



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 250 220**

⑤① Int. Cl. 7: **A61F 2/02**
A61K 35/12
A61L 27/36

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **00984310 .3**

⑧⑥ Fecha de presentación : **14.12.2000**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1244396**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.2002**

⑤④ Título: **Métodos para la descelularización de un órgano.**

③⑩ Prioridad: **29.12.1999 US 474678**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2006

⑦③ Titular/es:
CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
300 Longwood Avenue
Boston, Massachusetts 02115, US

⑦② Inventor/es: **Atala, Anthony**

⑦④ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 250 220 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

Métodos para la descelularización de un órgano.

Antecedentes de la invención

El campo técnico de la presente invención se refiere a procedimientos para descelularizar un órgano aislado o parte del mismo mediante la agitación mecánica del órgano aislado con un fluido que elimina la membrana celular que rodea al órgano aislado y con un fluido que solubiliza los componentes citoplasmático y nuclear del órgano aislado.

Las técnicas para restaurar la estructura y función de órganos o tejidos dañados se utilizan rutinariamente en el campo de la cirugía reconstructiva. Por ejemplo, materiales artificiales para sustituir extremidades y dientes (ver, por ejemplo, Paul, *J. Biomech.* 32:381-393, 1999; Fletchall *et al.*, *J. Burn Care Rehabil.* 13:584-586, 1992 y Wilson *et al.*, *Artif. Limbs* 14:53-56, 1970).

El trasplante de tejidos es otra manera de restaurar la función mediante la sustitución del órgano dañado y que ha salvado muchas vidas. Sin embargo, existen problemas cuando se transfiere material biológico de un individuo a otro. El rechazo de órganos es un riesgo significativo asociado con el trasplante, incluso con buena histocompatibilidad. Los fármacos inmunosupresores tales como la ciclosporina y el FK506 habitualmente se administran al paciente para evitar el rechazo. Sin embargo, estos fármacos inmunosupresores presentan una ventana terapéutica estrecha entre el nivel adecuado de inmunosupresión y la toxicidad. Una inmunosupresión prolongada puede debilitar el sistema inmunológico, conduciendo a una amenaza infecciosa. En algunos casos incluso la inmunosupresión no resulta suficiente para evitar el rechazo de órganos. Otro problema importante del trasplante es la disponibilidad de órganos de donantes. Sólo en los Estados Unidos existen aproximadamente 50.000 personas en las listas de espera para trasplante, muchas de las cuales morirán antes de que se disponga de un órgano para ellas.

Debido a estas restricciones, se está investigando la tecnología de producción de órganos artificiales *in vitro* para el trasplante *in vivo*. Los órganos artificiales están constituidos típicamente por células vivas cultivadas en una matriz o andamiaje realizado en material natural o artificial. Estos órganos artificiales evitan los problemas asociados con el rechazo o la destrucción del órgano, especialmente si las propias células de tejido del sujeto se utilizan para la reconstrucción del órgano artificial. Estos órganos artificiales también evitan el problema de no disponer de suficientes órganos de donante debido a que cualquier número requerido de órganos puede reconstruirse *in vitro*.

Vacanti *et al.* han dado a conocer procedimientos para cultivar células en un andamiaje tridimensional de andamiaje polímero-células realizado en un polímero biodegradable. Las células del órgano se cultivan dentro del andamiaje de polímero para las células, que se implanta en el paciente. Se propone la utilización de implantes realizados en materiales reabsorbibles para su utilización como trasplantes temporales, con preferencia a un trasplante permanente. El objetivo del trasplante temporal es permitir que tenga lugar el proceso de cicatrización para sustituir el material resorbido. Naughton *et al.* dan a conocer un sistema tridimensional de cultivo de tejidos en el que se depo-

sitan células estromales sobre un sistema de soporte de polímero (ver la patente US nº 5.863.531).

Sin embargo, los procedimientos indicados anteriormente se basan en conformar el andamiaje de soporte en la configuración deseada del órgano. La conformación de la matriz de andamiaje implica uno de entre muchos procedimientos, tales como la evaporación de solvente, la compresión, el moldeo y el lixiviado. Estas técnicas no siempre resultan en un andamiaje en forma de matriz con el mismo tamaño que el órgano nativo *in vivo* que requiere ser sustituido. Resulta esencial que la configuración tridimensional sea correcta, de manera que el órgano reconstruido funcione correctamente *in vivo*. No sólo se requiere que la forma encaje en la cavidad del cuerpo sino que su forma también produzca el microambiente necesario para que las células cultivadas se unan, proliferen, se diferencien y en algunos casos, migren a través de la matriz de andamiaje. Estos requisitos críticos pueden cumplirse mediante la selección de un material apropiado para el andamiaje y también a través de las técnicas de procesamiento. Se produce un crecimiento y desarrollo celular óptimos cuando la estructura intersticial del microambiente se asemeja a la estructura intersticial de un órgano natural.

El procedimiento de conformación puede presentar efectos perjudiciales sobre las propiedades mecánicas del andamiaje y en muchos casos producir andamiajes con geometrías tridimensionales irregulares. Además, muchas técnicas de conformación presentan limitaciones que evitan su utilización para una amplia diversidad de materiales poliméricos. Por ejemplo, el ácido poli L-láctico (PLLA) disuelto en cloruro de metileno y moldeado sobre la malla de fibras de ácido poliglicólico (PGA) resulta adecuado para el PGA, sin embargo la selección de solventes y las temperaturas de fundido relativas de otros polímeros restringen la utilización de esta técnica a otros polímeros. Otro ejemplo se refiere a la evaporación de solvente, que se utiliza para polímeros que son solubles en un disolvente tal como el cloroformo. La técnica utiliza varias partículas de sal que se dispersan en una solución de PLLA/cloroformo y se moldean en un recipiente de vidrio. Las partículas de sal utilizadas son insolubles en el cloroformo. El solvente se deja evaporar y las cantidades residuales del mismo son eliminadas mediante secado al vacío. Las desventajas de esta técnica es que únicamente puede utilizarse para producir películas o membranas delgadas de hasta 2 mm de grosor. Con esta técnica no se puede construir un andamiaje tridimensional.

Debido a las limitaciones de las técnicas de conformación y debido a la importancia de que el andamiaje presente la forma tridimensional correcta, existe la necesidad de producir un órgano descelularizado con la misma estructura intersticial tridimensional, forma y tamaño que el órgano nativo. La reconstrucción de un órgano artificial utilizando un órgano descelularizado producirá un órgano artificial que funciona tan bien como un órgano nativo debido a que conserva la misma forma, tamaño y estructura intersticial que permite que las células depositadas asuman una morfología y estructura comparables a las del órgano nativo.

Sumario de la invención

En general la invención se refiere a procedimientos para producir órganos descelularizados utilizando un órgano aislado o parte del mismo y una serie de

extracciones que eliminan la membrana celular que rodea el órgano o parte del órgano y los componentes citoplasmáticos y nucleares del órgano aislado o de parte del mismo.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto la invención proporciona un procedimiento para producir un órgano descelularizado, que comprende:

agitar mecánicamente un órgano aislado con el fin de romper las membranas celulares sin destruir la estructura intersticial del órgano,

tratar el órgano aislado en un fluido de solubilización a una concentración efectiva para extraer el material celular del órgano sin disolver la estructura intersticial del mismo, y

lavar el órgano aislado en un fluido de lavado para eliminar los residuos celulares sin eliminar la estructura intersticial del órgano hasta que el órgano aislado se encuentre sustancialmente libre de material celular, con el fin de producir de esta manera un órgano descelularizado.

El procedimiento puede comprender adicionalmente la equilibración del órgano descelularizado en un fluido de equilibración. El fluido de equilibración puede seleccionarse de entre el grupo constituido por agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo. El procedimiento puede comprender adicionalmente el secado del órgano descelularizado. El órgano descelularizado seco puede almacenarse a temperatura adecuada o equilibrarse en un tampón fisiológico previamente a su utilización.

En una forma de realización, la etapa de agitar mecánicamente el órgano aislado comprende adicionalmente la introducción del órgano aislado en un recipiente de agitación que presente una pala que gire a una velocidad comprendida entre aproximadamente 50 revoluciones por minuto (r.p.m.) y aproximadamente 150 r.p.m.

En una forma de realización, la etapa de agitación mecánica del órgano aislado se lleva a cabo en un fluido seleccionado de entre el grupo consistente en agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo.

En una forma de realización, la etapa de tratamiento del órgano aislado en el fluido de solubilización también se lleva a cabo en un recipiente de agitación. En una forma de realización preferida, el fluido de solubilización es una solución alcalina que incluye un detergente. En una forma de realización más preferida, la solución alcalina se selecciona de entre el grupo consistente en sulfatos, acetatos, carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, y se selecciona el detergente de entre el grupo consistente en Tritón X-100, Tritón N-101, Tritón X-114, Tritón X-405, Tritón X-705 y Tritón DF-16, monolaurato (Tween 20), monopalmitato (Tween 40), monooleato (Tween 80), polioxietilén-23-lauril éter (Brij 35), polioxietilén éter W-1 (Polyox), colato sódico, desoxicolatos, CHAPS, saponina, n-decil β -D-glucopiranosido, n-heptil β -D-glucopiranosido, n-octil α -D-glucopiranosido y Nonidet P-40. En la forma de realización más preferida, la solución de solubilización es una solución de hidróxido amónico que incluye Tritón X-100.

En una forma de realización, la etapa de lavado del órgano aislado también se lleva a cabo en un recipiente de agitación. El fluido de lavado puede seleccionarse de entre el grupo consistente en agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo.

En otro aspecto, la invención incluye un procedimiento para producir un riñón descelularizado, que

comprende:

agitar mecánicamente un riñón aislado en agua destilada para romper las membranas celulares sin destruir la estructura intersticial del riñón,

tratar el riñón aislado en una solución alcalina que incluye un detergente a una concentración efectiva para extraer el material celular sin disolver la estructura intersticial del riñón,

lavar el riñón aislado en agua destilada con el fin de eliminar los residuos celulares sin eliminar la estructura intersticial del riñón hasta que éste se encuentre sustancialmente libre de material celular, para producir de esta manera un riñón descelularizado.

En una forma de realización preferente, el procedimiento comprende además equilibrar el riñón descelularizado en una solución tamponada con fosfato. En otra forma de realización, el procedimiento comprende adicionalmente el secado del riñón descelularizado. Las formas de realización para agitar mecánicamente un órgano descelularizado se han descrito anteriormente y se reiteran a continuación. En otra forma de realización preferente, la etapa de lavado comprende además el centrifugado del riñón aislado en agua destilada dentro de un recipiente de agitación.

Descripción detallada

Con el fin de que la invención se entienda más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos de la manera siguiente:

El término "órgano descelularizado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un órgano o parte del mismo del que se ha eliminado la totalidad del contenido celular y de tejidos, dejando una compleja estructura intersticial. Los órganos están compuestos de diversos tejidos especializados. Las estructuras de tejido especializado de un órgano son el tejido del parénquima y proporcionan la función específica asociada con el órgano. La mayoría de órganos también presentan un armazón compuesto de tejido conectivo no especializado que da soporte al tejido del parénquima. El procedimiento de descelularización elimina el tejido del parénquima, dejando la estructura intersticial tridimensional de tejido conectivo, compuesta principalmente de colágeno. La estructura intersticial presenta la misma forma y tamaño que el órgano nativo, proporcionando el armazón de soporte que permite que las células se unan y crezcan sobre el mismo. Los órganos descelularizados pueden ser rígidos o semirrígidos, presentando la capacidad de alterar su forma. Entre los ejemplos de órganos descelularizados se incluyen, pero sin limitarse a ellos, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, vejiga, uréter y uretra.

El término "órgano aislado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un órgano que ha sido extirpado de un mamífero. Entre los mamíferos adecuados se incluyen el ser humano, primates, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, cabras y ovejas. El término "órgano aislado" también incluye un órgano extirpado de un sujeto que necesita un órgano reconstruido artificial. Los órganos adecuados pueden ser cualquier órgano o parte de órgano requerido para el trasplante en un sujeto. Entre los ejemplos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, corazón, riñón, hígado, páncreas, bazo, uréter y uretra.

La presente invención proporciona procedimientos para descelularizar órganos. La descelularización de órganos comprende eliminar los componentes nucleares y celulares de un órgano aislado o parte de un

órgano, dejando una estructura intersticial que presenta el mismo tamaño y forma de un órgano nativo.

En las subsecciones siguientes se describen en más detalle diversos aspectos de la invención:

I. *Aislamiento de órganos naturales*

Un órgano o parte de un órgano puede aislarse del sujeto que requiere un órgano reconstruido artificial. Por ejemplo, puede extirparse un órgano enfermo de un sujeto y descelularizarlo, con la condición de que la enfermedad afecte al tejido del parénquima del órgano, pero que no perjudique al tejido conectivo, por ejemplo por necrosis del tejido. El órgano enfermo puede extirparse del sujeto y descelularizarse tal como se indica en el Ejemplo 1 y en la Sección II intersticial. El órgano descelularizado, o parte del órgano, puede utilizarse como andamiaje tridimensional para reconstruir un órgano artificial. Puede reconstruirse un órgano artificial alogénico utilizando el propio órgano descelularizado del sujeto como andamiaje y utilizar una población de células derivadas del propio tejido del sujeto. Por ejemplo, poblaciones de células derivadas de la piel, hígado, páncreas, arterias, venas, cordón umbilical y tejidos placentarios del sujeto.

Puede reconstruirse un órgano artificial xenogénico utilizando el propio órgano descelularizado del sujeto como andamiaje, y utilizando poblaciones de células derivadas de una especie de mamífero diferente del sujeto. Por ejemplo, pueden derivarse diferentes poblaciones de células a partir de mamíferos tales como primates, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, cabras y ovejas.

También puede derivarse un órgano, o parte de un órgano, de un cadáver humano, o de especies de mamífero diferentes del sujeto, tales como órganos procedentes de primates, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, cabras y ovejas. Los procedimientos estándar para el aislamiento de un órgano diana son bien conocidos por el experto en la materia y pueden utilizarse para aislar el órgano.

II. *Descelularización de órganos*

Puede descelularizarse un órgano aislado o parte del mismo mediante la eliminación de la totalidad del material celular (por ejemplo los componentes citoplasmático y nuclear) del órgano, tal como se indica en el Ejemplo 1. El procedimiento de descelularización comprende una serie de extracciones secuenciales. Una característica clave de este procedimiento de extracción es que se evita la extracción dura, que podría perturbar o destruir la compleja estructura intersticial de la bioestructura. La primera etapa implica la eliminación de los residuos celulares y membranas celulares que rodean el órgano aislado o parte del mismo. A continuación, se solubilizan los componentes citoplasmático y nuclear del órgano aislado o de parte del mismo utilizando un fluido de solubilización, dejando una estructura intersticial tridimensional.

El órgano puede descelularizarse eliminando la membrana celular que rodea el órgano utilizando procedimientos de agitación mecánica. Los procedimientos de agitación mecánica deben resultar suficientes para alterar la membrana celular. Sin embargo, los procedimientos de agitación mecánica no deben dañar o destruir la estructura intersticial tridimensional del órgano aislado.

En una forma de realización, el procedimiento de agitación mecánica implica la utilización de una placa de agitación mecánica y una pala, por ejemplo un agitador magnético. El órgano aislado, o parte del mis-

mo, se introduce en un recipiente con un volumen adecuado de fluido y se agita en la placa de agitación magnética a una velocidad adecuada. La velocidad adecuada para agitar el órgano aislado dependerá del tamaño de éste. Por ejemplo, una velocidad de rotación comprendida entre aproximadamente 50 revoluciones por minuto (r.p.m.) y aproximadamente 150 r.p.m. Un órgano de grandes dimensiones requerirá una velocidad más rápida en comparación con un órgano más pequeño. El volumen de fluido en el que se introduzca el órgano aislado también dependerá del tamaño del órgano aislado. Los fluidos que resultan adecuados dependen de la capa del órgano que se extirpa y se describen en más detalle en la sección Intersticial.

En otra forma de realización, el procedimiento de agitación mecánica implica utilizar un agitador rotatorio mecánico. El órgano o parte de éste se introduce en un recipiente sellado con un volumen adecuado de fluido. El recipiente se coloca sobre la plataforma del agitador rotatorio y se hace girar 360°. La velocidad de rotación y el volumen de fluido dependerán del tamaño del órgano aislado.

En otra forma de realización, el procedimiento de agitación mecánica implica utilizar un rodillo de perfil bajo. El órgano o parte del mismo se introducen en un recipiente sellado con un volumen adecuado de fluido. El recipiente se coloca sobre la plataforma del rodillo y se lamina a una velocidad seleccionada en un volumen adecuado de fluido dependiendo del tamaño del órgano. Un experto en la materia apreciará que estos dispositivos de agitación mecánica pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo en Sigma Co.

En otras formas de realización, la agitación también puede incluir la colocación del órgano aislado en un recipiente cerrado, por ejemplo en una bolsa de polietileno autosellante o en un vaso de plástico. El recipiente puede introducirse en un baño de agua con sonicación y exponerse a procedimientos de sonicación que incluyen, pero sin limitarse a ellos, cuernos acústicos, cristales piezoeléctricos o cualquier otro procedimiento para producir ondas sónicas estables, por ejemplo con sondas de sonicación. La sonicación debe llevarse a cabo a una frecuencia que elimine selectivamente las membranas celulares y/o material celular sin destruir la estructura intersticial. Las frecuencias de sonicación que resulten adecuadas dependerán del tamaño y tipo de órgano aislado que se descelulariza. Las frecuencias de sonicación típicas se encuentran comprendidas entre 40 kHz y 50 kHz. Sin embargo, es previsible que un intervalo amplio de frecuencias, desde las subauditivas hasta las ultrasónicas (entre aproximadamente 7 Hz y 40 MHz, preferentemente entre 7 Hz y 20 MHz), proporcionen una disociación incrementada sónicamente de los tejidos. Las variaciones en el tipo de sonicación también se contemplan en la invención e incluyen la sonicación pulsante frente a la continua. Los niveles de potencia de la fuente de sonicación se encuentran comprendidos entre 10^{-4} y aproximadamente 10 vatios/cm² (ver Biological Effects of Ultrasound: Mechanisms and Clinical Implications, National Council on Radiation Protection and Measurements (NCRP) Report n° 74, NCRP Scientific Committee n° 66: Wesley L. Nyborg, presidente; 1983; NCRP, Bethesda, Md).

El procedimiento de descelularización requiere la eliminación secuencial de componentes del órgano aislado o de parte del mismo. La primera etapa im-

plica agitar mecánicamente el órgano aislado o parte del mismo hasta que la membrana celular que rodea el órgano se rompa y se hayan eliminado los residuos celulares alrededor del órgano. Esta etapa puede implicar la utilización de un fluido para eliminar membranas que sea capaz de eliminar las membranas celulares que rodean al órgano aislado o parte del mismo. Entre los ejemplos de fluido para eliminar membranas se incluyen, pero sin limitarse a ellos, agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo. Entre los tampones adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina, MOPS, HEPES, solución salina equilibrada de Hank y similares. Entre los medios de cultivo celular adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, RPMI 1640, medio de Fisher, medio de Iscove, medio de McCoy, medio de Dulbecco y similares. El fluido para eliminar membranas debe ser capaz de eliminar la membrana celular que rodea el órgano aislado, particularmente cuando se agita mecánicamente. En una forma de realización preferente, el fluido para eliminar membranas es agua destilada.

Tras eliminar la membrana celular, la segunda etapa implica eliminar el material celular, por ejemplo las células de tejido nativas y los componentes citoplasmáticos y nucleares del órgano o de parte del mismo. El material celular puede eliminarse por ejemplo mediante agitación mecánica del órgano aislado o de parte del mismo en un fluido de solubilización. El fluido de solubilización es una solución alcalina que incluye un detergente. Durante esta etapa, el material celular del órgano aislado se solubiliza sin disolver la estructura intersticial del órgano.

El componente citoplasmático, que consiste en redes densas de filamentos citoplasmáticos, complejos intercelulares y estructuras microcelulares apicales, puede solubilizarse utilizando una solución alcalina, tal como hidróxido amónico. También puede utilizarse otra solución alcalina que consiste en sales amónicas o sus derivados para solubilizar los componentes citoesqueléticos. Entre los ejemplos de otras soluciones amónicas adecuadas se incluyen, pero sin limitarse a ellas, sulfato amónico, acetato amónico, bicarbonato amónico, carbonato amónico e hidróxido amónico. En una forma de realización preferida, se utiliza hidróxido amónico. Entre otras soluciones alcalinas también se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sulfatos, acetatos, hidróxidos y carbonatos de calcio, litio, sodio y potasio.

Puede alterarse la concentración de las soluciones alcalinas, por ejemplo de hidróxido amónico, dependiendo del tipo de órgano que se descclulariza. Por ejemplo, debe reducirse la concentración de detergente para los tejidos delicados, por ejemplo vasos sanguíneos. Los intervalos preferentes de concentración pueden encontrarse comprendidos entre aproximadamente 0,006% (p/v) y aproximadamente 1,6% (p/v). Más preferentemente, entre aproximadamente 0,0125% (p/v) y aproximadamente 0,8% (p/v). Más preferentemente entre aproximadamente 0,025% (p/v) y aproximadamente 0,04% (p/v). Más preferentemente entre aproximadamente 0,05% (p/v) y aproximadamente 0,25% (p/v). Más preferentemente, entre aproximadamente 0,05% (p/v) y aproximadamente 0,1% (p/v). Todavía más preferentemente, entre aproximadamente 0,0125% (p/v) y aproximadamente 0,1% (p/v).

Con el fin de solubilizar los componentes nuclea-

res, pueden utilizarse detergentes no iónicos o tensioactivos en una solución alcalina. Entre los ejemplos de detergentes no iónicos o tensioactivos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, la serie Tritón, disponible de Rohm y Haas de Philadelphia, Pa, que incluye Tritón X-100, Tritón N-101, Tritón X-114, Tritón X-405, Tritón X-705 y Tritón DF-16, disponibles comercialmente de muchos vendedores; la serie Tween, tal como monolaurato (Tween 20), monopalmitato (Tween 40), monooleato (Tween 80) y polioxietilén-23-lauril éter (Brij 35), polioxietilén éter W-1 (Polyox) y similares, colato sódico, desoxicolatos, CHAPS, saponina, n-decil β -D-glucopuranósido, n-heptil β -D-glucopiranósido, n-octil α -D-glucopiranósido y Nonidet P-40.

Un experto en la materia apreciará que puede obtenerse comercialmente y encontrarse una descripción de los compuestos pertenecientes a las clasificaciones anteriormente indicadas y de los vendedores en "Chemical Classification, Emulsifiers and Detergents", McCutcheon's Emulsifiers and Detergents, 1986, North American and International Editions, McCutcheon Division, MC Publishing Co., Glen Rock, N.J., U.S.A. y Judith Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem, Hoechst Celanese Corp., 1987. En una forma de realización preferente, el tensioactivo no iónico es la serie Tritón, preferentemente Tritón X-100.

La concentración del detergente no iónico puede alterarse dependiendo del tipo de órgano que se descclulariza. Por ejemplo, para los tejidos delicados, por ejemplo los vasos sanguíneos, debe reducirse la concentración del detergente. Los intervalos preferentes de concentración del detergente no iónico pueden encontrarse comprendidos entre aproximadamente 0,00625% (p/v) y aproximadamente 2,0% (p/v). Más preferentemente, entre aproximadamente 0,125% (p/v) y aproximadamente 1,0% (p/v). Todavía más preferentemente, entre aproximadamente 0,25% (p/v) y aproximadamente 0,5% (p/v). El experto en la materia apreciará que puede utilizarse cualquier combinación de solución alcalina con cualquier combinación de detergentes en los intervalos anteriormente indicados de concentración dependiendo del tamaño y tipo de órgano que se descclulariza. En otras formas de realización pueden utilizarse uno o más detergentes en una solución alcalina.

Tras solubilizar los componentes citoplasmático y nuclear del órgano aislado o parte del mismo, la etapa siguiente en la extracción secuencial implica la eliminación de los componentes solubilizados mediante la agitación mecánica del órgano aislado en un fluido de lavado. La eliminación de los componentes citoplasmático y nuclear deja una estructura tridimensional de tejido conectivo intersticial que presenta la misma forma y tamaño que el órgano nativo. Entre los ejemplos de fluido de lavado se incluyen, pero sin limitarse a ellos, agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo. Anteriormente se han indicado ejemplos de tampones y medios de cultivos que resultan adecuados. En una forma de realización preferente, el fluido de lavado es agua destilada.

Tras eliminar los componentes citoplasmático y nuclear solubilizados, la etapa siguiente de la extracción secuencial puede implicar la equilibración del órgano descclularizado en un fluido de equilibración. Entre los ejemplos de fluido de equilibración se inclu-

yen, pero sin limitarse a ellos, agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo. Anteriormente se han indicado ejemplos de tampones y medios de cultivo adecuados.

El órgano descelularizado puede secarse para su almacenamiento a largo plazo. Entre los procedimientos de secado del órgano descelularizado se incluyen el secado por congelación o la liofilización del órgano para eliminar el fluido residual. El órgano descelularizado liofilizado puede almacenarse a una temperatura adecuada hasta que se requiera su utilización. Previamente a la utilización, el órgano descelularizado puede equilibrarse en un tampón o medio fisiológico adecuado de cultivo celular. Anteriormente se han descrito ejemplos de tampones y medios de cultivo adecuados.

III. Reconstrucción de órganos artificiales utilizando órganos descelularizados

La invención proporciona un procedimiento para reconstruir un órgano artificial utilizando un órgano descelularizado como andamiaje. Este órgano descelularizado da soporte a la maduración, diferenciación y segregación *in vitro* de poblaciones de células cultivadas para formar componentes de tejidos adultos análogos a las contrapartidas que se encuentran *in vivo*.

El órgano descelularizado producido mediante el procedimiento de la invención puede utilizarse como andamiaje tridimensional para reconstruir un órgano artificial. Pueden utilizarse poblaciones celulares tanto alogénicas como xenogénicas para reconstruir el órgano artificial. Los procedimientos para el aislamiento y cultivo de células utilizadas para reconstruir un órgano artificial se discuten en Freshney, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, segunda edición, A.R. Liss, Inc., New York, 1987, capítulo 9, páginas 107-126. Las células pueden aislarse utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el tejido u órgano puede disgregarse mecánicamente y/o tratarse con enzimas digestivos y/o con agentes quelantes que debiliten las conexiones entre células vecinas, haciendo posible dispersar el tejido en una suspensión de células individuales sin niveles apreciables de rotura celular. La disociación enzimática puede conseguirse triturando el tejido y tratando el tejido triturado con cualquiera de entre varios enzimas digestivos, sea solos o en combinación. Entre éstos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, tripsina, quimotripsina, colagenasa, elastasa y/o hialuronidasa, ADNasa, pronasa y dispasa. La ruptura mecánica también puede conseguirse mediante varios procedimientos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, raspar la superficie del órgano, la utilización de trituradores, mezcladores, tamices, homogeneizadores, celdas de presión o sonicadores, entre otros.

Entre los tipos celulares preferentes se incluyen, pero sin limitarse a ellos, células renales, uroteliales, mesenquimales, especialmente células de músculo esquelético o liso, miocitos (células madre musculares), fibroblastos, condrocitos, adipocitos, fibromioblastos y células ectodérmicas, incluyendo células dúctiles y de la piel, hepatocitos, células de los islotes, células presentes en el intestino y otras células parenquimatosas, osteoblastos y otras células formadoras de hueso o cartílago.

Las células aisladas pueden cultivarse *in vitro* con el fin de incrementar el número de células disponibles para la infusión en el andamiaje tridimensional.

La utilización de células alogénicas y más preferentemente de células autólogas, resulta preferente para evitar el rechazo de tejidos. Sin embargo, si se produce una respuesta inmunológica en el sujeto tras el implante del órgano artificial reconstruido, el sujeto puede tratarse con agentes inmunosupresores tales como ciclosporina o FK506, con el fin de reducir la probabilidad de rechazo.

Resulta importante recrear, en cultivo, el microambiente celular encontrado *in vivo* para un órgano particular a reconstruir. La invención proporciona un procedimiento en el que se utiliza un órgano descelularizado como andamiaje tridimensional para reconstruir un órgano artificial. Mediante la utilización de un órgano descelularizado se conserva la estructura intersticial de tejido conectivo. Ello permite que las poblaciones de células cultivadas y perfundidas se unan al andamiaje tridimensional. La conservación de una estructura intersticial tridimensional igual al órgano *in vivo* crea el ambiente óptimo para las interacciones célula-célula y para el desarrollo y diferenciación de las poblaciones de células.

El órgano descelularizado puede pretratarse previamente a la perfusión de células endoteliales cultivadas con el fin de potenciar la unión de poblaciones de células cultivadas al órgano descelularizado. Por ejemplo, podría tratarse el órgano descelularizado con, por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares, glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo heparán sulfato, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, queratín sulfato, etc.).

Las poblaciones de células cultivadas, por ejemplo de células endoteliales, pueden perfundirse en el órgano descelularizado utilizando agujas situadas en posiciones localizadas del órgano descelularizado. Un órgano descelularizado perfundido con una población de células se denomina "órgano perfundido". Tras la perfusión de una población de células, por ejemplo de células endoteliales, debe incubarse el órgano perfundido en un medio nutritivo apropiado. Pueden resultar adecuadas para su utilización muchos medios disponibles comercialmente, tales como RPMI 1640, medio de Fisher, medio de Iscove, medio de McCoy, medio de Dulbecco y similares. Además, debe cambiarse el medio de cultivo de manera periódica con el fin de eliminar el medio utilizado, despoblar las células liberadas y añadir medio fresco. Durante el periodo de incubación, las células endoteliales crecerán en el órgano perfundido para producir una capa de tejido endotelial.

Pueden perfundirse poblaciones adicionales de células cultivadas, tal como células parenquimales, sobre la capa de tejido endotelial. Las células de parénquima perfundidas sobre el tejido endotelial pueden incubarse para permitir que las células se adhieran a la capa de tejido endotelial. Las células de parénquima pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo con el fin de permitir que las células crezcan y se desarrollen hasta que las células adquieran una morfología y estructura similares a las del tejido nativo. El crecimiento de las células del parénquima sobre la capa de tejido endotelial resulta en la diferenciación de las células del parénquima en las estructuras orgánicas neomórficas apropiadas.

Alternativamente, tras perfundir el órgano descelularizado, puede implantarse el órgano perfundido *in vivo* sin cultivar *in vitro* previamente las células del

parénquima. Las células del parénquima seleccionadas para la perfusión dependerán del órgano a reconstruir. Por ejemplo, la reconstrucción de un riñón implicará infundir células endoteliales cultivadas en un andamiaje descelularizado de riñón. El andamiaje perfundido de riñón se cultiva hasta que se desarrollan células en la capa de tejido endotelial que comprende un sistema vascular primitivo. A continuación el tejido endotelial puede perfundirse con una población de células cultivadas de riñón y el riñón perfundido, cultivarse *in vitro* hasta que las células de riñón empiecen a diferenciarse para formar estructuras de nefrón. Un experto en la materia apreciará características y ventajas adicionales de la invención a partir de las formas de realización anteriormente indicadas. De acuerdo con ello, la invención no debe limitarse a lo que se ha mostrado y descrito particularmente, excepto según lo indicado en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de un riñón descelularizado

El método siguiente describe un procedimiento para eliminar la totalidad del contenido celular de un órgano o tejido sin destruir la compleja estructura intersticial tridimensional del órgano o tejido. Se extirpó quirúrgicamente un riñón de un ratón C7 de color negro utilizando técnicas estándar para la extirpación de tejidos. Se introdujo el riñón en un frasco que contenía un volumen adecuado de agua destilado para que cubriese el riñón aislado. Se utilizó una placa de agitación magnética y un agitador magnético para centrifugar el riñón aislado en el agua destilada a una velocidad adecuada de entre aproximadamente 95 y 150 r.p.m. durante 24 a 48 horas a 4°C. Este procedimiento elimina los residuos celulares y las membranas celulares que rodean el riñón aislado.

Tras esta primera etapa de eliminación, se sustituyó el agua destilada con una solución al 0,05% de hidróxido amónico que contenía Tritón X-100 al 0,5%.

Se cultivó en rotación el riñón en esta solución durante 72 horas a 4°C utilizando una placa de agitación magnética y un agitador magnético a una velocidad comprendida entre 95 y 150 r.p.m. Esta solución alcalina solubilizó los componentes citoplasmático y nuclear del riñón aislado. Se utilizó el detergente Tritón X-100 para eliminar los componentes nucleares del riñón, mientras que se utilizó la solución de hidróxido amónico para lisar la membrana celular y las proteínas citoplasmáticas del riñón aislado.

A continuación, se lavó el riñón aislado en agua destilada durante 24 a 48 horas a 4°C utilizando una placa de agitación magnética y un agitador magnético a una velocidad comprendida entre 95 y 150 r.p.m. Tras esta etapa de lavado, se confirmó la eliminación de los componentes celulares del aislado mediante análisis histológico de un trozo pequeño del riñón. En caso necesario, el riñón aislado se trataba nuevamente con la solución de hidróxido amónico que contenía Tritón X-100 hasta eliminar totalmente el contenido celular del riñón aislado. Tras la eliminación de los componentes solubilizados, se produjo un armazón colágeno tridimensional con la forma del riñón aislado.

Dicho riñón descelularizado se equilibró con solución de tampón fosfato 1 x (PBS) mediante la rotación del riñón descelularizado durante la noche a 4°C utilizando una placa de agitación magnética y un agitador magnético. Tras la equilibración, el riñón descelularizado se liofilizó durante la noche al vacío. El riñón liofilizado se esterilizó durante 72 horas utilizando gas óxido de etileno. Tras la esterilización, el riñón descelularizado se utilizó inmediatamente o se almacenó a 4°C o a temperatura ambiente hasta su utilización. Los órganos almacenados se equilibraron en el medio de cultivo de tejido durante la noche a 4°C previamente a su inoculación con las células cultivadas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de un órgano descelularizado, que comprende las etapas siguientes:

agitar mecánicamente un órgano aislado en un fluido para eliminar membranas, seleccionado de entre el grupo constituido por agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo, romper las membranas celulares, manteniendo la estructura intersticial del órgano,

tratar el órgano aislado en un fluido de solubilización a una concentración efectiva para extraer el material celular del órgano, manteniendo la estructura intersticial del órgano, y

lavar el órgano aislado en un fluido de lavado para eliminar los residuos celulares, manteniendo la estructura intersticial del órgano hasta que el órgano aislado se encuentre sustancialmente libre de material celular, para producir de esta manera un órgano descelularizado.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además equilibrar el órgano descelularizado en un fluido de equilibración.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la etapa de equilibración comprende además equilibrar el órgano descelularizado en un fluido de equilibración seleccionado de entre el grupo constituido por agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de tratamiento del órgano aislado en el fluido de solubilización también se lleva a cabo en un recipiente de agitación.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la etapa de tratamiento comprende además utilizar un fluido de solubilización que es una solución alcalina que incluye un detergente.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de lavado comprende además el lavado del órgano aislado en un fluido de lavado seleccionado de entre el grupo constituido por agua destilada, tampón fisiológico y medio de cultivo.

7. Procedimiento para la producción de un riñón descelularizado, que comprende:

agitar mecánicamente un riñón aislado en agua destilada para romper las membranas celulares, manteniendo la estructura intersticial del riñón,

tratar el riñón aislado en una solución alcalina que incluye un detergente a una concentración efectiva pa-

ra extraer el material celular, manteniendo la estructura intersticial del riñón, y

lavar el riñón aislado en agua destilada con el fin de eliminar los residuos celulares manteniendo la estructura intersticial del riñón hasta que éste se encuentre sustancialmente libre de material celular, para producir de esta manera un riñón descelularizado.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende además la equilibración del riñón descelularizado en un solución tamponada con fosfato.

9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa de tratamiento se lleva a cabo en un recipiente de agitación en la solución alcalina que incluye un detergente.

10. Procedimiento según la reivindicación 2 ú 8, que comprende además el secado del órgano descelularizado.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de agitación mecánica comprende además la agitación del órgano aislado, preferentemente en agua destilada, en un recipiente de agitación que presenta una pala que gira a una velocidad comprendida entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 r.p.m.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de tratamiento comprende además tratar el órgano aislado en una solución alcalina seleccionada de entre el grupo constituido por sulfatos, acetatos, carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos y un detergente seleccionado de entre el grupo constituido por Tritón X-100, Tritón N-101, Tritón X-114, Tritón X-405, Tritón X-705 y Tritón DF-16, monolaurato (Tween 20), monopalmitato (Tween 40), monooleato (Tween 80), polioxietilén-23-lauril éter (Brij 35), polioxietilén éter W-1 (Pol-yox), colato sódico, desoxicolatos, CHAPS, saponina, n-decil β -D-glucopuranósido, n-heptil β -D glucopiranósido, n-octil α -D-glucopiranósido y Nonidet P-40.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de tratamiento comprende además el tratamiento, preferentemente mediante rotación, del órgano aislado en una solución de hidróxido amónico que incluye Tritón X-100.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de lavado del órgano aislado también se lleva a cabo en un recipiente de agitación, preferentemente mediante rotación en agua destilada.