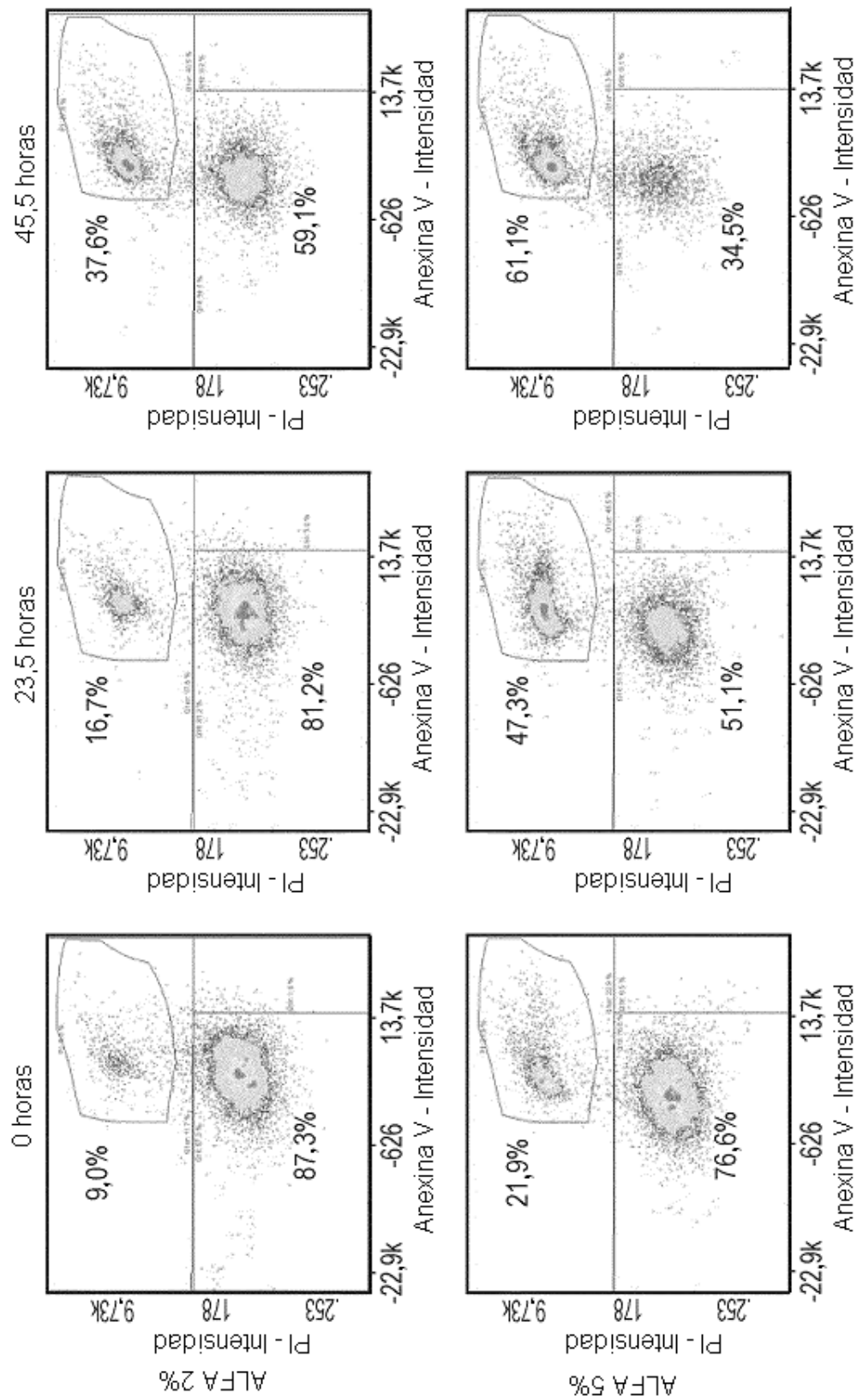


FIG. 6 (Continuación)

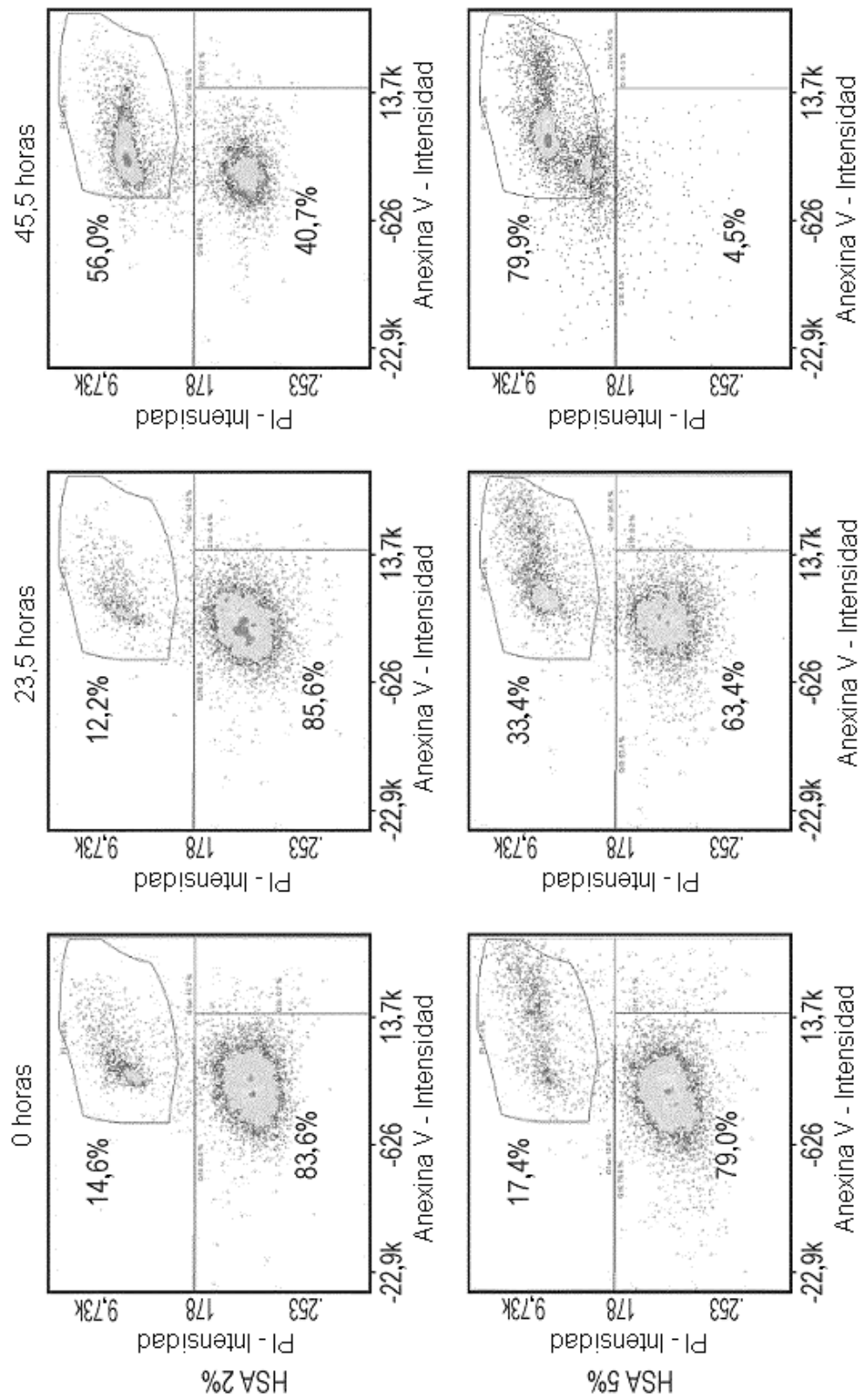


FIG. 6 (Continuación)

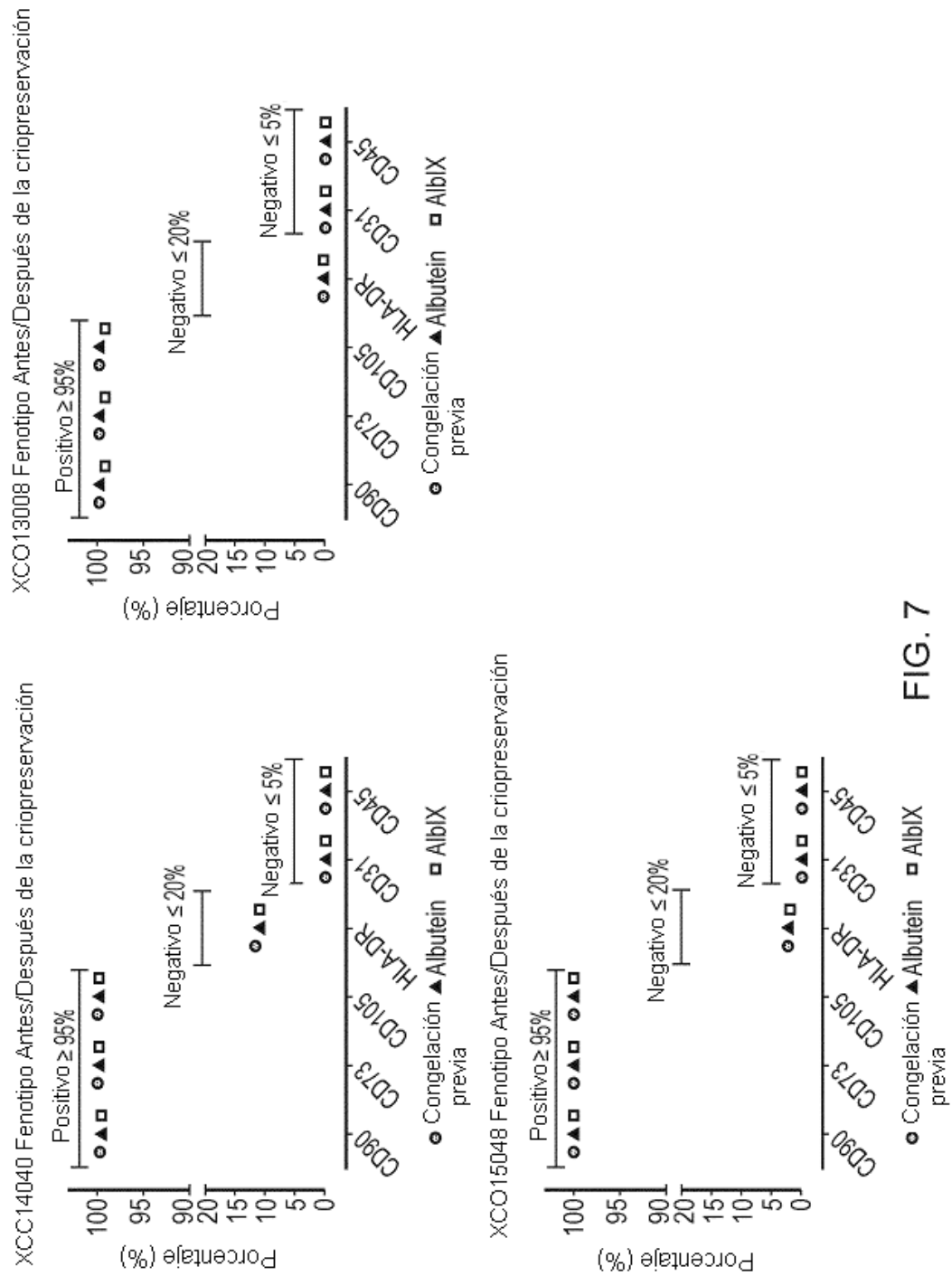
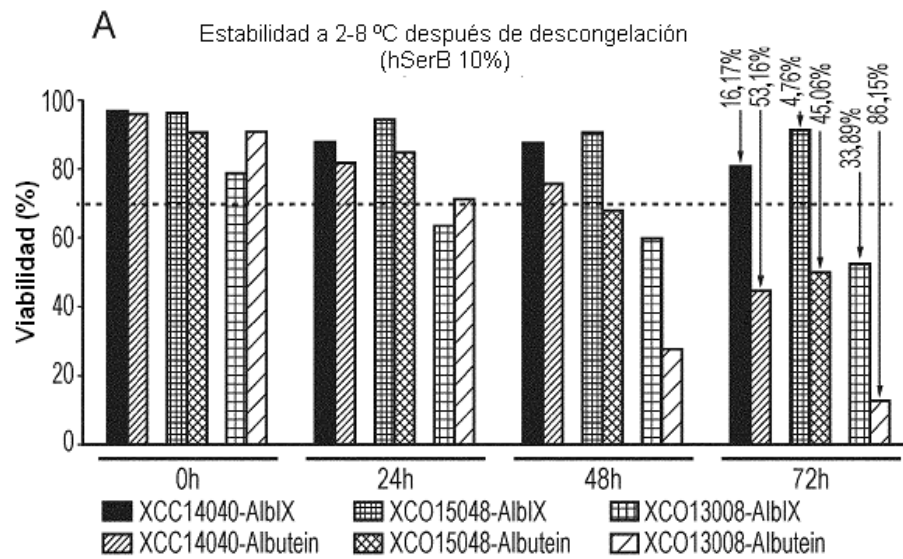
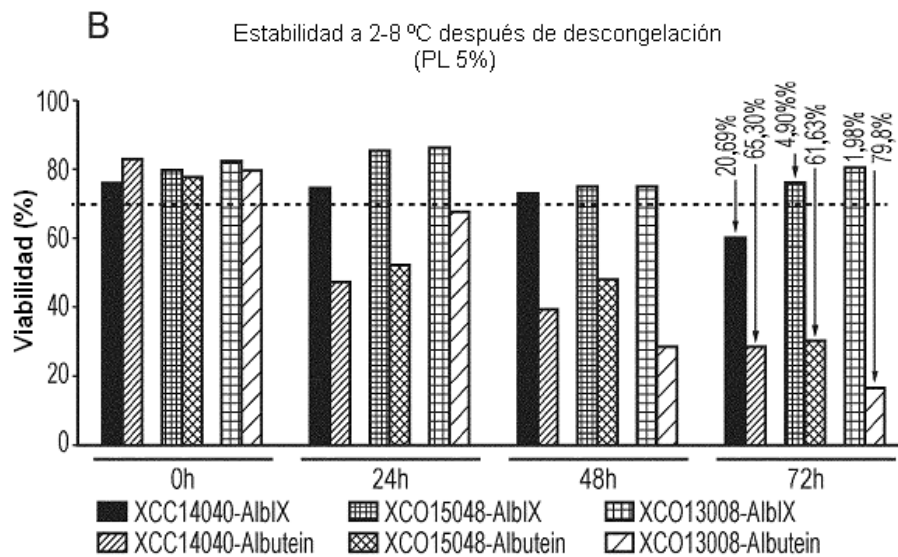


FIG. 7



Ensayo de comparación múltiple de ANOVA Tukey:
 AlbIX: sin diferencias significativas Albutein: t = 0 con respecto a 72 h ($p < 0,05$)



Ensayo de comparación múltiple de ANOVA Tukey: AlbIX: sin diferencias significativas
 Albutein: De t = 0 con respecto a 24 ($p < 0,05$); t = 0 con respecto a 48 y 72 ($p < 0,001$)

FIG. 8

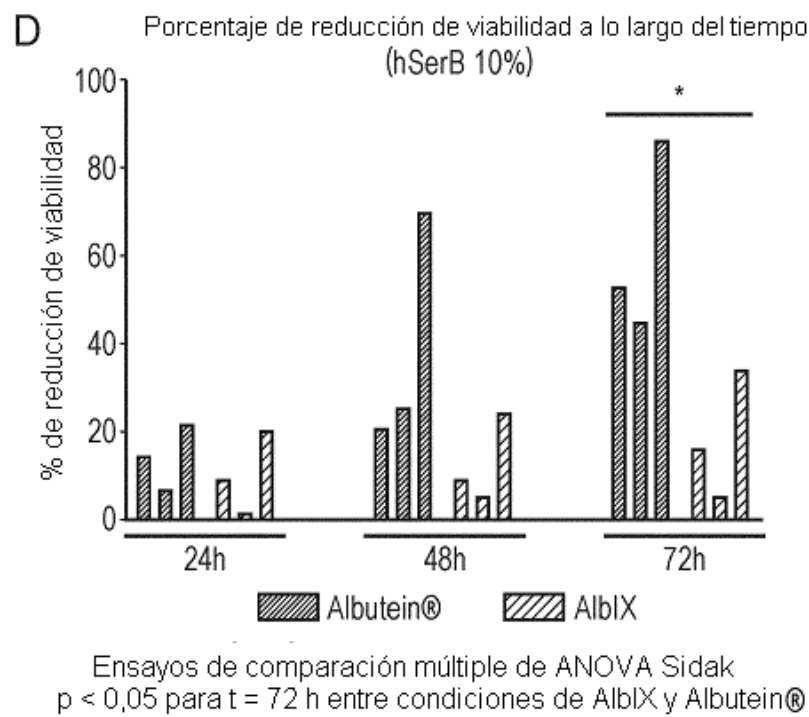
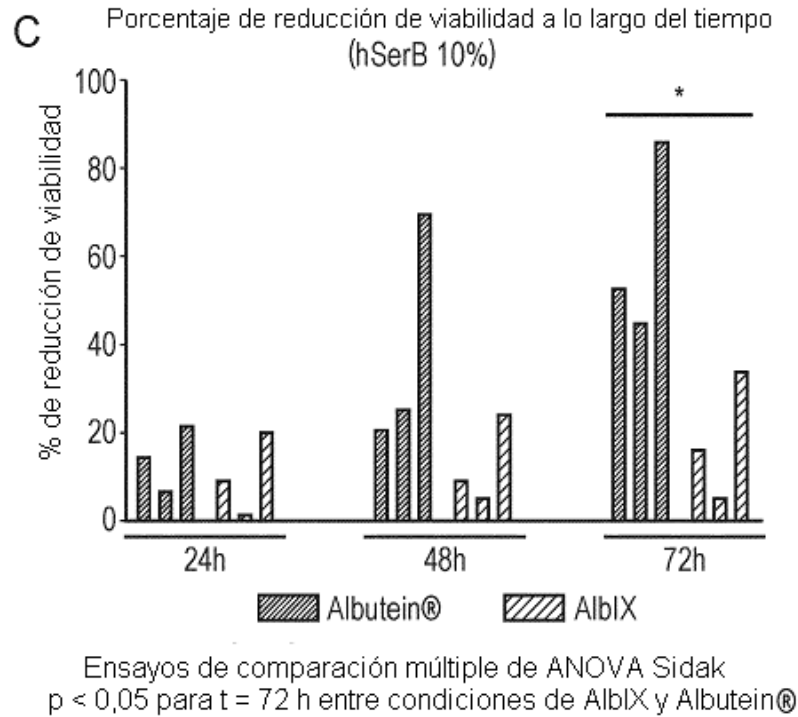


FIG. 8 (Continuación)

Acido				
Graso		Contenido medio de FA		
Lipido N.º	mg/ml	% en peso	mM	% en moles
C8:0	0,001	0,039	0,01	0,09
C8:0	0,033	1,268	0,23	2,36
C9:0	0,000	0,000	0,00	0,00
C10:0	0,001	0,039	0,01	0,06
C11:0	0,000	0,000	0,00	0,00
C12:0	0,011	0,429	0,05	0,58
C13:0	0,000	0,000	0,00	0,00
C14:0	0,229	8,933	1,00	10,51
C14:1	0,001	0,039	0,00	0,05
C15:0	0,010	0,390	0,04	0,43
C15:1	0,000	0,000	0,00	0,00
C16:0	0,866	33,762	3,38	35,37
C16:1n7	0,024	0,917	0,09	0,97
C16:2n4	0,000	0,000	0,00	0,00
C16:3n4	0,013	0,488	0,05	0,52
C17:0	0,014	0,527	0,05	0,52
C17:1	0,000	0,000	0,00	0,00
C18:0	0,584	22,762	2,05	21,49
C18:1n7	0,005	0,195	0,02	0,19
C18:1n9c	0,227	8,836	0,80	8,40
C18:1n9t	0,049	1,892	0,17	1,80
C18:2n6c	0,118	4,603	0,42	4,41
C18:2n6t	0,000	0,000	0,00	0,00
C18:3n3	0,000	0,000	0,00	0,00
C18:4n3	0,000	0,000	0,00	0,00
C19:0	0,000	0,000	0,00	0,00
C20:0	0,187	7,275	0,60	6,25
C20:1n9	0,000	0,000	0,00	0,00

FIG. 9

Acido				
Graso		Contenido medio de FA		
Lípido N.º	mg/ml	% en peso	mM	% en moles
C20:2n6	0,001	0,020	0,00	0,02
C20:3n3	0,000	0,000	0,00	0,00
C20:3n6	0,001	0,020	0,00	0,02
C20:4n6	0,000	0,000	0,00	0,00
C20:5n3	0,000	0,000	0,00	0,00
C22:0	0,194	7,568	0,57	5,97
C22:1n11	0,000	0,000	0,00	0,00
C22:1n9	0,000	0,000	0,00	0,00
C22:2n6	0,000	0,000	0,00	0,00
Suma	2,564	100,000	9,543	100,00

FIG. 9 (Continuación)

Metal	Conc (mg/kg de solución)
Plata	< 0,5
Aluminio	< 0,5
Arsénico	< 0,5
Boro	< 0,5
Bario	< 0,5
Berilio	< 0,5
Bismuto	< 0,5
Calcio	2.6
Cadmio	< 0,5
Cobalto	< 0,5
Cromo	< 0,5
Cobre	< 0,5
Hierro	< 0,5
Galio	< 0,5
Indio	< 0,5
Potasio	1
Litio	< 0,5
Magnesio	< 0,5
Manganeso	< 0,5
Molibdeno	< 0,5
Níquel	< 0,5
Fósforo	2.6
Plomo	< 0,5
Paladio	< 0,5
Platino	< 0,5
Antimonio	< 0,5
Selenio	< 0,5
Silicio	< 0,5
Estaño	< 0,5
Estroncio	< 0,5

FIG. 10

Metal	Conc (mg/kg de solución)
Titanio	< 0,5
Talio	< 0,5
Vanadio	< 0,5
Cinc	< 0,5
Circonio	< 0,5

FIG. 10 (Continuación)

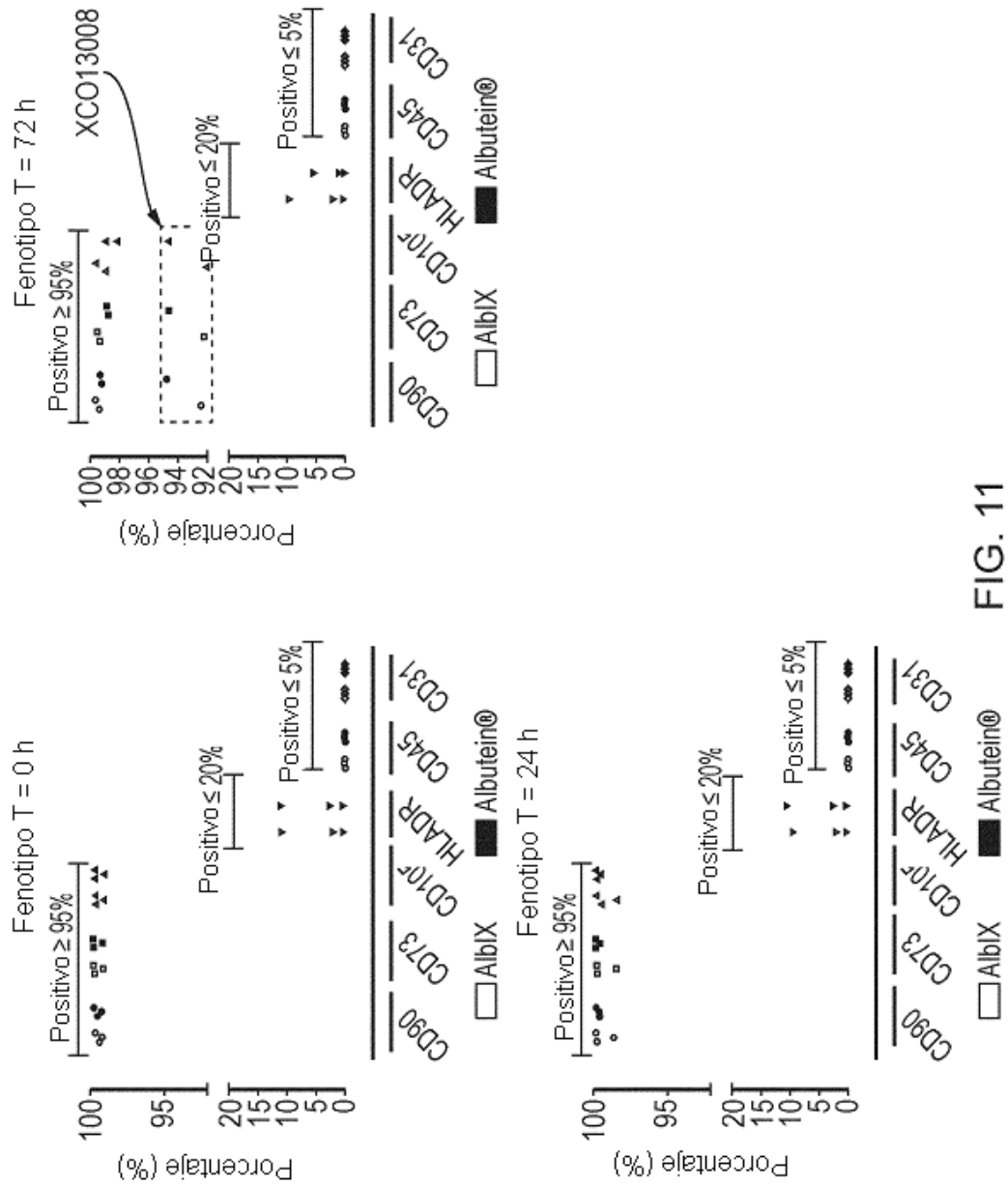
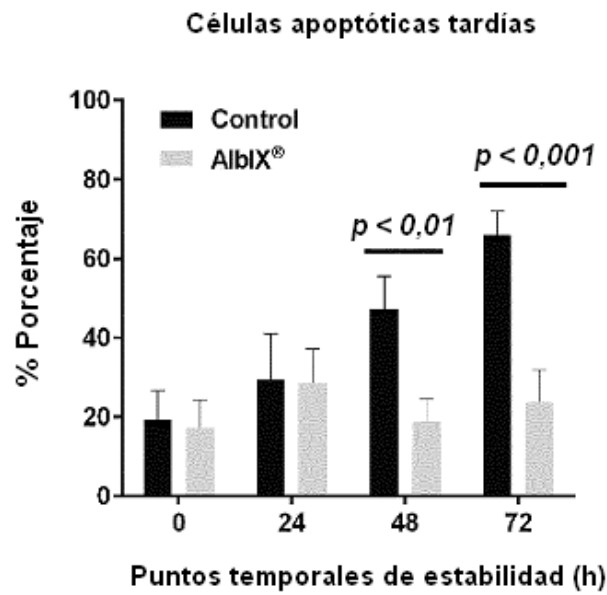


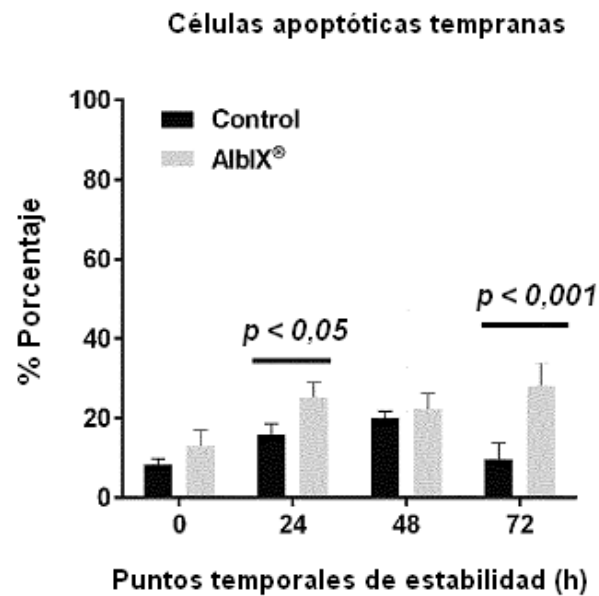
FIG. 11

A.



Análisis estadístico: ANOVA, ensayo de comparación múltiple de Sidak

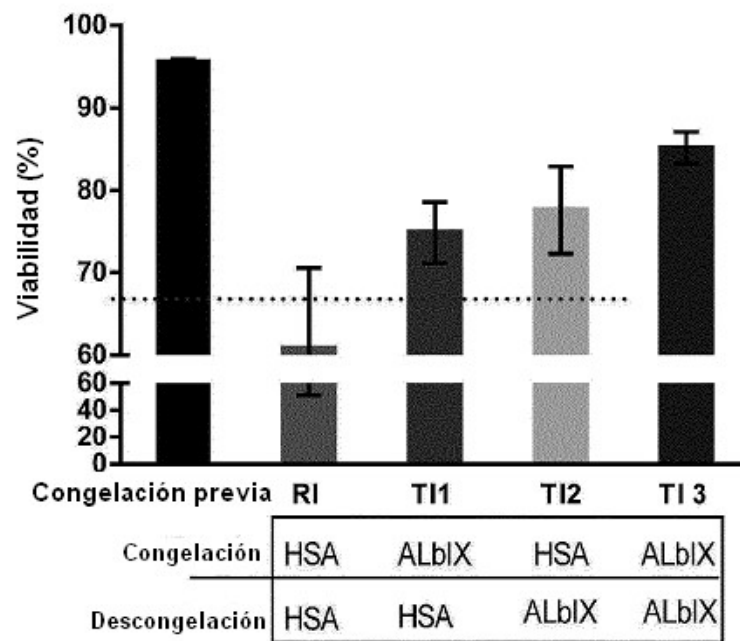
B.



Análisis estadístico: ANOVA, ensayo de comparación múltiple de Sidak

FIG. 12

A.



B.

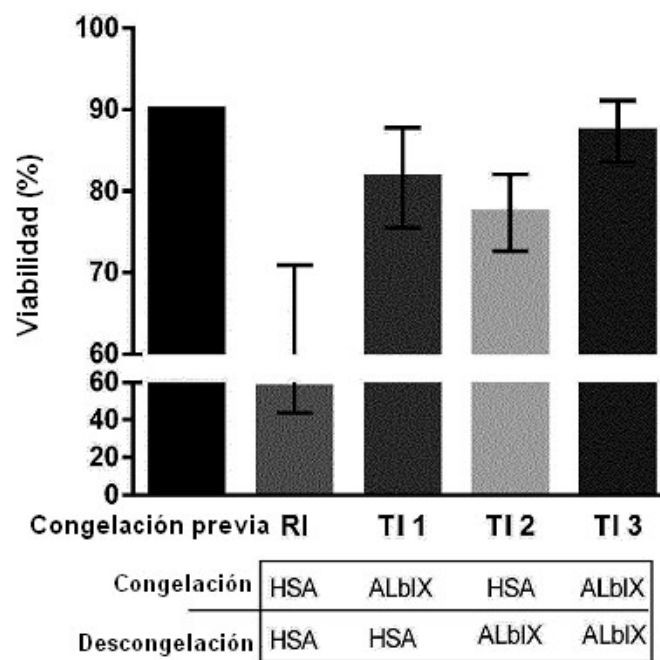
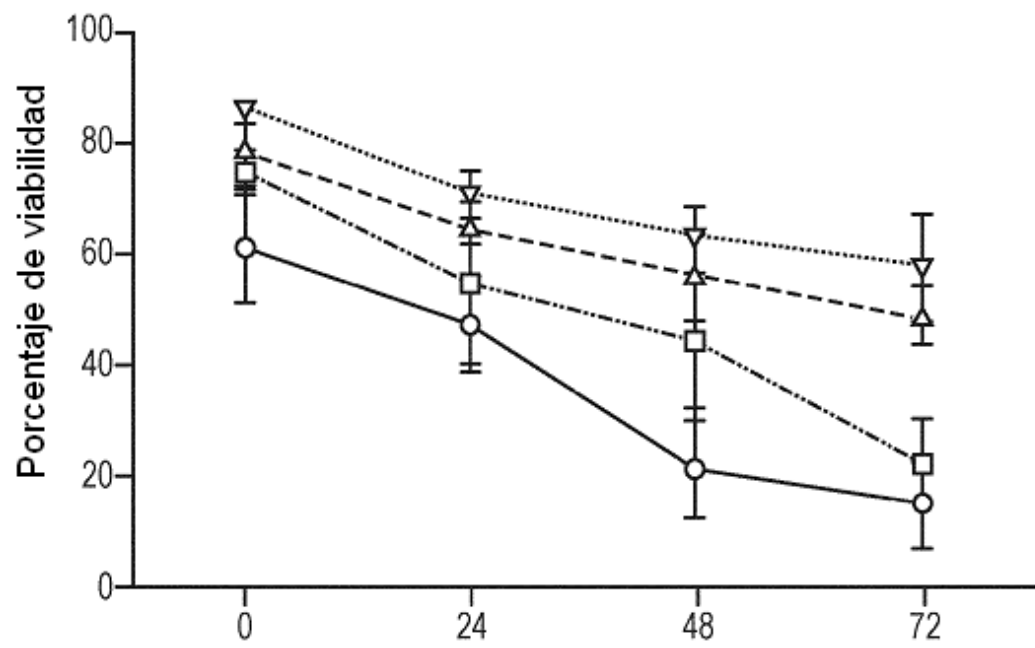


FIG. 13

A.



B.

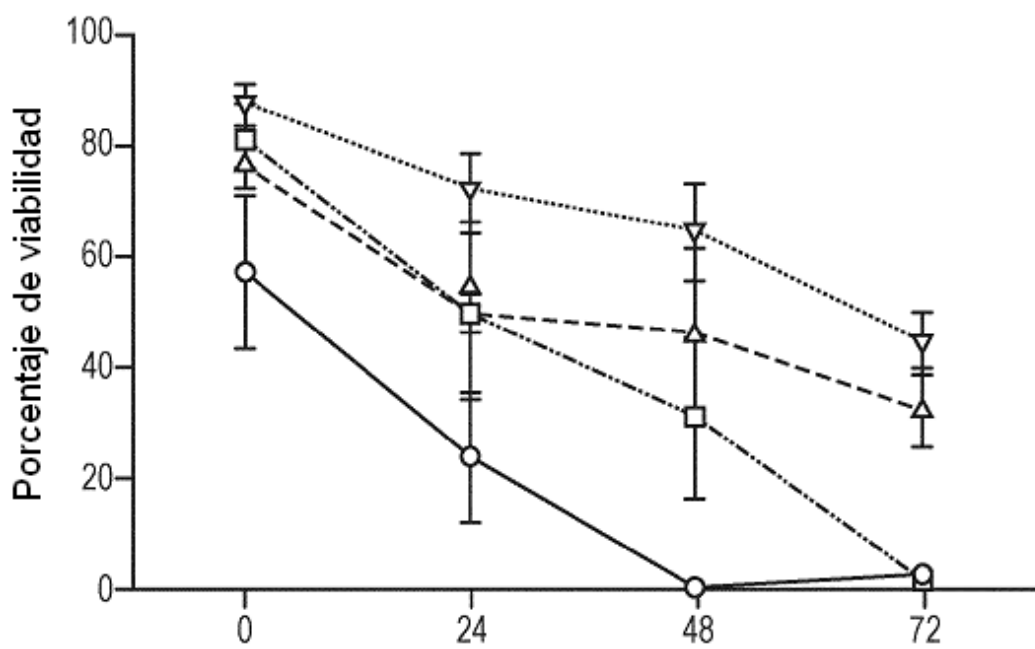


FIG. 14

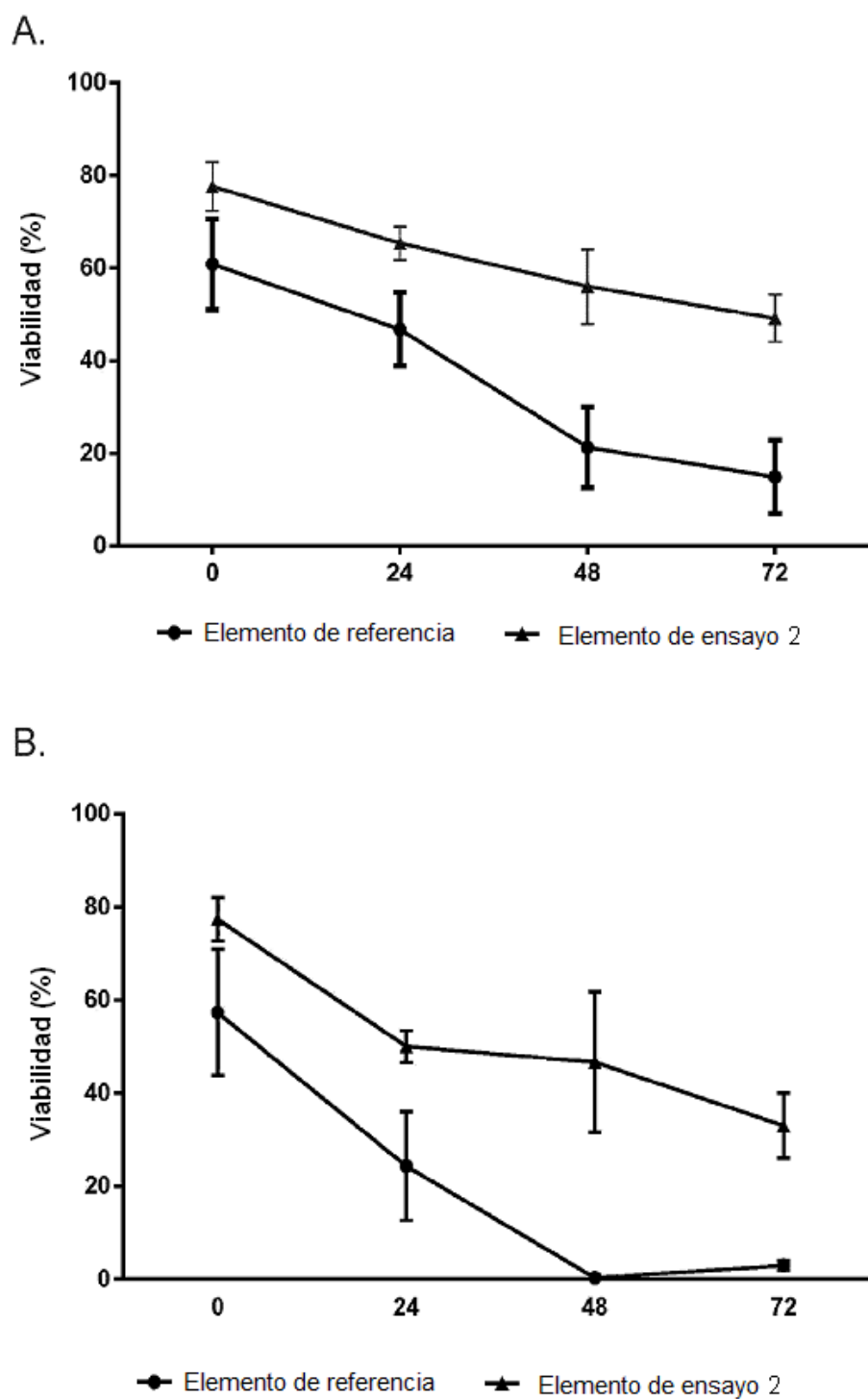
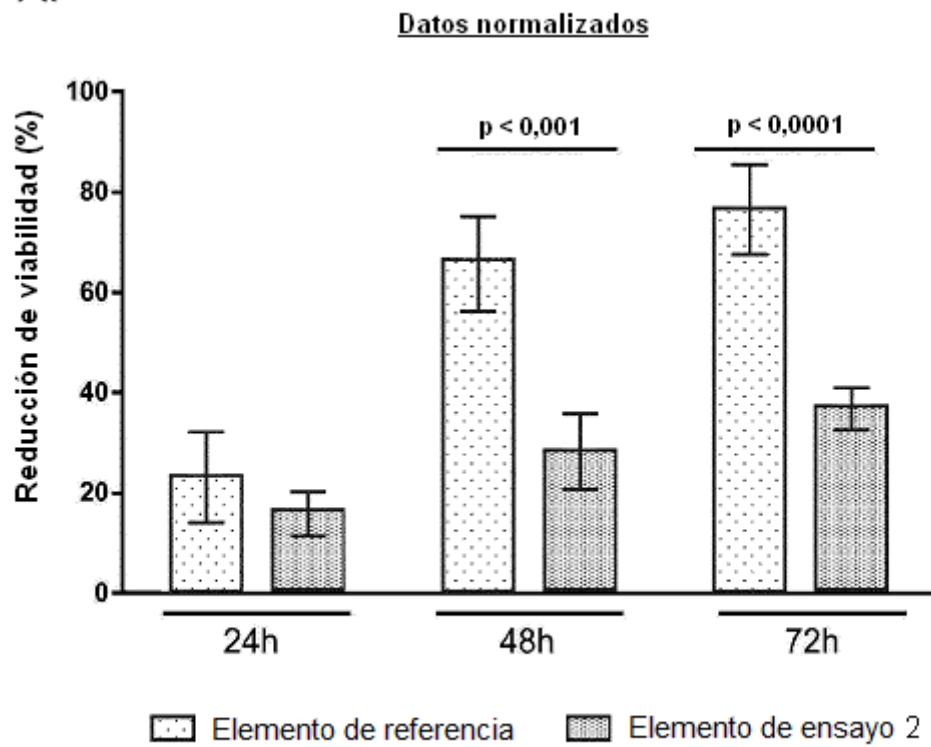


FIG. 15

A.



B.

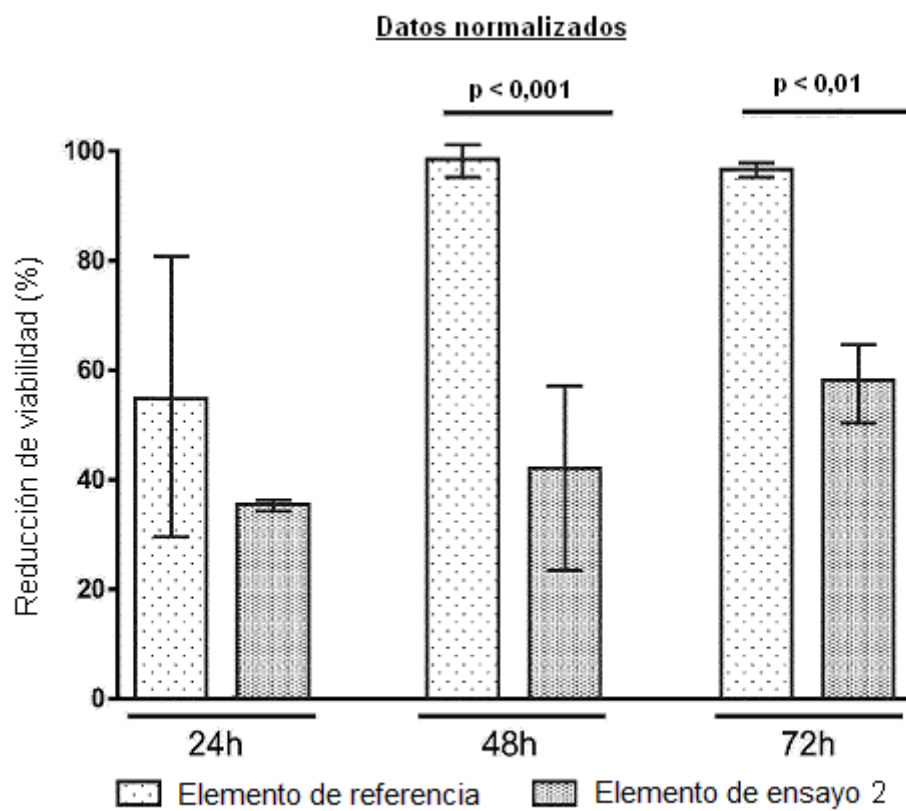


FIG. 16

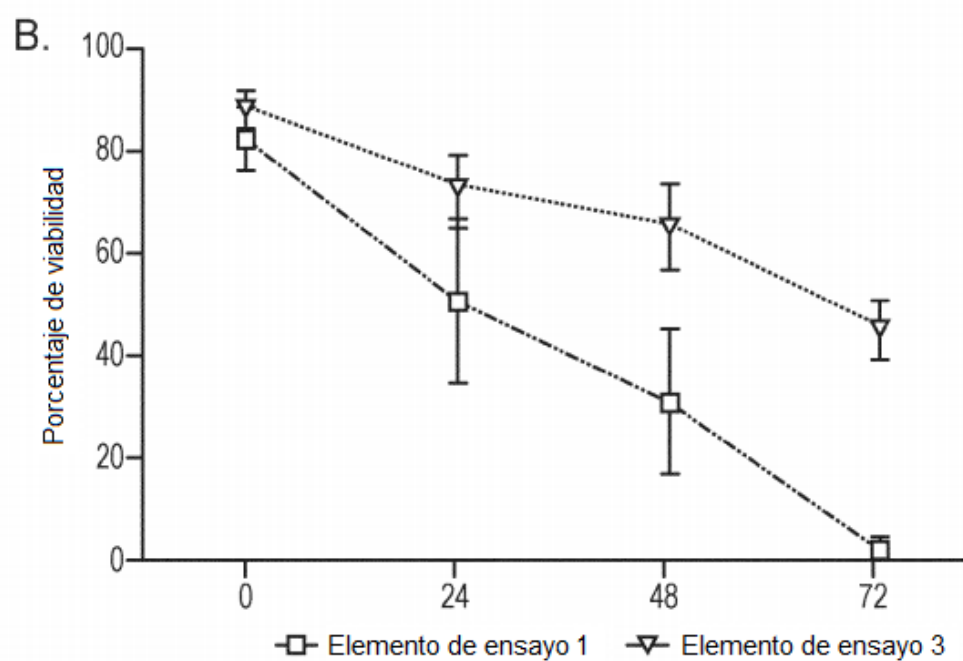
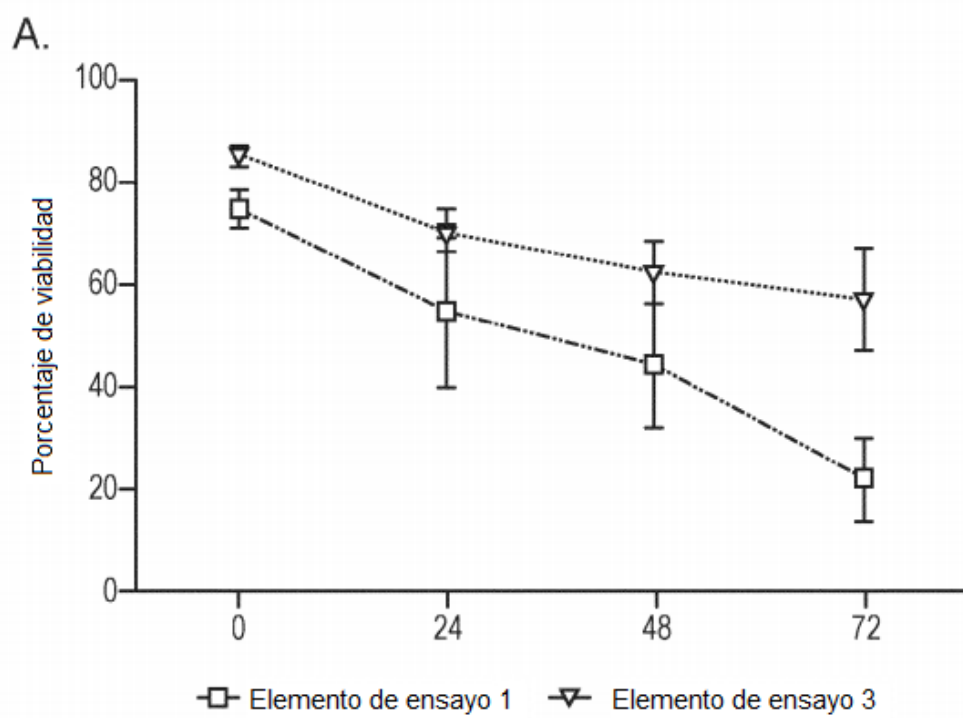


FIG. 17

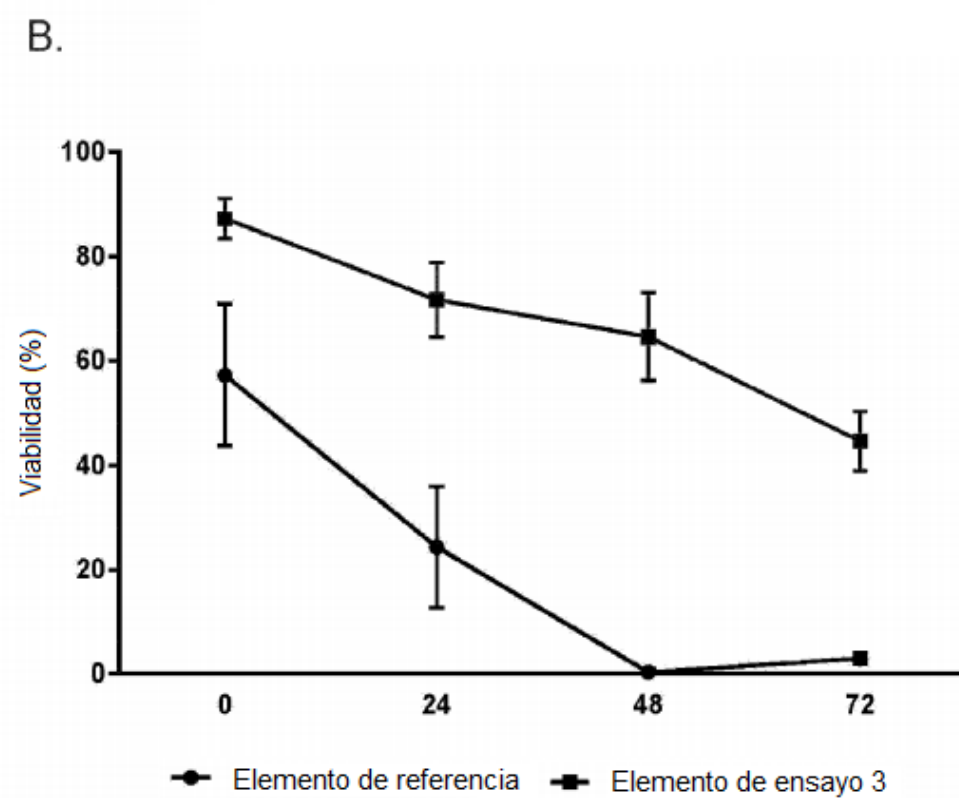
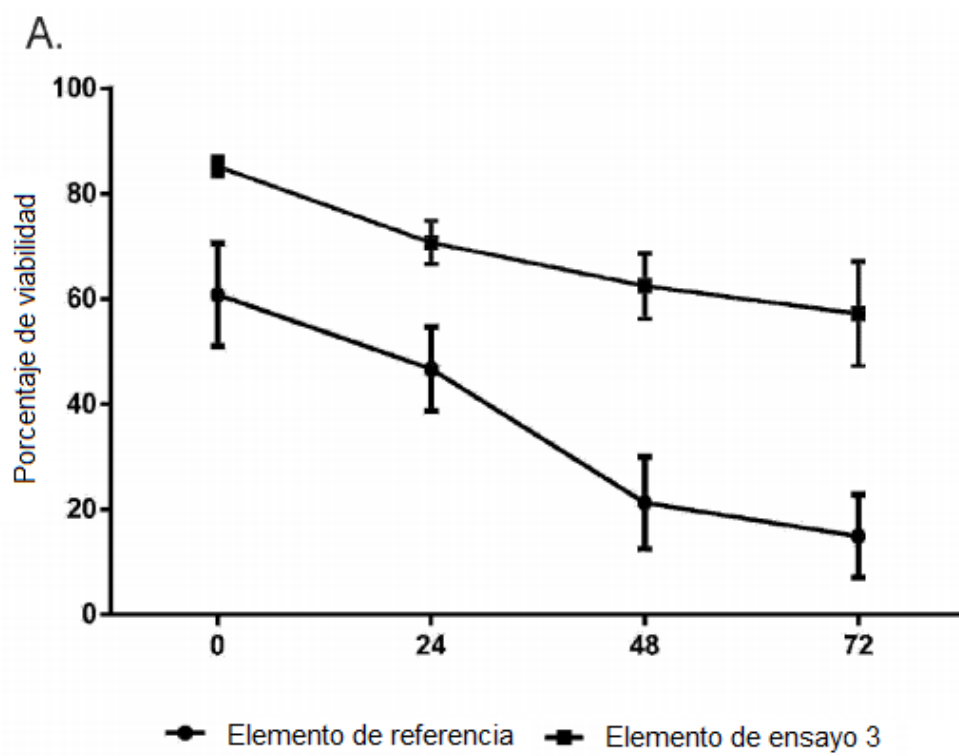


FIG. 18

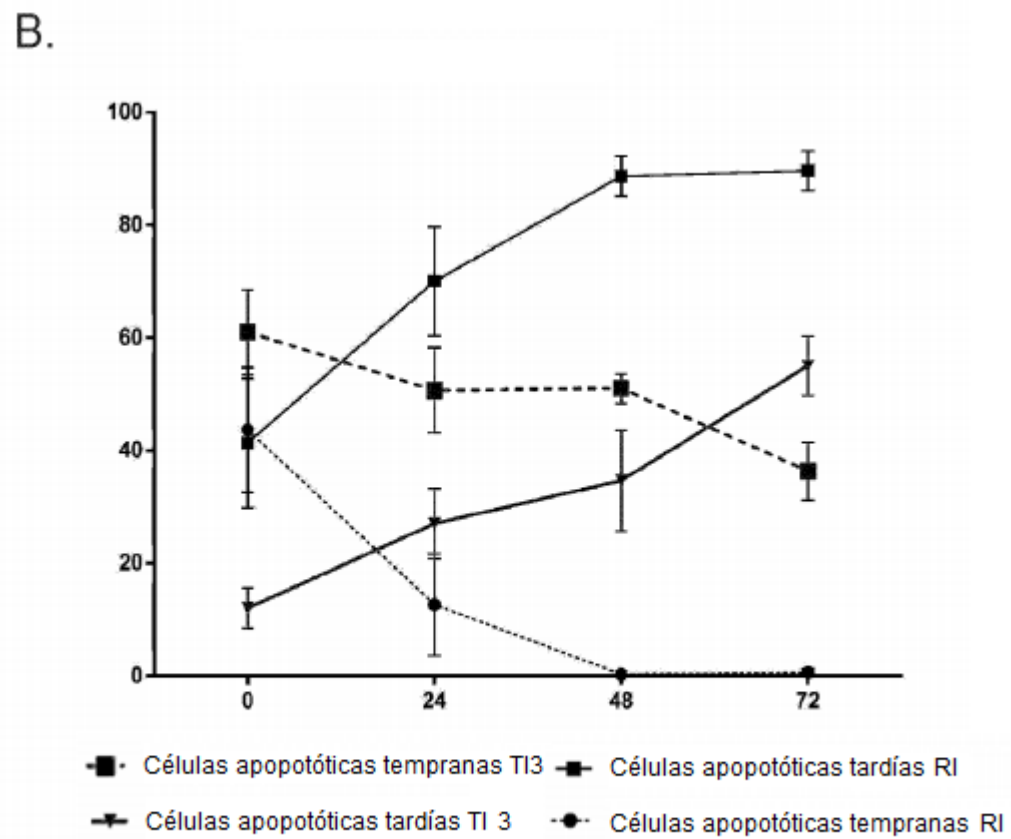
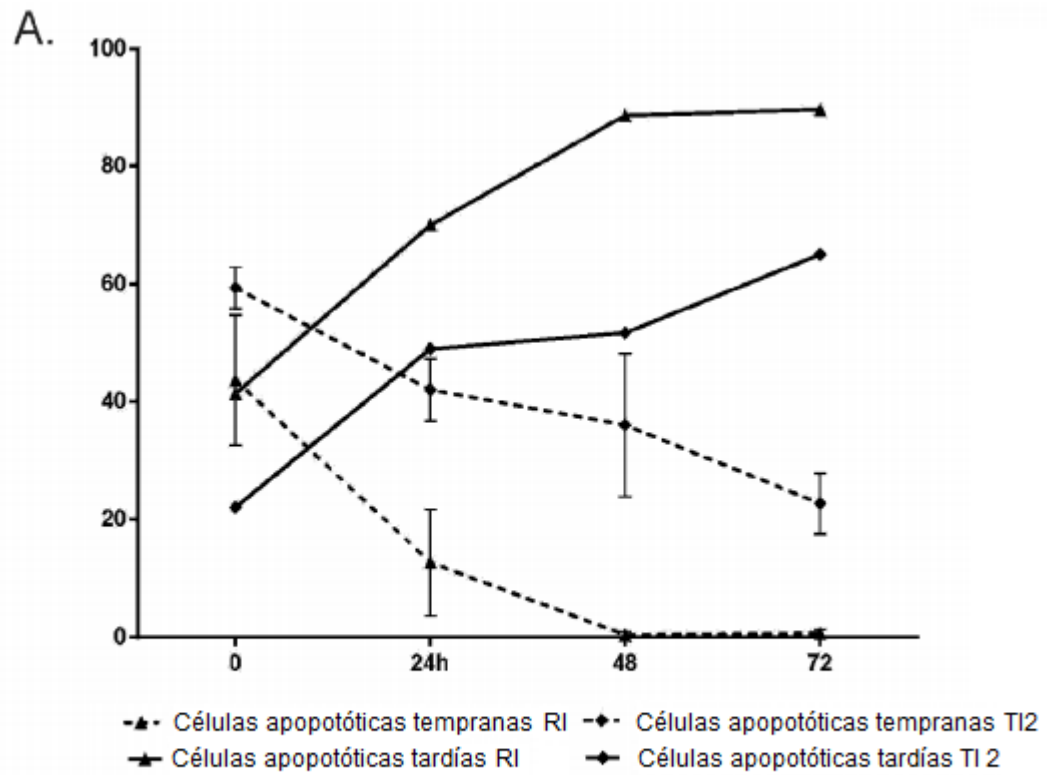


FIG. 19

C.

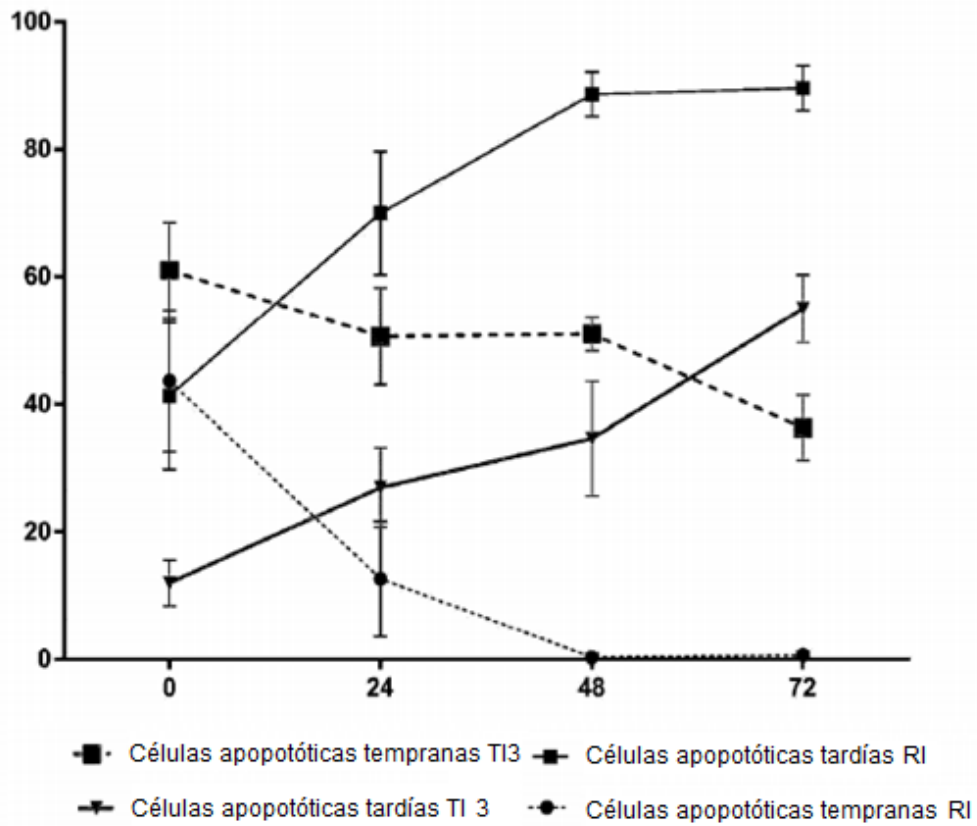


FIG. 19 (Continuación)