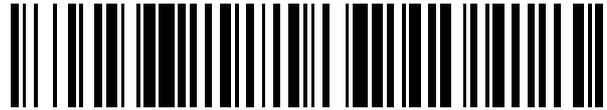


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 633**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09807733 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2366020**

54 Título: **Procedimiento para aislar productos celulares por criopreservación**

30 Prioridad:

12.12.2008 US 121957 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2013

73 Titular/es:

**TAYLOR, Michael (100.0%)
1184 Moss Bluff
Mt. Pleasant, South Carolina 29464 , US**

72 Inventor/es:

**TAYLOR, MICHAEL y
PEGG, DAVID**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 414 633 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 para aislar productos celulares por crioconservación.

5 Referencia cruzada para la solicitud relacionada

La presente solicitud no provisional reivindica los derechos de la solicitud provisional US nº 61/121.957, presentada el 12 de diciembre de 2008.

10 Antecedentes

En la medicina moderna, las terapias celulares, la medicina regeneradora y en la ingeniería tisular conllevan en su totalidad tecnologías para recoger, expandir, modificar y reimplantar células y tejidos viables vivos. Un ejemplo principal es el trasplante de islotes pancreáticos aislados de Langerhans para el tratamiento de la diabetes tipo I (dependiente de insulina). El procedimiento de recogida de las células donantes requiere la separación controlada de las células terapéuticas deseadas de otras células no deseadas en el tejido del donante.

Históricamente, los procedimientos de aislamiento de islotes se han basado en el corte en bruto del tejido en fragmentos, que no puede separar las células diana de las células no deseadas. Actualmente, el campo del trasplante de islotes se basa en procesos enzimáticos de digestión que destruyen la matriz extracelular del tejido, liberando los islotes atrapados para su posterior tratamiento y purificación. Este procedimiento generalmente practicado tiene inconvenientes debido principalmente a la dificultad de controlar el proceso digestivo para producir una cantidad óptima de células viables. Por otra parte, el proceso es duro e incluso tóxico, causando alguna pérdida inevitable de valiosas células. Además, el proceso se basa en las formas más puras de las enzimas, que son muy costosas y todavía sujetas a las variaciones por lotes que han llevado a la variabilidad e inconsistencia en los intentos para optimizar y normalizar estos procesos.

Sumario

30 Se describen procedimientos para el aislamiento de productos celulares que evitan, o reducen, la necesidad de digestión enzimática del producto celular y en su lugar se basan en las sensibilidades de las células a daños por congelación para efectuar la separación del tejido deseado del tejido no deseado en virtud de una técnica de congelación y crioconservación facilitada.

35 En las formas de realización, un producto celular se aísla mediante procedimientos que comprenden proporcionar un tejido que tiene las células deseadas que son menos propensas a la congelación destructiva y células no deseadas que son más propensas a la congelación destructiva, a la congelación del tejido, a la alteración del tejido, al calentamiento del tejido y a la separación de las células de las deseadas del material celular no deseado para obtener el producto celular.

40 En las formas de realización, el producto celular se aísla por procedimientos que comprenden el pretratamiento de un tejido tal que las células deseadas son menos propensas a la congelación destructiva y las células no deseadas son más propensas a la congelación destructiva, a la congelación del tejido, a la alteración del tejido, al calentamiento del tejido, y a la separación de las células deseadas de material celular no deseado para obtener el producto celular.

50 En las formas de realización, los islotes del páncreas se aíslan por procedimientos que comprenden infusión del tejido de los islotes con una solución crioprotectora que comprende un agente crioprotector (ACP) a través de un sistema vascular, infundiendo el tejido acinar con una solución acuosa a través de un sistema de conductos, congelando el páncreas, destruyendo el páncreas, calentando el páncreas y separando los islotes.

55 En las formas de realización, el tejido de los islotes pancreático que conserva suficiente integridad funcional para ser útil como un recurso para trasplantes se aísla por procedimientos que comprenden preparar quirúrgicamente páncreas *ex vivo* para la canulación vascular y ductal, enfriar el páncreas de aproximadamente 4°C a aproximadamente 7°C, equilibrar el tejido de los islotes con un agente crioprotector, infundir el páncreas con una solución acuosa por irrigación ductal para favorecer la frecuente formación de hielo en la congelación, congelar el páncreas a una temperatura de aproximadamente -10°C a aproximadamente -200°C, interrumpir mecánicamente el páncreas, manteniendo el páncreas congelado, descongelar el páncreas por inmersión en un medio para diluir el ACP, filtrar el páncreas, lavar el páncreas, y purificar en gradiente o cultivar el tejido de los islotes.

60 En la siguiente descripción detallada de las formas de realización se describen características y ventajas de la presente invención, y se pondrán de manifiesto a partir de la misma.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B representan pretratamiento del páncreas para el crioadislamiento de tejido de los islotes. La figura 1C representa una vista ampliada de la sección definida por la línea A discontinua de las figuras 1A y 1B.

Las Figuras 2A y 2B representan la supervivencia del tejido de los islotes en función de la penetración del sulfóxido de dimetilo ("SODM") con diferentes ritmos de congelación y calentamiento.

Descripción detallada de las formas de realización

Las formas de realización de la invención proporcionan un procedimiento sin enzimas o con enzimas reducidas para aislar productos celulares que es más consistente, fiable y menos tóxico que los procedimientos que se basan principalmente en la digestión con enzimas. Las formas de realización proporcionan un procedimiento que puede producir una cantidad óptima de células deseadas que conservan suficiente integridad funcional para ser útil como un recurso para trasplantes.

Las formas de realización de los procedimientos dados a conocer en la presente memoria pueden utilizarse para aislar cualquier producto celular para uso terapéutico y de investigación, siempre y cuando las células deseables y no deseables tengan, o pueden ser tratadas previamente para estimular, una respuesta diferencial de congelación. Dichos procedimientos pueden permitir reservar en un banco, enviar en estado congelado y suministrar el tejido congelado a un usuario final intacto, disminuyendo la sensibilidad de las células deseadas a la lesión isquémica.

En las formas de realización, un producto celular puede aislarse proporcionando un tejido que tiene células deseadas que son menos propensas a la congelación destructiva y células no deseadas que son más propensas a la congelación destructiva. El tejido puede tener propiedades intrínsecas de congelación diferencial que permitan la destrucción de algunas células y la conservación de otras células durante la congelación destructiva. Por ejemplo, el tejido puede comprender células que tienen diferentes temperaturas de nucleación en las que las células se convierten por congelación, tales como las células deseadas que tienen una temperatura de congelación inferior que las células no deseadas.

En las formas de realización, el producto celular puede aislarse tratando previamente un tejido, de modo que las células deseadas sean menos propensas a la congelación destructiva y las células no deseadas sean más propensas a la congelación destructiva. Por ejemplo, las células deseadas pueden llegar a ser menos propensas a la congelación destructiva infundiendo las células deseadas con un agente crioprotector (ACP), y las células no deseadas pueden llegar a ser más propensas a la congelación destructiva mediante la infusión de las células no deseadas con una solución que no contiene un ACP. El tejido entonces puede congelarse y destruirse de tal manera que las células deseadas se separan de material celular no deseado para obtener el producto celular. El tejido puede calentarse y las células deseadas separarse del material celular no deseado para obtener un producto celular que comprende las células deseadas.

En las formas de realización, la crioconservación se utiliza para conservar selectivamente las células deseadas y destruir las células no deseadas. La crioconservación es un proceso complejo de calor y transferencia de masa acoplados, generalmente ejecutado en condiciones sin equilibrio. Sencillamente las células o tejidos en congelación generalmente dan lugar a materiales no funcionales muertos.

Durante el enfriamiento lento, el agua se retira de las células y tejidos a medida que comienza a formarse hielo en la zona extracelular. La transformación del agua en hielo fuera de la célula provoca un desequilibrio osmótico que produce la exósmosis del agua a la zona extracelular donde se congela en hielo. La pérdida de agua continúa hasta que se alcanzan temperaturas a las que la difusión de agua a través de la membrana resulta despreciable. La cantidad de pérdida de agua de la célula depende del ritmo de enfriamiento después de la formación de hielo extracelular. Los ritmos lentos prolongan la exósmosis de agua celular al espacio extracelular y, por lo tanto, producen una mayor deshidratación celular. La deshidratación excesiva conduce a una serie de mecanismos de lesión celular que se clasifican como "efectos de solución" que incluyen la exposición a concentraciones cada vez más tóxicas de electrolitos producidas por la eliminación de agua de la fase líquida y el daño a la membrana por excesiva contracción celular.

Durante la congelación rápida, el período de exósmosis del agua se acorta a medida que la permeabilidad de la membrana al agua disminuye rápidamente con la temperatura. El agua resulta atrapada dentro de la célula y el citoplasma comienza a superenfriarse a medida que aumenta el desequilibrio termodinámico resultante del agua.

Por último, el agua intracelular se equilibra termodinámicamente con la solución extracelular provocando un cambio de fase que transforma el agua intracelular en hielo. La formación generalizada de hielo intracelular en la célula se ha asociado de manera uniforme con la lesión celular letal.

Para la mayoría de los tipos de células existen ritmos de enfriamiento óptimos que llevan a la viabilidad celular máxima. Estos ritmos de enfriamiento proporcionan deshidratación celular suficiente para evitar la formación de hielo intracelular sin producir pérdidas excesivas de agua que pueden dar lugar a lesiones de las células por "efectos de solución."

5 El calentamiento de células desde estados criopreservados se realiza por lo general con ritmos de calentamiento máximos para evitar la recrystalización de hielo en cristales de hielo más pequeños a medida que la temperatura de la muestra sube desde niveles criogénicos hasta el punto de fusión de la solución. La recrystalización durante el
10 recalentamiento es perjudicial y da como resultado una menor viabilidad celular aunque los mecanismos exactos de la lesión no se entienden en su totalidad. Sin embargo, la viabilidad es generalmente mayor cuando las células se calientan rápidamente por las condiciones en las que se produce la recrystalización.

15 Se conoce el uso de los ACP durante la congelación y descongelación de materiales biológicos. Se utiliza una amplia variedad de ACP, siendo el SODM el más ampliamente utilizado. Dichos productos químicos se dividen generalmente en dos clases: (1) ACP intracelulares de bajos pesos moleculares, que penetran en las células, y (2) ACP extracelulares de pesos moleculares relativamente altos (mayores o iguales a la de la sacarosa 342 daltons), que hacen no penetrar en las células. El principal modo de protección para la penetración de los ACP es el desplazamiento de agua intracelular por el ACP. La eliminación regulada de agua intracelular es esencial para inhibir la formación letal de hielo intracelular.

20 Los tejidos congelados experimentan una extensa formación de hielo extracelular, incluso durante los procedimientos que dan lugar por lo demás a excelente viabilidad celular. Mientras que los procedimientos histopatológicos de rutina por lo general no permiten la detección de hielo después de la descongelación, las técnicas de criosustitución pueden poner de manifiesto la situación de hielo dentro de los tejidos. El uso de estas
25 técnicas ha demostrado una distorsión y daño significativos de la matriz extracelular. El grado de daño por congelación depende de la cantidad de agua libre en el sistema y la capacidad de este agua para cristalizar durante la congelación.

30 A modo de ilustración, la siguiente descripción describe específicamente las formas de realización relacionadas con el aislamiento de islotes pancreáticos. Sin embargo, un experto en la materia aprecia que otras formas de realización no se limitan a las células pancreáticas.

35 En las formas de realización, como se representa en las figuras 1A, 1B y 1C, el procedimiento comprende el pretratamiento de páncreas 10 de tal manera que el tejido de los islotes 16 es menos propenso a la congelación destructiva y el tejido acinar 18 es más propenso a la congelación destructiva. El páncreas 10 puede ser pretratado por perfusión diferencial de tal manera que la destrucción del tejido acinar 18 se maximiza, mientras que el tejido de los islotes 16 se conserva. Por ejemplo, el tejido de los islotes 16 puede infundirse con una solución crioprotectora que comprende un ACP a través de un sistema vascular, tales como a través de tronco celíaco 12 y la arteria mesentérica superior 14. Después del equilibrado adecuado del tejido de los islotes 16, el tejido acinar 18 puede
40 infundirse con una solución acuosa a través de los conductos pancreáticos 20.

45 En las formas de realización, el pretratamiento del páncreas puede ocurrir en condiciones controladas para equilibrar preferentemente el tejido de los islotes dentro de la glándula del páncreas. Por ejemplo, la infusión vascular puede llevarse a cabo a una temperatura de desde aproximadamente 2°C a aproximadamente 35°C. Además, la perfusión se debe mantener durante un tiempo suficientemente largo que permita el equilibrado del tejido de los islotes, pero no de toda la glándula, con el ACP penetrando. Por ejemplo, la perfusión puede mantenerse durante un período de aproximadamente 20 min. a aproximadamente 70 min., tal como aproximadamente 25 a 35 min. o de aproximadamente 30 min. La razón de este paso es administrar suficiente ACP al tejido de los islotes para protegerlo contra lesiones por congelación durante la posterior congelación del páncreas.

50 En las formas de realización, la solución de crioprotector puede comprender un ACP en solución acuosa, tal como un medio biológico tamponado. La ACP puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consta de SODM, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, sacarosa y trehalosa. Se ha descubierto que el SODM es un ACP mejor que el glicerol, y los ACP a concentraciones de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 molar, son a menudo particularmente
55 eficaces en la minimización de daño celular en los sistemas biológicos congelados con ritmos lentos de enfriamiento.

60 En las formas de realización, el tejido acinar puede infundirse con una solución acuosa, tal como agua o solución salina isotónica. La infusión retrógrada de la solución acuosa dentro del conducto pancreático puede iniciarse inmediatamente a la finalización de la infusión vascular del tejido de los islotes descrito anteriormente. La razón de esta etapa es impregnar el tejido acinar con la solución acuosa para facilitar la formación extensa destructiva de hielo en el tejido acinar no crioprotegido durante el enfriamiento y la congelación.

65 La infusión del tejido acinar puede continuarse preferentemente en condiciones controladas hasta que la glándula pancreática se impregna con la solución acuosa para favorecer la formación de hielo extensa en la congelación, por ejemplo, hasta que la glándula se distiende visiblemente. Por ejemplo, aproximadamente 300 a aproximadamente 400 ml de agua o de solución salina isotónica pueden infundirse a una presión de aproximadamente 100 a

aproximadamente 120 mm de Hg durante aproximadamente 5 a aproximadamente 10 min. en un sistema de presión controlada.

5 En las formas de realización, el procedimiento comprende a continuación la congelación del páncreas. El páncreas se puede enfriar a temperaturas bajo cero hasta su congelación. La razón de esta etapa es maximizar la formación de hielo en el tejido sin protección para facilitar la destrucción de tejido para su posterior desintegración de la glándula pancreática para liberar el tejido crioprotegido de los islotes.

10 En las formas de realización, el páncreas puede congelarse a una temperatura de aproximadamente -10°C a aproximadamente -200°C , tal como de aproximadamente -40°C a aproximadamente -170°C , o de aproximadamente -80°C a aproximadamente -130°C . En las formas de realización, la congelación del páncreas puede ocurrir a un ritmo de enfriamiento de aproximadamente $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ a de aproximadamente $20^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, tal como de aproximadamente $6^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ a de aproximadamente $15^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ En las formas de realización, el ritmo de enfriamiento puede ser de aproximadamente $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ a de aproximadamente $5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$

15 El ritmo de congelación del páncreas acoplado a un ritmo de calentamiento rápido durante el calentamiento del páncreas puede proporcionar condiciones óptimas para la recuperación de tejido funcional de los islotes. En el ejemplo representado en la figura 1A, la congelación a $11^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ se correlaciona con más de 50% de supervivencia de la función de los islotes cuando los islotes se calentaron rápidamente después del equilibrado total o parcial con SODM 2 molar. La figura 1A indica, además, que la supervivencia puede aumentar hasta aproximadamente 80% si la congelación se reduce a aproximadamente $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ y el calentamiento es rápido. La figura 1B ilustra que el calentamiento lento es perjudicial (de aproximadamente 20% de supervivencia) para los islotes congelados lentamente de los ejemplos, independientemente de si los islotes están total o parcialmente equilibrados con el ACP. El calentamiento del páncreas se puede conseguir, en las formas de realización, por inmersión directa en un medio caliente, tal como un medio osmóticamente tamponado.

20 Se aprecia asimismo que el alcance de equilibrado con ACP puede no ser crítico, especialmente cuando el intercambio de calor se optimiza hacia el calentamiento rápido acoplado a la congelación lenta. Esto puede ser beneficioso debido a que las condiciones para el equilibrado pleno de los islotes *in situ* no se pueden determinar fácilmente en relación con el requisito de penetración mínima del ACP en las células exocrinas.

35 En las formas de realización, puede utilizarse un sistema de suministro de nitrógeno líquido para congelar el páncreas. Con el fin de mejorar la fractura del páncreas, el calentamiento volumétrico puede combinarse con la congelación en nitrógeno líquido, con la adición de un intercambiador de calor de aire comprimido sumergido en un baño de agua caliente. Esto permite la descongelación de la glándula sin necesidad de extraerla de la plataforma. La fractura de la glándula puede ocurrir durante el calentamiento.

40 En las formas de realización, puede resultar ventajoso el empleo de dosis bajas complementarias de una enzima digestiva para ayudar en la dispersión final del tejido conjuntivo si la congelación y la fractura no es completamente eficaz en permitir la liberación de los islotes crioprotegidos del tejido alterado. En el caso de que una liberación rápida del páncreas congelado a temperaturas criogénicas se considere beneficiosa, las sondas pueden calentarse momentáneamente, para descongelar rápidamente sólo una fina capa del páncreas que rodea las sondas y reducir la probabilidad de que las sondas se adhieran al páncreas.

45 En las formas de realización, el páncreas se disgrega para liberar tejido de islotes crioconservados a partir del tejido acinar disgregado. La disgregación del páncreas puede llevarse a cabo mientras se congela el páncreas o mientras se está calentando el páncreas. En las formas de realización, la disgregación se puede conseguir por agresión mecánica, agresión termomecánica producida por expansión diferencial, agresión termomecánica producida por gradientes de temperatura pronunciados, y agresión termomecánica producida por el cambio de volumen al congelarse, o una combinación de los mismos.

50 La agresión termomecánica es el resultado de la tendencia del material a contraerse al congelarse, lo que puede ser conducido por tres efectos diferentes: cambio de volumen al congelarse como se describió anteriormente, gradientes de temperatura pronunciados, y la expansión diferencial en materiales compuestos. En la práctica, dos o más de los efectos anteriores pueden estar actuando a la vez. Se explica a continuación cómo pueden aprovecharse estos efectos para conducir fracturas en las formas de realización.

55 *Efecto de los gradientes de temperatura pronunciados:* La mayoría de los materiales tienden a contraerse con la disminución de temperatura (una excepción es el comportamiento anómalo del agua durante la fase de transición). Cuando se desarrolla un gradiente de temperatura, las capas adyacentes del material tienden a contraerse a ritmos diferentes. Para compatibilizar la contracción real de las capas adyacentes, se desarrollarán tensiones mecánicas, lo que produce tensiones en el material. Cuando los gradientes de temperatura conducen a tensiones que exceden la resistencia del material congelado, se formarán fracturas.

Efecto de la expansión térmica diferencial: Incluso cuando la temperatura es uniforme a través del órgano, pero cambia con el tiempo para todo el órgano, se pueden desarrollar fracturas debido a la tendencia de material diferente a contraerse a diferentes velocidades.

5 En las formas de realización, el páncreas congelado tiene dos regiones principales después de pretratamiento: regiones llenas de una solución isotónica, y regiones llenas con ACP, donde, dada la morfología del páncreas, muchas regiones pequeñas ACP pueden resultar atrapadas dentro de las grandes regiones de solución isotónica congelada. Además, las discontinuidades materiales, tales como en las superficies de los islotes, o entre el tejido
10 conectivo y otros constituyentes de la glándula, pueden contribuir al daño estructural debido a la expansión y contracción térmica diferencial. En el estado sólido - cuando el órgano completo está a temperaturas extremadamente bajas - en las discontinuidades del material pueden tener poco efecto sobre la evolución de la fractura.

15 A temperaturas criogénicas moderadas, sin embargo, las fracturas pueden ser menos devastadoras para los islotes, que se comportan en parte como un material viscoso debido a la presencia del ACP. La viscosidad de un ACP vitrificado aumenta exponencialmente con la disminución de temperatura, pero el valor de la viscosidad hasta aproximadamente 10°C por encima de la temperatura de transición vítrea debe permitir al ACP comportarse como un fluido o líquido en cualquier escala de tiempo práctica. Un intervalo de temperatura criogénica moderada en este contexto está limitada por el punto de congelación del agua pura (0°C) como un límite superior, y la temperatura de transición vítrea del ACP como un límite inferior (de aproximadamente -123°C para SODM). Por ejemplo, la
20 contracción térmica del ACP puede ser tres veces tan alta como la del agua pura, que es probable que afecte a la distribución de la tensión y, por lo tanto, el patrón de fractura de alrededor de los islotes.

25 En otras formas de realización, la disgregación del páncreas puede conseguirse fracturando mecánicamente el tejido congelado. Por ejemplo, esto puede realizarse en dos etapas. La primera etapa puede ser dividir físicamente el páncreas congelado en trozos, por ejemplo, con un martillo y un cincel. La segunda etapa puede ser moler los trozos de tejido congelados mientras se sumerge en agua caliente o medio isotónico, por ejemplo, mediante el uso de una trituradora de hielo o licuadora eléctricas. Esto sirve también para efectuar un calentamiento rápido y la dilución del crioprotector al mismo tiempo que la molienda mecánica del tejido.

30 En las formas de realización, el procedimiento comprende además separar los islotes a partir del material pancreático no deseado. La separación del tejido de los islotes puede conseguirse, por ejemplo, por filtración, separación por gradiente de densidad, cultivo de tejidos, o una combinación de los mismos. La filtración se puede realizar utilizando un aparato de filtración, tal como una malla de acero inoxidable (colador de té). La separación
35 puede incluir el lavado del páncreas filtrado con un medio que contiene un inhibidor de la proteasa, tal como PEFABLOC®, y una desoxirribonucleasa, tal como PULMOZYME®, de manera que las proteasas endógenas nocivas y de ADN del tejido exocrino lisado se eliminan. En las formas de realización, el páncreas filtrado se puede teñir con un indicador para la identificación de islotes, tal como ditizona, y examinarse al microscopio para detectar la presencia de tejido intacto de los islotes.

40 El tejido de islotes separados no puede ser escindirse limpiamente del tejido acinar y no todo el tejido de los islotes puede estar completamente intacto. Por ejemplo, algunos tejidos de los islotes pueden tener una estructura difusa o sueltas que podría reflejar choque osmótico debido a la inmersión directa en un medio acuoso durante el calentamiento del páncreas. En las formas de realización, dicho problema puede evitarse empleando
45 amortiguamiento osmótico durante la elución del ACP del tejido de los islotes durante o después de la descongelación del páncreas. Utilizando la técnica de amortiguamiento osmótico en las formas de realización se puede proteger la estructura del tejido de los islotes y minimizar la hinchazón osmótica y la lisis durante la salida de la ACP penetrante. Por el contrario, el amortiguamiento osmótico no afecta a la destrucción simultánea y la lisis de las células acinares porque estas células no han sido protegidos por la penetración del ACP.

50 Para producir además una escisión suficientemente limpia de tejido de islotes, el procedimiento de crioaislamiento descrito anteriormente puede combinarse, en las formas de realización, con una digestión suave con enzimas para purificar el tejido de los islotes. Otro enfoque puede ser la utilización de cultivos de tejidos como una modalidad para el proceso de "limpieza", ya que el tejido acinar residual lesionado durante el proceso de crioaislamiento va a morir y
55 se desintegrará en el cultivo.

60 Se exponen ejemplos a continuación y son ilustrativos de diferentes composiciones y condiciones que pueden utilizarse en la puesta en práctica de formas de realización. Todas las proporciones son en peso a menos que se indique lo contrario. Es evidente, sin embargo, que la descripción puede ponerse en práctica con muchos tipos de composiciones y puede tener muchos usos diferentes de acuerdo con la descripción anterior y como se ha señalado en lo que sigue a continuación. Por ejemplo, estos ejemplos serán fácilmente reconocidos por los expertos en la materia como que también son aplicables al aislamiento de islotes humanos porque el páncreas de cerdo es un modelo de páncreas humano conocido en la técnica.

65 El páncreas de cerdo es un modelo útil al menos por las siguientes razones: (1) el páncreas de cerdo proporciona un modelo adecuado para los parámetros críticos de transferencia de calor y de masa, (2) páncreas de cerdo es un

modelo animal de gran tamaño, (3) los cerdos se consideran la fuente más prometedora de islotes para el xenotrasplante clínico en el futuro, y (4) el páncreas de cerdo puede separarse quirúrgicamente en dos lóbulos independientes perfundibles que permiten tratamientos comparativos utilizando un único páncreas y evitando la influencia de la variabilidad animal/tejido.

5

Ejemplo 1

Preparación quirúrgica del páncreas de cerdo para perfusión de todo el órgano y del lóbulo escindido.

10 Tras la irrigación en frío *in situ* con solución de conservación de órganos, el páncreas se extirpa del donante con un segmento duodenal unido alrededor de la cabeza del páncreas para proteger las arterias pancreaticoduodenales superior e inferior. Durante los preparativos de perfusión el páncreas se mantiene frío, en hielo. El conducto biliar común y aberturas de los conductos pancreáticos son parte del segmento de duodeno. La vena y la arteria esplénicas en el lado del bazo se ligan antes de la separación del bazo. Un segmento aórtico de 5 a 7 cm de largo se deja unido al páncreas para la futura canalización de órganos para la perfusión de todo el páncreas. El segmento incluye las aberturas tanto de la arteria mesentérica superior (AMS) como de los vasos el tronco celíaco (TC). Todas las ramificaciones arteriales expuestas en el margen de los lados gastroduodenal y hepático del páncreas se identifican meticulosamente y se ligan para asegurar la perfusión uniforme en toda la glándula y permitir que el efluente emerja sólo desde la vena porta. El conducto pancreático se canula usando su apertura en el lado duodeno para conservar todas las ramificaciones del conducto primeros y para garantizar buena distensión posterior del órgano para la digestión de la glándula y aislamiento de los islotes.

15

20

25

Para la perfusión de páncreas una cánula anular con sello (ORS, Des Plaines, IL) se coloca sobre el parche aórtico cortada desde el segmento aórtico inclusive de las aberturas de la AMS y TC, sin interferir con las dos luces de los vasos. Este canulación proporciona un enlace de flujo de sellado entre el páncreas y el sistema de perfusión. La cánula aórtica de parche está acoplada al puerto de infusión de la bomba.

30

35

Para la perfusión lobular, se divide cuidadosamente el páncreas en los lóbulos de la cabeza y de la cola. El páncreas se corta en dos en la posición del tronco celíaco y proximal a la AMS, dejándose este último con el lóbulo de la cola. Para este último, la arteria esplénica que se origina del tronco celíaco se canula recta para perfusión. Si es necesario, como la anatomía donante porcino requerirá, una segunda cánula puede colocarse en la arteria mesentérica superior para facilitar la perfusión de la parte inferior de cola. Para la perfusión del lóbulo de la cabeza (forma de "c") la arteria gastroduodenal y/o hepática se canula recta para perfusión. El duodeno permanece unido al órgano durante la perfusión del lóbulo cabeza. La vena porta se divide igualmente entre los dos lóbulos para la circulación de efluentes apropiada durante la perfusión. Las cánulas utilizadas para la canulación recta de los dos lóbulos están conectados directamente a la boca de infusión de la bomba.

40

45

50

Las condiciones que pueden seleccionarse para la realización del crioisolamiento de islotes pancreáticos de cerdo se describen a continuación.

Se utiliza SODM 2 molar como ACP, debido a que es ampliamente utilizado para la crioconservación de los islotes. Para el modo de infusión vascular del ACP, la celíaca/AMS se perfunde utilizando una cánula de sello-anillo y bomba peristáltica durante 30 min. a una temperatura de 4°C a 7°C. Para el modo de infusión ductal de agua, el páncreas se inyecta con agua utilizando una jeringa a través del conducto pancreático hasta que el páncreas se distiende visiblemente. Durante la etapa de congelación, se coloca el páncreas, con un termopar encastrado, en una bandeja de acero inoxidable apoyado por encima de la superficie de nitrógeno líquido en ebullición a -196°C. La bandeja de acero inoxidable proporciona una gran área superficial y la conductividad térmica necesaria para enfriar una glándula grande infiltrada. Para el modo de pulverización del tejido pancreático, el tejido se fractura mediante la aplicación de choque térmico sumergiendo el tejido congelado directamente en un medio caliente. Alternativamente, el tejido es secciona mecánicamente en un molinillo eléctrico de hielo con un medio caliente, que puede facilitar el calentamiento rápido y la dilución.

55

60

El crioisolamiento de los islotes pancreáticos realizado en las condiciones descritas anteriormente da como resultado en un ritmo de congelación de 11°C/min. y una temperatura final en el páncreas congelados inferior a -160°C. La glándula congelada sólida se divide en dos secciones para someterla a dos modos diferentes de disgregación y calentamiento. En el primero, la pieza congelada que contiene el termopar se sumerge directamente en medio de cultivo tisular caliente (30°C). Esto proporciona un ritmo de calentamiento de 12°C/min. pero no se consigue la fractura macroscópica. Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que este modo de calentamiento es menos probable que produzca la extensa fractura térmica deseada para desmenuzar el tejido en pequeños fragmentos que contienen islotes.

65

El segundo modo de disgregación y calentamiento comprende fracturar mecánicamente el tejido congelado en dos etapas. En primer lugar, el páncreas congelado se divide físicamente en pedazos con un martillo y un cincel. En segundo lugar, las piezas de tejido congelado se muelen físicamente mientras se sumergen en un medio cálido.

Los resultados obtenidos demuestran el concepto de que las condiciones de congelación diferencial se pueden aplicar a un solo páncreas para efectuar la crioconservación *in situ* de los islotes intactos al tiempo que facilita la destrucción de los tejidos acinares circundantes.

5 Ejemplo 2

Las técnicas de congelación diferenciales se utilizan para proteger selectivamente islotes *in situ* durante la destrucción por congelación del páncreas para disgregar la glándula y liberar islotes viables. Específicamente, el páncreas *ex vivo* se prepara en primer lugar quirúrgicamente para la canulación vascular y ductal. Para evitar los efectos de la variación animal a animal y para limitar el número de cerdos necesarios para un estudio, se emplea un preparado de división del lóbulo en el que el páncreas de cerdo se prepara quirúrgicamente de tal manera que permite dos infusiones independientes de la cola y la cabeza, como se describe a continuación. Pueden estudiarse seis replicantes, tanto en los grupos de referencia (procedimiento enzimático convencional) como en el experimental (crioaislamiento).

El páncreas se enfría a continuación a una temperatura de 4°C a 7°C y se infunde con una mezcla de ACP/Unisol durante 30 min. a una presión de 10 mm Hg. Cada islote representa la unidad osmótica, para el equilibrado, por lo tanto cabe esperar un equilibrado rápido (aproximadamente menos de 60 min.). El parénquima del páncreas se infunde con 300-400 ml de agua destilada o solución salina por irrigación ductal a una presión de 100-120 mm Hg durante 5-10 min. en un sistema de control de la presión. El páncreas se congela inmediatamente a -40°C o menos de -140°C a un ritmo de congelación de 1-10°C/min. para llevar a cabo la congelación del páncreas, al tiempo que se protegen los islotes. El tejido congelado se disgrega mecánicamente en trozos para cargar en una trituradora de tejidos (el tejido se mantiene congelado en esta etapa). Al mismo tiempo, el tejido se descongela y se pica en un medio de sacarosa en la trituradora de tejidos. El producto se filtra a continuación a través de una malla de acero inoxidable, tal como un colador de té. Este paso elimina grandes piezas de tejido exocrino sin picar y residuos fibrosos. El producto se lava a continuación mezclado con un medio que contiene PEFABLOC® y PULMOZYME®, eliminando de este modo proteasas endógenas nocivas y el ADN del tejido exocrino lisado. El producto se purifica en gradiente y/o se cultiva para purificar los islotes del lisado exocrino.

La eficiencia de la crioaislamiento se evalúa desde el punto de vista de la distribución del tamaño de los islotes y los fragmentos pancreáticos generados por el proceso de congelación diferencial. Esto incluye una evaluación con ditizona de los fragmentos generados ya sea con islotes incrustados o con islotes libres totalmente troceados, y parcialmente troceados, llamados islotes cubiertos. La eficiencia relativa de esta técnica de crioaislamiento de referencia se considera en comparación con la técnica de la colagenasa convencional (por ejemplo, LIBERASE, disponible en Roche, o colagenasa disponible en Serva o VitaCyte) que utiliza controles en esta descripción, así como los datos de los controles históricos a partir de aislamientos de páncreas de cerdo realizados de forma convencional.

En las formas de realización, las técnicas para la evaluación de tejido de islotes aislados y purificados pueden incluir la cuantificación de islotes, la viabilidad de los islotes, y la evaluación de la viabilidad funcional utilizando el ensayo de secreción de insulina estimulada por la glucosa.

Cuantificación de islotes: Siguiendo los procedimientos para el aislamiento y purificación de los islotes, el número total de islotes se determina utilizando una retícula de recuento en el ocular de un microscopio de disección, y se normaliza a equivalentes de islotes (IE). Los islotes se tiñen con ditizona, se cuentan y se convierten en equivalentes de islotes (IE). Los recuentos realizados por duplicado se compararán con los recuentos realizados usando un contador digital de células (por ejemplo, el programa informático IMAGEPRO®). La pureza del preparado de islotes se evalúa por comparación de tejido teñido con ditizona al tejido exocrino sin teñir.

Viabilidad de los islotes: Dos ensayos principales se utilizan para evaluar la viabilidad de los islotes; una tinción live/dead basada en el naranja de acridina/yoduro de propidio (AO/PI), o la prueba fluorescente de integridad de la membrana Syto Green/bromuro de etidio y un ensayo metabólico basado en de alamarBlue™. El ensayo con AO/PI proporciona una medida semicuantitativa de la integridad de los islotes. Por el contrario, el ensayo con alamarBlue™ es un procedimiento cuantitativo de medición no invasiva de la viabilidad de los islotes *in vitro* y, debido a que el reactivo no es tóxico, la prueba se puede realizar en islotes que se someten a continuación a otras pruebas.

Evaluación in vitro de la función y estructura de los islotes: La evaluación morfológica de la integridad del tejido y la necrosis incluye tinción de rutina (H & E), microscopía electrónica y apoptosis (ensayo TUNEL) además de los parámetros de agresión oxidativa (concentraciones de glutatión) y energéticos (ensayo de ATP). El contenido de insulina y los ensayos de secreción estimulada pueden llevarse a cabo utilizando técnicas convencionales.

Ejemplo 3

Este ejemplo se refiere a formas de realización que complementan la técnica de crioaislamiento con un proceso de digestión enzimática utilizando una concentración reducida de colagenasa. Esto es debido a que el crioaislamiento de islotes completamente exento de enzimas no puede proporcionar una escisión limpia del tejido de los islotes del

5 páncreas y una combinación de digestión suave con enzimas y crioaislamiento podría producir un producto mejor en algunas formas de realización. Por lo tanto, se desean procedimientos que incorporen una dosis baja de la colagenasa (por ejemplo LIBERASE, disponible en Roche, o colagenasa disponible en Serva o VitaCyte) en el perfundido ductal antes de la congelación de la glándula. Se llevan a cabo experimentos por duplicado utilizando un medio (0,7 mg/ml) y décimo (0,14 mg/ml) de la concentración normal de 1,4 mg/ml para determinar el efecto sobre la escisión de islotes tras el recalentamiento. Esto se evalúa comparando el rendimiento de los islotes y la proporción de islotes libres, cubiertos e incrustados como se ha descrito anteriormente. Un total de 9 cerdos permite comparaciones entre grupos con N = 6 en cada grupo enumerado en la Tabla 1 a continuación.

10 TABLA 1

| ID. del donante porcino | Grupo L0 | Grupo L1 | Grupo L2 |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Conc. de liberasa = 0 | Conc. de liberasa = 0,7 mg/ml | Conc. de liberasa = 0,14 mg/ml |
| nº 1 | Lóbulo de la cabeza | Lóbulo de la cola | - |
| nº 2 | - | Lóbulo de la cabeza | Lóbulo de la cola |
| nº 3 | Lóbulo de la cola | - | Lóbulo de la cabeza |
| nº 4 | Lóbulo de la cabeza | Lóbulo de la cola | - |
| nº 5 | - | Lóbulo de la cabeza | Lóbulo de la cola |
| nº 6 | Lóbulo de la cola | - | Lóbulo de la cabeza |
| nº 7 | - | Lóbulo de la cabeza | Lóbulo de la cola |
| nº 8 | Lóbulo de la cabeza | Lóbulo de la cola | - |
| nº 9 | Lóbulo de la cola | - | Lóbulo de la cabeza |
| | N=6 | N=6 | N=6 |

15 El diseño experimental descrito en la Tabla 1 permite una distribución igual de partes de la cabeza y la cola de los páncreas que deben asignarse a cada grupo. La evaluación del rendimiento de los islotes y los parámetros de la escisión se determina inmediatamente después del recalentamiento y otra vez después de cultivo de 24 horas a 37°C.

Técnica de digestión con colagenasa

20 El páncreas se distiende con una solución que contiene una enzima digestiva, tal como LIBERASE®. LIBERASE® (1,4 mg/ml) en solución exenta de suero se infunde a través del conducto pancreático. En este punto, cualquier tejido extraño se diseña exento del páncreas. A continuación, el páncreas impregnado se corta en trozos y se coloca en una cámara de acero inoxidable de 450 ml, tal como una cámara de Ricordi que incluye siete bolas huecas de acero inoxidable (Biorep Technologies, Inc., Miami) y una malla de acero de 500 micras de tamaño de poro colocada en su interior. Todo el sistema se llena con solución de sales equilibrada de Hanks (HBSS) a través de un sistema de tubería que pasa por encima de un intercambiador de calor. La temperatura de digestión se eleva entonces a 35 ± 2°C. La solución se recircula a continuación a 200 ml/min y la cámara de digestión se hace oscilar verticalmente a 300 oscilaciones/min con una amplitud de 1,8 cm. Unas muestras frecuentes se tiñen con ditizona y se examinan al microscopio para calibrar la magnitud del proceso de digestión. Cuando se produce una digestión adecuada, la cámara de digestión se irriga con HBSS frío frescas y la solución de los islotes se recoge en tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron a 55 g durante dos minutos a 4°C en presencia de cualquiera de suero de ternera fetal o calcio y magnesio en exceso para intumescer el proceso de la digestión enzimática. Se extrae el sobrenadante y los sedimentos de tejido, que consisten tanto en tejidos exocrinos como endocrinos, se lavan en HBSS frío y a continuación se recogen para su separación. La purificación de los islotes se realiza por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll/EuroCollins y una centrifugadora, tal como el COBE @ 2991. Este último permite una separación por gradiente de densidad continuo tal como especifica Roche. En este caso, la prueba hidráulica Cobe se realiza al principio. A continuación, la tubería se coloca en su lugar, mediante las válvulas, desde diafragma a la parte trasera de una tapa pesada de acero, para todas las líneas. Los gradientes de Ficoll deseados se preparan en EuroCollins. El sedimento del producto digerido del páncreas se vuelve a poner en suspensión en la solución del primer gradiente (1,108) y se bombea a la centrifuga (200 ml/min, durante 3 minutos). Una vez cargada la solución, se purga el aire de la centrifuga. Después, se ajusta la velocidad de la centrifugadora y la velocidad de la bomba (1000 rpm y 50 ml/min, respectivamente), y se inicia el proceso de centrifugado. Cuando se alcanzan las velocidades deseadas, se bombean sucesivamente otras dos soluciones de gradiente (1,096 y 1,037). Después de esto se bombea un volumen de 50 ml de HBSS, hasta que el líquido llega a la junta rotativa y se libera el exceso de presión. La centrifugadora se hace girar a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Se eliminan las fracciones de centrifugación, y se inspecciona la pureza de los islotes (con ditizona). Las fracciones se lavan dos veces

ES 2 414 633 T3

(centrifugado durante 2 minutos a 1200 rpm), se elimina el sobrenadante y las células se vuelven a poner en suspensión en el medio de cultivo. Se cuantifica a continuación el rendimiento de islotes.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de aislamiento de islotes pancreáticos, que comprende las etapas siguientes:

5 pretratar *in vitro* el tejido pancreático por:

- infusión de los islotes pancreáticos con una solución de crioprotector que comprende un agente crioprotector a través de un sistema vascular, y

10 - infusión de tejido acinar con una solución acuosa a través de un sistema ductal.

proporcionar un tejido que presenta las células deseadas que son menos propensas a la congelación destructiva y las células no deseadas que son más propensas a la congelación destructiva,

15 congelar el tejido,

disgregar el tejido,

calentar el tejido, y

20 separar las células deseadas del material celular no deseado para obtener los islotes pancreáticos.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además tratar los islotes pancreáticos con una enzima digestiva.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente crioprotector se selecciona de entre el grupo que consiste en sulfóxido de dimetilo, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, sacarosa y trehalosa.

30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la solución acuosa es agua o solución salina isotónica.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pretratamiento del tejido comprende la infusión del tejido con una solución de crioprotector hasta que las células deseadas se equilibran termodinámicamente con el agente crioprotector.

35 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la infusión de los islotes pancreáticos con la solución de crioprotector se lleva a cabo a una temperatura desde aproximadamente 2°C a aproximadamente 35°C y durante un período de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 minutos.

40 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la infusión del tejido acinar con una solución acuosa continúa hasta que el tejido pancreático se distiende visiblemente.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente crioprotector está presente en la solución de crioprotector a una concentración desde aproximadamente 0,5 molar a aproximadamente 3,0 molar.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la congelación del tejido pancreático comprende congelar el páncreas a una temperatura desde aproximadamente -10°C a aproximadamente -200°C.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la congelación del tejido pancreático se produce a un ritmo de enfriamiento de aproximadamente 1°C/min a aproximadamente 20°C/min.

50 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el calentamiento del tejido pancreático se produce a un ritmo de calentamiento superior a aproximadamente 12°C/min.

55 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se consigue calentar el tejido pancreático por inmersión directa del tejido en un medio caliente osmóticamente tamponado.

13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se consigue disgregar el tejido pancreático por una técnica seleccionada del grupo que consiste en agresión mecánica, agresión termomecánica producida por expansión diferencial, agresión termomecánica producida por gradientes de temperatura pronunciados, y agresión termomecánica producida por cambio de volumen al congelarse, y combinaciones de los mismos.

60 14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se consigue disgregar el tejido pancreático mientras el tejido pancreático se congela o mientras el tejido pancreático se está descongelando.

15. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además eluir el agente crioprotector de los islotes pancreáticos y aplicar un tamponamiento osmótico al tejido pancreático durante la elución del agente crioprotector de los islotes pancreáticos.

5 16. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además añadir una colagenasa al tejido pancreático a una concentración inferior a 1,4 mg/ml.

17. Procedimiento de aislamiento de tejido de islotes pancreáticos que conserva suficiente integridad funcional para resultar útil como un recurso para trasplantes, comprendiendo el procedimiento:

- 10
- preparar quirúrgicamente un páncreas *ex vivo* para canulación vascular y ductal;
 - enfriar el páncreas desde aproximadamente 2°C a aproximadamente 35°C;
 - equilibrar el tejido de los islotes con un agente crioprotector;
 - infundir el páncreas con agua destilada o solución salina por irrigación ductal para favorecer la formación de
- 15
- hielo extensa al congelarse;
 - congelar el páncreas a una temperatura desde aproximadamente -10°C a aproximadamente -200°C;
 - disgregar mecánicamente el páncreas mientras se mantiene el páncreas congelado;
 - descongelar el páncreas por inmersión en un medio para diluir el agente crioprotector; filtrar el páncreas;
 - lavar el páncreas con un medio que contiene un inhibidor de la proteasa y una desoxirribonucleasa; y
- 20
- purificar en gradiente o cultivar el tejido de los islotes.

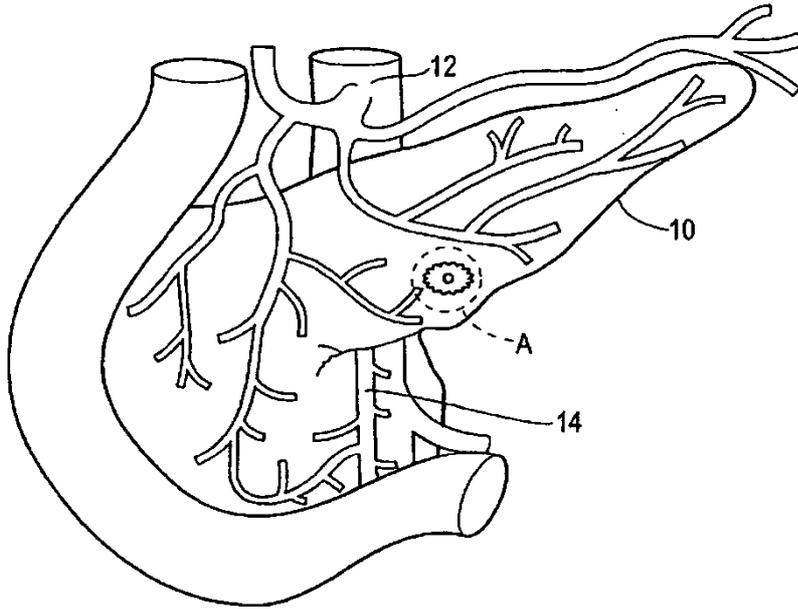


FIG. 1A

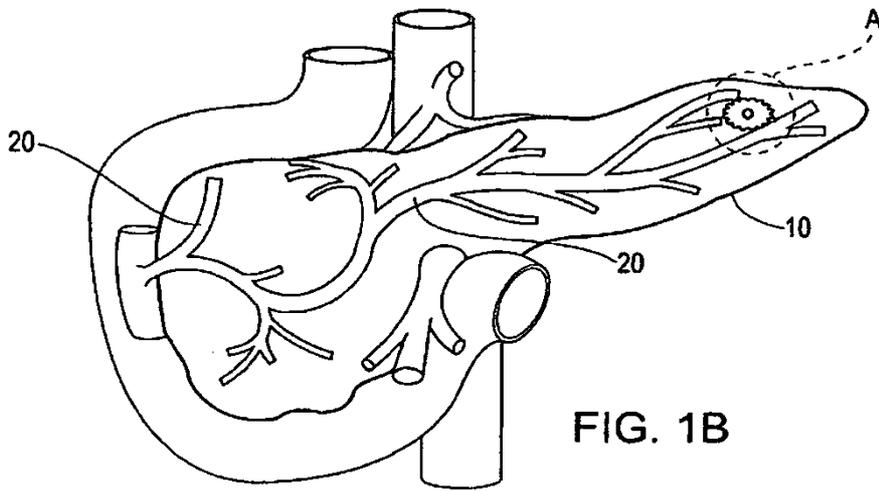


FIG. 1B

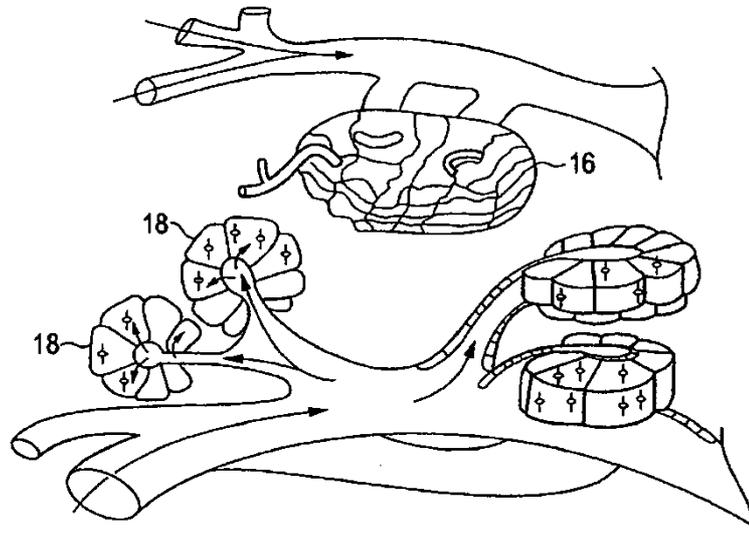


FIG. 1C

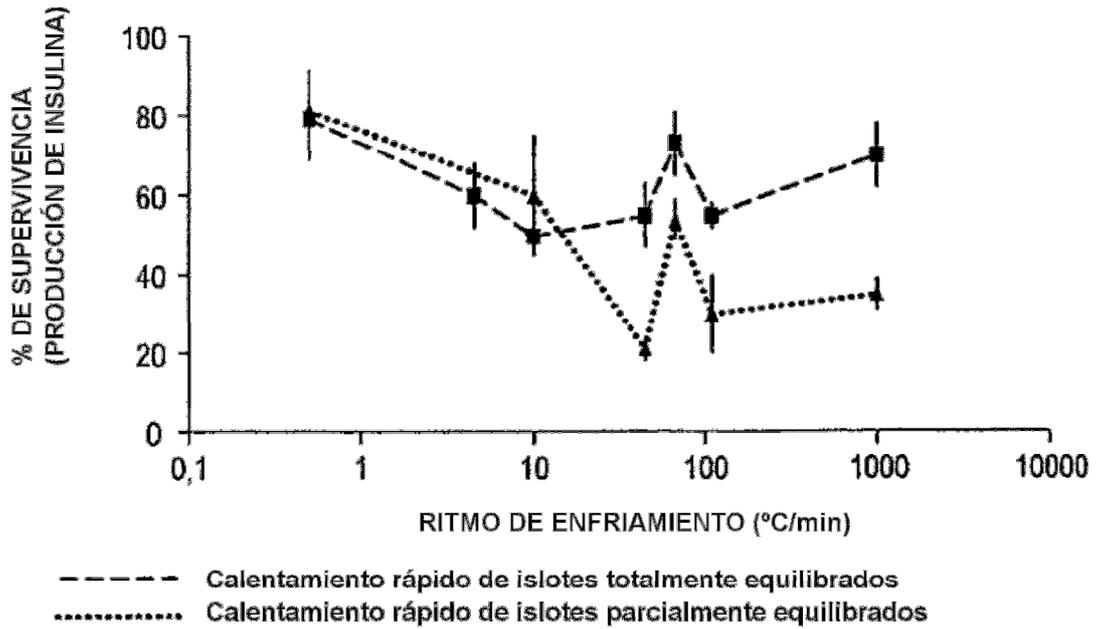


FIG. 2A

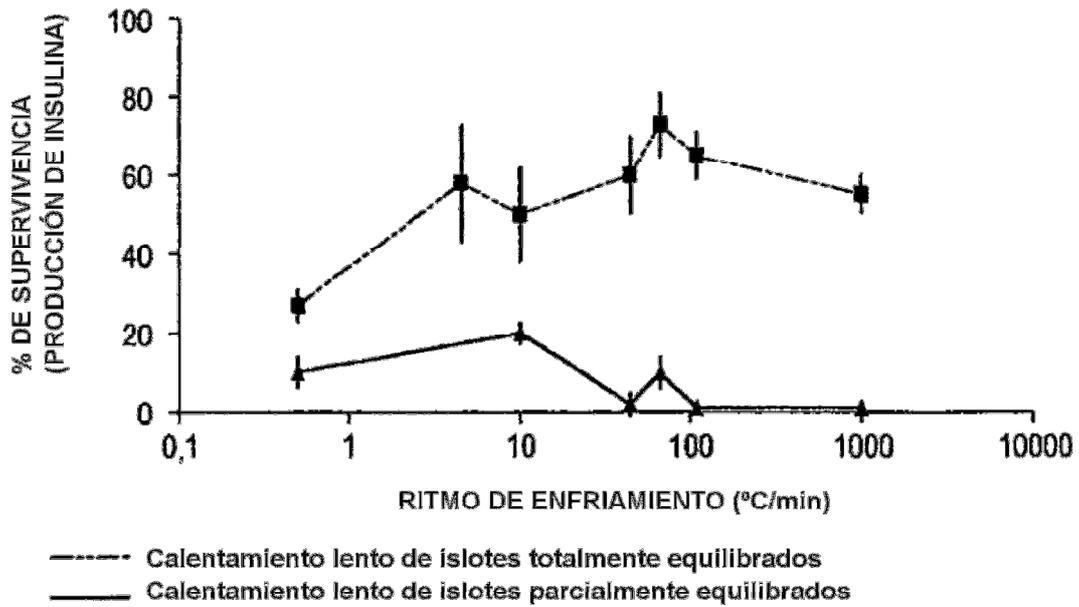


FIG. 2B