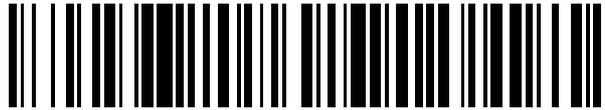


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 241**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2011 E 11748265 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2603074**

54 Título: **Procedimiento para preparar suspensiones de células humanas desinfectadas**

30 Prioridad:

**14.08.2010 DE 102010034330**

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

**24.05.2016**

73 Titular/es:

**CYTONET GMBH & CO. KG (100.0%)  
Albert-Ludwig-Grimm-Strasse 20  
69469 Weinheim, DE**

72 Inventor/es:

**ALEKSANDROVA, KRASIMIRA;  
BARTHOLD, MARC;  
ARSENEV, LUBOMIR;  
GRIESEL, CARSTEN y  
PRIESNER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 571 241 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 preparar suspensiones de celulas humanas desinfectadas

La presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar preparados unicelulares desinfectados y a los preparados así fabricados.

5 Los trasplantes hepáticos son las medidas más importantes en caso de fallo hepático agudo o crónico. En los últimos años se han desarrollado métodos alternativos al trasplante completo de un órgano, por ejemplo, el trasplante de parte del hígado o bien el trasplante de preparados celulares hepáticos, para paliar la necesidad no cubierta de material de trasplante a través de órganos donantes.

10 Son especialmente atractivos los preparados unicelulares ya que se pueden obtener de órganos de donantes no apropiados para el trasplante de órganos. Para la obtención de hepatocitos procedentes de tejido hepático se conoce un método de perfusión de dos etapas, que emplea un tampón que contiene colagenasa y uno que contiene EDTA (Berry and Friend, 1969, The Journal of Cell Biology, Vol. 43, páginas 506-520). Mediante la perfusión del tejido hepático con el tampón que contiene colagenasa algunas células salen despedidas por vía enzimática del entramado tisular.

15 Puesto que los preparados unicelulares obtenidos equivalen a medicamentos, se debe garantizar la esterilidad microbiana en cada caso. Sin embargo, este no es el caso en aproximadamente un 70 hasta un 80% de los preparados, puesto que existe una contaminación importante ya en el medio de transporte del órgano, que en general procede del material del órgano o del material del tejido del donante. En un bien tan valioso como el órgano del donante humano es deseable obtener un rendimiento grande en los preparados celulares o de tejidos trasplantables, no cargados desde el punto de vista microbiano. El procedimiento de descontaminación convencional como el calentamiento, la esterilización en autoclave o la irradiación es contrario a la conservación de la viabilidad de las células y por lo tanto no se puede emplear para la desinfección del tejido.

20 Son asimismo conocidos los procedimientos para la descontaminación de tejidos por medio de antibióticos. Por ejemplo, se han desarrollado para el almacenamiento de trasplantes de córnea (US 4.695.536) o para la descontaminación de trasplantes de válvulas del corazón (WO 92/12632 y EP 0 889 690). Los tiempos de actividad de las composiciones antibióticas empleadas oscilan entre 24 horas e incluso semanas en caso de almacenamiento. Un periodo de actividad de 24 horas puede ser incluso inapropiado para tejidos altamente sensibles. Además con este método la descontaminación se realiza únicamente de forma superficial. Otro requisito en el proceso de descontaminación basado en antibióticos para tejidos y células se basa en que el procedimiento así como el medio empleado no puedan influir de forma negativa en la obtención de células hepáticas, en la calidad de las células y en su viabilidad, y pueda ser compatible con el sistema de prueba de la esterilidad empleado en el control de calidad.

30 El problema técnico en que se basa la presente invención reside en preparar un procedimiento para una descontaminación buena y eficaz, es decir la desinfección de tejidos, que supere los inconvenientes antes mencionados, en particular aquellos que garanticen la desinfección más rápida y más eficiente del tejido en unas condiciones especialmente favorables, en particular la conservación simultánea de viabilidad de los tejidos o células, incluso cuando estos tejidos o las células contenidas en los mismos son muy sensibles, es decir proceden por ejemplo del hígado.

35 El problema técnico en que se basa la presente invención se resuelve mediante la técnica conforme a las reivindicaciones independientes. La presente invención se refiere pues a un procedimiento para fabricar preparados celulares desinfectados de tejidos de mamíferos, que comprende las siguientes etapas: a) Perfusión de tejidos de mamíferos con una composición antibiótica líquida, sin enzimas, que presenta al menos un antibiótico y está presente en al menos un tampón de perfusión, b) Realización de un tratamiento enzimático sin antibiótico del tejido para obtener una suspensión unicelular y c) Obtención de preparados celulares desinfectados, donde el tratamiento enzimático conforme a la etapa b) se realiza después de la etapa a).

40 La presente invención se basa en un procedimiento para fabricar preparados desinfectados, en particular preparados unicelulares a base de tejidos de mamíferos, en particular seres humanos, que comprende las etapas siguientes: a) la perfusión de tejidos de mamíferos con una composición antibiótica líquida, b) la realización de un tratamiento enzimático del tejido, en particular para obtener una suspensión unicelular, y c) la obtención de preparados desinfectados, en particular preparados unicelulares, es decir preparados en los cuales las células se presentan no en una agrupación de tejidos sino aisladas unas de otras, como células individuales o como agrupación de células o pequeños agregados celulares. La invención plantea por tanto un procedimiento preferido, según el cual se pueden preparar preparados desinfectados, en particular preparados unicelulares, preferiblemente suspensiones unicelulares, a partir de tejidos, es decir entramados celulares o bien órganos de mamíferos, especialmente del ser humano, en un procedimiento in vitro. Preferiblemente se puede obtener un preparado celular conforme a la invención, que sea adecuado especialmente para una prueba estéril de valor informativo. El modo de proceder conforme a la invención permite por tanto una prueba estéril que aporta mucha información respecto a la esterilidad de los preparados obtenidos.

La invención parte de tejidos de mamíferos, por ejemplo de mamíferos vivos o muertos, en particular de mamíferos recién sacrificados. En una configuración especialmente preferida se entiende por mamíferos aquellos seres humanos o animales, por ejemplo, animales útiles o animales de laboratorio, especialmente, cerdos, vacas, caballos, perros, gatos, ovejas, cabras, monos, primates, aves o roedores.

Los tejidos extraídos de mamíferos donantes y preparados conforme a la presente invención, en particular los entramados celulares o los órganos, se emplean como material de partida en la presente invención. La invención prevé que este tipo de tejidos preparados entre en contacto y sea perfundido con una composición antibiótica, preferiblemente aprovechando el sistema vascular propio, del órgano, del tejido. La invención prevé además que posteriormente a la perfusión con la composición antibiótica el tejido sea sometido a un tratamiento enzimático, en el transcurso del cual se disuelve el entramado del tejido y se obtiene una suspensión unicelular. De esta forma y modo se consigue que existan células aisladas, que sean especialmente tratadas de forma efectiva por el antibiótico y de este modo puedan ser desinfectadas.

En relación con la presente invención, se entiende por un preparado unicelular o una suspensión unicelular aquel preparado o suspensión en el cual las células se presenten solas y sin contacto físico permanente entre ellas. En otra configuración se entiende por un preparado unicelular o una suspensión unicelular que el número predominante de células existentes, en particular más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90% o más del 95% de células se mantienen separadas unas de otras y sin contacto físico permanente y que el resto hasta el 100% de las células se presenta en forma de agrupaciones celulares, agregados celulares más pequeños o más grandes y existen restos del entramado tisular no totalmente disueltos.

En relación con la presente invención se entiende por una perfusión, en particular una perfusión tisular, a la inundación de un órgano hueco o de vasos contenidos en el tejido, especialmente de vasos sanguíneos, con un líquido, es decir con la presente composición antibiótica. En relación con la presente invención una perfusión equivale a una configuración especialmente preferida de una incubación.

En relación con la presente invención se entiende por tejido aquel entramado de células coherente, en particular de la misma función y/o morfología, especialmente también un órgano, por ejemplo, un hígado, una parte de un órgano, un entramado de tejidos o un material divisorio, en particular una sección del hígado. De acuerdo con la invención el tejido empleado es tejido hepático, por ejemplo, todo el hígado o una parte del mismo, por ejemplo una sección del hígado. Las suspensiones unicelulares preparadas conforme a la invención son preferiblemente suspensiones de células hepáticas.

De acuerdo con la invención se realiza inicialmente la perfusión con una composición antibiótica, libre de enzimas, preferiblemente presente en al menos un tampón de perfusión, y seguidamente se lleva a cabo un tratamiento enzimático sin antibióticos conforme a la etapa b) y se obtienen las células del tejido empleado en la etapa a), de manera que en la etapa c) se obtienen unas células aisladas totalmente desinfectadas.

De acuerdo con la invención en una etapa opcional del proceso se puede prever el lavado superficial con una composición antibiótica, preferiblemente la composición antibiótica empleada conforme a la invención, del tejido empleado previamente a la perfusión conforme a la invención, en particular sin llevar a cabo una descontaminación superficial primaria. Para ello el tiempo de incubación será preferiblemente de solo 5 hasta 60 minutos, en particular de 5 a 45 minutos, especialmente de 5 a 30 minutos. En un periodo de incubación tan corto se puede emplear opcionalmente una concentración de antibiótico superior que durante la perfusión. El lavado superficial se puede realizar también durante las etapas del proceso a) y/o b).

El tratamiento enzimático previsto conforme a la invención del tejido para obtener una suspensión unicelular emplea preferiblemente al menos uno o preferiblemente al menos dos enzimas, que se encuentran en una solución preferiblemente acuosa, en particular una solución tamponada. Las enzimas empleadas para el tratamiento enzimático son capaces de disolver el entramado tisular, en particular el contacto célula-célula y el contacto célula-matriz extracelular, y fabricar a partir de este una suspensión unicelular sin dañar o alterar las células. En la configuración preferida conforme a la invención las enzimas especialmente adecuadas son las colagenasas, proteinasas y mezclas de las mismas. En relación con la presente invención se entiende por una proteinasa también una proteasa.

Se prefieren las mezclas de colagenasa y proteasa, especialmente las proteasas neutras, en una relación de actividades enzimáticas de 1 unidad de colagenasa hasta 40 hasta 60, preferiblemente de 50 unidades de proteasa.

Por perfusión se emplean preferiblemente unas 2000 hasta 4000 unidades de colagenasa en combinación con 100 000 unidades o con 400 hasta 2500 unidades de clostridiopeptidasa I.

En una configuración especialmente preferida del procedimiento conforme a la invención se realiza la perfusión in vitro del tejido con la composición que contiene al menos una enzima para disolver el tejido en células aisladas, especialmente a) al menos una colagenasa o b) al menos una colagenasa y al menos una proteinasa, en particular una proteinasa neutra. Esto conduce a la disolución de algunas células del entramado tisular y con ello a la

obtención de preparados unicelulares. Es decir, la colagenasa o la colagenasa y la proteinasa se encuentran separadas por al menos un principio activo antibiótico, preferiblemente el principio activo antibiótico en el cual al menos se emplea un tampón de perfusión, preferiblemente un tampón de fosfato-HEPES, en un disolvente único, por ejemplo un tampón, y luego se separan por la etapa de perfusión antibiótica.

5 De acuerdo con la invención la composición antibiótica empleada conforme a la invención se presenta en forma líquida, por ejemplo como solución o suspensión, preferiblemente como solución o suspensión acuosa, en particular preferiblemente en al menos un tampón de perfusión.

10 En una configuración especialmente preferida la composición antibiótica líquida presenta al menos un, preferiblemente al menos dos, preferiblemente al menos tres, preferiblemente al menos cuatro o incluso más antibióticos diferentes. Estos se pueden elegir del grupo compuesto por las no-penicilinas de los antibióticos beta-lactama, aminoglucósidos, antibióticos glucopeptídicos y antibióticos polipeptídicos.

15 La composición antibiótica empleada conforme a la invención no presenta en una configuración preferida ningún efecto negativo o inhibidor en el tratamiento enzimático empleado, en particular en el tratamiento con colagenasa o proteinasa.

20 De acuerdo con la presente invención se ha previsto que la composición antibiótica esté libre de colagenasas y proteinasas.

La composición antibiótica preferiblemente empleada conforme a la invención, especialmente la combinación antibiótica, se caracteriza preferiblemente por que no presenta ninguna influencia negativa en la vitalidad y morfología de las células aisladas.

25 Al menos un antibiótico, en particular los antibióticos que se presentan en cantidades que hacen que el crecimiento, la reproducción y/o la vitalidad de microorganismos como las bacterias, en particular los que aparecen en los medios de transporte de los órganos de los donantes, básicamente se reducen o se evitan mientras se mantenga la vitalidad del tejido o de las células.

30 En relación con la presente invención se entiende por una composición antibiótica una composición material que desarrolla una actividad antibiótica. En relación con la presente invención por eficacia antibiótica se entiende una acción perjudicial, especialmente una acción perjudicial antimicrobiana, como sacrificar, inhibir la reproducción, inhibir el crecimiento o reducir el crecimiento, especialmente una acción mortal sobre los microorganismos, las bacterias, y ciertamente tanto las bacterias aerobias como anaerobias gram-positivas o gram-negativas, los hongos, los protozoos o los productos de dicha reproducción, como esporas o gérmenes. Se prefiere en particular que la composición antibiótica sea especialmente eficaz contra microorganismos que aparecen en o sobre el tejido o los órganos del donante mamífero en sus medios de transporte.

40 En relación con la presente invención se entiende por una eficacia antibiótica preferiblemente, el que se sacrifiquen los microorganismos, es decir la composición antibiótica actúe de forma microbicida, preferiblemente bactericida. De acuerdo con la invención, en una configuración de la invención, la eficacia antibiótica no debe ir acompañada obligatoriamente de una acción microbicida sino que puede significar también que los microorganismos únicamente están limitados en sus funciones vitales como, por ejemplo, el crecimiento, metabolismo o reproducción, es decir existe un efecto microbiostático en particular bacteriostático.

50 En relación con la presente invención se entiende por el concepto de eficacia antibiótica preferiblemente una acción desinfectante, es decir, que la composición antibiótica actúa de forma desinfectante, o sea libera los materiales empleados, por ejemplo los tejidos y/o las células, de microorganismos vivos, matándolos preferiblemente del todo o casi del todo. La desinfección no comprende solamente la eliminación o muerte de los gérmenes, es decir de los estadios prematuros de un microorganismo, sino que también de otros estadios de desarrollo y estado de los microorganismos que incluyen sus formas de duración o las partes infecciosas de los microorganismos. Por una desinfección se entiende también una reducción significativa del número de microorganismos capaces de reproducirse, en particular que el contenido residual de microorganismos capaces de reproducirse es como máximo en una unidad del material de desinfección del orden de  $10^{-6}$  unidades que forman colonias. En relación con la presente invención se entiende por una desinfección también una descontaminación.

60 En una configuración especialmente preferida la composición antibiótica líquida se encuentra presente en al menos un tampón líquido.

La presente invención hace referencia también a un procedimiento en el cual se emplea una composición antibiótica, que comprende, que consta preferiblemente de no-penicilinas de antibióticos de beta-lactama, aminoglucósidos, antibióticos glucopeptídicos y/o antibióticos polipeptídicos en preferiblemente al menos un tampón de perfusión. La composición antibiótica empleada conforme a la invención es adecuada, especialmente apropiada y diseñada para la desinfección in vitro de tejido y de células de mamífero, preferiblemente tejido humano, órganos o trozos de órganos y células humanas, en particular tejido hepático y células hepáticas. La desinfección del tejido aislado se

5 consigue mediante la perfusión con la composición antibiótica empleada conforme a la invención, de manera que se aprovecha el sistema vascular natural. De ese modo se logra una desinfección de todo el tejido, de las partes internas y difícilmente accesibles y no solo de la superficie. Eso es especialmente importante sobre todo en el hígado, puesto que en el paciente moribundo las bacterias en diferente medida atraviesan las paredes intestinales y penetran por el sistema de la vena porta del órgano que se va a extraer a través de la perfusión. Asimismo se puede llegar a una contaminación retrógrada a través del sistema del conducto biliar, que fisiológicamente se encuentra en contacto abierto con la flora intestinal. A pesar de una técnica de trabajo óptima dicha contaminación no se puede evitar del todo y hace que sea especialmente necesaria una descontaminación buena y efectiva con la composición antibiótica empleada conforme a la invención. Además dichas contaminaciones "internas" según las circunstancias pueden conducir a que los agentes inicialmente no sean detectables en un medio de transporte sino que únicamente se liberen en el transcurso de la disociación enzimática del material tisular. Una desinfección del tejido aislado por perfusión con la composición antibiótica conforme a la invención conduce preferiblemente a una eliminación prematura de dichas contaminaciones "internas". Sin la adición de antibióticos se contaminan por tanto casi el 100% de los preparados de células hepáticas, fabricado a base de órganos hepáticos con un medio de transporte contaminado. Sin embargo, mediante la descontaminación conforme a la invención se han podido fabricar más de un 65% de preparados celulares hepáticos desinfectados.

20 Preferiblemente el tejido es perfundido en al menos una etapa de perfusión, preferiblemente dos, tres, cuatro o varias etapas de perfusión, por ejemplo tres etapas. En una configuración preferida se pueden emplear por etapa de perfusión respectivamente 3 hasta 5 litros de tampón de perfusión que contiene antibiótico o colagenasa/proteinasa, preferiblemente tampón fosfato-HEPES. De acuerdo con la invención es preferible que en tres etapas de perfusión solamente los dos primeros tampones de perfusión contengan antibiótico y se emplee la colagenasa/proteinasa en una última etapa de perfusión en un tampón de perfusión sin antibiótico.

25 En una configuración especialmente preferida la composición antibiótica se encuentra en al menos dos tampones de perfusión, especialmente dos tampones de perfusión, en particular o al menos un tampón fosfato-HEPES que contiene EGTA o EDTA y al menos un tampón fosfato-HEPES o bien otras soluciones tampón adecuadas.

30 Preferiblemente los tampones empleados para la perfusión son el tampón de fosfato-HEPES (2-(4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinil) etanosulfónico), así como el EGTA(etilenglicol-bis-(aminoetileter)-N,N'-tetracético)- o bien el tampón fosfato-HEPES que contiene EDTA(etilendiamintetracético). Los tampones de perfusión empleados presentan preferiblemente un valor de pH fisiológico de 7 hasta 8, en particular de 7,3 hasta 7,8 y especialmente de 7,5.

35 En una configuración especialmente preferida el tiempo de perfusión así como el tiempo de tratamiento enzimático son respectivamente de 10 hasta 360 minutos, preferiblemente de 20 hasta 240 minutos, en particular de 30 hasta 120 minutos. En otra configuración especialmente preferida la temperatura tanto para la perfusión como para el tratamiento enzimático es de 9 hasta 39°C, preferiblemente de 10 hasta 37°C, en particular de 25 hasta 37°C. Durante la perfusión y si es preciso durante el tratamiento enzimático se eleva la temperatura de la composición antibiótica y del órgano perfundido, pasando en particular de una temperatura inicial inferior a 10°C, por ejemplo de 40 4°C hasta 10°C, hasta una temperatura final del orden de 30°C hasta 39°C, por ejemplo de 37°C.

Mediante la existencia de colagenasa o de colagenasa y proteinasa se consigue una disociación del material tisular durante la incubación, en especial la perfusión, y se pueden obtener suspensiones unicelulares.

45 La presente invención prepara en una configuración preferida también un procedimiento para la desinfección in vitro de un tejido o para la fabricación in vitro de un preparado celular de mamífero desinfectado, donde a) el tejido de mamífero es perfundido con la composición antibiótica conforme a la presente invención en unas condiciones adecuadas, especialmente durante un periodo de tiempo adecuado a una temperatura apropiada, b) seguidamente se realiza un tratamiento enzimático para fabricar una suspensión unicelular del tejido y c) se obtiene un preparado celular desinfectado.

50 En una configuración especialmente preferida de la presente invención se ha previsto que los preparados celulares desinfectados obtenidos mediante el procedimiento conforme a la invención sean sometidos seguidamente a al menos una, dos, tres o varias etapas de lavado, una etapa de aislamiento o ambas, para poder eliminar o reducir del todo o casi del todo la concentración de antibiótico, enzima empleada de los preparados obtenidos. Es preferible después de la etapa b), es decir antes o después de la etapa c) del proceso realizar una o varias etapas de lavado, preferiblemente con un tampón de lavado sin antibiótico. Esto conduce preferiblemente a que se liberen parcial o totalmente los antibióticos y enzimas empleados en el proceso conforme a la invención y los preparados unicelulares se encuentren listos para una posterior esterilización.

60 En una configuración preferida se puede prever que los preparados celulares desinfectados obtenidos sean crioconservados para su almacenamiento. Para ello los preparados se almacenarán en un medio adecuado para la crioconservación a una temperatura baja adecuada.

65 Preferiblemente se ha podido demostrar que mediante el procedimiento conforme a la invención en un tiempo notablemente rápido se ha podido conseguir un rendimiento celular elevado (número de células totales obtenidas),

un rendimiento celular específico alto (número de células por gramo de tejido hepático empleado), así como una elevada vitalidad de las células hepáticas desinfectadas aisladas (porcentaje de células vivas en suspensión).

5 La utilización de la composición antibiótica empleada conforme a la invención conduce preferiblemente a que, por ejemplo, se disponga de órganos donantes para trasplantes que aunque no son adecuados rápidamente se puedan preparar unos preparados unicelulares desinfectados, en particular se puedan obtener suspensiones celulares en medios de cultivo por ejemplo, que antes no se podían obtener, en especial de células hepáticas.

10 El procedimiento conforme a la invención tiene la ventaja de que el tratamiento antibiótico realizado no perjudica un posterior tratamiento enzimático, en particular un tratamiento con colagenasa y/o proteinasa, y además no influye negativamente en los controles de esterilidad realizados. En una configuración especialmente preferida son adecuadas las composiciones antibióticas empleadas conforme a la invención para la fabricación de suspensiones celulares desinfectadas de tejidos, en las células aisladas presentes en el entramado tisular. Para irrigar el tejido de mamífero aislado o bien el órgano aislado se emplean los volúmenes adaptados al tamaño del tejido o del órgano de  
15 la composición antibiótica presente en al menos un tampón de perfusión empleado conforme a la invención. Estos se pueden calcular empíricamente tal como indica el experto.

Otras configuraciones preferidas de la invención se deducen de las sub reivindicaciones.

20 La invención se aclara en los ejemplos siguientes. Los ejemplos no tienen en ningún caso carácter limitativo y se pretende que queden claras las ventajas de la invención mediante unos ejemplos ilustrativos.

### Ejemplos

25 Ejemplo 1, no conforme a la invención: Fabricación de suspensiones de células hepáticas desinfectadas con un tratamiento antibiótico y enzimático simultáneo

#### A. Realización

30 Para fabricar suspensiones de células hepáticas desinfectadas de un hígado se ha fabricado la siguiente composición antibiótica:

Los antibióticos se añadían en las concentraciones siguientes a todos los tampones de perfusión indicados:

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN
MEROPENEM	0,2 mg/ml
VANCOMYCIN	0,05 mg/ml

35 Un órgano hepático de varios donantes no adecuado para el trasplante del órgano completo se lavaba inicialmente de forma superficial con 5 ml de tampón de fosfato-HEPES que contiene antibiótico durante 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se perfundía en tres etapas con los volúmenes siguientes de tampón que contiene antibiótico, de pH 7,25-7,45:

- 40 1. 5 L tampón fosfato-HEPES que contiene EDTA; tiempo de perfusión 10 min; 20-40°C;
2. 5 L tampón fosfato-HEPES ; tiempo de perfusión 10 min; 25-40°
3. 3 L tampón fosfato-HEPES que contiene colagenasa/proteasa; tiempo de perfusión 24 min; 25-40°

45 Concentración de colagenasa/proteasa: Combinación de 2000 unidades de colagenasa I y 400 hasta 2500 unidades de proteasa (Clostridiopeptidasa I).

El periodo de perfusión con el tampón que contiene enzimas y antibiótico era en total de 44 min. Para la perfusión se empleaba el sistema de vasos sanguíneos natural del hígado empleado.

50 Durante la perfusión se incrementaba lentamente la temperatura del órgano perfundido y del entorno de <10°C a 37°C (temperatura de la solución tampón entre la temperatura ambiente y 40°C).

Las células se lavaban varias veces con tampón libre de antibiótico después de su aislamiento del tejido hasta que la concentración antibiótica era inferior a 1/1000 de la concentración antibiótica empleada.

55 Se extraía una muestra para el control de esterilización tanto del medio de transporte en el que se transportaba el órgano, como también de la suspensión celular desinfectada después de la crioconservación.

#### B. Resultados

60 En un medio de transporte se detectaban los microorganismos siguientes: Enterobacter cloacae, Acinetobacter baumannii, de manera que se determinaba el tiempo durante la incubación automática hasta el crecimiento microbiano, es decir el llamado "Time to positivity", que era de 1,67 h.

En la suspensión celular desinfectada conforme a la invención después de la crioconservación no se podía detectar ningún germen después de un cultivo de 14 días.

Después de un número suficiente de lavados con tampón libre de antibiótico se puede llevar a cabo una prueba de esterilización con la suspensión celular fabricada.

5 Ejemplo 2: Fabricación de suspensiones de células hepáticas desinfectadas con un tratamiento antibiótico y enzimático secuencial

A. Realización

10 Un órgano hepático de varios donantes no adecuado para el trasplante del órgano completo se lavaba inicialmente de forma superficial con 5 ml de tampón de fosfato-HEPES con una concentración de antibiótico doble durante 8 minutos, se enjuagaba a temperatura ambiente y seguidamente se perfundía en dos etapas con tampones que contienen antibiótico y en otra etapa adicional con tampón libre de antibiótico y que contiene colagenasa con los volúmenes siguientes a un pH 7,25-7,45:

- 15
1. 10 L tampón fosfato-HEPES que contiene EDTA; tiempo de perfusión 68 min; 20-40°C;
  2. 5 L tampón fosfato-HEPES ; tiempo de perfusión 10 min; 25-40°
  3. 3 L tampón fosfato-HEPES que contiene colagenasa/proteasa y libre de antibiótico; tiempo de perfusión 24 min; 25-40°

20 Concentración de colagenasa/proteasa: Combinación de 2000 unidades de colagenasa I y 400 hasta 2500 unidades de proteasa (Clostridiopeptidasa I).

25 El periodo de perfusión con el tampón que contiene enzimas y antibiótico era en total de 102 min. Para la perfusión se empleaba el sistema de vasos sanguíneos natural del hígado empleado.

Durante la perfusión se incrementaba lentamente la temperatura del órgano perfundido y del entorno de <10°C a 37°C (temperatura de la solución tampón entre la temperatura ambiente y 40°C).

30 Las células se lavaban varias veces con tampón libre de antibiótico después de su aislamiento del tejido hasta que la concentración antibiótica era inferior a 1/1000 de la concentración antibiótica empleada.

Se extraía una muestra para el control de esterilización tanto del medio de transporte en el que se transportaba el órgano, como también de la suspensión celular desinfectada después de la crioconservación.

35 B. Resultados

En un medio de transporte no se han podido detectar Staphylococcus Aureus. El tiempo durante la incubación automática hasta el crecimiento microbiano, es decir el llamado "Time to positivity", era de 3,85 horas.

40 En la suspensión celular desinfectada conforme a la invención tras una crioconservación no se detectaba ningún germen después de un periodo de cultivo de 14 días.

Después de un número suficiente de lavados con tampón libre de antibiótico se puede llevar a cabo una prueba de esterilización con la suspensión celular fabricada

45

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para fabricar preparados celulares desinfectados de tejidos de mamíferos, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) Perfusión de tejidos de mamíferos con una composición antibiótica líquida, sin enzimas, que presenta al menos un antibiótico y está presente en al menos un tampón de perfusión,  
b) Realización de un tratamiento enzimático sin antibiótico del tejido para obtener una suspensión unicelular y  
c) Obtención de preparados celulares desinfectados  
donde el tratamiento enzimático conforme a la etapa b) se realiza después de la etapa a).
- 15 2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, donde el tejido es tejido hepático.
3. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el tratamiento enzimático es un  
tratamiento con colagenasa y/o proteinasa.
- 20 4. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el tiempo de perfusión en la etapa del proceso a) es de 30 a 120 minutos y la temperatura se incrementa durante la perfusión.
5. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la composición antibiótica líquida se encuentra en al menos dos tampones de perfusión, es decir al menos un tampón fosfato-HEPES que contiene EGTA o EDTA y al menos un tapón fosfato/HEPES.
- 25 6. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones anteriores, donde previamente a la etapa del proceso a) se enjuaga la superficie del tejido con una composición líquida antibiótica.
7. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una vez finalizada la etapa b) se realiza al menos una etapa de lavado usando un tampón de lavado sin antibiótico.