

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 769**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2011 PCT/JP2011/051317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11093268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2011 E 11736981 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2530142**

54 Título: **Procedimiento de perfusión de cultivo y dispositivo de perfusión de cultivo en órgano y tejido**

30 Prioridad:

29.01.2010 JP 2010018938

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

29.05.2018

73 Titular/es:

**ORGAN TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
5-1-4, Toranomom Minato-ku
Tokyo 105-0001, JP**

72 Inventor/es:

**TSUJI, TAKASHI y
NAKAO, KAZUHISA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 669 769 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de perfusión de cultivo y dispositivo de perfusión de cultivo en órgano y tejido

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de perfusión de un cultivo para la conservación a largo plazo de un órgano o tejido que se ha extirpado primariamente con el objetivo de su trasplante.

Técnica precedente

10 El trasplante de órganos se lleva a cabo actualmente como la terapia principal para la disfunción irreversible de órganos debido a enfermedades o accidentes. Aunque el número de casos de trasplantes ha aumentado y sus tasas de éxito han aumentado drásticamente debido al avance de los fármacos inmunosupresores y la tecnología de trasplante, la escasez crónica de órganos se ha convertido en un serio problema en la medicina del trasplante (Documento no Patente 1). Aunque se ha llevado a cabo un procedimiento de trasplante de órganos a partir de animales de trasplante o el desarrollo de animales modificados genéticamente que es menos probable que produzca un rechazo inmunológico (Documentos no Patente 2 y 3), así como el desarrollo de órganos artificiales con el objetivo de sustituir una función orgánica con un material artificial (Documento no Patente 4) con el fin de superar la escasez de órganos, ninguno de los desarrollos tecnológicos han logrado sustituir las funciones de órganos adultos.

15 Las razones principales de la escasez de órganos donados suministrados para el trasplante no son solo por el número de órganos proporcionados, sino también por el corto periodo de tiempo en el que se puede conservar el órgano extirpado en un estado que se pueda trasplantar. Por esta razón, el desarrollo de tecnologías para conservar el órgano extirpado ex vivo en un estado que se pueda trasplantar durante un tiempo prologado se está promoviendo. El procedimiento empleado más ampliamente hoy día es el almacenamiento en frío de remplazo de la sangre en el órgano con una solución de conservación de órganos a baja temperatura para suprimir el metabolismo células, y entonces se sumerge en una solución de conservación a baja temperatura. Existe también un procedimiento de perfusión en frío de conservación por inmersión a baja temperatura mientras se perfunde red vascular del órgano con una solución de conservación de órganos a baja temperatura, cuyo fin es retirar los productos de desecho en el órgano conservado. Recientemente, se han llevado a cabo ensayos para esto en Europa y en Estados Unidos (Documento no Patente 5). Sin embargo, hay un periodo de tiempo límite en el que los órganos conservados por estos procedimientos se pueden utilizar con seguridad (por ejemplo, el límite de uso del hígado por almacenamiento en frío se piensa que es de 20 horas), y se necesita una tecnología para extender más el periodo de conservación.

20 Como un dispositivo para la conservación a largo plazo del hígado, se ha propuesto un sistema de órgano artificial, en el que un tubo de suspensión del órgano se inserta en el muñón de la vena cava inferior del hígado, el hígado entero se suspende, y el hígado está soportado por dicho tubo suspensor y la superficie de un recipiente en el que se coloca parte del hígado, lo que puede permitirle mantenerse en un estado dilatado (véase por ejemplo, el párrafo [0024] de Documento de Patente 1, Figura 2, y Figura 4).

Técnica relacionada

35 Documento de Patente 1: Publicación de Solicitud de Patente Japonesa sin Examinar N.º 2003-206201
Documento no Patente 1: Lechler RI. y col.: Nat. Med. 11 (6): 605, 2005
Documento no Patente 2: Eventov-Friedman S. y col.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102 (8): 2928, 2005
40 Documento no Patente 3: Yang YG. y col.: Nat. Rev. Immunol. 7 (7): 519, 2007
Documento no Patente 4: Malchesky PS. y col.: Artif. Organs. 30 (9): 655, 2006
Documento no Patente 5: Moers C. y col.: N. Engl. J. Med. 360 (1): 7, 2009
Documento no Patente 6: Butler AJ. Y col.: Transplantation 73 (8): 1212, 2002
Documento no Patente 7: Nui A. y col.: Int. J. Artif. Organs 26 (1) : 46, 2003

Divulgación de la invención**Problemas que resolver por la invención**

45 En el procedimiento del Documento de Patente 1, el órgano se daña fácilmente ya que se inserta un tubo suspensor en el órgano. Además, los presentes inventores han confirmado en un experimento que utiliza una configuración similar, que el perfusante no se suministra a todas las partes del hígado.

50 En consecuencia, el objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de cultivo, en el que se puede conservar un órgano durante un largo periodo de tiempo mientras mantiene suficientemente la función del mismo mediante el suministro de un perfusante a todas las partes del órgano.

Medio para resolver los problemas

como resultado de investigaciones repetidas para resolver los problemas anteriores, los presentes inventores han descubierto que en el cultivo de perfusión de un órgano o tejido (al que se hace referencia a veces de aquí en

adelante como “un órgano, etc.”), más que suspender el propio órgano, etc., extirpando el órgano, etc. junto con un segundo órgano o tejido que está conectado con el órgano, etc. *in vivo*, y suspender el órgano, etc. para cultivarse fijando el segundo órgano o tejido mencionado anteriormente, se puede llevar a cabo un cultivo de manera que el perfusante se suministre a todas las partes sin producir daños al órgano, etc.

- 5 Adicionalmente, se descubrió que cuando se suspende y se cultiva el órgano, etc. sumergiéndolo en un líquido de inmersión de órganos, etc. de manera que al menos parte del órgano, etc. recibe flotabilidad, el perfusante se puede suministrar a más partes del órgano, etc. y el periodo de tiempo de funcionalidad del mismo que se puede mantener se extiende significativamente, y por lo tanto se completa la presente invención.

En otras palabras, la presente invención se refiere a la materia objeto de la reivindicación 1:

- 10 [1] Un procedimiento para la perfusión de un cultivo de un órgano o tejido extirpado de un mamífero, en el que dicho órgano o tejido se extirpa junto con un segundo órgano o tejido que se conecta al órgano o tejido mencionado anteriormente *in vivo*, que comprende una etapa de suspensión del órgano o tejido mencionado anteriormente fijando dicho segundo órgano o tejido, y una etapa de perfusión de los vasos sanguíneos del órgano o tejido mencionado anteriormente con un perfusante;
- 15 [2] El procedimiento de perfusión de acuerdo con el [1] anterior, en el que, en dicha etapa de perfusión, al menos una parte del órgano o tejido mencionado anteriormente se sumerge en un líquido de inmersión de órganos, etc.;
- [3-1] El procedimiento de perfusión de un cultivo de acuerdo con los [1] o [2] anteriores, en el que el órgano o tejido mencionado anteriormente es el hígado, y dicho segundo órgano o tejido es el diafragma;
- 20 [3-2] El procedimiento de perfusión de un cultivo de acuerdo con los [1] o [2] anteriores, en el que el órgano o tejido mencionado anteriormente es el hígado, y dicho segundo órgano o tejido son el diafragma y la costilla;
- [4] El procedimiento de perfusión de un cultivo de acuerdo con los [1] o [2], en el que el órgano o tejido mencionado anteriormente es el riñón, y dicho segundo órgano o tejido es el tejido adiposo que rodea el riñón; y
- 25 [5] Un procedimiento para la perfusión de un cultivo de un órgano o tejido extirpado de un mamífero, que comprende una etapa de suspensión del órgano o tejido mencionado anteriormente, y la inmersión de al menos una parte del órgano o tejido mencionado anteriormente en un líquido de inmersión de un órgano, etc., y una etapa de perfusión de vasos sanguíneos en el órgano o tejido mencionado anteriormente con un perfusante.

Ventajas de la invención

- 30 De acuerdo con el procedimiento de perfusión de un cultivo para órganos o tejidos de la presente invención, como se puede suministrar perfusante a todas las partes del órgano si producir daños en el órgano, se puede conservar durante un largo periodo de tiempo mientras mantiene la función del órgano para proporcionarse para el trasplante en un buen estado.

Breve descripción de los dibujos

- 35 La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de un dispositivo de perfusión de un cultivo para un órgano o tejido de acuerdo con la presente invención;
- La Figura 2 es un diagrama esquemático del vaso de cultivo magnificado del dispositivo de perfusión del cultivo que se muestra en la Figura 1.
- El hígado que se muestra en el diagrama esquemático de la Figura 2 simplemente es una ejemplificación.
- 40 La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de la cánula que se va a conectar al órgano o tejido de acuerdo con la presente invención;
- La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de dispositivo de eliminación de burbujas;
- La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo del circuito de pre-perfusión;
- La Figura 6 es la apariencia e imágenes micro-CT después de la circulación de azul tripano en un hígado sometido a la perfusión de cultivo por distintos procedimientos de fijación;
- 45 La Figura 7 es el cambio en el tiempo de GOT y GPT en un hígado sometido a perfusión de cultivo mediante distintos medios de fijación;
- La Figura 8 es el cambio en el tiempo de la cantidad de síntesis de urea en un hígado sometido a perfusión de un cultivo por el procedimiento de fijación suspendida en un líquido;
- La Figura 9 es el cambio en el tiempo de la cantidad de secreción de bilis en un hígado sometido a perfusión de un cultivo mediante el procedimiento de fijación suspendida en un líquido; y
- 50 La Figura 10 es el cambio en el tiempo de GOT y GPT en un riñón sometido a perfusión de cultivo mediante el procedimiento de fijación estacionaria y el procedimiento de fijación suspendida en un líquido.

Descripción de las realizaciones

[Procedimiento de perfusión de un cultivo para un órgano o tejido]

- 55 El primer aspecto del procedimiento de perfusión de un cultivo al órgano de acuerdo con la presente invención es un procedimiento para la perfusión de un cultivo de un órgano o tejido extirpado de un mamífero, que se caracteriza por que el órgano o tejido mencionado anteriormente se extirpa junto con un segundo órgano o tejido que está conectado *in vivo* al órgano o tejido mencionado anteriormente, que comprende una etapa de suspensión del órgano

o tejido fijando el segundo órgano o tejido, y una etapa de perfusión de los vasos sanguíneos del órgano o tejido con un perfusante.

5 “Mamífero” en el presente documento no está limitado particularmente, y el procedimiento de perfusión de un cultivo de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para un órgano, etc. de cualquier mamífero. Cuando se emplea un órgano, etc. cultivado con el procedimiento de acuerdo con la presente invención para un trasplante, el mamífero se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el sujeto al que se va a trasplantar el órgano, etc. (receptor), ejemplos de los cuales incluyen, seres humanos, cerdos, vacas, monos, babuinos, perros y gatos. Cuando el receptor es un ser humano, el órgano, etc. que se utiliza es primariamente el que se extirpa de un paciente con muerte cerebral.

10 “Órgano o tejido (órgano, etc.)” en el presente documento no está limitado particularmente a condición de que sea un órgano o tejido adecuado para la perfusión de un cultivo, cuyos ejemplos incluyen el corazón, hígado, riñón, pulmón, páncreas, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diente y su tejido circundante, y pelo y su tejido circundante.

15 “Perfusión de un cultivo” de un órgano, etc. en la presente invención se refiere a unir un tubo tal como una cánula a los vasos sanguíneos de un órgano, etc. extirpado, y permitir que el perfusante fluya dentro y fuera de manera similar al flujo sanguíneo con el fin de cultivar el órgano. Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente una composición bien conocida o una composición correspondiente del perfusante de acuerdo con el tipo de mamífero u órgano. Por ejemplo, pueden ser los que comprendan nutrientes tales como azúcares o aminoácidos necesarios para la supervivencia celular. Se puede emplear una solución de cultivo que se emplee para el cultivo general o una solución de conservación de órganos que se emplee para la conservación de órganos, y la composición de los mismos no está particularmente limitada.

20 En el procedimiento de la perfusión de un cultivo de la presente invención, se emplea un órgano, etc. que se extirpa junto con un segundo órgano o tejido que está conectado *in vivo* al órgano, etc. De acuerdo con dicha configuración, como se puede fijar el segundo órgano o tejido mencionado anteriormente con el fin de suspender el órgano, etc. que se va a cultivar, la solución de cultivo se puede suministrar a todas las partes del órgano, etc. sin producir daño al órgano, etc. que se va a cultivar.

25 El segundo órgano o tejido es preferentemente un órgano o tejido que está conectado *in vivo* al órgano, etc., más preferentemente un órgano o tejido que está conectado *in vivo* en la parte superior del órgano, etc. Suspendido con dicho órgano o tejido, el órgano, etc. se puede cultivar en un ambiente similar a la configuración *in vivo*. Un ambiente similar a la configuración *in vivo* en el presente documento significa un ambiente en el que el órgano, etc. puede mantener su forma natural sin someterse a compresión por materiales duros tales como la superficie interior de un recipiente. Debido a que la perfusión de un cultivo convencional para el órgano, etc. se llevaba a cabo colocando el órgano, etc. en un envase tal como una placa de Petri, los vasos sanguíneos en la parte en contacto con la placa de Petri se comprimía, y el perfusante no se suministraba suficientemente. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, como el órgano, etc. está colgado y se cultiva en un ambiente similar a la configuración *in vivo*, el perfusante se puede suministrar a todas las partes del órgano, etc.

Adicionalmente, cuando se fija el segundo órgano o tejido, como no existe la inconveniencia si se daña el segundo órgano o tejido, se puede fijar firmemente con procedimientos tales como insertan un tubo suspensor, pinzar con un clip, o coserlo con una sutura.

40 Por ejemplo, si el órgano que se va a cultivar es el hígado, el diafragma se conecta *in vivo* a la parte superior del mismo, y el diafragma mencionado anteriormente se conecta a la costilla. En consecuencia, se puede emplear solo el diafragma, o el diafragma y la costilla como segundo órgano(s) o tejido(s). Cuando se extirpa el hígado de un mamífero, si se extirpa junto con el diafragma, el hígado se puede suspender en un ambiente que se aproxime a como *in vivo* fijando el diafragma mencionado anteriormente. Si además se extirpa la costilla junto con el diafragma, la costilla se puede fijar para permitir una suspensión más estable.

45 Otros ejemplos del segundo órgano o tejido incluye, pero no se limita a: para el cultivo del riñón o páncreas, el tejido adiposo adjunto a la superficie del riñón o páncreas; para el cultivo de un órgano del sistema digestivo, un órgano adyacente corriente arriba (específicamente, el estómago o duodeno para el cultivo de intestino delgado y el intestino delgado para el cultivo del intestino grueso); para el cultivo de los dientes y su tejido circundante, el hueso de la mandíbula, el hueso alveolar, el hueso de la raíz y la encía; y para el cultivo del pelo y su tejido circundante, la epidermis, dermis y tejido adiposo.

50 En el procedimiento de perfusión de un cultivo de la presente invención, la etapa de perfusión de los vasos sanguíneos en el órgano, etc. con un perfusante (etapa de perfusión) se puede llevar a cabo, por ejemplo, uniendo un tubo conectado a los vasos sanguíneos del órgano, etc. a una bomba, y permitiendo que el perfusante fluya dentro y fuera.

55 El procedimiento de perfusión de un cultivo de la presente invención se lleva a cabo preferentemente por inmersión al menos de una parte del órgano, etc. en el líquido de inmersión del órgano, etc. en la etapa de perfusión. Al hacer esto, al menos parte del órgano, etc. recibe flotabilidad, y por lo tanto se puede crear un ambiente que se aproxima

más a la configuración *in vivo* en comparación con la suspensión simple, y el perfusante se puede suministrar a todas las partes del órgano, etc. Se prefiere un estado en el que al menos un 30 % del órgano, etc. se encuentra en el líquido, más preferentemente un 50 %, más preferentemente un 80 %, y más preferentemente, el órgano, etc. completo se encuentra en el líquido. Como con el perfusante, los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente el líquido de inmersión del órgano, etc. de acuerdo con el tipo de mamífero y órgano, etc., y puede ser de la misma o diferente composición que el perfusante.

5

El segundo aspecto del procedimiento de perfusión del cultivo para un órgano o tejido de acuerdo con la presente invención es un procedimiento para la perfusión de un cultivo de un órgano, etc. extirpado de un mamífero, que se caracteriza porque comprende una etapa de suspensión del órgano, etc. y la inmersión de al menos una parte del órgano, etc. en un líquido de inmersión de órganos, y una etapa de perfusión de los vasos sanguíneos del órgano, etc. con un perfusante.

10

Los términos utilizados en el primer aspecto del procedimiento de perfusión de un cultivo para un órgano o tejidos de acuerdo con la presente invención se emplean como sinónimos en el segundo aspecto, y la descripción por lo tanto se omite en el presente documento.

15 En el segundo aspecto del procedimiento de acuerdo con la presente invención, la etapa de suspensión del órgano, etc. puede ser cualquier procedimiento a condición de que el órgano, etc. pueda mantener la función del mismo, aunque es preferentemente un estado similar al ambiente *in vivo*. En consecuencia, se prefiere suspender en la misma orientación vertical que *in vivo* utilizando un procedimiento lo más no invasivo posible.

[Dispositivo para la perfusión de un cultivo en un órgano o tejido]

20 El dispositivo de perfusión de un cultivo para un órgano o tejido se caracteriza porque comprende un medio de suspensión para suspender el órgano, etc., un vaso que puede permitir la inmersión de al menos una parte de dicho órgano, etc. en un líquido de inmersión de órganos, etc. mientras que el órgano, etc. está suspendido, una cánula de entrada del flujo de perfusante para permitir que el perfusante fluya en el órgano, etc., y una cánula de salida del flujo de perfusante para permitir que el perfusante fluya fuera del órgano, etc.

25 Cuando se emplea el dispositivo mencionado anteriormente para cultivar el hígado, se prefiere que comprenda adicionalmente una cánula biliar. Al insertar una cánula biliar en el conducto biliar del hígado, la bilis secretada por el hígado se puede recuperar en el exterior del vaso de cultivo.

30 Cuando se emplea el dispositivo mencionado para el cultivo del riñón, se prefiere que comprenda además una cánula ureteral. Al insertar una cánula ureteral en el conducto urinario del riñón, la orina secretada por el riñón se puede recuperar en el exterior del vaso de cultivo.

Además, cuando se emplea el dispositivo mencionado anteriormente para el cultivo del hígado, cuando se extirpa el hígado junto con la costilla y el diafragma, el medio de suspensión tendrá preferentemente una configuración que pueda fijar la costilla.

35 Además, cuando se emplea el dispositivo mencionado anteriormente para cultivar el riñón, en el que el riñón se extirpa junto con el tejido adiposo circundante, el medio de suspensión tendrá preferentemente una configuración que pueda fijar el tejido adiposo.

40 Como un ejemplo de dispositivo de perfusión de un cultivo de acuerdo con la presente invención, se muestra un dispositivo 1 de cultivo del hígado en la Figura 1, y su revisión se describirá a continuación. El dispositivo 1 de cultivo del hígado es para cultivar el hígado extirpado junto con el diafragma y la costilla, y el hígado se somete a la perfusión del cultivo en un estado en el que el hígado completo se sumerge en el líquido.

45 El dispositivo 1 de cultivo del hígado comprende un vaso 10 de fijación del hígado cultivado, así como una cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y una cánula de salida 30 del flujo de perfusante que se fijarán al hígado, y los tubos 80 y 82 se conectan a cada cánula. El tubo 80 que se unirá a la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se conecta a un matraz de agitación 62 con el microportador mediante una bomba peristáltica 70 de entrada del flujo de perfusante, y suministra el perfusante en el matraz de agitación 62 con el microportador a la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante.

El perfusante que fluye en el hígado 100 mediante la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante fluirá hacia afuera por la cánula de salida 30 del flujo de perfusante, y se exporta al matraz de agitación 62 con el microportador mediante el tubo 82, etc. unido a la cánula de salida 30 del flujo de perfusante.

50 Ejemplos preferentes de cada elemento constituyente se describirán ahora.

Una magnificación del vaso 10 de fijación del hígado se muestra en la Figura 2.

El vaso 10 de cultivo comprende medios de suspensión 106 y 108 que permiten que el hígado 100 que se va a suspender por la costilla 104. El interior del vaso de cultivo 10 tiene una configuración en la que el vaso se puede llenar con líquido y el hígado 100 completo se puede sumergir en el de manera que reciba flotación. Además, la

pared del vaso de cultivo 10 tiene los agujeros 99a y 99b formados en el mismo para pasar los tubos 80 y 82 que se unen a las cánulas.

5 El vaso de cultivo 10 también comprende las fijaciones 96 y 98 para fijar la cánula o el tubo unido a la misma. Al fijar la cánula con las fijaciones 96 y 98, se evita que la cánula se inserte demasiado profunda en el órgano y cause un daño al mismo o que se desenganche del órgano, de manera que la solución de cultivo puede circular establemente. Para las fijaciones 96 y 98, por ejemplo, se puede emplear un miembro en forma de columna que tiene una hendidura de unos pocos milímetros en la punta en la que se puede ajustar la cánula o el tubo. La cánula se fija anclando el miembro mencionado anteriormente en la pared interna del vaso de cultivo e insertando la cánula en la hendidura.

10 El vaso de cultivo 10 puede ser de cualquier material y se puede fabricar con, por ejemplo, cristal o acrílico.

15 La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se muestra en la columna superior de la Figura 3, la cánula de salida 30 del flujo de perfusante en la columna del medio de la Figura 3, y la cánula biliar 40 en la columna inferior de la Figura 3. En cada cánula que se muestra en la Figura 3, el tamaño, etc. de cada miembro, por ejemplo, la parte de catéter que configura la cánula puede alterarse dependiendo del órgano o tejido a que se aplica. Por ejemplo, en la perfusión del cultivo del hígado, la cánula de entrada del flujo/salida del flujo de perfusante se fabrica cortando las partes de un catéter 21 y 31 con agujas permanentes (por ejemplo, de 22G para la entrada de flujo y 16G para la salida de flujo), conectándolas a tubos de silicona de 25 y 35 (por ejemplo, DI de 1 mm), cosiéndolas y fijándolas en dos posiciones con suturas de seda 24 y 34 flexibles, y Parafilms 22 y 32 de envolver. La cánula biliar 40 se fabrica conectando la parte del catéter 42 de la aguja fija (por ejemplo, 27G) a un tubo de silicona 45 (por ejemplo, DI 1 mm) mediante un ajuste luer 42 en cada cánula de manera que se puedan unir a los tubos 80, 82, y 88 (Figura 1).

La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y la cánula de salida 30 del flujo de perfusante se conecta cada una directa o indirectamente a, por ejemplo, la vena porta del hígado 100 y la vena del hígado, respectivamente.

25 La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se conecta a la bomba peristáltica 70 de entrada del flujo de perfusante, y el perfusante fluye desde la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante en el hígado 100 operando la bomba 70. El perfusante que fluye en el interior pasa a través del hígado 100 y fluye hacia fuera desde la cánula de salida 30 del flujo de perfusante, y fluye en el interior del tubo 82. Además, la bilis secretada por el hígado se recupera desde la cánula biliar 40 en el circuito de recuperación de bilis (tubo de recuperación 88 de bilis y botella de recuperación 68 de bilis).

30 La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se une al tubo de silicona 80 (por ejemplo, con un DI de 2 mm) con un ajuste luer 23 (por ejemplo, para un DI de 2,5 mm), y el tubo de silicona se conecta de manera similar a un tubo Pharmed (por ejemplo, con un DI de 3,15 mm) con un ajuste luer. Se aplica grasa fluorada a este tubo Pharmed, y se conecta a la bomba peristáltica 70 de entrada del flujo de perfusante.

35 La cánula de salida 30 del flujo de perfusante se une al tubo de silicona 82 (por ejemplo, con DI de 2 mm) con un ajuste luer 33 (por ejemplo, para un DI de 2,5 mm). Este tubo de silicona se conecta adicionalmente a un tubo de Teflon T1 de una botella Scott con un tapón de silicona 60 (por ejemplo, de 100 ml) que tiene tres tubos de Teflón (por ejemplo, con un DI de 1 mm; T1 y T2, el tercer tubo no se muestra) agujereados en el borde.

40 Por otra parte, a uno de los dos tubos de Teflon restantes de la botella Scott 60, se conecta un tubo de silicona (por ejemplo, de un DI de 2 mm) suficientemente largo para alcanzar el fondo de la botella en el interior (T2 en la Figura 1), y se conecta un tubo Pharmed que tiene tubos de silicona (por ejemplo, con un DI de 2 mm) unidos en ambos lados en el exterior. El otro extremo del tubo de silicona se conecta mediante la bomba peristáltica 72 de salida del flujo de perfusante al tubo de Teflon T3 (ASONE), que no tiene un tubo de silicona unido en la parte interior de la botella y la punta no alcanza la superficie del líquido, entre los tres tubos de Teflon (T3 y T4, el tercer tubo no se muestra) perforan el borde derecho del matraz de agitación con microportador con un tapón de silicona (por ejemplo, de 1000 ml), 62 en la Figura.

45 El tercer tubo de Teflon que perfora el borde de la botella Scott 60 tiene un filtro de aire conectado en la parte exterior de la botella.

50 El perfusante se mantiene caliente con un calentador envuelto alrededor de matraz de agitación 62 con el microportador. La temperatura es preferentemente la temperatura corporal media del mamífero diana, y en el caso de seres humanos alrededor de 37 °C. El calentador que se emplea es preferentemente el calentador flexible CELLMASTER (Wakenyaku, Kyoto, Japón) y CELLMASTER 1700 (Wakenyaku), Temperature Electrode (Mettler Toled, Tokyo, Japón). Los dos bordes del matraz de agitación 62 con el microportador tienen cada uno tres tubos de Teflon que los perforan. El tubo de Teflon T4 unido a un tubo de silicona (por ejemplo, con un DI de 2 mm) perfora el borde derecho en la Figura que alcanza el fondo de la botella se une a la bomba peristáltica 70 de entrada de flujo de perfusante mediante un tubo de silicona.

55 El otro tubo de Teflon que perforaba el borde derecho en la Figura tiene conectado un filtro de aire en el exterior de la botella.

5 Cuando se cultiva el órgano, etc. a baja temperatura, se puede emplear un dispositivo refrigerante bien conocido en vez del calentador para enfriar el perfusante. La temperatura de enfriamiento es preferentemente de 4 °C a 35 °C, más preferentemente de 20 °C a 35 °C. Además, cuando se cultiva el órgano, etc. a baja temperatura, se prefiere que el líquido para la inmersión del órgano, etc. también esté a baja temperatura, y el órgano, etc. en el cultivo se enfría simultáneamente. Ejemplos de dispositivos refrigeradores que se emplean para dicho enfriamiento incluyen distintos radiadores y un dispositivo refrigerador Peltier.

10 Se instalan llaves de paso 84 y 86 en los tubos de silicona entre la bomba peristáltica 70 de entrada del flujo de perfusante y la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante, y entre la cánula de salida 30 del flujo de perfusante y la botella Scott 60, y se inserta en estas un tubo de recuperación de perfusante (por ejemplo, de 15 ml) para recolectar el perfusante.

15 Se instala un dispositivo de eliminación de burbujas 50 entre la bomba peristáltica 70 de entrada del flujo de perfusante y la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante. La configuración del dispositivo de eliminación de burbujas 50 se muestra en la Figura 4. Los tubos de silicona tapados con tapones 51 con ajuste luer se unen con tubos en forma de Y para evitar que las burbujas que entran en el circuito fluyan por el hígado, y al mismo tiempo se instala un dispositivo para eliminar estas burbujas desde los tapones 51 con ajuste luer (ISIS). Se emplean preferentemente mini-ajustes (F) 53 (para DI de 6,5 mm; ISIS) como los tubos en forma de Y.

20 Con el fin de intercambiar el perfusante cada 24 horas de perfusión del cultivo, entre los tres tubos de Teflon (T5 y T6, el tercer tubo no se muestra) que perforan el borde izquierdo del matraz de agitación 62 con el microportador en la Figura como se muestra en la Figura 1, para cada tubo de Teflon T5 que no tienen un tubo de silicona unido en el interior y la punta no alcanza la superficie de líquido, y el tubo de Teflon T6 que tiene unido un tubo de silicona en el interior y la punta alcanza la superficie de líquido, se conectan a un tubo Pharmed que tiene tubos de silicona conectados en ambos extremos. Se conecta un filtro de aire en el tubo de Teflon remanente.

25 El tubo de silicona conectado al tubo de Teflon T5 se une a una botella Scott 64 de adición de perfusante (por ejemplo, de 2000 ml) que comprende medio nuevo mediante una bomba peristáltica 74 de adición de perfusante.

El tubo de silicona conectado al tubo de Teflon T6 se une a una botella Scott 66 de recuperación del perfusante (por ejemplo, de 2000 ml) mediante una bomba peristáltica 78 de recuperación de perfusante.

30 El circuito de pre-perfusión que se muestra en la Figura 5 se construye de manera que el perfusante se pueda bombear durante la retirada del hígado. La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se une a un tubo de silicona (por ejemplo, con DI de 2 mm) con un ajuste luer 23, y este tubo de silicona se conecta a un dispositivo de eliminación de burbujas 50'. Otro tubo de silicona se une al dispositivo de eliminación de burbujas 50', un tubo Pharmed (por ejemplo, con un DI de 3 mm) aplicado con grasa fluorada se une adicionalmente al tubo de silicona, y el tugo Pharmed se fija en la bomba peristáltica 94. Un tubo de silicona (por ejemplo, con un DI de 2 mm) se une al otro extremo del tubo Pharmed para bombear el perfusante de la botella Scott 92.

35 Esto da como resultado que el perfusante se bombee desde la botella Scott 92 para fluir en el hígado mediante la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y fluya desde el hígado por la cánula de salida 30 del flujo de perfusante. La cánula de salida 30 del flujo de perfusante se une a un tubo de silicona (por ejemplo, con un DI de 2 mm) con un ajuste luer 33, y el perfusante que fluye desde el hígado se exporta por el tubo de silicona y se desecha.

40 El hígado conectado al circuito de pre-perfusión se puede conectar al circuito de perfusión que se muestra en la Figura 1 desconectando la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y la cánula de salida 30 del flujo de perfusante de los tubos de silicona por los ajustes luer 23 y 33, y entonces se conectan los ajustes luer 23 y 33 a los ajustes luer de los tubos de silicona 80 y 82 (Figura 1).

45 Aunque la vista del dispositivo 1 de cultivo del hígado se ha descrito como un ejemplo del dispositivo de perfusión del cultivo de acuerdo con la presente invención, también se puede cultivar por perfusión otro órgano, etc. con una configuración similar al dispositivo 1 de cultivo del hígado. Por ejemplo, el riñón puede cultivarse por perfusión con una configuración similar. En dicho caso, la configuración se puede alterar como se describe a continuación.

50 Por ejemplo, las cánulas son similares a los empleados para el cultivo de perfusión que se muestra en la Figura 3, excepto que las partes de catéter 109 y 110 de agujas incorporadas (por ejemplo, de 26G para la entrada de flujo y 16G para la salida de flujo) se utilizan para las cánulas de entrada/salida del flujo de perfusante, y la parte de la punta 111 de una punta de carga de gel con una punta estrecha (por ejemplo GELoader Tip 0,5-20 ml de Eppendorf) se utiliza para la cánula ureteral.

Además, la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante, la cánula de salida 30 del flujo de perfusante son similares al caso del hígado excepto en que cada una se conectan directa o indirectamente a, por ejemplo, la arteria renal del riñón y la vena renal del riñón, y el conducto urinario, respectivamente.

55 La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se une al tubo de silicona 80 (por ejemplo, con un DI de 1,0 mm) con el ajuste luer 23 (por ejemplo, para un DI de 1,5 mm), y el tubo de silicona se conecta de manera similar a un tubo Pharmed con un ajuste luer. Se aplica grasa fluorada al tubo Pharmed (por ejemplo, con un DI de 1,6 mm), y se

inserta a la bomba peristáltica 70 de entrada del flujo de perfusante.

5 La cánula de salida 30 del flujo de perfusante se une al tubo de silicona 82 (por ejemplo, con un DI de 1 mm) con el ajuste luer 33 (por ejemplo, con un DI de 1,5 mm). Este tubo de silicona se conecta adicionalmente al tubo de Teflon T1 de los tres tubos de Teflon (por ejemplo, con un DI de 1 mm; T1 y T2, el tercer tubo no se muestra) que perforan el borde de la botella Scott con un tapón 60 de silicona (por ejemplo, de 100 ml)

10 Por otra parte, a uno de los dos tubos de Teflon restantes de la botella de Scott 60, se conecta un tubo de silicona (por ejemplo, con un DI de 2 mm) lo suficientemente largo como para alcanzar el fondo de la botella en el interior (T2 en la Figura 1), y se conecta en el exterior un tubo Pharmed que tiene tubos de silicona (por ejemplo, con un DI de 2 mm) unidos en ambos lados. El otro extremo del tubo de silicona se conecta mediante la bomba peristáltica 72 de salida de flujo de perfusante al tubo de Teflon T3 (ASONE) que no tiene un tubo de silicona unido en el interior de la botella y la punta no alcanza la superficie de líquido, entre los tres tubos de Teflon (T3 y T4, el tercer tubo no se muestra) perforan el borde derecho del matraz de agitación con el microportador con un tapón de silicona (por ejemplo, de 1000 ml) 62 en la Figura.

15 El tercer tubo de Teflon perfora el borde de la botella Scott 60 se conecta a un filtro de aire en el exterior de la botella.

Además, el tubo de recuperación del perfusante, el dispositivo de eliminación de burbujas, y el circuito de perfusión de intercambio de medio se puede utilizar en una configuración similar al dispositivo de cultivo del hígado.

20 El circuito de pre-perfusión que se muestra en la Figura 5 se construye de manera que el perfusante también se pueda bombear durante la retirada del riñón. La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se une a un tubo de silicona (por ejemplo, con un DI de 1,0 mm) con el ajuste luer 23, y este tubo de silicona se conecta al dispositivo de eliminación de burbujas 50', un tubo Pharmed (por ejemplo, con un DI de 1,6 mm) aplicado con grasa fluorada se une adicionalmente, y se inserta en la bomba peristáltica 94. Un tubo de silicona (por ejemplo, con un DI de 1,0 mm) se une al otro extremo del tubo Pharmed para bombear el perfusante desde la botella Scott 92.

25 El perfusante bombeado de esta manera desde la botella Scott 92 fluye por el riñón a través de la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y fluye hacia fuera por la cánula de salida 30 del flujo del perfusante. La cánula de salida 30 del flujo del perfusante se une a un tubo de silicona (por ejemplo, con un DI de 2 mm) con ajuste luer 33, y el flujo de perfusante que sale del riñón se exporta desde el tubo de silicona y se desecha. El riñón conectado al circuito de pre-perfusión se puede conectar al circuito de perfusión que se muestra en la Figura 1 desconectando la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante del tubo de silicona por el ajuste luer 23, y conectando entonces al ajuste luer 23 al ajuste luer del tubo de silicona 80 (Figura 1).

30 Los términos que se utilizan en el presente documento describen realizaciones particulares, y no se pretende que limiten la invención.

35 Además, la expresión "que comprende" y "que incluye" como se utiliza en el presente documento pretende, a menos de que el contexto indique claramente otra cosa, que los artículos establecidos (partes, etapas, elementos, números, etc.) existen, y no excluyen la existencia de otros artículos (partes, etapas, elementos, números, etc.).

40 A menos de que se defina otra cosa, todos los términos que se utilizan en el presente documento (incluyendo los términos técnicos y científicos) tienen el mismo significado que reconocen ampliamente los expertos en la técnica de la tecnología a la que pertenece la presente invención. Los términos que se utilizan en el presente documento, a menos de que se defina explícitamente otra cosa, se debería considerar que tienen los significados consistentes con los significados del presente documento y en el campo tecnológico relacionado, y no se deben considerar como significados idealizados o excesivamente formales.

Las realizaciones de la presente invención se pueden describir en referencia a los diagramas esquemáticos. En dicho caso se puede exagerar su presentación con el fin de clarificar la descripción.

45 Los términos tales como primero y segundo se puede emplear para expresar distintos elementos, pero se reconocerá que estos elementos no se limitan a estos términos. Estos términos se emplean para diferenciar un elemento de otro elemento, y, por ejemplo, es posible, sin alejarse del alcance de la invención, describir el primer elemento como el segundo elemento, y de manera similar describir el segundo elemento como el primer elemento.

50 La presente invención se describirá ahora en detalle en referencia a Ejemplos. Sin embargo, la presente invención puede realizarse mediante distintos aspectos, y no se considerará que está limitada por los Ejemplos que se describen en el presente documento.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora específicamente en los Ejemplos, pero no se limitará a estos de ninguna manera.

1. Preparación del perfusante

El perfusante que es empleado era un medio L-15 (Sigma, Missouri, EE. UU.) suplementado con un 10 % de FCS (Life Technologies, California, EE. UU.) y una solución mixta de antibióticos-antifúngicos (nacalai tesque, Japón), sulfato de gentamicina (Wako, Osaka, Japón), L-Glutamina (Life Technologies). Se colocaron 1000 ml del perfusante en un matraz de agitación con el microportador (Bellco) de 1000 ml con un tapón de silicona, y se mantuvo caliente a 37 °C.

2. Extirpación del hígado y conexión al circuito de pre-perfusión

El hígado se extirpó de una rata, y se conectó al circuito de pre-perfusión que se muestra en la Figura 5.

Se cargó un desecador con dietil éter (Wako), se transfirió una rata Wistar (SLC) de 8-10 semanas de edad al desecador para la anestesia inhalatoria, y entonces se le inyectaron 400 µl de una solución de pentobarbital sódico (TCI, Tokyo, Japón) a una concentración final de 25 mg/ml con una aguja de inyección de 25G (Terumo) y una jeringa de 1 ml (Terumo).

Se hizo una incisión en la piel de la rata bajo anestesia profunda desde el abdomen inferior a debajo de la garganta a lo largo de la línea media. Se incidió el peritoneo, y se retiraron los órganos del sistema digestivo para exponer el hígado y la vena porta. El hígado se levantó hacia la costilla para exponer la arteria hepática y se empujó una sutura de seda del N.º 7 (Natume) por debajo de la arteria hepática y se ligó. De manera similar, se empujó una sutura de seda N.º 4 (Natume) por la vena cava inferior subhepática para crear un lazo de ligadura. Se empujó una sutura de seda N.º 7 (Natume) a través de la vena esplenogástrica y se ligó. Dos suturas de seda dobladas del N.º 4 (Natume) se empujaron a través de la vena porta con un intervalo para crear dos lazos de sutura. El perfusante se hizo fluir a través del circuito de pre-perfusión (Figura 5) con un avance de 10 ml/min, la vena porta se seccionó en el sitio más lejano del hígado de los dos lazos de ligadura de la vena porta, y se insertó rápidamente la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante en la vena porta. La vena cava inferior subhepática se cortó inmediatamente corriente abajo del lazo de ligadura para permitir la entrada del flujo de perfusante.

Los dos lazos de ligadura de la vena porta se ligaron para fijar la cánula 20 a la vena porta, y la parte de canulación se fijó con una pequeña cantidad de Aron Alpha A (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japón). El conducto biliar común se seccionó y se insertó la cánula biliar 40, y entonces se fijó con Aron Alpha A (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japón). Se expuso el diafragma, y se ligaron las arterias/venas frénicas izquierda y derecha con una sutura del N.º 7 (Natume).

El diafragma se cortó junto con la costilla haciendo incisiones entre las costillas, y la parte de la costilla por encima de la incisión que se cortó hasta la garganta. Se hizo una incisión en una parte de la costilla, se empujó una sutura de seda N.º 4 (Natume) a través de la vena cava inferior suprahepática, y se crearon dos lazos de ligadura. Los lazos se ligaron, se detuvo la salida de flujo de perfusante a partir de la vena cava inferior subhepática, y el atrio derecho se seccionó. Se insertó la cánula de salida 30 del flujo de perfusante en la parte seccionada del atrio derecho, se ligaron los dos lazos de ligadura de la vena cava inferior suprahepática para fijar la cánula, y las partes de ligadura y canulación se fijaron con Aron Alpha A. Después de extirpar los órganos alrededor del hígado y el tejido conjuntivo, se separó el hígado cortando por su parte trasera con la costilla y el diafragma unidos aún al hígado.

3. Conexión al circuito de perfusión hepático

3-1. Fijación estática (procedimiento convencional)

Primero, mientras continúa conectado el circuito de pre-perfusión, se fijó la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante a la fijación 96 del vaso de cultivo 10, la cánula de salida 30 del perfusante se fijó a la fijación 98, y la cánula biliar 40 también se fijó a una fijación (no mostrada). La cánula biliar 40 se conectó mediante una fijación luer 43 (ISIS) al circuito de recuperación de bilis que fluye al exterior del vaso de cultivo 10 (tubo 88 y botella Scott 68).

A continuación, el tubo de silicona (ASONE) conectado a la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se pinza con un fórceps hemostático de Pean (Natume) para detener temporalmente el flujo de líquido, y entonces la cánula de salida 30 del flujo de perfusante se une inmediatamente al tubo 82 con el ajuste luer 33 (ISIS), y se conecta al circuito de perfusión. Entonces, la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se cortó inmediatamente del circuito de pre-perfusión con el ajuste luer 23 (ISIS), y se une a la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y el tupo 80 mediante el ajuste luer 23 (ISIS), conectado de manera estéril al circuito de perfusión precargado con la solución de cultivo y con las burbujas eliminadas para evitar la entrada de burbujas en el hígado. Además, el flujo de líquido en el circuito de perfusión se inició simultáneamente retirando los fórceps hemostáticos de Pean (Natume) del circuito de perfusión.

El hígado 100 se montó en una plataforma en el vaso de cultivo 10.

3-2. Fijación estática en solución (procedimiento convencional)

El hígado 100 se conectó al circuito de perfusión con un procedimiento similar a 3-1.

El hígado 100 se montó en la plataforma en el vaso de cultivo 10, se cubrió con una gasa de manera que el hígado no flotara debido a la flotación cuando el vaso de cultivo 10 se llena con líquido, dejando suficiente espacio para evitar la compresión, y la gasa se fija a la plataforma.

Entonces, el vaso de cultivo 10 se llenó con PBS (-) permitiendo que el hígado flote suavemente y el vaso se selló.

5 3-3. Fijación en suspensión (Procedimiento de la presente invención)

El hígado 100 se conecta al circuito de perfusión con un procedimiento similar a 3-1.

10 Como se muestra en la Figura 2, después de que las costillas 104 se fijen en varios sitios de la fijación 109 enganchada en el vaso de cultivo 10 con sutura de seda N.º 4 (Natume) 106, el vaso de cultivo 10 se selló, el vaso de cultivo se coloca verticalmente de manera que la cánula de entrada 20 del flujo se colocará en el lado inferior, y el hígado 100 estaba suspendido por las costillas 104 y el diafragma 102.

3-4. Fijación en suspensión en solución (Procedimiento de la presente invención)

El hígado 100 se conectó al circuito con un procedimiento similar a 3-1.

15 Después de fijar las costillas 104 en varios sitios de la fijación 108 anclada al vaso de cultivo 10 con sutura de seda N.º 4 (Natume) 106, el vaso de cultivo 10 se cargó con PBS (-) para permitir que el hígado flotara. El vaso de cultivo se selló, el vaso de cultivo 10 se colocó verticalmente de manera que la cánula de entrada 20 del flujo se coloca en el lado inferior y el hígado 100 está suspendido por las costillas 104 y el diafragma 102 y flotaba.

4. Perfusión del cultivo del hígado

La bomba peristáltica 70 (IWAKI) entre la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y el matraz de agitación 62 con el microportador (Belico) se ajustó a un caudal de 10 ml/min, y el perfusante se deja fluir en el hígado 100.

20 La altura del vaso de cultivo se ajusta de manera que el caudal de salida sea de 10 ml/min por gravedad debido a la diferencia de elevación elevando y manteniendo el vaso de cultivo más alto en dirección vertical respecto al matraz de agitación 62. El ajuste de estas caudales se llevó a cabo con la cantidad de perfusante recuperado por el tubo de recuperación de perfusante durante cierto periodo de tiempo. Además, la bomba peristáltica 72 entre la botella Scott de 100 ml 60 (DURAN) y el matraz de agitación 62 con el microportador (IWAKI) también se ajustó para que tuviera un caudal de 10 ml/min. Además, se instalaron filtros de aireación (Millipore) en los bordes de la botella Scott 60 y el matraz de agitación 62 con el microportador de manera que la presión en el circuito no cambie por la bomba peristáltica 72.

5. Verificación de la circulación del perfusante por los vasos sanguíneos en el órgano

30 Para los hígados fijados con cada procedimiento de fijación descritos en 3-1 a 3-4, la apariencia y las imágenes micro-CT de los hígados se fotografiaron después de bombear 10 ml de una solución de azul tripano (Sigma) diluida 5 veces en PBS (-) de acuerdo con el procedimiento de "4. Perfusión de cultivo en el hígado". El resultado se muestra en la Figura 6. En la figura 6, 3-1 muestra la fijación estática convencional, 2-3 muestra la fijación estática en líquido, 3-3 muestra la fijación suspendida, y 3-4 muestra la fijación suspendida en líquido. En la Figura 6, A es la fotografía que muestra la apariencia del hígado, y B muestra la imagen micro-CT del hígado. En las fotografías que muestran la apariencia, el área incluida en la línea discontinua es la parte teñida por el azul tripano.

35 Para la fijación estática convencional (3-1) y la fijación estática en líquido (3-2), no se teñía de azul todo el órgano, y no se observó tinción en el área en el que cada lóbulo del hígado se dobla sobre el otro. Por la fijación suspendida (3-3), aunque se observaba una parte sin tinción existente, casi todas las partes del órgano estaban teñidas, y estaba claro que la circulación del perfusante en el órgano había mejorado en comparación con la fijación estática convencional o la fijación estática en líquido. Para la fijación suspendida en líquido (3-4), se demuestra que la circulación estaba más mejorada que en la fijación suspendida y el perfusante circulaba por todos los vasos sanguíneos en el órgano ya que todo el órgano estaba prácticamente teñido de azul.

6. Medición de la velocidad de perfusión

45 Para los hígados fijados con los procedimientos de fijación descritos en 3-1 y 3-4 y cultivados por perfusión durante 24 horas, el perfusante se recolectó durante 30 segundos en un tubo de 15 ml (BD) conectado a la llave de paso conducto de flujo cada hora, y se midieron la velocidad del flujo de perfusante en el hígado y la velocidad de flujo del perfusante que sale fluyendo del hígado. El porcentaje de la cantidad de flujo de salida con respecto a la cantidad de flujo de entrada se calculó como la velocidad de perfusión.

50 Una velocidad de perfusión del 90 % o más se mantuvo durante 24 horas en todos los casos, confirmando que se había llevado a cabo la perfusión normal del cultivo.

7. Medición de la actividad enzimática alterada

El perfusante se recuperó durante 30 segundos en un tubo de 15 ml (BD) conectado a la llave de la vía de flujo cada hora, se hicieron alícuotas del perfusante recuperado en partes de 50 µl en tubos de 0,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), y se crioconservaron a -80 °C. En una fecha posterior, el perfusante crioconservado se descongeló, se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos, y se midieron las actividades enzimáticas de la GOT y GPT del sobrenadante de acuerdo con el procedimiento adjunto al Ensayo-CII de Transaminasas Wako (Wako). Las mediciones después del intercambio del perfusante se calcularon añadiendo el valor de la medición que cambia antes y después del intercambio.

La medición resultante se muestra en la Figura 7. Para cada una de las fijaciones estáticas convencionales, la fijación suspendida, y la fijación suspendida en solución, la GOT era de 20 UI o menos/medio total y la GPT era de 10 UI o menos/medio total hasta las 18 horas de perfusión de cultivo.

Para la fijación estática convencional (3-1) después de 24 horas de cultivo, la GOT era de 85 UI o más/medio total y la GPT era de 30 UI o más/medio total, y para la fijación suspendida (3-3), la GOT era de 70 UI o más/medio total y la GPT era 35 UI o más/medio total. Por otra parte, para la fijación suspendida en solución (3-4) después de 24 horas de cultivo, la GOT era de 40 UI o menos/medio total y la GPT era de 10 UI o menos/medio total. En consecuencia, estaba claro que en la fijación suspendida en solución en la que estaba asegurada la circulación a todos los vasos sanguíneos del órgano, la incapacidad del órgano se suprime en comparación con la fijación estática o la fijación suspendida.

8. Medición de la cantidad de síntesis de urea

Se recuperó el perfusante durante 30 segundos en un tubo de 15 ml (BD) conectado a la llave de paso 84 cada hora, y se hicieron alícuotas del perfusante recuperado en partes de 1 ml en tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), y se crioconservó a -80 °C. En una fecha posterior, el perfusante crioconservado se descongeló, se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos y se midió la urea de acuerdo con el procedimiento adjunto al kit F (J.K Internacional). Las mediciones después del intercambio de perfusante se calcularon añadiendo el valor de la medición que cambiaba antes y después del intercambio.

El resultado de la medición se muestra en la Figura 8. Para la fijación suspendida en solución, las mediciones eran de 1,098 mM hasta las 14 horas de perfusión del cultivo, 2,566 mM a las 34 horas del cultivo, y 3,529 mM a las 41,5 horas del cultivo.

En consecuencia, está claro que en la fijación suspendida en solución en la que se asegura la circulación a todos los vasos del órgano, la capacidad de síntesis de urea se mantiene más allá del límite de conservación del procedimiento convencional que es de 20 horas.

9. Medición de la cantidad de secreción de bilis

Para la cantidad de bilis recuperada en el circuito de recuperación de bilis (tubo 88 y botella Scott 68), la cantidad de secreción de bilis se midió con una báscula electrónica a partir del peso recuperado cada hora.

El resultado de la medición se muestra en la Figura 9. Para la fijación suspendida en solución, se verificó que la secreción biliar cronológica de 0,06 g por hora desde el inicio de la perfusión del cultivo hasta las 40 horas de cultivo.

En consecuencia, estaba claro que en la fijación suspendida en solución en la que se asegura la circulación en todos los vasos del órgano, la productividad biliar se mantiene más allá del límite de conservación hepática del procedimiento convencional que es de 20 horas.

10. Extirpación del riñón y conexión al circuito de pre-perfusión

El riñón se extirpó de una rata, y se conectó al circuito de pre-perfusión que se muestra en la Figura 5 en vez del hígado mediante las cánulas 20 y 30 de entrada del flujo/salida del flujo de perfusante empleadas para el cultivo de perfusión renal.

Se llenó un desecador con dietil éter (Wako), se transfirió una rata Wistar (SLC) de 8-10 semanas de edad al desecador para la anestesia por inhalación, y entonces se le inyectó por vía intraperitoneal 400 µl de una solución de pentotal sódico (TCI, Tokyo, Japón) a una concentración final de 25 mg/ml con una aguja para inyección de 25G (Terumo) y una jeringa de 1 ml (Terumo).

Se hizo una incisión en la piel de la rata bajo anestesia profunda desde el abdomen inferior hasta debajo de la garganta a lo largo de la línea media. Se incidió el peritoneo, y se retiraron los órganos del sistema digestivo para exponer el riñón, la arteria renal, la vena renal, y el conducto urinario. La arteria renal, la vena renal y el conducto urinario se separaron del tejido circundante, se empujaron suturas de seda N.º 4 (Natume) por debajo de cada uno de la arteria renal, vena renal y conducto urinario, y se crearon dos lazos de sutura para cada uno. El perfusante se hizo fluir a través del circuito de pre-perfusión (Figura 5) avanzando a 0,2 ml/min, la arteria renal se seccionó en un sitio lejano al riñón de los lazos de ligadura de la arteria renal, y se insertó rápidamente la cánula de entrada 20 del

flujo de perfusante en la arteria renal. La vena cava dorsal se cortó inmediatamente para permitir la entrada del flujo de perfusante.

5 Los dos lazos de ligadura de la arteria renal se ligaron para fijar la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante a la arteria renal, la vena renal se seccionó, y la cánula de salida 30 del flujo de perfusante se insertó rápidamente en la vena renal. Los dos lazos de la ligadura de la vena renal se ligaron para fijar la cánula de salida 30 del flujo de perfusante, y la parte de la canulación se fijó con una pequeña cantidad de Aron Alpha A (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japón). el conducto urinario se seccionó y se insertó la cánula ureteral 40, se ligó el lazo, y entonces se fijó con Aron Alpha A (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japón).

10 Con el fin de extirpar el riñón, después de escindir otros órganos, se extrajo el riñón desde la parte trasera con el tejido adiposo circundante del riñón aún adherido al riñón.

11. Conexión al circuito de perfusión renal

11-1. Fijación estática (Procedimiento convencional)

15 Primero, mientras el riñón sigue conectado al circuito de pre-perfusión, la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se fijó a la fijación 96 del vaso de cultivo 10, la cánula de salida 30 del flujo de perfusante se fijó en la fijación 98, y la cánula ureteral 40 se fijó también a una fijación (no mostrada). La cánula ureteral 40 se conectó mediante una fijación luer 43 (ISIS) al circuito de recuperación de orina que fluye fuera del vaso de cultivo 10 (tubo 88 y botella Scott 68).

20 A continuación, el tubo de silicona (ASONE) conectado a la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se pinzó con fórceps hemostáticos Pean (Natume) para detener temporalmente el flujo de líquido, y entonces la cánula de salida 30 del flujo de perfusante se unió inmediatamente al tubo 82 con la fijación luer 33 (ISIS), y se conectó al circuito de perfusión. Entonces la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se cortó inmediatamente del circuito de pre-perfusión con la fijación luer 23 (ISIS), y uniendo la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante al tubo 80 mediante la fijación luer 23 (ISIS, se conectó de manera estéril al circuito de perfusión precargado con la solución de cultivo y las burbujas se eliminaron para evitar la entrada de burbujas en el riñón. Además, el flujo de líquido del
25 circuito de perfusión se inició simultáneamente retirando los fórceps hemostáticos de Pean (Natume) del circuito de perfusión.

El riñón se montó en una plataforma del vaso de cultivo 10.

11-2. Fijación suspendida en solución (Procedimiento de la presente solicitud)

30 Primero, el riñón todavía conectado al circuito de pre-perfusión, el riñón junto con la arteria renal, la vena renal, y el conducto urinario se movió a una almohadilla de silicona mientras se mantenía la relación posicional del riñón, y se fijaron las cánulas 20, 30 y 40 de entrada del flujo/salida del flujo de perfusante/ureteral a la almohadilla de silicona con agujas de inyección 25G (Terumo). Cada cánula se fijó cruzando y pinchando dos agujas de inyección de manera que se disponen a horcajadas como presionándolas hacia abajo. Además, el tejido adiposo circundante del riñón se fijó a la almohadilla de silicona con agujas de inyección de 25G (Terumo).

35 La cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se fijó a la fijación 96 del vaso de cultivo 10, la cánula de salida 30 del flujo de perfusante se fijó a la fijación 98, y la cánula ureteral 40 también se fijó a una fijación (no mostrada). La cánula ureteral 40 se conectó mediante una fijación luer 43 (ISIS) al circuito de recuperación de orina (tubo 88 y botella Scott 68) que fluye fuera del vaso de cultivo 10.

40 A continuación, el tubo de silicona (ASONE) conectado a la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se pinzó con fórceps hemostáticos de Pean (Natume) para detener temporalmente el flujo de líquido, y entonces la cánula de salida 30 del flujo de perfusante se une inmediatamente al tubo 82 con la fijación luer 33 (ISIS), y se conecta al circuito de perfusión. Entonces, la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante se cortó inmediatamente del circuito de pre-perfusión con la fijación luer 23 (ISIS), y uniendo la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y el tubo 80 mediante el ajuste luer 23 (ISIS), se conectó de manera estéril al circuito de perfusión precargado con la solución de
45 cultivo y las burbujas eliminadas para evitar la entrada de burbujas en el hígado. Además, el flujo de líquido del circuito de perfusión se inició simultáneamente retirando los fórceps hemostáticos de Pean (Natume) pinzadas con anterioridad.

50 Después de invertir la almohadilla de silicona a la que está fijado el riñón y suspender el riñón y fijar la almohadilla de silicona a la fijación 108 anclada al vaso de cultivo 10 con suturas de seda N.º 4 (Natume) 106, el vaso de cultivo 10 se llenó con PBS (-) para permitir que el riñón flotara. El vaso de cultivo se selló, el vaso de cultivo 10 se colocó verticalmente de manera que la cánula de entrada de flujo se colocara en el lado inferior, y el riñón estaba suspendido y flotaba mediante el tejido adiposo circundante.

12. Perfusión del cultivo renal

la bomba peristáltica 70 (IWAKI) entre la cánula de entrada 20 del flujo de perfusante y el matraz de agitación 62 con el microportador (Bellco) se ajustó apropiadamente de manera que la cantidad de orina era de 0,3 ml/hora, y se permitió que el perfusante fluyera en el riñón.

- 5 Se permitió que el perfusante saliera fluyendo del riñón por gravedad debido a la diferencia de elevación elevando y suspendiendo el vaso de cultivo más alto en dirección vertical que el matraz de agitación 62. Las demás condiciones eran similares a la de la perfusión de cultivo en el hígado.

13. Medición de la actividad enzimática alterada

- 10 Se hicieron alícuotas de la orina recuperada en el circuito de recuperación de orina (tubo 88 y botella Scott 68) en partes de 50 µl en tubos de 0,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), y se crioconservaron a -80 °C. En una fecha posterior, la orina crioconservada se descongeló, se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos, y se midió la actividad enzimática de GOT/GPT del sobrenadante del mismo de acuerdo con el procedimiento adjunto al Ensayo CII de Transaminasas Wako (Wako).

- 15 Los resultados de la medición se muestran en la Figura 10. Para la fijación estática convencional (11-1) después de 40 horas de cultivo, la GOT era 0,6 UI/riñón o más y la GPT era de 0,08 UI/riñón o más, mientras que para la fijación suspendida en solución (11-2), la GOT era aproximadamente 0,1 UI/riñón y la GPT era casi de 0 UI/riñón. Además, para la fijación suspendida en solución (11-2) después de 60 horas de cultivo, la GOT era aproximadamente de 0,3 UI/riñón y la GPT era aproximadamente de 0,01 UI/riñón. En consecuencia, estaba claro que la incapacidad del órgano se suprime por la fijación suspendida en solución en comparación con la fijación estática convencional.

20 **Descripción de símbolos**

- 25 1: dispositivo de perfusión de cultivo de órganos; 10: vaso de cultivo; 20: cánula de entrada del flujo de perfusante; 21, 31, 41, 109, 110, 111: parte de catéter del hígado/riñón; 22, 32, 42: Parafilm; 23, 33, 43: Parafilm; 24, 34: sutura de seda flexible; 25, 35, 45: tubo de silicona; 30: cánula de salida del flujo de perfusante; 40: cánula biliar/urinaria; 50, 50': dispositivo de eliminación de burbujas; 60, 64, 66, 68, 92: botella Scott; 62: matraz de agitación con el microportador; 70, 72, 74, 78, 94: bomba; 80, 82, 88: tubo; 84, 86: llave de paso; 96, 98: fijación; 99a, 99b: ojal; 100: hígado; 102: diafragma; 104: costilla; 106: sutura, y 108: fijación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la perfusión de un cultivo en un órgano o tejido extirpado de un mamífero, en el que dicho órgano o tejido se extirpa junto con un segundo órgano o tejido que está conectado *in vivo* al órgano o tejido, que comprende:

- 5 una etapa de suspensión del órgano o tejido fijando el segundo órgano o tejido, y
una etapa de perfusión de los vasos sanguíneos del órgano o tejido con un perfusante,
en el que, en la etapa de perfusión, al menos una parte del órgano o tejido está sumergido en un líquido,
en el que el órgano o tejido es un hígado o un riñón, cuando el órgano o tejido es un hígado, el segundo órgano o
tejido es un diafragma o un diafragma y la costilla, y
10 cuando el órgano o tejido es un riñón, el segundo órgano o tejido es el tejido adiposo que circunda el riñón.

Fig.1

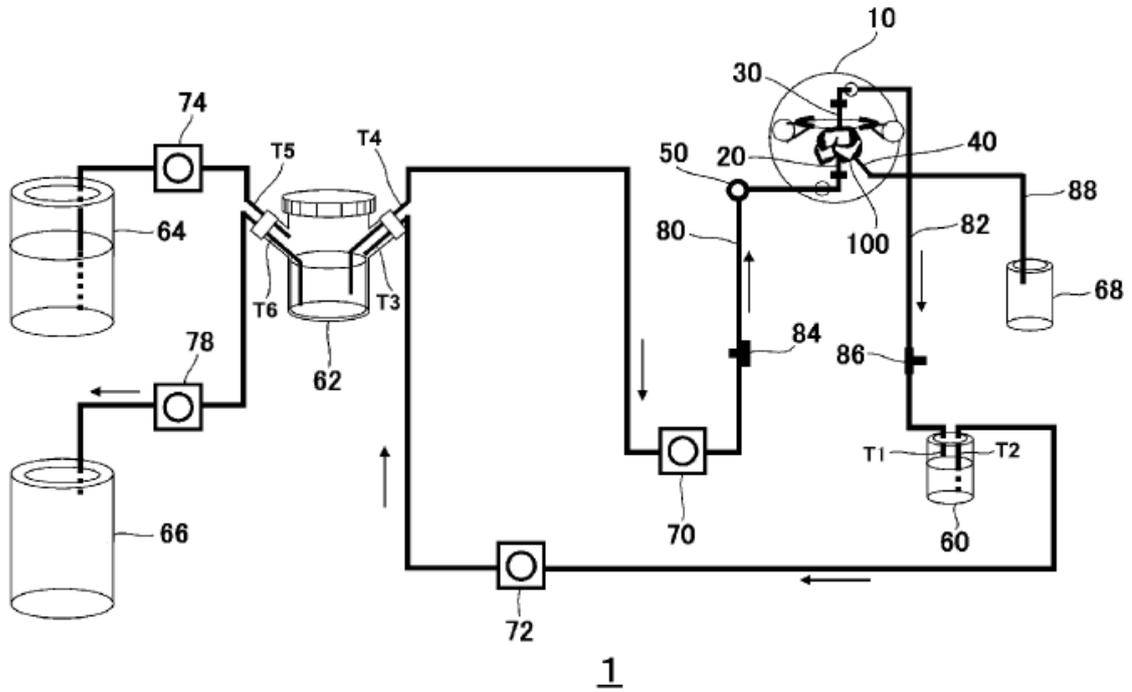


Fig.2

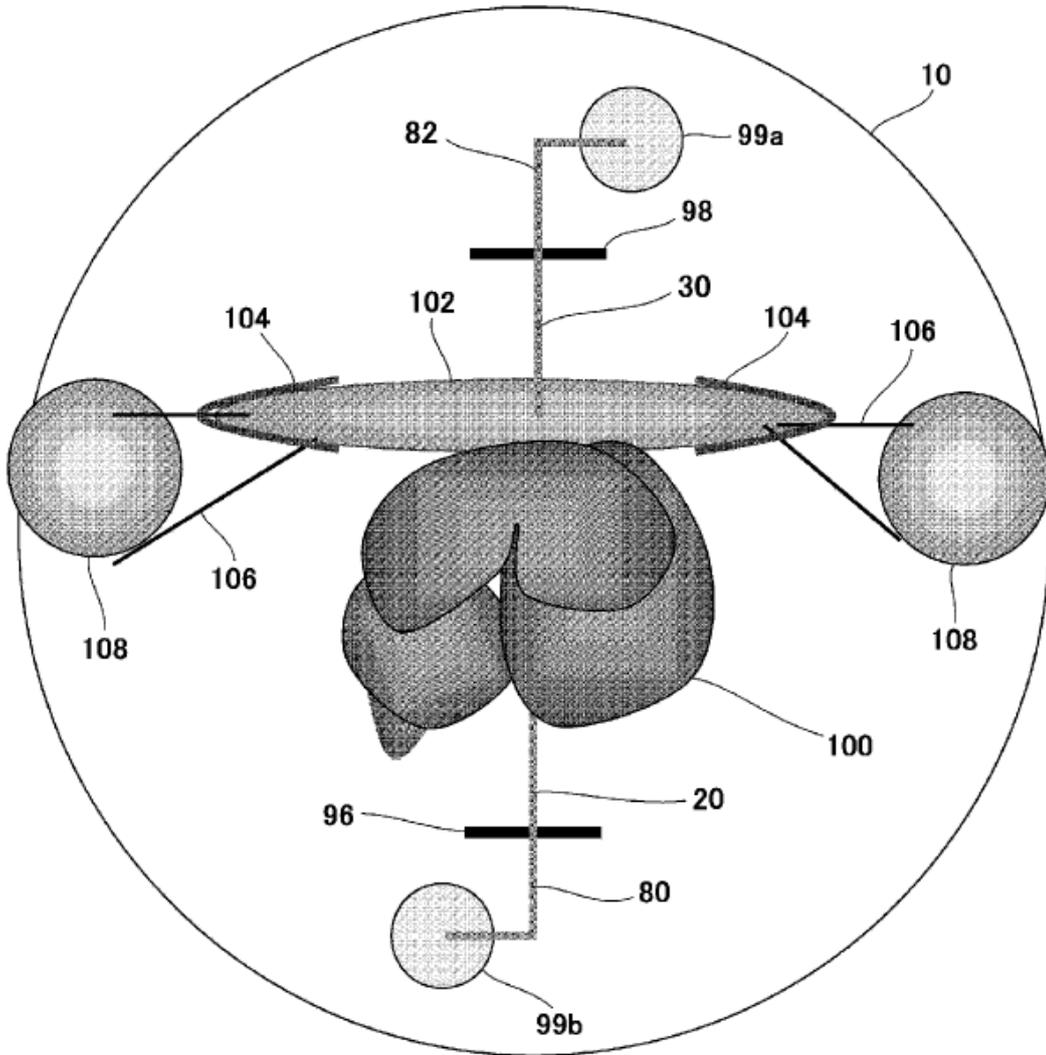


Fig.3

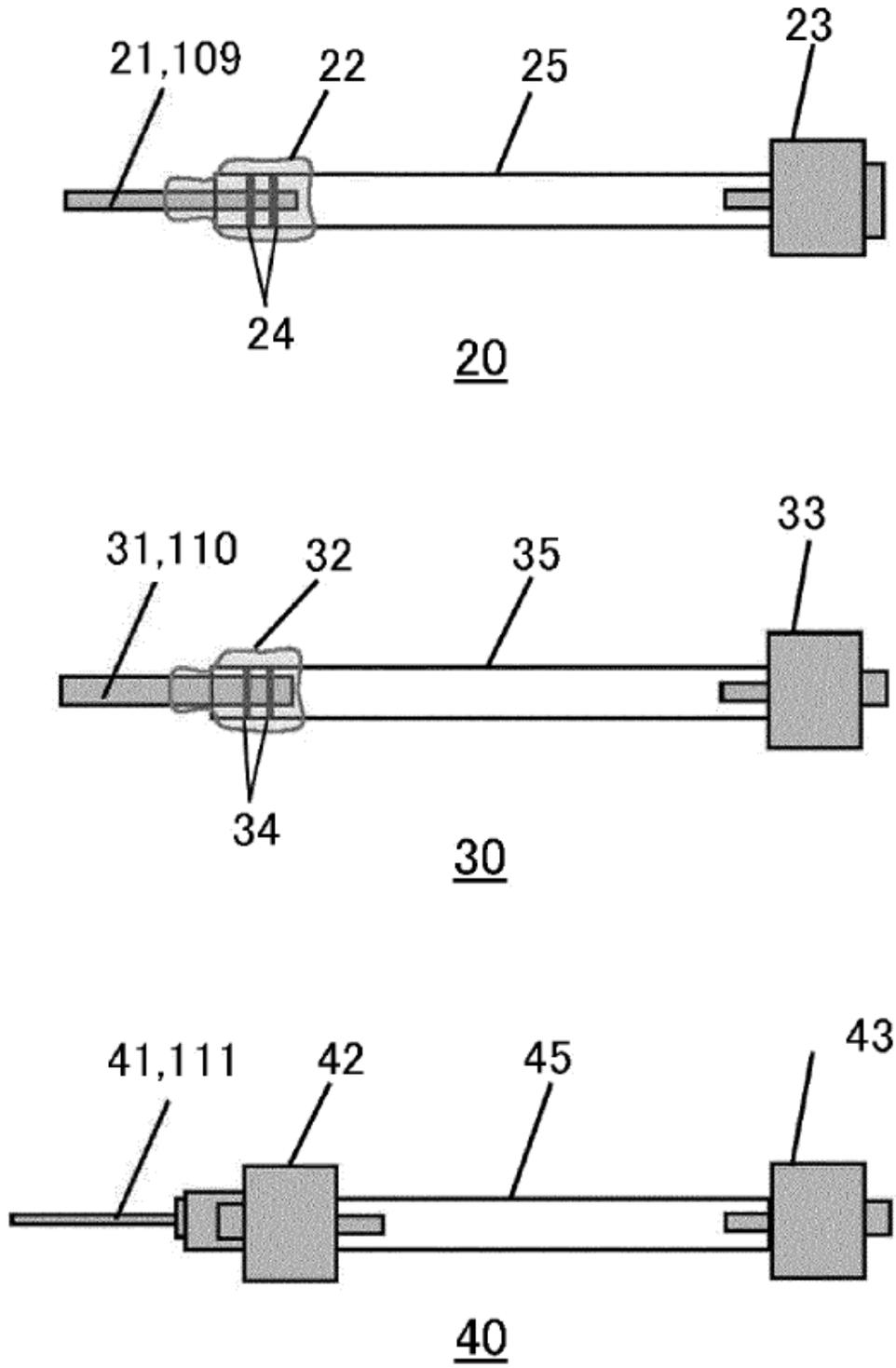


Fig.4

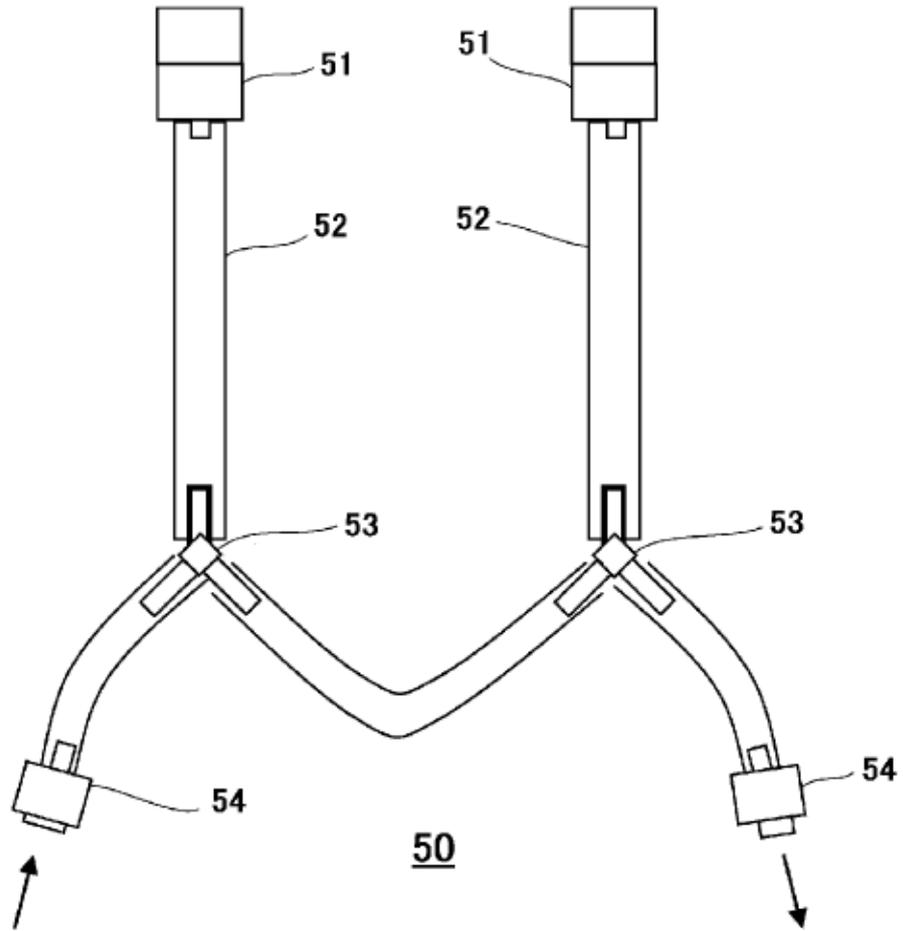


Fig.5

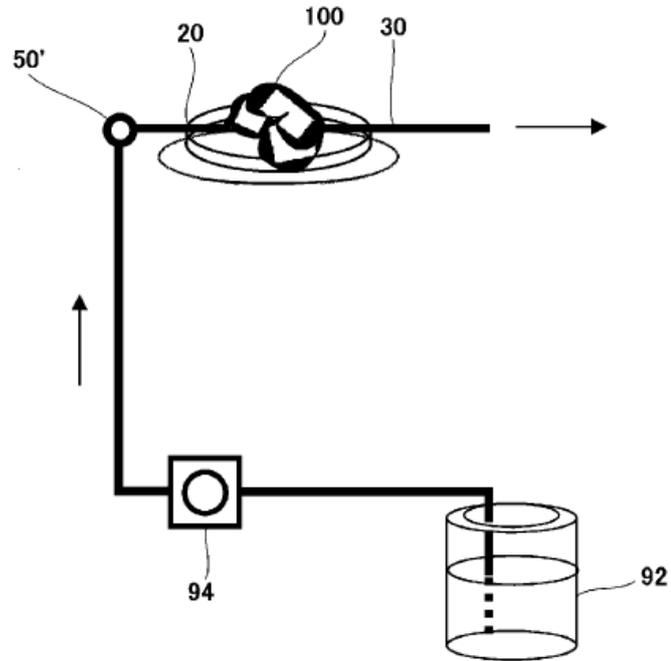


Fig.6

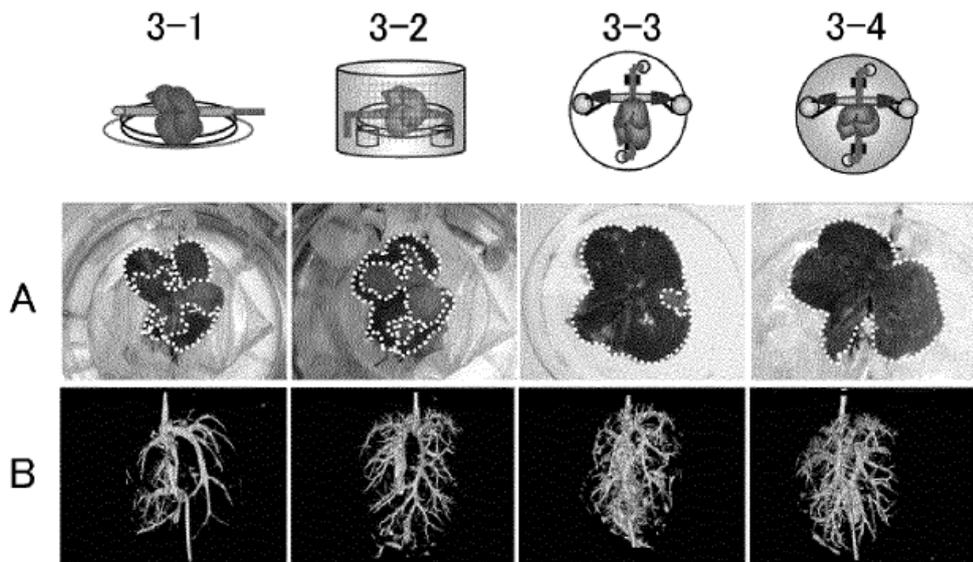


Fig.7

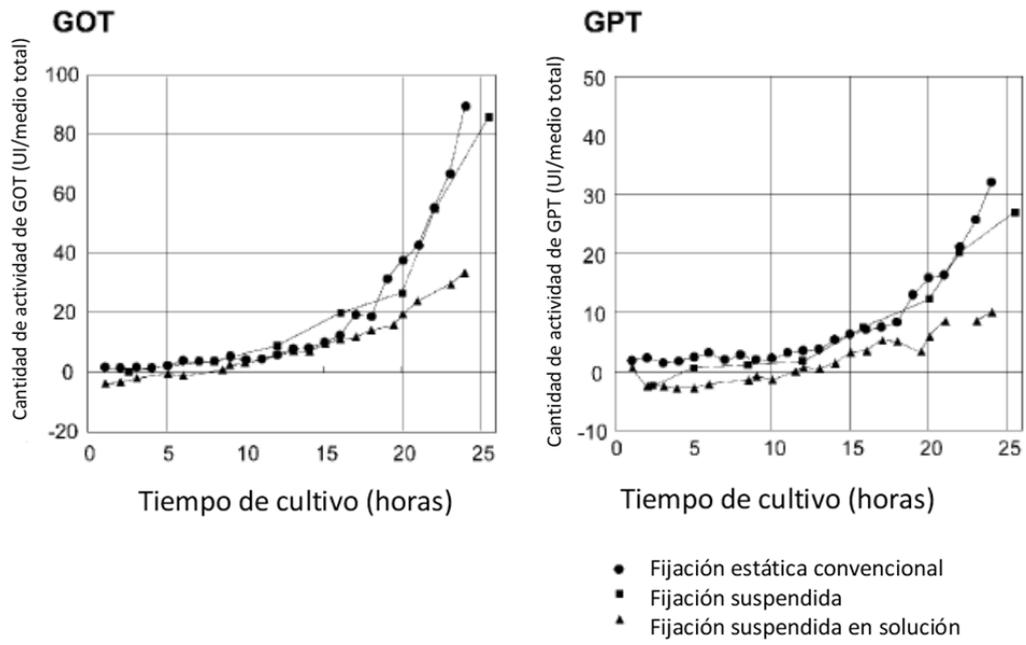


Fig.8

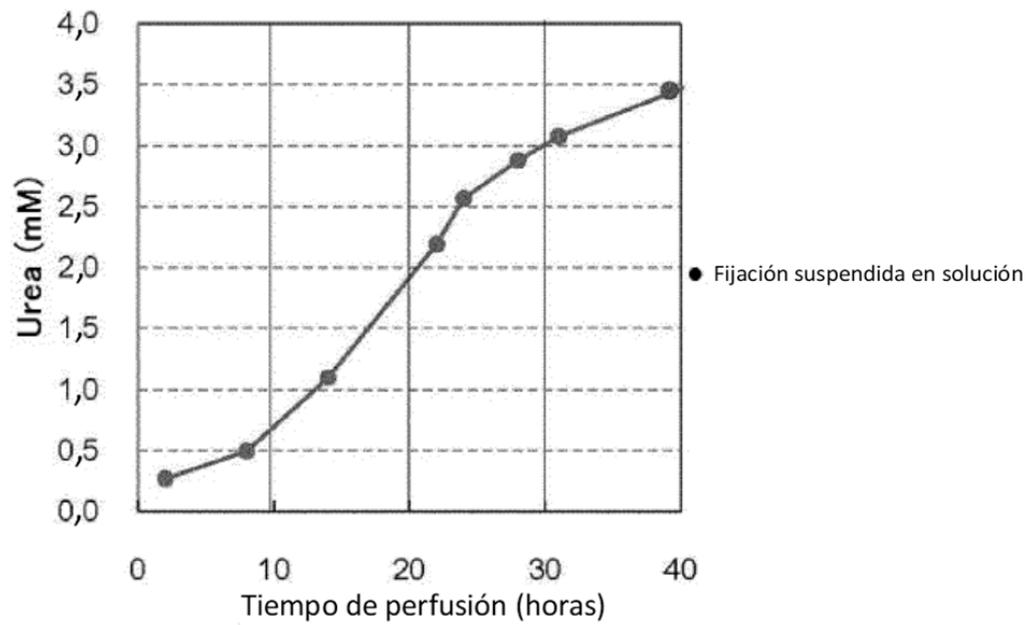


Fig.9

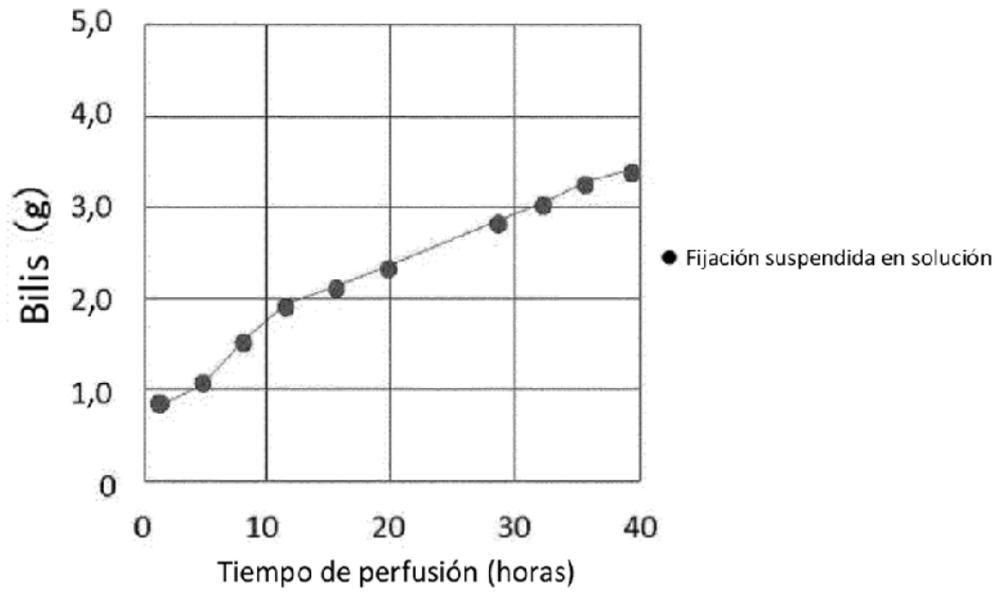


Fig.10

