

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 728**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016 PCT/FR2016/050948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170281**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016 E 16723430 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3285576**

54 Título: **Procedimiento de conservación de células, tejidos u órganos en hipotermia**

30 Prioridad:

**23.04.2015 FR 1553659**

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

**24.03.2021**

73 Titular/es:

**ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG (33.3%)  
20, Avenue du Stade de France  
93218 La Plaine Saint Denis Cedex, FR;  
UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (33.3%) y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**IVANOVIC, ZORAN;  
GERBY, SANDIE y  
VLASKI-LAFARGE, MARIJA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 813 728 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**

Procedimiento de conservación de células, tejidos u órganos en hipotermia

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de conservación a medio y largo plazo de células, tejidos u órganos. Este procedimiento está destinado más en concreto a la conservación de los injertos hasta que haya que trasplantarlos en el receptor.

**Antecedentes de la invención**

En la actualidad, la crioconservación es el único método disponible para conservar los injertos de células hematopoyéticas a medio y largo plazo. En efecto, sin congelación y a una temperatura de 4 °C, se ha observado que el número y la capacidad funcional de las células progenitoras contenidas en los injertos disminuyen drásticamente al cabo de tan solo 3 días de conservación (Hechler et al., 1996).

No obstante, la crioconservación presenta inconvenientes notables, sobre todo la posibilidad de aglutinación durante la descongelación o el riesgo de reacción anafiláctica desencadenada por la presencia de crioprotectores. Además, este método no se puede aplicar a todos los tipos celulares.

Los estudios ya publicados han demostrado que la conservación a corto plazo a 4 °C de las células madre hematopoyéticas CD34+ se mejoraba con la modificación de las condiciones atmosféricas de los cultivos, sobre todo con la disminución de la concentración de oxígeno y el aumento de la concentración de dióxido de carbono (Vlaski et al., 2014). Aunque sean notables, estas mejoras resultan insuficientes para garantizar la supervivencia y el mantenimiento de las capacidades funcionales de las células y, en particular, de las células progenitoras, para una conservación a largo plazo a 4 °C. Se ha contemplado igualmente la utilización de los inhibidores de la entrada del calcio para conservar los tejidos y órganos antes del trasplante (solicitud de patente de los EE. UU. US 2008/089947).

Un procedimiento óptimo permitiría conservar a largo plazo los injertos en condiciones de hipotermia, sin congelación, y simplificaría también la logística y los procesos de implantación de injertos, a la vez que se mejoran los resultados obtenidos en el receptor.

**Compendio de la invención**

Los inventores han demostrado que la incubación previa de las células en hipotermia moderada y en una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica antes de ser conservadas en hipotermia intensa permitía mejorar considerablemente la supervivencia y la capacidad de proliferación de dichas células, sobre todo en el caso de las células madre.

Así pues, según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de conservación de las células animales, preferiblemente de las células humanas, en hipotermia intensa, que comprende una etapa que consiste en mantener dichas células en hipotermia moderada y en una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica durante aproximadamente 12 a aproximadamente 72 horas, antes de conservarlas en hipotermia intensa.

Las células se pueden conservar en hipotermia intensa a una temperatura comprendida entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 12 °C, preferiblemente de aproximadamente 4 °C.

Las células se mantienen en hipotermia moderada a una temperatura comprendida entre 20 °C y 35 °C, preferiblemente de aproximadamente 30 °C.

Las células pueden mantenerse en hipotermia moderada y en una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica durante aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas, preferiblemente durante aproximadamente 48 horas.

La atmósfera hipóxica comprende del 0,5 al 10 % de dioxígeno, preferiblemente aproximadamente el 5 % de dioxígeno.

La atmósfera hipercápnica comprende del 5 al 20 % de dióxido de carbono, preferiblemente aproximadamente el 9 % de carbono.

Preferiblemente, las células se mantienen en hipotermia moderada y en una atmósfera hipóxica e hipercápnica.

Las células conservadas según el procedimiento de la invención pueden ser células de piel, de cartílago, osteocitos, células endoteliales, células musculares, células neurales, células retinianas, células pancreáticas, células sanguíneas, o células madre o progenitoras capaces de diferenciarse en estas células.

Las células pueden estar organizadas sobre todo en un tejido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en piel, córnea, tendón, tejido óseo, vaso sanguíneo, nervio, válvula cardíaca, membrana amniótica, tejido cartilaginoso, islote de Langerhans y tejido muscular, u organizadas en un órgano completo o parcial, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en riñón, hígado, corazón, cordón umbilical, placenta, intestino, pulmón y páncreas.

Preferiblemente, las células conservadas son células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas, o

una combinación de ellas, preferiblemente células madre hematopoyéticas.

En la presente solicitud se describe igualmente un kit que comprende un medio de conservación celular, un primer envase estéril destinado a recibir las células, tejidos u órganos y el medio de conservación celular, y un dispositivo que permite crear una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica en el primer envase que comprende las células, tejidos u órganos, y optativamente un segundo envase que permite garantizar el mantenimiento del primer envase y/o de las células, tejidos u órganos a una temperatura controlada.

Como alternativa, el kit puede comprender un envase estéril destinado a recibir las células, tejidos u órganos y el medio de conservación celular que encierra una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica, en donde dicho envase estéril se ha llenado opcionalmente antes con el medio de conservación celular.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere igualmente a la utilización de un kit, tal como el descrito, para llevar a cabo el procedimiento según la invención, es decir, para conservar las células animales en hipotermia intensa.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Células CD34+ de sangre de la placenta. Rendimiento de células viables con respecto a t = 0. Aire: 21 % de O<sub>2</sub> y 0,01 % de CO<sub>2</sub>; HH: 9 % de CO<sub>2</sub> y 5 % de O<sub>2</sub>; Hipo: 5 % de O<sub>2</sub> y 0,001 % de CO<sub>2</sub>; Hiper: 20 % de O<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>. \*: p < 0,5; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

Figura 2: Células CD34+ de sangre de la placenta. Rendimiento de los progenitores clonogénicos con respecto a t = 0. Aire: 21 % de O<sub>2</sub> y 0,01 % de CO<sub>2</sub>; HH: 9 % de CO<sub>2</sub> y 5 % de O<sub>2</sub>; Hipo: 5 % de O<sub>2</sub> y 0,001 % de CO<sub>2</sub>; Hiper: 20 % de O<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>. \*: p < 0,5; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

Figura 3: Células mesenquimatosas humanas. Rendimiento de células viables con respecto a t = 0. Aire: 21 % de O<sub>2</sub> y 0,01 % de CO<sub>2</sub>; HH: 9 % de CO<sub>2</sub> y 5 % de O<sub>2</sub>; Hipo: 5 % de O<sub>2</sub> y 0,001 % de CO<sub>2</sub>; Hiper: 20 % de O<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>. \*: p < 0,5; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

Figura 4: Células mesenquimatosas humanas. Rendimiento de células progenitoras clonogénicas con respecto a t = 0. Aire: 21 % de O<sub>2</sub> y 0,01 % de CO<sub>2</sub>; HH: 9 % de CO<sub>2</sub> y 5 % de O<sub>2</sub>; Hipo: 5 % de O<sub>2</sub> y 0,001 % de CO<sub>2</sub>; Hiper: 20 % de O<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>. \*: p < 0,5; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

Figura 5: Células FDCPmix. Rendimiento de células viables con respecto a t = 0. Aire: 21 % de O<sub>2</sub> y 0,01 % de CO<sub>2</sub>; HH: 9 % de CO<sub>2</sub> y 5 % de O<sub>2</sub>; Hipo: 5 % de O<sub>2</sub> y 0,001 % de CO<sub>2</sub>; Hiper: 20 % de O<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>. \*: p < 0,5; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

### Descripción detallada de la invención

En los estudios anteriores, los inventores de la presente invención han observado que la hipoxia y la hipercapnia permiten mejorar la conservación de las células madre hematopoyéticas con respecto a su exposición al aire (Jeanne et al.; 2009; Ivanovic et al.; 2010; Vlaski et al.; 2014).

En la parte experimental de la presente solicitud, los inventores han demostrado que la incubación previa de las células madre durante 2 días en hipotermia moderada (30 °C) antes de transferirlas a 4 °C mejoraba de manera muy significativa la supervivencia de estas células y la capacidad funcional de las células progenitoras con respecto a una colocación directa a 4 °C. Los resultados obtenidos salen más claros cuando la incubación previa está combinada con una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica. Estos resultados, validados en tres tipos celulares diferentes, a saber, células hematopoyéticas CD34+, células mesenquimatosas y células de la línea FDCPmix, indican que este procedimiento se puede utilizar para mejorar la conservación de células, tejidos u órganos en hipotermia, sobre todo con vistas a un trasplante.

Así pues, según un primer aspecto, la presente solicitud se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de conservación de células animales en hipotermia intensa que comprende una etapa que consiste en mantener dichas células en hipotermia moderada durante un breve margen de tiempo, antes de conservarlas en hipotermia intensa.

El procedimiento según la invención tiene por objeto mejorar la conservación de las células animales cuando se conservan en hipotermia intensa, sin congelación. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «hipotermia intensa» se refiere a temperaturas superiores a 0 °C e inferiores a 15 °C. Preferiblemente, este término se refiere a las temperaturas comprendidas entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 12 °C, a saber, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 °C, preferiblemente entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 8 °C, y, en particular, entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. De manera más particularmente preferida, las condiciones de hipotermia intensa corresponden a una temperatura comprendida entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 6 °C, preferiblemente de aproximadamente 4 °C.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «aproximadamente» hace referencia a una horquilla de valores del ±5 % del valor especificado, preferiblemente el ±2 % del valor especificado. Por ejemplo, «aproximadamente 20» incluye los ±5 % de 20 o de 19 a 21. Se entiende que los valores anteriores del término «aproximadamente» deben igualmente considerarse que están descritos específicamente en la presente solicitud. Por ejemplo, la expresión «una

temperatura comprendida entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 12 °C» debe considerarse que describe «una temperatura comprendida entre 1 °C y 12 °C». De la misma manera, la expresión «una temperatura de aproximadamente 4 °C» debe igualmente considerarse que describe «una temperatura de 4 °C».

5 Antes de ser colocadas en hipotermia intensa, las células se mantienen en hipotermia moderada durante un intervalo de tiempo breve. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «hipotermia moderada» se refiere a las temperaturas comprendidas entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 35 °C, a saber, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 °C, preferiblemente entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 32 °C, de manera aún más preferida entre aproximadamente 27 °C y aproximadamente 32 °C. De manera más particularmente preferida, una hipotermia moderada corresponde a una temperatura de aproximadamente 30 °C.

10 En el procedimiento según la invención, las células se colocan en hipotermia moderada durante aproximadamente 12 horas a aproximadamente 72 horas, preferiblemente durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 60 horas, o durante aproximadamente 36 horas a aproximadamente 60 horas, antes de ser colocadas en hipotermia intensa con vistas a una conservación a más largo plazo. Preferiblemente, la fase de hipotermia moderada dura de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas, y de manera particularmente preferida, aproximadamente 48 horas.

Según un modo de realización preferido, las células se colocan en hipotermia intensa inmediatamente después de la etapa de hipotermia moderada.

20 En el procedimiento según la invención, las células se pueden conservar en hipotermia intensa durante un largo intervalo de tiempo, por ejemplo, de varios días a varios meses, antes de utilizarse. En particular, las células se pueden conservar en hipotermia intensa durante más de 24 horas, en particular de 1 día a 120 días, preferiblemente durante 1 día a 1 mes, de manera aún más preferida durante 1 día a 15 días, y de manera más particularmente preferida durante 5 días a 10 días.

25 Las células conservadas mediante el procedimiento según la invención son preferiblemente células que se han retirado de un animal o donante, preferiblemente de un mamífero, y de manera particularmente preferida de un humano. En particular, estas células pueden destinarse a ser administradas posteriormente a un receptor en el marco de un trasplante.

30 Según un modo de realización preferido, las células no se congelan ni se someten a las condiciones de hipotermia intensa antes de ser colocadas en hipotermia moderada. Las células se colocan preferiblemente en hipotermia moderada en un plazo de un máximo de 4 horas después de extraerlas del donante. De manera particularmente preferida, las células se colocan en hipotermia moderada inmediatamente después de su extracción, es decir, durante la hora que sigue a la extracción.

35 Antes de su conservación, las células pueden verse sometidas a diferentes análisis, tales como la serología, la tipificación del HLA y los exámenes fenotípicos, morfológicos (sobre todo en el caso de las células organizadas en tejidos u órganos) o bacteriológicos.

Tal y como se demuestra en la parte experimental, la etapa previa de hipotermia moderada es suficiente para mejorar la conservación de las células. No obstante, según ciertos modos preferidos, esta etapa se combina con un ajuste de las condiciones atmosféricas del cultivo para constituir una atmósfera hipóxica, hipercápnica o hipóxica/hipercápnica, preferiblemente una atmósfera hipóxica/hipercápnica.

40 Una atmósfera hipóxica es una atmósfera que comprende una concentración reducida en dióxigeno con respecto a la concentración en el aire que es habitualmente del 20 al 21 %. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «atmósfera hipóxica» se refiere a una atmósfera que comprende menos del 10 % de O<sub>2</sub>. Así pues, una atmósfera hipóxica puede comprender, por ejemplo, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 10 % de O<sub>2</sub>, es decir, aproximadamente el 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 %. Según determinados modos de realización preferidos, una atmósfera hipóxica comprende entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 5 % de O<sub>2</sub>. De manera particularmente más preferida, la atmósfera hipóxica comprende aproximadamente el 5 % de O<sub>2</sub>. En una atmósfera hipóxica, la concentración del dióxido de carbono corresponde preferiblemente a la del aire ambiental, a saber, aproximadamente el 0,05 %. El complemento de la mezcla gaseosa está en general compuesto por dióxido de nitrógeno.

50 Una atmósfera hipercápnica es una atmósfera que comprende una concentración de dióxido de carbono más alta que la concentración del aire, que es habitualmente inferior al 0,05 %. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «atmósfera hipercápnica» se refiere preferiblemente a una atmósfera que comprende más del 5 % de CO<sub>2</sub>. Así pues, una atmósfera hipercápnica puede comprender, por ejemplo, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 20 % de CO<sub>2</sub>, es decir, aproximadamente el 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 %. Según determinados modos de realización preferidos, una atmósfera hipercápnica comprende entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 10 % de CO<sub>2</sub>, preferiblemente entre aproximadamente el 6 o el 7 % y aproximadamente el 10 % de CO<sub>2</sub>. Según otros modos de realización preferidos, una atmósfera hipercápnica comprende entre aproximadamente el 6 % y aproximadamente el 20 % de CO<sub>2</sub>, preferiblemente entre

aproximadamente el 9 % y aproximadamente el 20 % de CO<sub>2</sub>. De manera particularmente más preferida, la atmósfera hipercápnica comprende aproximadamente el 9 % de CO<sub>2</sub>. En una atmósfera hipercápnica, la concentración de dióxigeno corresponde preferiblemente a la del aire ambiental, a saber, aproximadamente el 20-21 %. El complemento de la mezcla gaseosa está en general compuesto por dióxido de nitrógeno.

5 Una atmósfera hipóxica/hipercápnica es una atmósfera que comprende una reducción de la concentración de dióxigeno y un aumento de la concentración de dióxido de carbono con respecto a las concentraciones habituales en el aire ambiental. De manera más específica, tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «atmósfera hipóxica/hipercápnica» se refiere a una atmósfera que comprende menos del 10 % de O<sub>2</sub> y más del 5 % de CO<sub>2</sub>. Los intervalos de valores preferidos de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> son los definidos más arriba para las condiciones de hipoxia e hipercapnia.  
10 De manera particularmente preferida, la atmósfera hipóxica/hipercápnica comprende aproximadamente el 5 % de O<sub>2</sub> y aproximadamente el 9 % de CO<sub>2</sub>. El complemento de la mezcla gaseosa está compuesto en general por dióxido de nitrógeno.

15 Cada una de estas mezclas gaseosas concretas se puede obtener con los procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica, sobre todo por medio de cámaras de incubación en una atmósfera controlada que se pueden comprar a numerosos proveedores.

Las células conservadas por el procedimiento según la invención pueden ser cualquier célula animal para la cual se desea una conservación de hipotermia intensa.

Preferiblemente, las células son células de mamífero y, de manera más particularmente preferida, las células humanas.

20 Según un modo de realización preferido, las células son células destinadas a ser trasplantadas en un receptor y proceden preferiblemente de una extracción de un donante. El donante y el receptor puede ser el mismo individuo (injerto autólogo o autoinjerto) o de individuos diferentes (aloinjerto).

Las células pueden ser células aisladas o células organizadas en tejidos u órganos.

25 Según un modo de realización, las células a conservar son células aisladas. Estas células pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en células de la piel, de cartilago, osteocitos, células endoteliales, células musculares, células neurales, células retinianas, células pancreáticas, células sanguíneas, o células madre o células progenitoras capaces de diferenciarse en estas células.

30 Las células madre pueden ser células madre pluripotentes (capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares de un organismo), multipotentes (capaces de diferenciarse en tipos celulares de diferentes tejidos) o unipotentes (capaces de diferenciarse en tipos celulares de un solo tejido). Las células progenitoras son células capaces de diferenciarse en diferentes tipos celulares de un solo tejido. Estas pueden ser oligopotentes (capaces de diferenciarse en un pequeño número de tipos celulares, por ejemplo, las células progenitoras CFU-GEMM), bipotentes (capaces de diferenciarse en dos tipos celulares, por ejemplo, las células progenitoras CFU-GM) o unipotentes (capaces de diferenciarse en un solo tipo celular, por ejemplo, las células progenitoras CFU-G, CFU-M, CFU-MK, BFU-E y CFU-E). A diferencia de las células progenitoras, las células madre poseen una capacidad real de autorrenovación y  
35 presentan una capacidad de proliferación muy superior.

En un modo de realización, las células madre son células madre pluripotentes elegidas entre las células madre embrionarias, las células progenitoras multipotentes adultas (o MAPC, por su nombre en inglés) o las células madre pluripotentes inducidas.

40 Las células madre embrionarias proceden de la masa celular interna del blastocito y tienen la capacidad de conducir a la formación de todos los tejidos del organismo (mesodermo, endodermo, ectodermo), incluidas las células de la línea germinal. La pluripotencia de las células madre embrionarias se puede evaluar mediante la presencia de marcadores, tales como los factores de transcripción OCT4 y NANOG, y los marcadores de superficie, como SSEA3/4, Tra-1-60 y Tra-1-81. Las células madre embrionarias se pueden obtener sin la destrucción del embrión del cual proceden, por ejemplo, con ayuda de la técnica descrita por Chung et al. (2008). En un modo de realización concreto,  
45 y por razones legales o éticas, las células madre embrionarias son células madre embrionarias que no son humanas. De manera general, según un modo de realización concreto, las células a conservar según el procedimiento de la invención no son células madre embrionarias humanas.

50 Las células progenitoras multipotentes adultas pueden, al igual que las células madre embrionarias, diferenciarse en células procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y expresan los factores de transcripción OCT4 y NANOG. Estas células se pueden aislar a partir de diferentes órganos, sobre todo a partir de la médula ósea (Schwartz et al., 2002).

55 Las células madre pluripotentes inducidas (iPS, por su nombre en inglés) son células pluripotentes que se obtienen por reprogramación genética de las células somáticas diferenciadas. Además de su aspecto y su potencial de autorrenovación y de pluripotencia similares a los de las células madre embrionarias, las iPS presentan igualmente una reprogramación epigenética con un perfil global de metilación de las histonas y de expresión génica muy similar a los de las células madre embrionarias. Cabe destacar que estas células son claramente positivas para los

marcadores de pluripotencia, sobre todo la coloración con fosfatasa alcalina y la expresión de las proteínas NANOG, SOX2, OCT4 y SSEA3/4. Los procedimientos que permiten la obtención de las células madre pluripotentes inducidas los conoce bien el experto en la técnica y están claramente descritos en los artículos de Yu et al. (2007), Takahashi et al. (2007) y Nakagawa et al. (2008).

5 En otro modo de realización, las células madre son células madre multipotentes. Los ejemplos no limitantes de las células madre multipotentes incluyen las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse en células sanguíneas e inmunitarias, como son los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las plaquetas, en particular las células madre hematopoyéticas que expresan el antígeno CD34, o las células madre mesenquimatosas capaces de diferenciarse en células cartilaginosas (condrocitos), células óseas (osteoblastos) y células grasas (adipocitos).  
10 Las células madre hematopoyéticas CD34+ y las células madre mesenquimatosas pueden aislarse a partir de la médula ósea con ayuda de cualquiera de las técnicas que conoce el experto en la técnica, por ejemplo, con la ayuda de un sistema inmunomagnético o de un sistema de filtración.

En otro modo de realización, las células madre son células madre unipotentes. Los ejemplos no limitantes de las células madre unipotentes incluyen las células madre de la piel, del hígado y de la mucosa intestinal.

15 Según un modo de realización preferido, las células a conservar son o contienen células madre, preferiblemente células madre hematopoyéticas o mesenquimatosas, o una combinación de las mismas. De manera muy particularmente preferible, las células a conservar son células madre hematopoyéticas.

En determinados modos de realización, las células conservadas pueden estar organizadas en tejidos u órganos.

20 Los ejemplos no limitantes de tejidos que pueden conservarse según el procedimiento de la invención incluyen la piel, la córnea, un tendón, un tejido óseo, un vaso sanguíneo, un nervio, una válvula cardíaca, una membrana amniótica, un tejido cartilaginoso, un islote de Langerhans y un tejido muscular.

25 Los órganos conservados según el procedimiento de la invención pueden estar completos, por ejemplo, un riñón o un hígado completos, o ser un trozo, por ejemplo, un trozo de hígado. Los ejemplos no limitantes de los órganos que se pueden conservar según el procedimiento de la invención incluyen riñón, hígado, corazón, cordón umbilical, placenta, intestino, pulmón y páncreas.

30 En el procedimiento según la invención, las células, tejidos u órganos se pueden conservar en cualquier medio adaptado, preferiblemente un medio líquido. Existen numerosos medios adaptados para la conservación de células, tejidos u órganos. El experto en la técnica puede fácilmente elegir un medio adaptado en función del tipo de células, tejidos u órganos a conservar. Tales medios se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional WO 2014/057220, WO 2014/120014, WO 2012/129538, WO 2011/159359, WO 06/052133, WO 97/33978 y WO 00/02572. Hay muchos proveedores que comercializan igualmente los medios adaptados, tales como, por ejemplo, los medios HP01 y HP02 de Macopharma, los medios Stem Alpha A y Stem Alpha S3 de Stemcell, o el medio Viaspan (o «Solución de la Universidad de Wisconsin»).

El medio permite preferiblemente la supervivencia de las células sin que se les estimule la proliferación.

35 Una de las ventajas del procedimiento según la invención es que no requiere la utilización de crioprotectores en el medio de conservación. El medio se puede inyectar directamente, sobre todo en el caso de un injerto de células madre hematopoyéticas, o cuando se necesita un lavado del injerto antes de su administración.

En el caso de órganos o de tejidos, pueden sumergirse en un volumen adaptado para que queden totalmente recubiertos.

40 Antes de la utilización de las células, sobre todo en el ámbito de un trasplante, se pueden realizar diferentes pruebas para verificar la calidad del injerto, por ejemplo, la medida de la apoptosis o una prueba clonogénica de las células progenitoras CFU-GM (unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos) o CFC-GM (células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos) realizado en el ámbito del control de calidad de los injertos hematopoyéticos.

La presente solicitud describe igualmente un kit.

45 Según un primer aspecto, comprende:

- un medio de conservación celular,
- un primer envase estéril destinado a recibir las células, tejidos u órganos y el medio de conservación celular, y
- un dispositivo que permite crear una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica en el primer envase que comprende las células, tejidos u órganos.

50 Optativamente, el primer envase estéril ya puede venir lleno con el medio de conservación celular.

En el primer envase se puede crear una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica después de haber colocado en él las

células, tejidos u órganos.

Según un aspecto concreto, dicho envase comprende una entrada y una salida que permite los intercambios gaseosos, y el dispositivo que permite crear una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica se utiliza para inyectar en dicho envase la atmósfera deseada. Esta entrada y salida se cierran a continuación para mantener las células, tejidos u órganos en dicha atmósfera. El dispositivo que permite crear una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica es preferiblemente un dispositivo a presión, tal como un cartucho de gas.

Según otro aspecto concreto, el envase estéril que comprende las células, tejidos u órganos puede estar colocado en una cámara de incubación con una atmósfera controlada que permite crear una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica.

Según un segundo aspecto, el kit puede comprender un envase estéril destinado a recibir las células, tejidos u órganos y el medio de conservación celular que comprende una atmósfera hipóxica y/o hipercápnica. Optativamente, este envase estéril puede venir lleno del medio de conservación celular.

El kit tal como el descrito en la presente memoria puede comprender además un segundo envase que permite garantizar el mantenimiento del primer envase y/o de las células, tejidos u órganos a una temperatura controlada.

Este segundo envase permite mantener las células, tejidos u órganos en hipotermia moderada, preferiblemente justo después de la extracción. A continuación, este mismo envase se puede utilizar para colocar las células, tejidos u órganos en hipotermia intensa. Como alternativa, las células, tejidos u órganos se pueden cambiar de envase cuando se van a colocar en hipotermia intensa.

El medio de conservación celular puede ser cualquier medio de conservación, tal como el descrito más adelante, y adaptado a las células, tejidos u órganos a conservar.

El kit tal como el descrito en la presente memoria está particularmente adaptado al transporte y a la conservación de las células, tejidos u órganos desde el donante hasta el receptor en el ámbito de un trasplante.

Optativamente, el kit puede igualmente comprender otros envases, tales como un envase destinado a recibir la muestra de sangre del donante para la determinación del grupo sanguíneo, o un envase destinado a recibir una muestra de bazo o de ganglios para la tipificación del HLA.

La presente invención se refiere igualmente a la utilización de un kit, tal como el descrito más arriba, para poner en práctica el procedimiento según la invención.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Células CD34+ de sangre de la placenta

### Material y métodos

Después de su aislamiento mediante el sistema inmunomagnético, las células CD34+ se han incubado durante una noche en un cultivo a 37 °C en el medio HP01 (Macopharma) en presencia del factor de células madre SCF (100 ng/ml), trombopoyetina (20 ng/ml) e IL 3 (1 ng/ml) a una concentración de aproximadamente 10<sup>5</sup> células por mililitro. Este medio garantiza la supervivencia de las células CD34+ sin estimular su proliferación. Este cultivo se ha repartido en 8 frascos impermeables al gas (2 por condición atmosférica: i) aire (21 % de O<sub>2</sub>, 0,01 % de CO<sub>2</sub>), ii) hipoxia/hipercapnia —HH— (9 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub>), iii) hipoxia (5 % de O<sub>2</sub>, 0,001 % de CO<sub>2</sub>), iv) hipercapnia (20 % de O<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>). Todos los frascos se colocan 1 noche (aproximadamente 16 h) a 37 °C, a continuación 1 h en una atmósfera modificada siguiendo las condiciones anteriores a 37 °C. Se coloca un frasco por condición directamente a +4 °C durante 13 días y el otro frasco a 30 °C durante 2 días, luego a +4 °C durante 11 días (13 días en total). Al final de este periodo, se han atemperado las células a 37 °C durante 2 h y se han evaluado en términos de viabilidad/apoptosis mediante el análisis de expresión de la anexina V y de la fijación del yoduro de propidio, así como mediante la prueba funcional de capacidad de formación de colonias en cultivo semisólido (Duchez et al., 2013).

### Resultados

En la figura 1 se muestra el rendimiento de las células viables y no afectadas por la apoptosis. Los resultados presentados en esta figura demuestran que la colocación directa en hipotermia intensa a +4 °C y la conservación de las células durante 13 días al aire conduce a la pérdida de todas las células viables.

Si, por el contrario, las suspensiones se han transferido directamente a +4 °C en atmósfera de hipoxia/hipercapnia después de 13 días, sobrevivieron aproximadamente el 10% de las células. Este efecto positivo de hipoxia/hipercapnia se multiplica por 4 si las células se incuban antes durante 2 días en hipotermia moderada (30 °C).

La hipoxia sola asociada a una incubación previa a 30 °C mejora la supervivencia celular de forma moderada, mientras que no tiene ningún efecto positivo sin esta incubación previa.

La hipercapnia sola resulta beneficiosa con o sin incubación previa, pero el efecto con incubación previa en hipotermia

moderada es 6 veces superior.

Se obtienen resultados muy similares para las células progenitoras clonogénicas en las condiciones estudiadas (figura 2). Estos datos demuestran pues con claridad que la asociación de hipercapnia y de hipoxia con una incubación previa en hipotermia moderada mejora de manera espectacular la supervivencia de las células CD34+, así como de las células progenitoras clonogénicas de sangre de la placenta. El periodo observado (13 días) es muy largo y el nivel de supervivencia de las células y de las progenitoras (del 40 al 65 %) excede cualquier expectativa.

#### Ejemplo 2: Células mesenquimatosas

##### Material y métodos

En este ejemplo, y con el fin de la mayor claridad posible, solo se han considerado las células mesenquimatosas (CM) capaces de formar colonias de células fibroblastoides adherentes (CFU-F).

Las células mesenquimatosas producidas a partir de la médula ósea humana (células retenidas en los filtros utilizados para la filtración de la médula ósea antes del injerto) congeladas con anterioridad se han descongelado y se han puesto en cultivo ( $\alpha$  MEM, 10 % de SVF,  $\beta$  FGF (1 ng/ml), L-glutamina (2 mM), 0,5 % de penicilina-estreptomicina) a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub> en 9 frascos, y se han amplificado hasta la confluencia. A continuación, los frascos se han aireado a 37 °C de la siguiente forma: i) aire (21 % de O<sub>2</sub>, 0,01 % de CO<sub>2</sub>), ii) hipoxia/hipercapnia —HH— (9 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub>), iii) hipoxia (5 % de O<sub>2</sub>, 0,001 % de CO<sub>2</sub>), iv) hipercapnia (20 % de O<sub>2</sub> y 20 % de CO<sub>2</sub>) (dos frascos por condición; en donde el 9.º frasco se ha utilizado para el análisis de viabilidad/apoptosis y para la prueba clonogénica antes de la conservación en hipotermia). Para cada condición, el primer frasco se ha colocado directamente a +4 °C y se ha conservado durante 5 días a 4 °C, y el segundo se ha mantenido durante 48 h a 30 °C, y a continuación durante 3 días a 4 °C. Al cabo de 5 días, se han atemperado las células durante 2 h a 37 °C y se les ha analizado la viabilidad/apoptosis y la capacidad clonogénica para los cultivos de CFU-F (véase el ejemplo 1).

##### Resultados

Tal y como se demuestra en la figura 3, un periodo de 48 h en hipotermia moderada mejora drásticamente la supervivencia de las células mesenquimatosas, incluso al aire, donde la totalidad de las células ha muerto si se han incubado a +4 °C durante 5 días.

La hipoxia/hipercapnia mejora la supervivencia de las CM que se han colocado directamente a +4 °C, y este efecto se ha multiplicado por 3 mediante un pase a 30 °C.

Con un pase en hipotermia moderada, la hipoxia y la hipercapnia, cada una por separado, garantizan un mantenimiento máximo de las CM (en torno al 70 %). Se obtienen resultados muy similares para las células madre multipotentes (CFU-F) (figura 4).

#### Ejemplo 3: Células de la línea FDCPmix

##### Material y métodos

Las células FDCPmix se han amplificado a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> en el medio RPMI complementado con suero de caballo al 20 % y el medio acondicionado WEHI (fuente de interleucina 3) al 8 %. A continuación, las células se han repartido en dos frascos por condición en las condiciones siguientes: i) aire (21 % de O<sub>2</sub>, 0,01 % de CO<sub>2</sub>), ii) hipoxia/hipercapnia —HH— (9 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub>), iii) hipoxia (5 % de O<sub>2</sub>, 0,001 % de CO<sub>2</sub>), iv) hipercapnia (20 % de O<sub>2</sub> y 20% de CO<sub>2</sub>). El protocolo siguiente es el mismo que para las células mesenquimatosas del ejemplo 2.

##### Resultados

El mantenimiento de las células FDCPmix es mediocre al aire y en hipoxia/hipercapnia sin ningún pase en hipotermia moderada (directamente a +4 °C).

En cambio, la combinación hipoxia/hipercapnia o hipercapnia sola con el pase en hipotermia moderada da un muy buen mantenimiento, de aproximadamente el 60 % de las células FDCPmix (figura 5).



Referencias bibliográficas

- Chung et al. Cell Stem Cell. 2008 Feb 7 ; 2(2) : 113-7  
Duchez et al. Transfusion. 2013 Sep;53(9):2012-9.  
Hechler et al. Ann Hematol, 1996 ; 72 :303-6  
Ivanovic et al. Transfusion. 2010 Jan;50(1):120-7.  
Jeanne et al. Transfusion. 2009 Aug;49(8):1738-46  
Nakagawa et al. Nat Biotechnol. 2008 Jan;26(1):101-6.  
Schwartz et al. J Clin Invest. 2002 May;109(10):1291-302.  
Takahashi, et al. 2007. Cell 131 (5): 861–872  
Vlaski et al. J Cell Physiol. 2014, 229 :2153-2165  
Yu et al., 2007. Science 318 (5858): 1917–1920

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de conservación de las células animales, preferiblemente de células humanas, en hipotermia intensa, que comprende una etapa que consiste en mantener dichas células en hipotermia moderada a una temperatura comprendida entre 20 °C y 35 °C y en una atmósfera hipóxica que comprende del 0,5 % al 10 % de dióxigeno, y/o una atmósfera hipercápnic que comprende del 5 % al 20 % de dióxido de carbono, durante 12 a 72 h, antes de conservarlas en hipotermia intensa a una temperatura superior a 0 °C e inferior a 15 °C.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células se conservan en hipotermia intensa a una temperatura comprendida entre 1 °C y 12 °C, preferiblemente a 4 °C.
- 10 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se mantienen en hipotermia moderada a una temperatura comprendida entre 25 °C y 32 °C.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se mantienen en hipotermia moderada a una temperatura comprendida entre 27 °C y 32 °C.
- 15 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se mantienen en hipotermia moderada y en una atmósfera hipóxica y/o hipercápnic durante 24 a 60 h, preferiblemente durante 36 a 60 h.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se conservan en hipotermia intensa durante más de 24 h.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se conservan en hipotermia intensa durante 1 a 15 días.
- 20 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la atmósfera hipóxica comprende entre el 1 y el 5 % de dióxigeno.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la atmósfera hipercápnic comprende entre el 9 y el 20 % de dióxido de carbono.
- 25 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se mantienen en hipotermia moderada y en una atmósfera hipóxica e hipercápnic.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células son células de piel, de cartílago, osteocitos, células endoteliales, células musculares, células neurales, células retinianas, células pancreáticas, células sanguíneas, o células madre o progenitoras capaces de diferenciarse en estas células.
- 30 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se organizan en tejido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en la piel, la córnea, un tendón, un tejido óseo, un vaso sanguíneo, un nervio, una válvula cardíaca, una membrana amniótica, un tejido cartilaginoso, un islote de Langerhans y un tejido muscular, o se organizan en órgano completo o trozo de órgano, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en riñón, hígado, corazón, cordón umbilical, placenta, intestino, pulmón y páncreas.
- 35 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células son células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas o una combinación de las mismas, preferiblemente células madre hematopoyéticas.
- 40 14. Utilización de un kit para conservar las células animales según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho kit comprende un medio de conservación celular, un primer envase estéril destinado a recibir las células, tejidos u órganos y el medio de conservación celular, y un dispositivo que permite crear una atmósfera hipóxica y/o hipercápnic en el primer envase que comprende las células, tejidos u órganos, y opcionalmente un segundo envase que permite garantizar el mantenimiento del primer envase y/o de las células, tejidos u órganos a una temperatura controlada.
15. Utilización según la reivindicación 14, en donde dicho kit comprende un envase estéril destinado a recibir las células, tejidos u órganos y el medio de conservación celular que comprende una atmósfera hipóxica y/o hipercápnic, en donde dicho envase estéril puede venir optativamente lleno con el medio de conservación celular.

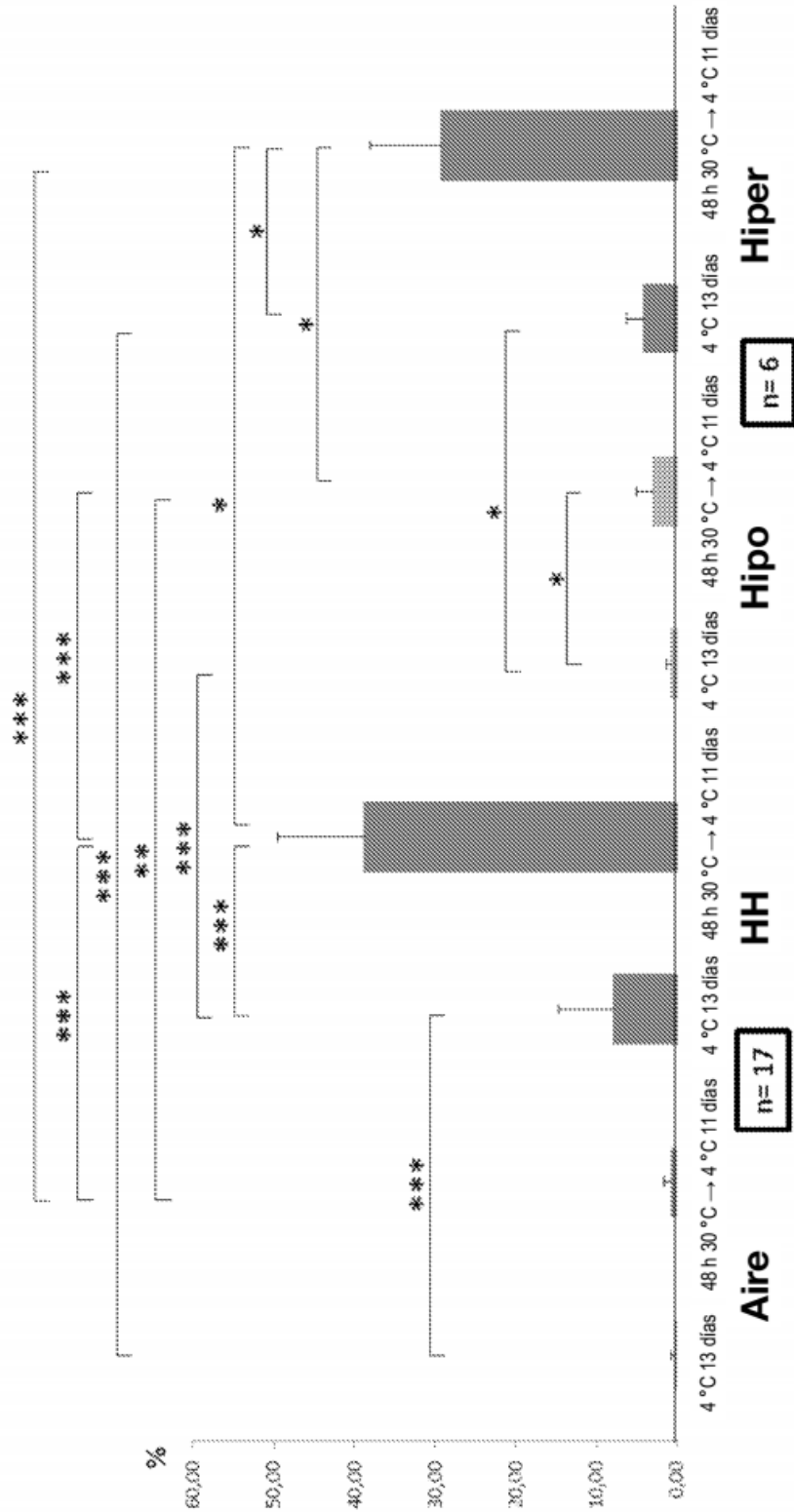


Figura 1

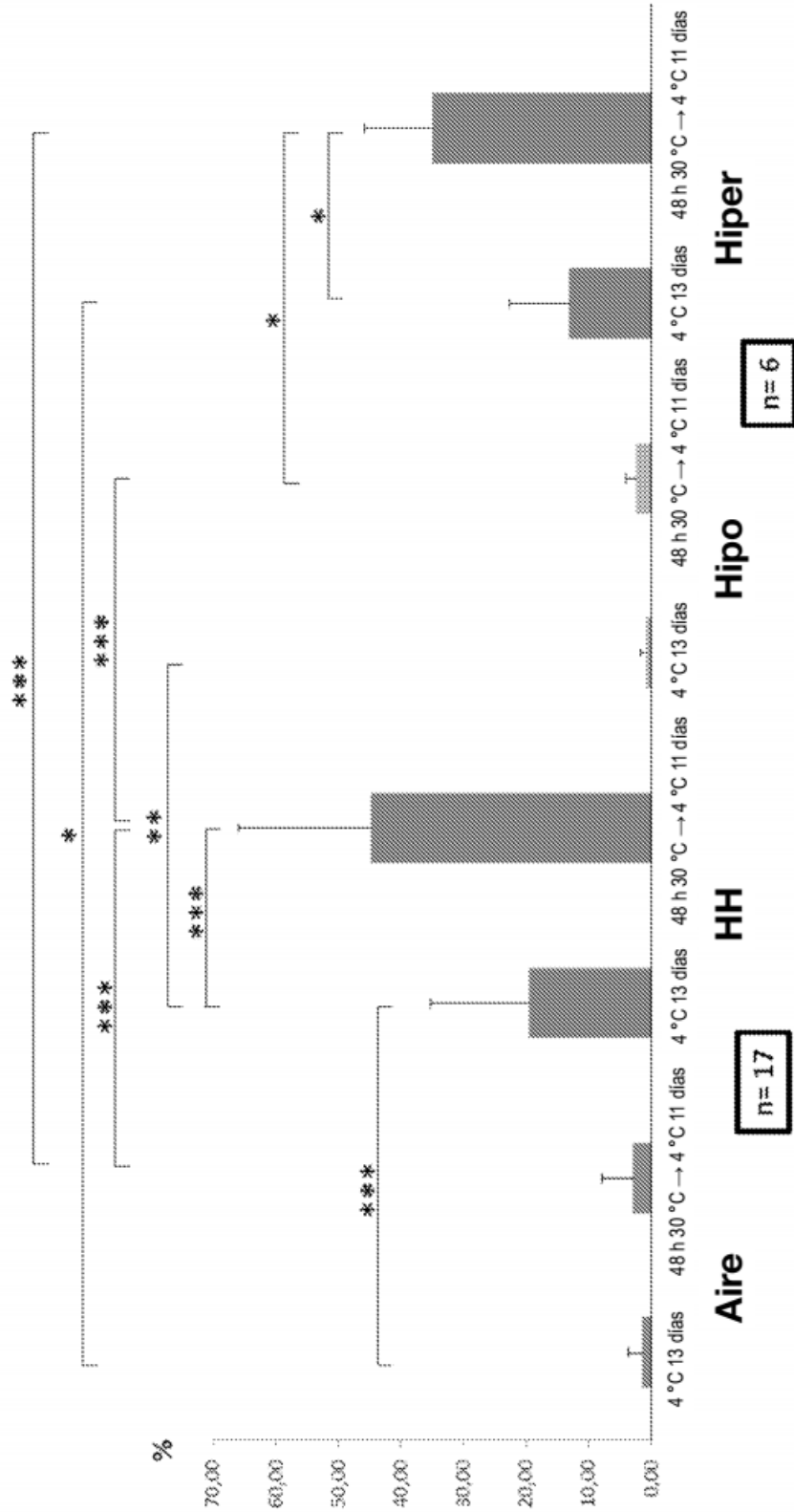


Figura 2

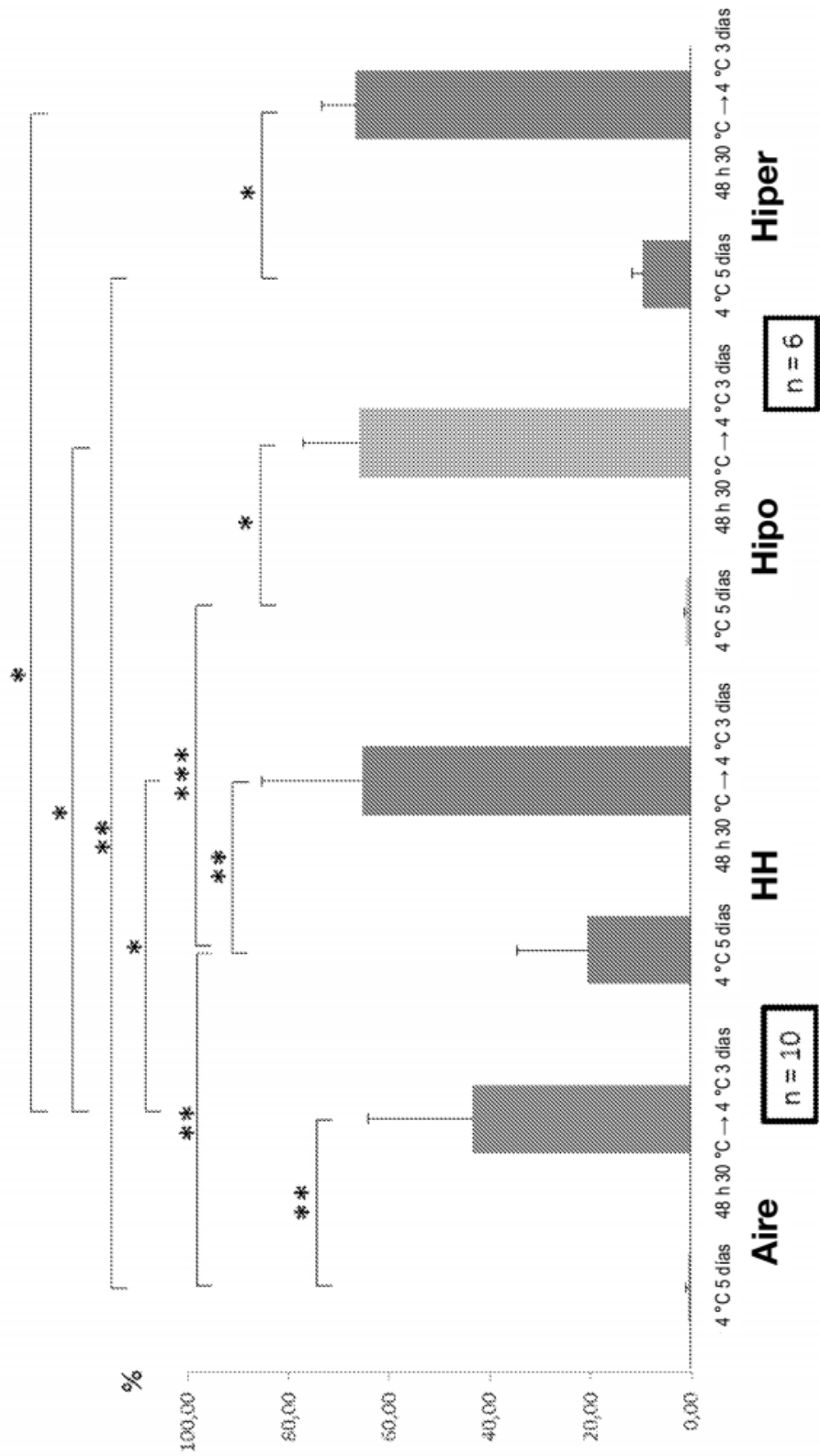


Figura 3

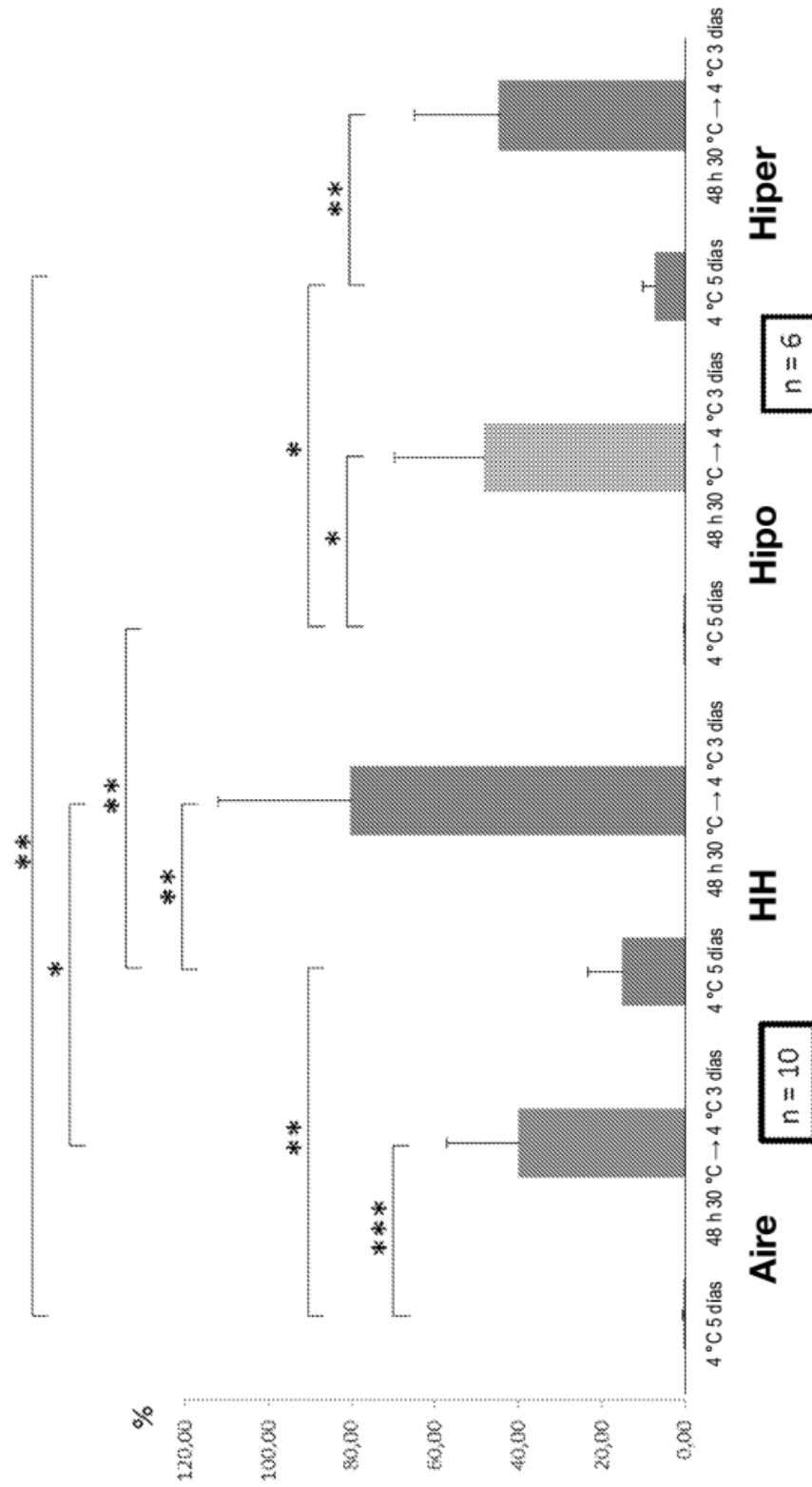


Figura 4

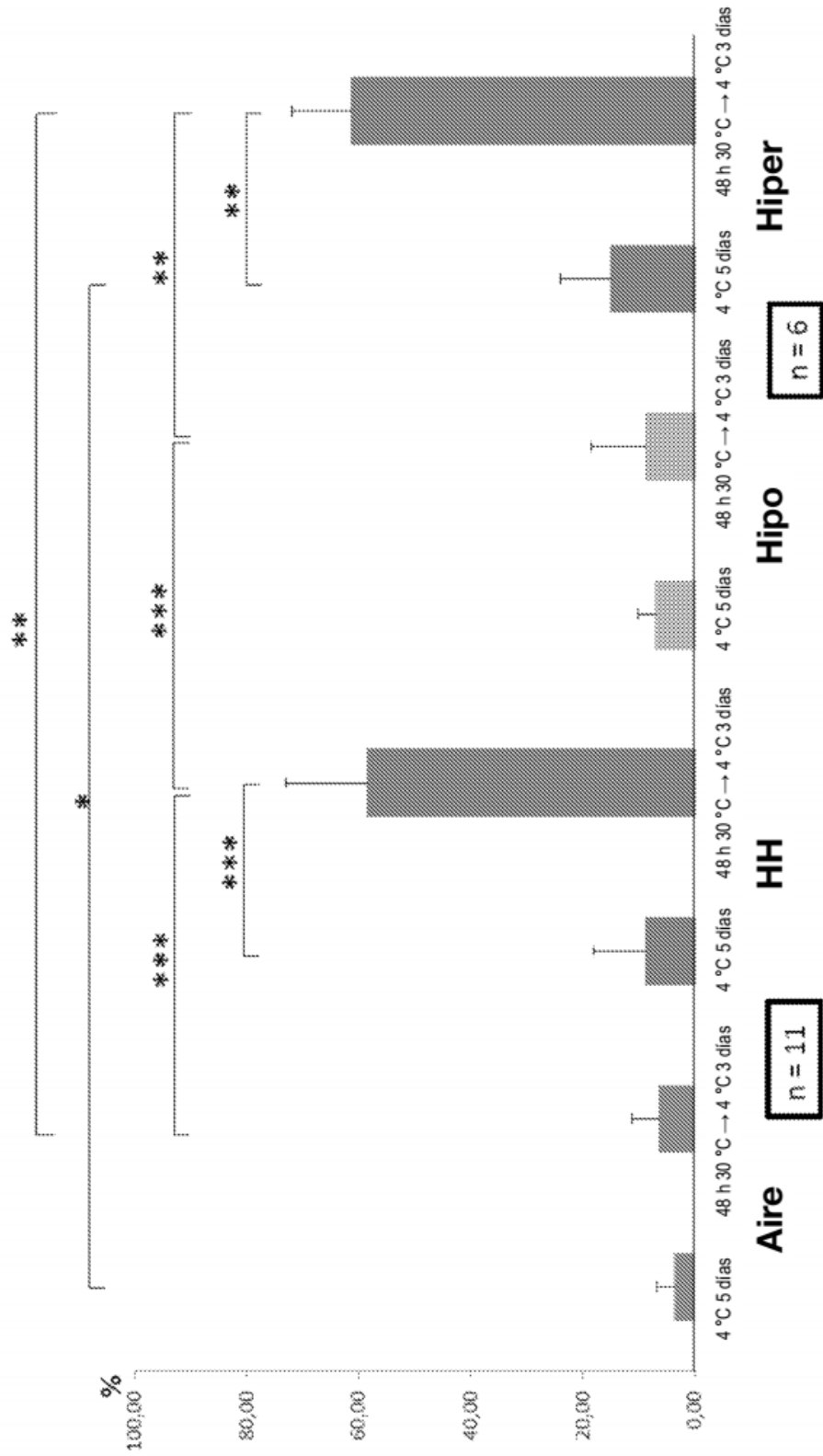


Figura 5