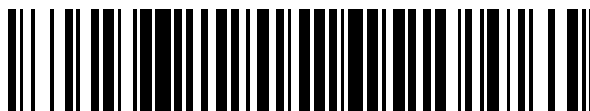


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 480**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2013 PCT/JP2013/073207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14038473**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2013 E 13834977 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2893806**

54 Título: **Método para mantener un órgano o tejido para su uso para trasplante durante un largo período**

30 Prioridad:

08.09.2012 JP 2012197986

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

24.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TSUJI, TAKASHI y
OSHIMA MASAMITSU**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 728 480 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

Método para mantener un órgano o tejido para su uso para trasplante durante un largo período

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un método para mantener un órgano o tejido principalmente para trasplante para la conservación a largo plazo mientras se mantiene la función del órgano o tejido, así como a un método para aislar un órgano o tejido. La presente divulgación también se refiere a un órgano o tejido para trasplante.

10

Técnica antecedente

El trasplante de órganos se realiza actualmente como la terapia principal para la disfunción irreversible de los órganos debido a enfermedades o accidentes. Aunque el número de casos de trasplantes ha aumentado y sus tasas de éxito han aumentado dinámicamente por los avances en los agentes inmunosupresores o las tecnologías de trasplante, la escasez crónica de órganos plantea un grave problema en la atención médica de trasplantes (Bibliografía no de patente 1). A pesar de que se han promovido un método para trasplantar un órgano de trasplante animal o un desarrollo de animales modificados genéticamente con menos tendencia a causar rechazo inmunológico (Bibliografías no de patente 2 y 3) y además un desarrollo de órganos artificiales con el objetivo de reemplazar las funciones de los órganos con materiales artificiales para adaptarse a esta escasez de órganos (Bibliografía no de patente 4), ninguno de los desarrollos tecnológicos ha alcanzado el punto de reemplazar la función de órganos adultos.

15

20

La escasez de órganos donados provistos para trasplante no solo se debe a la cantidad de órganos proporcionados, sino que la corta duración durante la cual el órgano aislado se puede conservar en un estado de trasplante es también una razón importante. Por este motivo, se ha promovido el desarrollo de una tecnología para conservar el órgano aislado *ex vivo* a largo plazo en un estado trasplantable. El método actualmente más ampliamente empleado es un método de enfriamiento simple para reemplazar la sangre en el órgano con una solución de conservación de órganos a baja temperatura y luego sumergirlo en una solución de conservación a baja temperatura para inhibir el metabolismo celular. También hay un método de conservación por perfusión hipotérmica que perfunde el plexo vascular en el órgano con una solución de conservación de órganos a baja temperatura mientras se realiza la conservación por inmersión a baja temperatura con el fin de eliminar los productos de desecho en el órgano en conservación, que se está probando recientemente en Europa y Estados Unidos (Bibliografía no de patente 5). El documento WO 2004/105484 describe un sistema para el soporte metabólico exanguinoso de un órgano o tejido.

25

30

35

Sin embargo, se cree que el tiempo de caducidad seguro de los órganos conservados mediante estos métodos es de 60 horas para riñones y 20 horas para hígados en general, y se ha deseado una tecnología de alargamiento para una mayor duración de la conservación.

40

Por otra parte, además de los problemas anteriores, otro factor que causa la escasez en el número de órganos donados es que los órganos que se pueden proporcionar son limitados porque la mayoría de los donantes registrados mueren de paro cardíaco. En el trasplante de órganos de donantes con paro cardíaco, en contraste con el trasplante de órganos de donantes con muerte cerebral, se detiene el flujo de sangre a los órganos durante un período, en otras palabras, se produce un período de "isquemia caliente" entre el paro cardíaco y el aislamiento y conservación de los órganos. El trastorno de la inflamación celular debido al agotamiento de ATP o la acumulación de productos de desecho como la hipoxantina se produce en un órgano o tejido en un estado de isquemia caliente. La hipoxantina acumulada en las células se metaboliza rápidamente por el perfundido oxigenado cuando se reanuda el flujo de sangre al órgano o tejido. Durante este proceso, el trastorno tisular se puede provocar por la gran cantidad de oxígeno reactivo producido y se puede provocar un shock agudo sistémico en el receptor que recibe el trasplante de órganos mediante citoquinas, etc. secretadas de las células.

45

50

Debido a que un órgano o tejido se vuelve inadecuado para el trasplante de órganos cuando el estado de isquemia caliente continúa durante unos minutos debido a un trastorno de los órganos o tejidos que acompaña a la isquemia caliente y la reperfusión, la tasa de adaptación al trasplante de los órganos de donantes que han muerto por paros cardíacos inesperados fuera de los hospitales es, actualmente, solo el 10 % o menos y además la tasa de injerto de trasplante se mantiene en alrededor del 70 %. (Bibliografía no de patente 6)

55

En otras palabras, la tasa de adaptación de trasplante de órganos de donantes con paro cardíaco se mantiene en un nivel muy bajo en comparación con la tasa de adaptación de trasplante de órganos de donantes con muerte cerebral, y se desea el desarrollo de una tecnología que permita la donación de órganos de donantes con paro cardíaco para ampliar el número de órganos donados.

60

Lista de citas

[Bibliografía no de patente 1] Lechler RI. et al.: Nat. Med. 11 (6): 605, 2005

65 [Bibliografía no de patente 2] Eventov-Friedman S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(8): 2928, 2005

[Bibliografía no de patente 3] Yang YG. et al.: Nat. Rev. Immunol. 7(7): 519,2007

- [Bibliografía no de patente 4] Malchesky PS. et al.: Artif. Organs. 30(9): 655, 2006
 [Bibliografía no de patente 5] Moers C. et al.: N. Engl. J. Med. 360(1): 7, 2009
 [Bibliografía no de patente 6] Fondevila C, et al.: Am. J. Transplant. 12: 162-170, 2012

5 **Sumario de la invención**

Problemas a resolver por la invención

10 El objeto de la presente invención es proporcionar una tecnología que permita la conservación a largo plazo mientras se mantiene la función de un órgano o tejido para trasplante. Un objeto adicional es utilizar esta tecnología para proporcionar una tecnología para inhibir el trastorno de tejido que acompaña a la isquemia caliente y la reperfusión, así como para restaurar un órgano o tejido de un donante con paro cardíaco a un nivel compatible para el trasplante.

15 Medios para resolver los problemas

Como resultado de las investigaciones repetidas por los presentes inventores para resolver los problemas anteriores, se encontró que el trastorno de órganos o tejidos se puede mantener en un estado significativamente reprimido durante mucho tiempo mediante la perfusión de un órgano o tejido para trasplante con un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación sanguínea.

20 Los presentes inventores también han encontrado que el trastorno de órganos o tejidos se puede inhibir adicionalmente de manera significativa mediante el mantenimiento de la temperatura del órgano o tejido durante la perfusión dentro de un intervalo dado.

25 Los presentes inventores han encontrado además que un órgano o tejido que una vez estuvo en un estado de isquemia caliente se puede restaurar a un estado cercano al órgano o tejido antes del paro cardíaco mediante la perfusión del órgano o tejido que ha llegado a estar en un estado de isquemia caliente debido a un paro cardíaco con un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre, y de este modo se logró la finalización de la presente invención.

30 En otras palabras, la presente invención proporciona un método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de un donante que falleció por un paro cardíaco que emplea perfusión mediante un perfundido, que comprende cada uno de las siguientes etapas de (a) conectar una cánula de entrada de perfundido para transmitir dicho perfundido en dicho órgano o tejido, (b) conectar una cánula de salida de perfundido para transmitir dicho perfundido desde dicho órgano o tejido, y (c) perfundir un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de coagulación de la sangre en dicho órgano o tejido mientras mantiene la temperatura del órgano o tejido en un estado de 20 °C - 25 °C, en donde el portador de oxígeno es 0,5 x 10¹¹ células/l - 50,0 x 10¹¹ células/l de eritrocitos.

40 En este caso, un aspecto del método de mantenimiento a largo plazo de un órgano o tejido de mamífero para trasplante se caracteriza por que dicho portador de oxígeno en dicha etapa (c) es eritrocito.

45 Una realización del método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de un donante que murió de un paro cardíaco de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que el perfundido en dicha etapa (c) circula.

50 Una realización del método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de un donante que murió de un paro cardíaco de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que comprende una etapa posterior adicional (d) antes de dicha etapa (c), que perfunde dicho órgano o tejido con un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre para lavar dicho órgano o tejido, y luego eliminar el perfundido empleado para dicho lavado.

55 Una realización del método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de un donante que murió de un paro cardíaco de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que en dicha etapa (c), dicho órgano o tejido se aísla junto con un segundo órgano o tejido que es continuo *in vivo* para dicho órgano o tejido, y la perfusión se realiza con dicho órgano o tejido en un estado suspendido mediante la inmovilización de dicho segundo órgano o tejido.

60 Una realización del método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de un donante que murió de un paro cardíaco de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que en dicha etapa (c), dicho órgano o tejido se sumerge en un líquido para que al menos una parte del mismo reciba flotabilidad.

65 Un aspecto del método de mantenimiento a largo plazo de un órgano o tejido de mamífero para trasplante se caracteriza por que en dicha etapa (c), dicho órgano o tejido se coloca en un estado de temperatura mantenido a 4 °C - 37 °C.

Una realización del método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de

un donante que murió de un paro cardíaco de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que dicho inhibidor de la coagulación de la sangre es heparina.

5 Una realización del método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de un donante que murió de un paro cardíaco de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que dicho órgano o tejido es un órgano o tejido seleccionado del grupo que consiste en el hígado, el riñón, el páncreas, el corazón, el pulmón, el estómago, el testículo, el ovario y el globo ocular.

10 Por otra parte, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se describe un método para aislar dicho órgano o tejido para un mantenimiento a largo plazo de un órgano o tejido de mamífero para trasplante, que comprende las siguientes etapas de (f) aislar dicho órgano o tejido de dicho mamífero y (g) administrar un inhibidor de la coagulación de la sangre a dicho mamífero antes de dicha etapa (f), en donde dicho mamífero no es un ser humano o es un ser humano (pero se limita a un ser humano que es un paciente con muerte cerebral).

15 Además, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se describe un órgano o tejido de mamífero para trasplante, caracterizado por que dicho órgano o tejido se aísla de un mamífero, y la sangre en dicho órgano o tejido se sustituye por un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre.

20 Efectos de la invención

De acuerdo con el método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de acuerdo con la presente invención, mediante la perfusión de un órgano o tejido para trasplante con un perfundido complementado con un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre, se puede mantener un trastorno de un órgano, etc., después del aislamiento del órgano, en un estado significativamente inhibido durante mucho tiempo. Por otra parte, el trastorno de órganos o tejidos se puede mantener en un estado adicional significativamente inhibido durante un largo período de tiempo mediante el mantenimiento de la temperatura del órgano o tejido durante la perfusión dentro de un intervalo dado. Además, mediante la perfusión de un órgano o tejido después de un paro cardíaco con un perfundido complementado con un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre, la estructura y función de un órgano o tejido que se ha vuelto intrasplantable debido al trastorno que sufre de isquemia caliente se puede restablecer a un estado trasplantable. De esta manera, se permite la conservación a largo plazo mientras se mantiene la función de un órgano o tejido para trasplante con el fin de someterlo a trasplante en un buen estado.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra el diagrama esquemático del circuito de perfusión.
 La Figura 2 muestra el gráfico que compara el aumento de la actividad de la ALT en el perfundido cuando el hígado de ratas, inmediatamente después del sacrificio, se perfundió durante 48 horas mediante la alteración de la condición de concentración de eritrocitos en el perfundido.
 La Figura 3 muestra las imágenes de tinción tisular del hígado de ratas inmediatamente después del sacrificio, así como las imágenes de tinción tisular después de que el hígado de ratas, inmediatamente después del sacrificio, se perfundiera durante 48 horas mediante la alteración de la condición de concentración de eritrocitos en el perfundido.
 La Figura 4 muestra el gráfico que compara el aumento de la actividad de la ALT en el perfundido cuando el hígado de ratas, inmediatamente después del sacrificio, se perfundió mediante la alteración de la condición de la temperatura del hígado durante la perfusión.
 La Figura 5 muestra las imágenes de tinción tisular del hígado de ratas inmediatamente después del sacrificio, así como las imágenes de tinción tisular después de que el hígado de ratas, inmediatamente después del sacrificio, se perfundiera mediante la alteración de la condición de la temperatura del hígado durante la perfusión.
 La Figura 6 muestra el diagrama esquemático del lavado del hígado.
 50 La Figura 7 muestra el gráfico que compara el aumento de la actividad de la ALT en el perfundido cuando el hígado de ratas modelo con isquemia caliente se perfundió durante 48 horas con un perfundido complementado o no complementado con eritrocitos.
 La Figura 8 muestra el gráfico que compara la actividad de la ALT en el perfundido durante el lavado del hígado antes del inicio de la perfusión mediante el circuito de perfusión en la Figura 7.
 La Figura 9 muestra las imágenes de tinción tisular del hígado de ratas modelo con isquemia caliente después de 48 horas de perfusión con un perfundido complementado con eritrocitos.
 La Figura 10 muestra las imágenes de tinción tisular del hígado de ratas modelo con isquemia caliente después de 48 horas de perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.
 La Figura 11 muestra la comparación de la cantidad de albúmina en el perfundido cuando el hígado de ratas modelo con isquemia caliente se perfundió durante 48 horas con un perfundido complementado o no complementado con eritrocitos.
 La Figura 12 muestra la comparación de la cantidad de albúmina en el perfundido cuando el hígado de ratas modelo con isquemia caliente se perfundió durante 48 horas con un perfundido complementado o no complementado con eritrocitos.
 65 La Figura 13 muestra el gráfico de los resultados de la medición de la capacidad de síntesis de urea cuando se realizó la prueba de carga de amoníaco con el hígado de ratas modelo con isquemia caliente perfundidas durante

48 horas con un perfundido complementado o no complementado con eritrocitos y el hígado de ratas inmediatamente después del sacrificio.

La Figura 14 muestra las imágenes de tejido cuando se solidificó el plexo vascular intrahepático de las ratas modelo con isquemia caliente perfundidas durante 48 horas con un perfundido complementado o no complementado con eritrocitos y ratas inmediatamente después del sacrificio con gelatina que comprende un tinte fluorescente.

La Figura 15 muestra el diagrama esquemático de cuándo se realiza un trasplante heterotópico en una rata receptora con el hígado de una rata modelo con isquemia caliente.

La Figura 16 es el gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratas receptoras cuando se realizó un trasplante heterotópico después de la perfusión o conservación del hígado de ratas modelo con isquemia caliente mediante diversos métodos.

La Figura 17 muestra las imágenes de tejido del hígado después del trasplante cuando se realizó el trasplante heterotópico después de la perfusión o conservación del hígado de ratas modelo con isquemia caliente mediante diversos métodos.

La Figura 18 muestra el diagrama esquemático de cuando el hígado de una rata modelo con isquemia caliente se trasplanta heterotópicamente a una rata receptora, y luego el hígado del receptor se reseca parcialmente y se liga la vena porta que conduce al hígado del receptor.

La Figura 19 es el gráfico que muestra la tasa de supervivencia de las ratas receptoras cuando el hígado de las ratas modelo con isquemia caliente se trasplanta heterotópicamente, y luego el hígado del receptor se reseca parcialmente y se liga la vena porta que conduce al hígado del receptor.

La Figura 20 es el gráfico de la medición del cambio en el peso del hígado del receptor y del trasplante cuando el hígado de ratas modelo con isquemia caliente se trasplanta heterotópicamente, y luego el hígado del receptor se reseca parcialmente y se liga la vena porta que conduce al hígado del receptor.

La Figura 21 muestra las imágenes de tejido del hígado del receptor y del trasplante después de 1 semana después de que el hígado del receptor se reseca parcialmente y se liga la vena porta que lleva al hígado del receptor.

La Figura 22 muestra las imágenes de inmunotinción (albúmina, BrdU) del hígado del receptor y del trasplante después de 1 semana después de que el hígado del receptor se reseca parcialmente y se liga la vena porta que lleva al hígado del receptor, así como el gráfico que representa el número de hepatocitos o el número de hepatocitos positivos a BrdU dentro de un determinado intervalo de campo.

30 Descripción de las realizaciones

<Método de mantenimiento a largo plazo de un órgano o tejido>

El primer aspecto de la presente divulgación es un método de mantenimiento a largo plazo de un órgano o tejido de mamífero para trasplante que emplea perfusión mediante un perfundido, caracterizado por que comprende cada uno de las siguientes etapas de (a) conectar una cánula de entrada de perfundido para transmitir dicho perfundido en dicho órgano o tejido, (b) conectar una cánula de salida de perfundido para expulsar dicho perfundido desde dicho órgano o tejido, y (c) perfundir un perfundido que comprende eritrocitos y un inhibidor de la coagulación de la sangre en dicho órgano o tejido.

El "mantenimiento a largo plazo" de un órgano o tejido en el presente documento se refiere a un mantenimiento a largo plazo mientras se mantiene la función de un órgano o tejido para trasplante, es decir, se mantiene un estado trasplantable y el método para ello no está particularmente limitado. Por ejemplo, mediante la perfusión de un órgano o tejido para trasplante con un perfundido que comprende eritrocitos y un inhibidor de la coagulación de la sangre, se puede mantener un trastorno de órgano o tejido, después del aislamiento del órgano, en un estado significativamente inhibido durante mucho tiempo.

Hay que tener en cuenta que el método de mantenimiento de un órgano o tejido de mamífero para trasplante que emplea perfusión mediante un perfundido en el presente documento es un método que restaura la función de órganos o tejidos mediante el mantenimiento del metabolismo del órgano o tejido, y puede ser aprehendido como un cultivo de órganos o tejidos que emplea el perfundido como medio de cultivo.

El "trasplante" de un órgano o tejido en el presente documento se refiere a mover e implantar un órgano o tejido del donante al receptor, y el tipo de trasplante no está particularmente limitado. Los tipos de trasplante incluyen, por ejemplo, en términos de clasificación por la relación entre el donante y el receptor, trasplante autólogo, trasplante isogénico, trasplante alogénico, trasplante heterólogo y similares, y por ejemplo, en términos de clasificación por el estado del donante, trasplante vivo, trasplante de muerte cerebral, trasplante de paro cardíaco y similares.

Un "órgano o tejido" en el presente documento no está particularmente limitado siempre que sea un órgano o tejido que se pueda emplear para perfusión, cuyos ejemplos incluyen el corazón, el hígado, el riñón, el pulmón, el páncreas, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso, el testículo, el ovario, el globo ocular, el diente y los tejidos circundantes del mismo, el pelo y los tejidos circundantes del mismo y similares.

Un "órgano o tejido" en el presente documento cuando el donante no es un ser humano puede ser un órgano o tejido en el que las cánulas de entrada y salida del perfundido se conectan a un órgano o tejido para trasplante y el órgano o tejido se aísla después de iniciar la perfusión. Cuando el donante es un ser humano, puede ser un órgano o tejido en el que se conectan las cánulas de entrada y salida del perfundido y se inicia la perfusión después de aislar el órgano

o tejido para trasplante.

Para un "perfundido" en el presente documento, los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente una composición bien conocida o una composición conforme al mismo de acuerdo al tipo de mamífero o tipo de órgano o tejido del sujeto. Los ejemplos pueden ser aquellos que comprenden nutrientes tales como azúcares o aminoácidos necesarios para la supervivencia celular. Se puede emplear un medio de cultivo empleado para el cultivo celular general o una solución de conservación empleada para la conservación de órganos y similares, cuyas composiciones no están particularmente limitadas. El perfundido también puede comprender, por ejemplo, azúcares (glucosa, trehalosa, rafinosa), espesantes (HES, dextrano), antioxidantes (N-acetilcisteína, alopurinol, glutatión), vasodilatadores (nitroglicerina) y citocinas/factores de crecimiento (IGF, FGF, EGF, HGF).

La "perfusión" de un órgano o tejido en el presente documento se refiere a la unión de tubos como las cánulas de entrada y salida del perfundido a los vasos sanguíneos de un órgano o tejido para trasplante, y la transmisión del perfundido dentro y fuera del órgano o tejido de manera similar al flujo sanguíneo. Por ejemplo, cuando el órgano a perfundir es el hígado, el perfundido se puede transmitir desde la vena porta y emitirse desde la vena cava inferior suprahepática, pero también se puede emplear una ruta para transmitir el perfundido desde la arteria hepática. Incluso cuando se emplea un órgano que no sea el hígado, los expertos en la técnica pueden seleccionar los vasos sanguíneos apropiados para emplearlos en la entrada y salida del perfundido y emplearlos para la perfusión.

Un "mamífero" en el presente documento no está particularmente limitado, y el método de mantenimiento de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para todos y cada uno de los órganos o tejidos de mamíferos. Cuando un órgano o tejido mantenido con el método de acuerdo con la presente invención se emplea para trasplante, el mamífero se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el sujeto (receptor) para trasplantar el órgano o tejido, cuyos ejemplos pueden incluir un ser humano, un cerdo, una vaca, un mono, un babuino, un perro, un gato, una rata, un ratón y similares. Cuando el donante es un ser humano, el órgano o tejido empleado principalmente puede ser un órgano o tejido de un donante con muerte cerebral, pero no está limitado al mismo y también puede emplearse un órgano o tejido de un donante con paro cardíaco. Además, el método de mantenimiento a largo plazo de acuerdo con la presente divulgación también se puede emplear, por ejemplo, cuando se emplea un órgano o tejido para trasplante en un ser humano que se cultivó *in vivo* en un mamífero no humano tal como por tecnología de recombinación genética.

Una "cánula" en el presente documento no está particularmente limitada siempre que sea un tubo, etc. para su inserción en el vaso sanguíneo, y se puede seleccionar de manera apropiada de acuerdo con el tipo o tamaño del órgano o tejido, la composición del perfundido y similares.

En el primer aspecto de la presente divulgación, se prefiere a que se administre un inhibidor de la coagulación de la sangre antes del paro cardíaco del mamífero para ser donante. Mediante la administración de un inhibidor de la coagulación de la sangre antes del paro cardíaco del mamífero, se inhibe la coagulación de la sangre en los vasos sanguíneos del órgano o tejido después del paro cardíaco y se puede prevenir el fallo circulatorio que puede ocurrir en el órgano o tejido después del inicio de la perfusión. Sin embargo, el efecto preventivo de la insuficiencia circulatoria por el inhibidor de la coagulación de la sangre comprendido en el perfundido puede obtenerse de manera suficiente incluso sin la administración de un inhibidor de la coagulación de la sangre antes del paro cardíaco.

Un "inhibidor de la coagulación de la sangre" en el presente documento no está particularmente limitado siempre que sea una sustancia que tenga el efecto de actuar sobre el sistema de coagulación de la sangre para inhibir la coagulación, cuyos ejemplos incluyen heparina, warfarina, acenocumarol, fenindiona y similares. Cuando se administra un inhibidor de la coagulación de la sangre antes del paro cardíaco, el método de administración no está particularmente limitado. Por ejemplo, cuando el inhibidor de la coagulación de la sangre es heparina, se puede administrar por vía intravenosa, y cuando el inhibidor de la coagulación de la sangre es warfarina, acenocumarol, fenindiona y similares, se puede administrar por vía oral. Las administraciones intravenosa y oral del inhibidor de la coagulación de la sangre también se pueden utilizar en combinación. Por ejemplo, cuando la heparina se administra por vía intravenosa antes de un paro cardíaco, se administra preferentemente en el intervalo de 20 a 4000 unidades, y más preferentemente se administra en el intervalo de 40 a 2500 unidades.

Por otra parte, la cantidad del inhibidor de la coagulación de la sangre comprendido en el perfundido empleado para la perfusión de órganos o tejidos se puede seleccionar apropiadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el tipo de mamífero u órgano. Por ejemplo, cuando el agente de coagulación de la sangre comprendido en el perfundido es heparina, la cantidad de heparina comprendida en el perfundido está preferentemente en el intervalo de 2500 a 80000 unidades por 1 litro de perfundido, y más preferentemente en el intervalo de 40000 a 60000 unidades por 1 litro de perfundido.

El método para complementar un portador de oxígeno al perfundido en el presente documento no está particularmente limitado, y puede complementarse después de preparar el perfundido o complementarse simultáneamente con la preparación del perfundido. Por otra parte, en un aspecto, mediante el mantenimiento constante de la concentración de oxígeno disuelto en el perfundido, la perfusión se puede realizar mientras se mantiene la función del portador de oxígeno complementado durante un largo tiempo. El método para mantener constante el oxígeno disuelto en el perfundido no está particularmente limitado y, por ejemplo, se puede emplear un dispositivo de cultivo celular animal

simplificado (ABLE, Tokio, Japón) para mantener la concentración de oxígeno disuelto en el perfundido a 6,5 - 7,5 mg/l.

5 Un "portador de oxígeno" en el presente documento no está particularmente limitado siempre que tenga la función de transportar oxígeno mediante la unión al mismo. Por ejemplo, pueden emplearse eritrocitos, perfluorocarbono, hemoglobina del retículo endoplásmico, eritrocitos artificiales y similares.

10 Hay que tener en cuenta que cuando se emplea "eritrocito" como "portador de oxígeno" en el presente documento, el "eritrocito" no está particularmente limitado siempre que se pueda complementar con el perfundido y se puedan emplear eritrocitos de diversos mamíferos. Ejemplos de animales para recolectar eritrocitos pueden incluir seres humanos, cerdos, vacas, monos, babuinos, perros, gatos, ratas, ratones y similares. Cuando el receptor para trasplantar un órgano o tejido es un ser humano, los eritrocitos empleados son preferentemente los que se recogen del propio receptor en términos de inhibir el rechazo del trasplante. Además, incluso cuando los eritrocitos recogidos del propio receptor no se emplean, se prefiere emplear eritrocitos del mismo tipo de sangre que el receptor en términos de inhibir el rechazo del trasplante. El método para preparar eritrocitos tampoco está particularmente limitado y, por ejemplo, se puede preparar mediante la dilución de la sangre recogida de un mamífero con un medio de cultivo, que se somete a centrifugación y luego se lava el componente de plasma sanguíneo.

20 La concentración del portador de oxígeno en el perfundido en el presente documento se puede establecer de manera apropiada por los expertos en la técnica de acuerdo con el órgano o tejido objeto y el tipo de portador de oxígeno utilizado. Por ejemplo, cuando se emplean "eritrocitos" como portadores de oxígeno, la concentración de eritrocitos en el perfundido es preferentemente de $0,5 \times 10^{11}$ células - $50,0 \times 10^{11}$ células por 1 litro de perfundido, más preferentemente $1,0 \times 10^{11}$ células - $50,0 \times 10^{11}$ células por 1 litro de perfundido y lo más preferentemente de $2,0 \times 10^{11}$ células - $50,0 \times 10^{11}$ células por 1 litro de perfundido. Cuando la concentración de eritrocitos en el perfundido es menor que $0,5 \times 10^{11}$ células por 1 litro de perfundido, el suministro de oxígeno al órgano será insuficiente y ocurrirá una necrosis de las células en el órgano, y cuando sea mayor que $50,0 \times 10^{11}$ células por 1 litro de perfundido, puede ocurrir un trastorno de los órganos debido a un infarto de eritrocitos durante la perfusión.

30 La perfusión de un órgano o tejido en el presente documento se realiza mientras se mantiene la temperatura del órgano o tejido en un estado de 20 °C - 25 °C. Durante la perfusión del órgano o tejido, la disfunción del órgano debido a una lesión a baja temperatura se produce cuando la temperatura del órgano o tejido es inferior a 4 °C y se observa un aumento en el valor del trastorno hepático cuando es superior a 37 °C.

35 El método para mantener un órgano o tejido en perfusión a una temperatura constante en el presente documento no está particularmente limitado. Por ejemplo, el órgano o tejido se puede mantener a una temperatura constante mediante la realización de una perfusión mientras se mantiene la temperatura del líquido en el que el órgano o tejido flota a una temperatura deseada. Preferentemente, la temperatura del órgano o tejido se puede mantener a una temperatura deseada mediante el mantenimiento de la temperatura del perfundido perfundido en el órgano o tejido a temperatura ambiente (25 °C) - 37 °C y mediante el mantenimiento de la temperatura del líquido en el que el órgano o tejido flota a 20 °C - 25 °C.

45 El dispositivo para mantener un órgano o tejido en perfusión a una temperatura constante no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede emplear un calentador, etc., para aplicar externamente el cambio de temperatura a un recipiente que comprende el órgano o tejido, o se puede emplear un dispositivo para controlar la temperatura del propio perfundido, etc. para aplicar directamente el cambio de temperatura al perfundido.

50 "Circulación del perfundido" en el presente documento significa que el perfundido emitido desde la cánula de salida del perfundido conectado al órgano o tejido no se descarta, sino que se transfiere al órgano o tejido nuevamente a través de la cánula de entrada del perfundido y esto se repite.

55 Perfundir el perfundido a un órgano o tejido para "lavar" el órgano o tejido en el presente documento significa que el perfundido se transfiere hacia/desde los vasos sanguíneos del órgano o tejido, y el perfundido emitido se elimina sin circulación. Mediante el lavado del órgano o tejido con el perfundido, se eliminan el oxígeno reactivo, el autolisado celular, los microtrombos y similares que se han acumulado en el órgano o tejido en el que se ha detenido el flujo de sangre debido a un paro cardíaco, lo que puede reducir los trastornos de órganos o tejidos causados a partir de allí.

60 En el método de mantenimiento de acuerdo con la presente invención, se puede emplear un órgano o tejido que se aisló junto con un segundo órgano o tejido que es continuo *in vivo* con respecto al órgano o tejido. De acuerdo con dicha configuración, debido a que dicho segundo órgano o tejido se puede inmovilizar para suspender el órgano o tejido a perfundir cuando se realiza la perfusión, la perfusión se puede administrar a cada parte del órgano o tejido sin dañar el órgano o tejido a perfundir.

65 El segundo órgano o tejido es preferentemente un órgano o tejido que es continuo *in vivo* al órgano o tejido, y más preferentemente un órgano o tejido que es continuo *in vivo* a la porción superior del órgano o tejido. El órgano o tejido se puede perfundir en un entorno similar a la configuración *in vivo* mediante la suspensión con dicho órgano o tejido. Un entorno similar a la configuración *in vivo* significa, en el presente documento, un entorno en el que el órgano o tejido puede mantener su forma natural sin estar comprimido a partir de materiales duros como la superficie interna

del recipiente. Dado que la perfusión convencional de órganos o tejidos se realizó mediante la colocación del órgano o tejido en un recipiente, como una placa, los vasos sanguíneos en la porción que se puso en contacto con la placa se comprimieron y la perfusión no se administró lo suficiente. De acuerdo con la realización anterior, debido a que el órgano o tejido está suspendido y perfundido en un entorno similar a la configuración *in vivo*, el perfundido se puede administrar a todo el órgano o tejido.

Por otra parte, cuando se inmoviliza el segundo órgano o tejido, ya que se puede dañar el segundo órgano o tejido, la inmovilización se puede realizar firmemente con un método como insertar un tubo de soporte, pellizcar con una pinza o coser con una sutura quirúrgica. Por ejemplo, cuando el órgano a perfundir es el hígado, el diafragma es continuo por encima del mismo *in vivo* y dicho diafragma está conectado al hueso costal y, por lo tanto, solo el diafragma o tanto el diafragma como el hueso costal se pueden emplear como el segundo órgano o tejido. Si el diafragma se aísla conjuntamente cuando se aísla el hígado de un mamífero, el hígado se puede suspender en un entorno cercano al *in vivo* mediante la inmovilización de dicho diafragma. Si el hueso costal además del diafragma se aísla conjuntamente, será posible una suspensión más estable porque el hueso costal se puede inmovilizar.

Otros ejemplos del segundo órgano o tejido incluyen, pero sin limitación, el tejido graso adherido a la superficie de estos órganos cuando se perfunde el riñón o el páncreas; los órganos adyacentes por detrás cuando se perfunden los órganos del sistema gastrointestinal (específicamente, el estómago o el duodeno cuando se perfunde el intestino delgado o el intestino delgado cuando se cultiva el intestino grueso); el hueso de la mandíbula, el hueso alveolar, el hueso de la raíz del diente y la encía cuando se perfunde el diente y los tejidos circundantes del mismo; la epidermis, la dermis y el tejido adiposo cuando se perfunde el cabello y los tejidos circundantes del mismo, y similares.

Se prefiere que el método de mantenimiento de acuerdo con la presente invención se realice con el órgano o tejido sumergido en un líquido, de modo que al menos una parte del mismo reciba flotabilidad en la etapa de perfusión. Al hacer eso, al menos una parte del órgano o tejido recibirá flotabilidad, lo que permitirá la creación de un entorno más cercano a la configuración *in vivo* en comparación con la suspensión simple, y la perfusión se puede administrar a cada parte del órgano o tejido. El órgano o tejido está, preferentemente, en un estado en el que al menos un 30 % del mismo existe en el líquido, más preferentemente, un 50 %, más preferentemente, un 80 % y, lo más preferentemente, en un estado en el que la totalidad existe en el líquido.

El líquido para sumergir el órgano o tejido, de manera similar al perfundido, se puede seleccionar apropiadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el tipo de mamífero y órgano etc., y puede tener la misma o diferente composición que el perfundido.

En el método de mantenimiento de acuerdo con la presente invención, se prefiere que la perfusión se realice con el órgano o tejido en un estado inmovilizado en un recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos. Para que el órgano o tejido se inmovilice en el recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos, se puede emplear un órgano o tejido que se aisló junto con un segundo órgano o tejido que es continuo *in vivo* al órgano o tejido para el trasplante. El recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos está provisto de un medio de suspensión con el cual el órgano para trasplante se suspende con dicho segundo órgano o tejido. El interior del recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos se puede llenar con un líquido y se configura de manera que el órgano o tejido se pueda sumergir para dar flotabilidad a al menos una parte del mismo. El recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos puede ser de cualquier material y se puede fabricar con, por ejemplo, vidrio o acrílico. En el recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos, un órgano o tejido para el trasplante se inmoviliza mediante la suspensión de dicho segundo órgano o tejido, y el órgano o tejido para el trasplante se encuentra inmerso en un líquido durante la perfusión, lo que permite que se administre el perfundido a cada parte del órgano o tejido sin dañar el órgano o tejido a perfundir.

En otras palabras, la presente divulgación en un aspecto se puede referir como un dispositivo de mantenimiento para un órgano o tejido que comprende un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre, una cánula de entrada del perfundido para transmitir el perfundido en dicho órgano o tejido, y una cánula de salida del perfundido para expulsar el perfundido de dicho órgano o tejido.

Por otra parte, dicho dispositivo de mantenimiento en un aspecto puede comprender un medio de suspensión para suspender dicho órgano o tejido. Además, dicho dispositivo de mantenimiento puede comprender además un recipiente que permita la inmersión de al menos una parte de dicho órgano o tejido en líquido de inmersión de órganos o tejidos con dicho órgano o tejido en un estado suspendido.

El método para medir el grado de daño de un órgano o tejido en el presente documento no está particularmente limitado y puede ser seleccionado apropiadamente por los expertos en la técnica de acuerdo con el órgano o tejido objeto. Por ejemplo, cuando el órgano o tejido objeto es el hígado, el grado de daño hepático se puede medir mediante la actividad de la enzima del trastorno hepático (ALT), el análisis histológico, la medición de la cantidad de producción de bilis, la medición de la cantidad de síntesis de albúmina, la medición de la síntesis de urea mediante la prueba carga de amoníaco, el análisis del plexo capilar intrahepático y similares.

<Método de resección de órgano o tejido>

5 El segundo aspecto de la presente divulgación es un método para aislar un órgano o tejido para mantener un órgano o tejido de mamífero durante un largo tiempo para el trasplante, caracterizado por que comprende las siguientes etapas de (f) aislar dicho órgano o tejido de dicho mamífero y (g) administrar un inhibidor de la coagulación de la sangre a dicho mamífero antes de dicha etapa (f), en donde dicho mamífero no es un ser humano o es un ser humano (pero se limita a un ser humano que es un paciente con muerte cerebral). Los términos utilizados en el primer aspecto de la presente divulgación se emplearán de manera sinónima en el segundo aspecto y se omitirán las descripciones de los mismos.

10 En el segundo aspecto de la presente divulgación, mediante la administración de un inhibidor de la coagulación de la sangre antes del paro cardíaco del donante, se inhibe la coagulación de la sangre en los vasos sanguíneos del órgano o tejido después del paro cardíaco y se puede prevenir el fallo circulatorio que puede ocurrir en el órgano o tejido después del inicio de la perfusión.

15 En el segundo aspecto de la presente divulgación, el método de administración del inhibidor de la coagulación de la sangre no está particularmente limitado. Por ejemplo, cuando el inhibidor de la coagulación de la sangre es heparina, se puede administrar por vía intravenosa, y cuando el inhibidor de la coagulación de la sangre es warfarina, acenocumarol, fenindiona y similares, se puede administrar por vía oral. Las administraciones intravenosa y oral del inhibidor de la coagulación de la sangre también se pueden utilizar en combinación. La dosificación del inhibidor de la
20 coagulación de la sangre tampoco está particularmente limitada y los expertos en la técnica pueden prepararla adecuadamente de acuerdo con el tipo, la edad en semanas y el peso, etc., del mamífero al que se le administrará el inhibidor de la coagulación de la sangre.

25 El momento para aislar un órgano o tejido para trasplante del donante en el presente documento no está particularmente limitado. Por ejemplo, cuando el donante no es un ser humano, las cánulas de entrada y salida del perfundido pueden conectarse a un órgano o tejido para trasplante, y el órgano o tejido se aísla después de iniciar la perfusión. Cuando el donante es un ser humano, las cánulas de entrada y salida del perfundido pueden conectarse después de aislar un órgano o tejido para el trasplante, y la perfusión se inicia a partir de entonces.

30 <Órgano o tejido de mamífero para trasplante>

35 El tercer aspecto de la presente divulgación es un órgano o tejido de mamífero para trasplante, caracterizado por que dicho órgano o tejido se aísla de un mamífero y la sangre en dicho órgano o tejido se sustituye por un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre. Los términos utilizados en el primer aspecto de la presente divulgación se emplearán de manera sinónima en el tercer aspecto y se omitirán las descripciones de los mismos.

40 En el tercer aspecto de la presente divulgación, el método para sustituir la sangre en el órgano o tejido con un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre no está particularmente limitado y la sustitución puede ser, por ejemplo, mediante perfusión del perfundido en el órgano o tejido.

45 Hay que tener en cuenta que los términos utilizados en el presente documento se emplean para describir unas realizaciones particulares y no se pretende que limiten la invención.

50 Por otra parte, la expresión "que comprende", como se usa en el presente documento, salvo que el contenido indique claramente que debe entenderse de otro modo, se refiere a la presencia de los artículos descritos (tales como componentes, etapas, elementos y números) y no excluye la presencia de otros artículos (tales como componentes, etapas, elementos y números).

55 Salvo que se definan de otra manera, todos los términos utilizados en el presente documento (incluyendo términos técnicos y científicos) tienen los mismos significados que reconocen ampliamente los expertos en la técnica de la tecnología a la que pertenece la presente invención. Los términos utilizados en el presente documento, salvo que se definan de forma explícita de otra manera, deben interpretarse como que tienen significados consistentes con los significados en el presente documento y en los campos técnicos relacionados, y no deben interpretarse como que tienen significados idealizados o excesivamente formales.

60 Los términos primero y segundo pueden emplearse para expresar diversos elementos y debe reconocerse que estos elementos no deben estar limitados por estos términos. Estos términos se emplean únicamente con el fin de discriminar un elemento de otro, y es posible, por ejemplo, describir un primer elemento como segundo elemento y, de manera similar, describir un segundo elemento como primer elemento sin apartarse del alcance de la presente invención.

65 La presente invención se describirá ahora de forma más específica mediante Ejemplos. Sin embargo, la presente invención se puede realizar mediante diversas realizaciones y no debe interpretarse como limitada a los Ejemplos descritos en el presente documento.

Ejemplos

(1) Preparación de perfundido

5 <Preparación de eritrocitos>

En este ejemplo, se muestra un ejemplo de prueba que emplea eritrocitos como portador de oxígeno. La solución concentrada de eritrocitos humanos se recibió del Centro de Sangre de la Cruz Roja Japonesa cuando se solicitó una donación de sangre que no se puede usar para transfusión de sangre, etc. A 50 ml de dicha solución concentrada de eritrocitos humanos se añadieron 200 ml de medio L-15, (SIGMA) y esto se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante distinto del componente eritrocítico precipitado y se añadió medio L-15 (SIGMA) a una cantidad total de 250 ml. Esta operación se repitió dos veces para preparar los eritrocitos humanos empleados para la perfusión de órganos o tejidos.

15 <Preparación de perfundido>

El perfundido empleado para la perfusión se preparó complementando medio L-15 (SIGMA) con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Gibco, Nueva York, EE.UU.), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B (nacalai tesque, Kyoto, Japón), 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Wako, Osaka, Japón), L-alanil/l-glutamina 2 mM, 50 unidades/ml de heparina (Wako, Osaka, Japón) y 3 µg/ml de ciclosporina A.

El perfundido preparado como anteriormente se denomina en el presente ejemplo como un "perfundido no complementado con eritrocitos". Por otra parte, un perfundido que es el perfundido no complementado con eritrocitos complementado con eritrocitos humanos a $5,0 \times 10^{11}$ células/l se denomina en el presente ejemplo como un "perfundido complementado con eritrocitos".

(2) Producción de ratas modelo con isquemia caliente

Se colocaron ratas Wistar de ocho semanas de edad (Japan SLC, Inc.) en un desecador lleno de éter dietílico (Wako) para realizar anestesia por aspiración. Se inyectaron cien microlitros de solución de heparina sódica (Wako) preparada para tener una concentración final de 25000 U/ml en la vena del pene de las ratas sometidas a anestesia por aspiración con una aguja de inyección de 25 G (Terumo, Tokio, Japón) y una jeringa de 1 ml (Terumo). Las ratas inyectadas se dejaron durante 5 minutos para permitir que la solución de heparina sódica se administrara de forma sistémica y luego se sacrificaron mediante dislocación cervical. En este ejemplo, el punto de tiempo de sacrificio mediante dislocación cervical se estableció como el punto de tiempo de inicio de paro cardíaco. Las ratas sacrificadas se dejaron en una incubadora de cultivo celular (SANYO, Tokio, Japón) durante 1 hora a temperatura ambiente (25 °C) - 37 °C. Las ratas, después de la incubación, se establecieron en este ejemplo como ratas modelo con isquemia caliente.

Hay que tener en cuenta que el manejo y el funcionamiento de las ratas se realizaron de acuerdo con las Pautas para animales experimentales del Instituto Nacional de Salud. Por otra parte, todos los experimentos se llevaron a cabo con el permiso del Comité de Manejo de Animales Experimentales de la Universidad de Ciencias de Tokio.

(3) Construcción del Circuito de Perfusión

El diagrama esquemático del circuito 1 de perfusión empleado en este Ejemplo se muestra en la Figura 1. En la Figura 1, la temperatura del perfundido y la cantidad de oxígeno disuelto en el perfundido del perfundido colocado en un primer recipiente 30 y un segundo recipiente 31 se mantuvieron constantes mediante un dispositivo 20 de cultivo celular animal simplificado (ABLE, Tokio, Japón). La perfusión colocada en el primer recipiente 30 se transmitió desde/hacia el órgano o tejido sujeto a perfusión, se colocó en un recipiente 10 de perfusión para inmovilización de órganos con una bomba 40 peristáltica (IWAKI/AGC TECHNO GLASS, Chiba, Japón). El perfundido que se extendió se estableció para ser recuperado en el segundo recipiente 31. El perfundido recuperado en el segundo recipiente 31 se estableció para ser devuelto nuevamente al primer recipiente 30 con una bomba 41 peristáltica. Se estableció un puerto 50 de recuperación de perfusión en una parte del tubo que conecta el órgano o tejido y el segundo recipiente 31 para recolectar el perfundido que salía del órgano o tejido a lo largo del tiempo. El circuito anterior se estableció como el circuito de perfusión empleado en el presente Ejemplo.

(4) Investigación de la concentración óptima de eritrocitos en el perfundido

Se colocaron ratas Wistar de ocho semanas de edad (Japan SLC, Inc.) en un desecador lleno de éter dietílico (Wako) para realizar anestesia por aspiración. Se inyectaron cien microlitros de solución de heparina sódica (Wako) preparada para tener una concentración final de 25000 U/ml en la vena cava inferior de dichas ratas con una aguja de inyección de 25 G (Terumo, Tokio, Japón) y una jeringa de 1 ml (Terumo). Las ratas inyectadas se dejaron durante 5 minutos para permitir que la solución de heparina sódica se administrara de forma sistémica y luego se sacrificaron mediante dislocación cervical. Inmediatamente después del sacrificio, se aisló el hígado con el método de (6) descrito a continuación y se conectó al circuito de perfusión para realizar la perfusión. En otras palabras, el hígado de ratas se emplea inmediatamente después del sacrificio en lugar del hígado de las ratas modelo con isquemia caliente en esta investigación de condiciones.

El perfundido no complementado de eritrocitos preparado en el método de (1), así como los perfundidos que tienen el perfundido no complementado con eritrocitos complementado con eritrocitos humanos preparados en el método de (1) a $0,5 \times 10^{11}$ células/l, $2,0 \times 10^{11}$ células/l y $5,0 \times 10^{11}$ células/l, respectivamente, se prepararon y se emplearon como perfundidos. Durante la perfusión, se empleó un dispositivo de cultivo celular animal simplificado para mantener la temperatura del perfundido a 37 °C y el oxígeno disuelto en el perfundido se mantuvo a 6,77 mg/l. Durante la perfusión, la temperatura del hígado se mantuvo a 22 °C mediante el mantenimiento del medio L-15 dentro del recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos a 22 °C. Durante la perfusión, la velocidad de flujo de cada perfundido se fijó a 11 ml/min con una bomba peristáltica. Durante la perfusión en el circuito de perfusión, se tomaron muestras del perfundido que salía del hígado cada 4 horas desde el puerto de recuperación del perfundido. La muestra perfundida del puerto de recuperación de perfundido se centrifugó a 1800 rpm durante 3 minutos y se recuperó el sobrenadante. La actividad de la ALT en el sobrenadante se midió con Transaminase CII-test Wako (Wako) de acuerdo con las instrucciones de uso proporcionadas.

Por otra parte, el hígado después de 48 horas después del inicio de la perfusión se fijó inmediatamente mediante la perfusión con tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos. El hígado sometido a fijación mediante perfusión se cortó en trozos de tejido y luego se sumergió en tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % durante 24 horas para una fijación adicional. Dichos trozos de tejido sometidos a fijación mediante inmersión se deshidrataron con solución de etanol, penetraron con xileno y luego se sustituyó con parafina y se embebieron. Las muestras incrustadas se cortaron en rodajas finas hasta un espesor de 5 μ m y la tinción HE se llevó a cabo de acuerdo con los medios convencionales. Las muestras teñidas se examinaron microscópicamente con Axio Imager A1 (Carl Zeiss) instalado con AxioCamMRc5 (Carl Zeiss, Jene, Alemania) y se obtuvieron imágenes con Axio Vision Rel. 4.7 (Carl Zeiss).

La comparación de la actividad de la ALT obtenida en cada condición de concentración de eritrocitos se muestra en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, se encontró sorprendentemente que el aumento en la actividad de la ALT es la concentración de eritrocitos humanos que se inhibe de manera dependiente. En este ejemplo, se encontró que el aumento en la actividad de la ALT se inhibe más en el grupo sometido a perfusión con el perfundido complementado con eritrocitos humanos a $5,0 \times 10^{11}$ células/l.

Por otra parte, en la Figura 3 se muestran imágenes de tejido hepático después de la perfusión en cada condición de concentración de eritrocitos. Como se muestra en la Figura 3, el agrandamiento sinusoidal y la muerte difusa de hepatocitos se observaron parcialmente en el grupo sometido a perfusión con el perfundido complementado con eritrocitos humanos a $0,5 \times 10^{11}$ células/l, se observó un ligero agrandamiento sinusoidal y una muerte parcial de hepatocitos en el grupo sometido a perfusión con el perfundido complementado con eritrocitos humanos a $2,0 \times 10^{11}$ células/l y la retención de la estructura sinusoidal casi equivalente a la del hígado inmediatamente después del sacrificio y la supervivencia de los hepatocitos se observaron en el grupo sometido a perfusión con el perfundido complementado con eritrocitos humanos a $5,0 \times 10^{11}$ células/l. En otras palabras, se observó una supresión del trastorno del tejido hepático dependiente de la concentración de eritrocitos y se encontró en el presente ejemplo que el grupo sometido a perfusión con el perfundido complementado con eritrocitos humanos a $5,0 \times 10^{11}$ células/l fue el más inhibido en el trastorno tisular.

En otras palabras, se encontró que mediante la realización de la perfusión de un órgano o tejido para trasplante con el perfundido complementado con eritrocitos humanos a $5,0 \times 10^{11}$ células/l, el trastorno de órgano o tejido después del aislamiento se puede inhibir de manera más significativa, lo que permite así una conservación a largo plazo mientras se mantiene la función del órgano o tejido.

(5) Investigación de la condición de temperatura óptima durante la perfusión

Se colocaron ratas Wistar de ocho semanas de edad (Japan SLC, Inc.) en un desecador lleno de éter dietílico (Wako) para realizar anestesia por aspiración. Se inyectaron cien microlitros de solución de heparina sódica (Wako) preparada para tener una concentración final de 25000 U/ml en la vena cava inferior de dichas ratas con una aguja de inyección de 25 G (Terumo, Tokio, Japón) y una jeringa de 1 ml (Terumo). Las ratas inyectadas se dejaron durante 5 minutos para permitir que la solución de heparina sódica se administrara de forma sistémica y luego se sacrificaron mediante dislocación cervical. Inmediatamente después del sacrificio, se aisló el hígado con el método de (6) descrito a

continuación y se conectó al circuito de perfusión para realizar la perfusión. En otras palabras, el hígado de ratas se emplea inmediatamente después del sacrificio en lugar del hígado de las ratas modelo con isquemia caliente en esta investigación de condiciones.

5 El perfundido empleado fue el perfundido complementado con eritrocitos preparado en el método descrito en (1). Durante la perfusión, se empleó un dispositivo de cultivo celular animal simplificado para mantener la temperatura del perfundido a 37 °C y el oxígeno disuelto en el perfundido se mantuvo a 6,77 mg/l. Durante la perfusión, la temperatura del hígado se mantuvo a cada temperatura manteniendo el medio L-15 dentro del recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos a 37 °C, 33 °C o 22 °C. Durante la perfusión, la velocidad de flujo del perfundido
10 complementado con eritrocitos se estableció en 11 ml/min con una bomba peristáltica. Durante la perfusión en el circuito de perfusión, se tomaron muestras del perfundido complementado con eritrocitos que salía del hígado cada 4 horas desde el puerto de recuperación del perfundido. La muestra perfundida del puerto de recuperación de perfundido se centrifugó a 1800 rpm durante 3 minutos y se recuperó el sobrenadante. La actividad de la ALT en el sobrenadante del perfundido se midió con Transaminase CII-test Wako (Wako) de acuerdo con las instrucciones de uso
15 proporcionadas.

La fijación se realizó después de 20 horas desde el inicio de la perfusión para el hígado perfundido a 37 °C, después de 32 horas desde el inicio de la perfusión para el hígado perfundido a 33 °C y después de 48 horas desde el inicio de la perfusión para el hígado perfundido a 22 °C. La fijación se realizó mediante la perfusión del hígado con tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos. El hígado sometido a fijación mediante perfusión se cortó en trozos de tejido y luego se sumergió en tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % durante 24 horas para una fijación adicional. Dichos trozos de tejido sometidos a fijación mediante inmersión se deshidrataron con solución de etanol, penetraron con xileno y luego se sustituyó con parafina y se embebieron. Las muestras incrustadas se cortaron en rodajas finas hasta un espesor de 5 µm y la tinción HE se llevó a cabo de acuerdo con los medios convencionales.
20 Las muestras teñidas se examinaron microscópicamente con Axio Imager A1 (Carl Zeiss) instalado con AxioCamMRc5 (Carl Zeiss, Jene, Alemania) y se obtuvieron imágenes con Axio Vision Rel. 4.7 (Carl Zeiss).

La comparación de la actividad de la ALT obtenida en cada condición de temperatura se muestra en la Figura 4. Como se muestra en la Figura 4, se encontró sorprendentemente que el aumento en la actividad de la ALT se inhibe más en el grupo en el que se realizó la perfusión mientras se mantenía el hígado a 22 °C.
30

Por otra parte, en la Figura 5 se muestran imágenes de tejido hepático después de la perfusión en cada condición de temperatura. Como se muestra en la Figura 5, cuando se realizó la perfusión a 37 °C, se observaron necrosis de hepatocitos y ruptura de la estructura sinusoidal en un punto de tiempo 20 horas después del inicio de la perfusión.
35 Por otra parte, cuando se realizó la perfusión a 33 °C, aunque se observó un efecto de mantenimiento de la estructura del tejido durante un período más prolongado, se observaron necrosis de hepatocitos y ruptura de la estructura sinusoidal en un punto de tiempo 32 horas después del inicio de la perfusión. Sin embargo, cuando se realizó la perfusión a 22 °C, se encontró que se observó una estructura sinusoidal casi equivalente a la del hígado inmediatamente después del sacrificio y la estructura del plexo vascular intrahepático también se conservó en gran medida incluso en un punto de tiempo 48 horas después del inicio de la perfusión.
40

En otras palabras, se encontró que mediante la realización de la perfusión mientras se mantiene un órgano o tejido para el trasplante a 22 °C, el trastorno de órgano o tejido se puede inhibir de manera más significativa, lo que permite así una conservación a largo plazo mientras se mantiene la función del órgano o tejido.
45

(6) Perfusión hepática con perfundido complementado con eritrocitos

<Lavado del hígado de modelo de rata con isquemia caliente y aislamiento del hígado>

50 Se emplearon ratas modelo con isquemia caliente producidas por el método descrito en (2) para el experimento. Se realizó una incisión en el abdomen de la rata modelo con isquemia caliente, la vena cava inferior subhepática se extirpó a la bifurcación de la vena renal izquierda y la vena renal derecha, la vena renal izquierda y la vena lumbar se ligaron con sutura quirúrgica de seda n.º 7 (Natume). La sutura quirúrgica de seda n.º 4 (Natume) se pasó a través de la vena cava inferior subhepática caudal a la bifurcación de la vena renal izquierda para formar un bucle de ligadura. Se retiró la vena porta del tejido conectivo y se pasó la sutura quirúrgica de seda n.º 7 (Natume) a través de la arteria hepática propiamente dicha, la vena pilórica y la vena esplénica y se ligaron. Se pasaron dos suturas quirúrgicas de seda n.º 4 (Natume) a través de la vena porta con un intervalo para hacer dos bucles de ligadura. La temperatura del perfundido complementado con eritrocitos se mantuvo a 37 °C y el oxígeno disuelto en el perfundido complementado con eritrocitos se mantuvo a 6,77 mg/l mediante un dispositivo simplificado de cultivo de células animales. El perfundido complementado con eritrocitos se transmitió a través de la cánula de entrada del perfundido a 11 ml/min con una bomba peristáltica y luego la vena porta se redujo a la mitad y se insertó dicha cánula de entrada del perfundido. A continuación, la vena cava inferior subhepática se transectó inmediatamente por debajo del bucle de ligadura y se dejó que el perfundido complementado con eritrocitos saliera del sitio transectado. Los dos bucles de ligadura de la vena porta se ligaron para inmovilizar la cánula de entrada de perfusión a la vena porta y el sitio de inserción de la cánula de entrada del perfundido se inmovilizó con una cantidad apropiada de Aron Alpha A (Daiichi Sankyo, (Tokio, Japón). Se hizo una incisión en el hueso costal y se pasó la sutura quirúrgica de seda n.º 4 (Natume) a través de la vena cava
65

inferior suprahepática para hacer dos bucles de ligadura. Después de que la aurícula derecha se redujo a la mitad, se ligó el bucle establecido en la vena cava inferior subhepática. La cánula de salida del perfundido se insertó en la porción de aurícula derecha dividida en dos, los dos bucles de ligadura de la vena cava inferior suprahepática se ligaron para inmovilizar la cánula de salida del perfundido y el sitio de ligadura y el sitio de inserción de la cánula de salida del perfundido se inmovilizaron con Aron Alpha A (Daiichi Sankyo). El conducto biliar común se redujo a la mitad, se insertó una cánula de salida de la bilis y se inmovilizó con Aron Alpha A (Daiichi Sankyo). El diafragma se expuso y la arteria/venas frénicas izquierda y derecha se ligaron con la sutura quirúrgica de seda n.º 7 (Natume). Después de que se resecaron los órganos y el tejido conectivo que rodea el hígado, se separó el hígado de la dorsal con el hueso costal y el diafragma aún unidos al hígado, y se aisló.

El hígado aislado se llevó al recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos, se suspendió el hígado completo mediante la inmovilización del hueso costal a un accesorio unido al recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos, y se llenó con medio L-15 dentro del recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos. El hígado estaba en un estado suspendido con el hueso costal y el diafragma y flotaba en medio L-15. La temperatura del hígado flotante se mantuvo a 22 °C mediante el mantenimiento del medio L-15 dentro del recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos a 22 °C.

El interior de los vasos sanguíneos del hígado se lavó durante 100 minutos desde que el perfundido complementado con eritrocitos se inyectó en el hígado. El diagrama esquemático de un dispositivo para lavar el hígado en este ejemplo se muestra en la Figura 6. En la Figura 6, el hígado aislado se inmovilizó en un recipiente 11 de perfusión para la inmovilización de órganos. El perfundido complementado con eritrocitos colocado en un primer recipiente 32 se introdujo en el hígado a través de la cánula de entrada del perfundido y se extrajo de la vena cava inferior suprahepática a través de la cánula de salida del perfundido. El perfundido complementado con eritrocitos salido de la vena cava inferior suprahepática se eliminó sin circular hacia el primer recipiente 32 y se recuperó todo en un segundo recipiente 33. Durante dicho lavado de 100 minutos, se tomaron muestras del perfundido complementado con eritrocitos que salía del hígado cada 10 minutos desde un puerto 51 de recuperación de perfundido que se estableció en una parte del tubo conectado a la cánula de salida del perfundido.

<Perfusión en Circuito de Perfusión>

Después de dicho lavado hepático de 100 minutos, el hígado se conectó al circuito de perfusión descrito en (3). La temperatura del perfundido complementado con eritrocitos se mantuvo a 37 °C y el oxígeno disuelto en el perfundido complementado con eritrocitos se mantuvo a 6,77 mg/l mediante un dispositivo simplificado de cultivo de células animales. Durante la perfusión, la temperatura del hígado flotante se mantuvo a 22 °C mediante el mantenimiento del medio L-15 dentro del recipiente de perfusión para la inmovilización de órganos a 22 °C. Dicho perfundido complementado con eritrocitos se transmitió al hígado conectado al circuito de perfusión a 11 ml/min con una bomba peristáltica (IWAKI/AGC TECHNO GLASS, Chiba, Japón). Durante la perfusión en el circuito de perfusión, se tomaron muestras del perfundido complementado con eritrocitos que salía del hígado cada 4 horas desde el puerto de recuperación del perfundido.

(7) Perfusión hepática con perfundido no complementado con eritrocitos

Se realizaron etapas similares a las de (6) con un perfundido no complementado con eritrocitos.

(8) Análisis del trastorno del tejido hepático

<Análisis de la actividad de la enzima del trastorno hepático (ALT)>

En los experimentos de (6) y (7), los perfundidos tomados del puerto de recuperación del perfundido durante el lavado dentro de los vasos sanguíneos y la perfusión en el circuito de perfusión se centrifugaron a 1800 rpm durante 3 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. La actividad de la ALT en el sobrenadante del perfundido se midió con Transaminase CII-test Wako (Wako) de acuerdo con las instrucciones de uso proporcionadas.

Para los resultados hasta 48 horas después del inicio de la perfusión, en la Figura 7 se muestra la comparación de los resultados obtenidos del grupo que emplea un perfundido complementado con eritrocitos y el grupo que emplea un perfundido no complementado con eritrocitos. En la Figura 8 se muestra una vista ampliada del gráfico de medición de la actividad de la ALT en el perfundido durante el lavado del hígado antes del inicio de la perfusión por el circuito de perfusión (antes de 0 minutos) en la Figura 7. Como se muestra en la Figura 7, la actividad de la ALT cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos alcanzó 57 unidades/hígado a las 48 horas después de la iniciación de la perfusión por el circuito de perfusión. Por otro lado, la actividad de la ALT cuando se realizó la perfusión con un perfundido complementado con eritrocitos permaneció en 32 unidades/hígado a las 48 horas después del inicio de la perfusión por el circuito de perfusión. Por otra parte, como se muestra en la Figura 8, con respecto a la actividad de la ALT de los perfundidos que fluyeron desde el hígado muestreado durante el lavado de 100 minutos dentro de los vasos sanguíneos, el grupo que emplea un perfundido no complementado con eritrocitos alcanzó 17 unidades/hígado, mientras que el grupo que emplea un perfundido complementado con eritrocitos alcanzó 12 unidades/hígado.

A partir de los resultados anteriores, se encontró que se observa un claro efecto de supresión del trastorno del tejido hepático con el grupo que se realizó la perfusión con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con el grupo que se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.

5

< Análisis histológico >

En los experimentos de (6) y (7), el hígado después de 48 horas de perfusión se fijó inmediatamente mediante perfusión con tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos. El hígado sometido a fijación mediante perfusión se cortó en trozos de tejido y luego se sumergió en tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % durante 24 horas para una fijación adicional. Dichos trozos de tejido sometidos a fijación mediante inmersión se deshidrataron con solución de etanol, penetraron con xileno y luego se substituyó con parafina y se embebieron. Las muestras incrustadas se cortaron en rodajas finas hasta un espesor de 5 μm y la tinción HE se llevó a cabo de acuerdo con los medios convencionales. Las muestras teñidas se examinaron microscópicamente con Axio Imager A1 (Carl Zeiss) instalado con AxioCamMRc5 (Carl Zeiss, Jene, Alemania) y se obtuvieron imágenes con Axio Vision Rel. 4.7 (Carl Zeiss).

Las imágenes de tinción HE del hígado perfundido con un perfundido complementado con eritrocitos se muestran en la Figura 9 y las imágenes de tinción HE del hígado perfundido con un perfundido no complementado con eritrocitos se muestran en la Figura 10. Cada una de las Figuras 9 y 10 muestra imágenes ampliadas de diferentes porciones de una imagen de una sección del hígado con aumentos de 1x a 40x.

En las Figuras 9 y 10, las imágenes de tejido de aumentos de 10x a 40x son vistas ampliadas de la porción rodeada por un recuadro en la imagen de tejido a un aumento de 1x. Las imágenes de tejido con un aumento de 40x en las Figuras 9 y 10 muestran cada una la vista ampliada del área de la porta, el parénquima hepático y la vena central. Como se muestra en la Figura 9, cuando se realizó la perfusión con un perfundido complementado con eritrocitos, aunque se observa una cierta extensión del agrandamiento sinusoidal, se observa mucha supervivencia de hepatocitos en el tejido vivo 48 horas después del inicio de la perfusión por el circuito de perfusión. Por otro lado, como se muestra en la Figura 10, cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos, la imagen de tinción normal solo se observa alrededor del área de la porta y se observaron imágenes de necrosis difusa y agrandamiento de la región sinusoidal en el tejido hepático 48 horas después del inicio de la perfusión por el circuito de perfusión.

A partir de los resultados anteriores, se encontró que la reducción en la región de necrosis difusa del hígado y el efecto de supresión del aumento sinusoidal se observaron cuando la perfusión se realizó con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.

< Medición de la cantidad de síntesis de albúmina 1 >

En los experimentos de (6) y (7), los perfundidos recogidos a lo largo del tiempo del puerto de recuperación de perfundidos se centrifugaron a 1800 rpm durante 3 minutos para recuperar los sobrenadantes. La medición de la concentración de albúmina en el sobrenadante del perfundido se midió mediante ELISA con el KIT ELISA de albúmina de rata (shibayagi, Gunma, Japón) de acuerdo con las instrucciones de uso proporcionadas.

La transición de la concentración de albúmina en el perfundido hasta 48 horas desde el inicio de la perfusión en el circuito de perfusión se muestra en la Figura 11. Como se muestra en la Figura 11, se mostró que la capacidad de síntesis de albúmina del hígado se mantiene significativamente alta cuando la perfusión se realizó con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.

50

< Medición de la cantidad de síntesis de albúmina 2 >

En los experimentos de (6) y (7), los perfundidos recogidos a lo largo del tiempo del puerto de recuperación de perfundidos se centrifugaron a 1800 rpm durante 3 minutos para recuperar los sobrenadantes. La medición de la concentración de albúmina en el sobrenadante del perfundido se midió mediante ELISA con el kit de cuantificación de albúmina de rata (Bethyl, Montgomery, EE.UU.). El anticuerpo primario anticuerpo de oveja anti-albúmina de rata de afinidad purificado (1:200) se realizó en fase sólida en un multiplaca de 96 pocillos, se bloqueó con BSA al 1 % y luego se agregaron muestras. Después de la reacción del anticuerpo con el anticuerpo de oveja anti-albúmina de rata conjugado con HRP (1:30000) como el anticuerpo secundario, se desarrolló color mediante TMB (Bethyl) y se detectó la absorbancia con VersaMax (Molecular Devices) para medir cuantitativamente la concentración de albúmina.

La transición de la concentración de albúmina en el perfundido hasta 48 horas desde el inicio de la perfusión en el circuito de perfusión se muestra en la Figura 12. Como se muestra en la Figura 12, la cantidad de albúmina sintetizada durante la perfusión de 48 horas alcanzó $10,3 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$ cuando la perfusión se realizó con un perfundido complementado con eritrocitos, mientras que la cantidad de albúmina sintetizada durante la perfusión de 48 horas se mantuvo en $3,5 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$ cuando la perfusión se realizó con un perfundido no complementado con eritrocitos. En

65

otras palabras, se mostró que la capacidad de síntesis de albúmina del hígado se mantiene significativamente alta cuando la perfusión se realizó con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.

5 <Medición de la capacidad de síntesis de urea mediante la prueba de carga de amoníaco>

En los experimentos de (6) y (7), se perfundió tampón Krebs-Henseleit al hígado después de la perfusión de 48 horas desde la vena porta a una velocidad de 11 ml/min durante 2 horas para lavar la sangre y el perfundido dentro del órgano. A continuación, se perfundió el tampón Krebs-Henseleit complementado con clorhidrato de ornitina 1 mM y cloruro de amonio 1 mM a 11 ml/min durante 30 minutos para realizar una prueba de carga de amoníaco y se recogió el tampón Krebs-Henseleit que salía de la vena cava inferior suprahepática a lo largo del tiempo. El hígado que se aisló inmediatamente después del sacrificio con el método descrito en (6) y que luego se conectó al circuito de perfusión también se sometió a la prueba de carga de amoníaco de manera similar a la anterior, y el tampón de Krebs-Henseleit que salía de la vena cava inferior suprahepática fue sucesivamente recogido. Al final de la prueba de carga de amoníaco de 30 minutos, se administró de nuevo tampón Krebs-Henseleit para lavar la solución dentro del órgano y se recogió el tampón Krebs-Henseleit a lo largo del tiempo. El tampón Krebs-Henseleit recogido se centrifugó a 1800 rpm durante 3 minutos para recuperar el sobrenadante y la cantidad de urea se midió con F-kit urea/amoníaco (JK International, Tokio, Japón) de acuerdo con la especificación proporcionada.

El cambio temporal en la cantidad de urea comprendida en el tampón Krebs-Henseleit recolectado se muestra en la Figura 13. Como se muestra en la Figura 13, se mostró que la cantidad de urea sintetizada por la carga de amoníaco se mantiene significativamente alta cuando se realizó la perfusión con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos y aproximadamente el 60 % de la cantidad de urea sintetizada se mantiene incluso cuando se compara con el hígado inmediatamente después del sacrificio.

En otras palabras, a partir de los resultados de la medición de la cantidad de síntesis de albúmina y la capacidad de síntesis de urea mediante la prueba de carga de amoníaco, se encontró que la función del metabolismo hepático se mantiene significativamente alta cuando la perfusión se realizó con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.

<Análisis del plexo vascular intrahepático>

En los experimentos de (6) y (7), el hígado después de la perfusión de 48 horas se perfundió inmediatamente con solución salina para lavar los eritrocitos o el perfundido en el órgano. Tras el lavado, se perfundió con 25 ml de gelatina marcada con FTTC, luego se colocó a temperatura de congelación para solidificar la gelatina en el plexo vascular en el órgano. Después de que la gelatina se solidificó, el órgano se sumergió en tampón de fosfato de paraformaldehído al 0,5 % y se fijó. A continuación, se incrustó por congelación con compuesto OCT. Los bloques congelados producidos se cortaron en secciones con un espesor de 100 μm , se trataron con desoxicolato de sodio y luego se fijaron con tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % que comprendía Hoechst. El hígado que se aisló inmediatamente después del sacrificio con el método descrito en (6) también se sometió a un tratamiento similar al anterior. Después de montar con un agente de montaje, las imágenes se obtuvieron mediante Z-stack con un microscopio láser confocal LSM780 (Carl Zeiss).

Las imágenes de fluorescencia para cada sección del hígado se muestran en la Figura 14. Como se muestra en la Figura 14, se encontró que solo hay una pequeña fuga del colorante fluorescente fuera del vaso sanguíneo y que la estructura del vaso sanguíneo se mantiene en gran medida cuando la perfusión se realizó con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.

En otras palabras, a partir del análisis del plexo vascular intrahepático, se encontró que la estructura de los vasos sanguíneos del hígado se restablece a un estado cercano al del hígado inmediatamente después del sacrificio cuando se realizó la perfusión con un perfundido complementado con eritrocitos en comparación con cuando se realizó la perfusión con un perfundido no complementado con eritrocitos.

(9) Evaluación de injerto de órgano isquémico mediante trasplante heterotópico de hígado

<Trasplante heterotópico de hígado>

Las ratas modelo con isquemia caliente se produjeron con un método similar al método descrito en (2), excepto que se dejaron a temperatura ambiente con una incubadora de cultivo celular durante 90 minutos después del paro cardíaco cuando se emplearon como donantes de trasplante heterotópico de hígado. Dichas ratas modelo con isquemia caliente se emplearon para el aislamiento y perfusión del hígado con el método descrito en (6). Después de la perfusión, se retiró la cánula de la vena porta, se conectó un nuevo tubo para la perfusión y se realizó la perfusión con 500 ml de un perfundido que comprendía eritrocitos ($5,0 \times 10^{11}$ células/l) que no se complementó con heparina. Durante la perfusión, se transfirieron las ratas Wistar (SLC) de 13 semanas de edad receptoras a un desecador lleno

de éter dietílico (Wako) para realizar anestesia por aspiración. El ambiente anestésico se ajustó a una concentración de isoflurano del 4 % y se realizó una incisión abdominal en las ratas. Se expuso la arteria renal derecha, se extrajo de la vena renal derecha, se cortó el flujo sanguíneo de estas con una pinza y luego se seccionó. Se instaló un manguito en el sitio transectado. La vena cava inferior subhepática estaba medio clampeada, se transectó la vena renal derecha y se aisló el riñón derecho. El hígado del donante se colocó en el sitio de la cirugía sin cesar la perfusión y se realizó una anastomosis terminolateral de la vena cava inferior subhepática a la vena renal derecha del receptor. A continuación, la anastomosis de la arteria hepática del hígado del donante a la arteria renal derecha del receptor se realizó mediante infiltrado. Después de la anastomosis, se realizó la reperusión de la arteria hepática y la vena cava inferior subhepática, se retiró la cánula conectada a la vena porta y luego se realizó una anastomosis terminolateral de la vena porta del hígado del donante a la vena porta del receptor y se realizó una reperusión de la vena porta después de la anastomosis. Se inyectaron dos mililitros de transfusión de la vena del pene. Se insertó una endoprótesis vascular del conducto biliar en el yeyuno, inmovilizado mediante anastomosis y se suturó el peritoneo y la piel para cerrar el abdomen. El diagrama esquemático del trasplante heterotópico de hígado en este Ejemplo se muestra en la Figura 15.

<Evaluación de injerto de órgano isquémico mediante trasplante heterotópico de hígado>

Con el fin de aclarar que un órgano o tejido perfundido mediante el método de la presente invención se puede emplear para el trasplante, la evaluación del injerto de órganos mediante trasplante heterotópico de hígado se realizó con los siguientes grupos 1-3.

Grupo 1: El trasplante heterotópico de hígado se realizó con hígados perfundidos con el método de la presente invención utilizando el método descrito anteriormente (también denominado en el presente documento como el grupo complementado con eritrocitos).

Grupo 2: El trasplante heterotópico de hígado se realizó con hígado de ratas después de un estado isquémico cálido de 90 minutos (es decir, hígado de ratas con 90 minutos de incubación mediante una incubadora de cultivo de células en el método de producción de ratas modelo con isquemia caliente descrito en (2)) después de la conservación de la penetración a temperatura fría, empleando solución UW (Viaspan, Astellas Parma Inc., Japón) como solución de conservación del órgano durante 100 minutos (también denominado en el presente documento como el grupo de conservación UW). La conservación de la penetración a temperatura fría, empleando una solución UW como solución de conservación, es un método de conservación del órgano para trasplante que se realiza comúnmente en la atención médica de trasplante actual.

Grupo 3: El trasplante heterotópico de hígado se realizó de manera similar al Grupo 1, excepto que los hígados se perfundieron con un perfundido no complementado con eritrocitos (también denominado en el presente documento como el grupo no complementado con eritrocitos).

La tasa de supervivencia de ratas hasta el día 7 del trasplante para cada grupo se muestra en la Figura 16.

Como se muestra en la Figura 16, la tasa de supervivencia de las ratas a los 7 días después del trasplante fue del 40 % para el grupo de conservación UW y la tasa de supervivencia de las ratas a los 7 días después del trasplante fue del 60 % para el grupo no complementado con eritrocitos. Por otro lado, sorprendentemente, la tasa de supervivencia de las ratas a los 7 días después del trasplante fue del 100 % para el grupo complementado con eritrocitos. También se demostró a partir de la observación de la apariencia del órgano trasplantado que el órgano trasplantado fue mantenido por el flujo sanguíneo del receptor en el grupo complementado con eritrocitos y se injertó en el cuerpo vivo.

Además, se realizó un análisis de tejido mediante tinción HE para individuos que murieron durante la observación del seguimiento. Como resultado, se confirmó la desaparición de hepatocitos y la fibrosis del tejido, así como la invasión de linfocitos con el grupo de conservación UW y se confirmó la retención de eritrocitos o porciones sin tinción del núcleo con el grupo no complementado con eritrocitos, lo que sugiere la posibilidad de que haya ocurrido necrosis tisular. Por otro lado, en el grupo complementado con eritrocitos, aunque el agrandamiento de la cápsula de Glisson en el área de la porta se observó parcialmente en el órgano trasplantado a partir de los resultados del análisis de tejidos 7 días después del trasplante, se observaron células de supervivencia y la estructura sinusoidal similar a la de un hígado vivo en la imagen del tejido, que muestra el injerto del hígado trasplantado. Los resultados de estos análisis de tejidos se muestran en la Figura 17.

En otras palabras, de acuerdo con el método de la presente invención, se demostró que un órgano que una vez ha estado en un estado isquémico caliente se puede mantener y/o restaurar a un estado de trasplante seguro. Como se pensó convencionalmente que es extremadamente difícil emplear un órgano que alguna vez haya estado en un estado isquémico caliente para el trasplante, se puede decir que los resultados de este Ejemplo son sorprendentes.

(10) Análisis de la función hepática fisiológica del órgano trasplantado mediante resección hepática/ligadura de la vena porta hepática

<Resección hepática/ligadura de la vena porta hepática de ratas sometidas a trasplante hepático heterotópico>

El trasplante heterotópico de hígado se realizó con el método descrito en (9) y los individuos después de 7 días después del trasplante se transfirieron a un desecador lleno de éter dietílico (Wako) para realizar la anestesia por

aspiración. El ambiente anestésico se ajustó a una concentración de isoflurano del 4 % y se realizó una incisión abdominal en las ratas. El lóbulo izquierdo, el lóbulo medio izquierdo y el lóbulo medio derecho del hígado del receptor se ligaron al sitio de lobulación respectivo con sutura quirúrgica de seda n.º 4 y se resecaron después de que cesó el flujo de sangre. La vena porta que conduce al hígado del receptor se ligó luego con la sutura quirúrgica de seda n.º 4 y se suturaron el peritoneo y la piel para cerrar el abdomen. El diagrama esquemático de la ligadura de la vena porta hepática en el presente Ejemplo se muestra en la Figura 18.

<Análisis de la función hepática fisiológica en el órgano trasplantado>

Para aclarar que el órgano trasplantado tiene una función hepática normal, la función hepática se redujo mediante la resección hepática parcial del hígado del receptor y la ligadura de la vena porta que conduce al hígado del receptor y se evaluó si la sustitución de la función por el órgano trasplantado era posible. En el grupo de conservación UW que se realizó trasplante con tecnología de conservación de órganos convencional y en el grupo no complementado con eritrocitos que se realizó la perfusión del órgano trasplantado sin complementar con eritrocitos, se confirmó la muerte en todos los casos después de que se redujo la función hepática del receptor (Figura 19). Por el contrario, en el grupo complementado con eritrocitos que se realizó la perfusión del órgano trasplantado con el método de la presente invención, se observaron 5 casos de supervivencia de cada 5 casos (Figura 19). A partir de los resultados anteriores, quedó claro que el órgano en que se realizó la perfusión con el método de la presente invención mantiene la función orgánica necesaria para la supervivencia de los individuos.

Por otra parte, para evaluar la función *in vivo* del hígado trasplantado, se analizó la capacidad de regeneración hepática en el grupo complementado con eritrocitos. El valor medio del peso del hígado del receptor a los 7 días después del trasplante (antes de la resección hepática parcial) fue de 927 g y el valor medio del hígado trasplantado fue de 3,386 g. El valor medio del peso del hígado del receptor disminuyó a 3,26 g en un 70 % de resección hepática parcial. Después de la observación de seguimiento de 7 días después de la resección hepática parcial del hígado del receptor, el órgano del receptor y el órgano trasplantado se aislaron y se pesaron. Como resultado, el valor medio del peso del hígado del receptor no cambió mucho a 3,28 g, mientras que el valor medio del hígado trasplantado aumentó a 8,24 g (Figura 20).

A partir de los resultados anteriores, se demostró que el método de la presente invención es una tecnología que no solo permite que un órgano que alguna vez se encuentre en un estado isquémico caliente sea utilizado en el trasplante, sino una tecnología que también puede resucitarlo a un órgano que tiene funciones fisiológicas necesarias para la supervivencia.

Además, para determinar si el aumento en el peso hepático del hígado trasplantado había pasado por un proceso normal de regeneración hepática, se realizaron análisis de tejidos mediante tinción HE y análisis de expresión de albúmina y Brd-U mediante inmunotinción en el hígado después de 1 semana después de la resección hepática parcial del hígado del receptor y la ligadura de la vena porta. Como se muestra en las Figuras 21 y 22, en el hígado trasplantado antes de la resección parcial del hígado del receptor, aunque se observa una estructura tisular equivalente a la del tejido hepático normal, casi no se detectó la expresión de albúmina. Sin embargo, el cambio estructural en el cordón hepático del hígado trasplantado y el agrandamiento de la estructura sinusoidal se confirmaron con la reducción de la función hepática del hígado del receptor. También se confirmó que la cantidad de producción de albúmina aumentó claramente en el hígado trasplantado en el día 7 después de la resección parcial del hígado del receptor. Además, se demostró la regeneración del hígado mediante proliferación celular debido al hecho de que las células positivas para Brd-U (es decir, las células en división celular) representaron el 47,7 % del número total de células en el hígado trasplantado en el día 7 después de la resección parcial del hígado del receptor.

A partir de los resultados anteriores, se encontró que cuando el hígado perfundido mediante método de la presente invención se emplea para el trasplante, el hígado trasplantado muestra la restauración de la función hepática normal y el aumento de peso en correspondencia con la reducción de la función hepática del hígado del receptor.

Para los datos del experimento, el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson se analizó con IBM SPSS Statistics Base (SPSS Inc., (Tokio, Japón). La diferencia estadística significativa de los datos de cada experimento se analizó con la prueba de la t de Student no emparejada. El análisis se realizó con el Programa de Interfaz de la Pasarela Común (twk, Saint John's University, Minnesota, EE.UU.).

(11) Conclusión

A partir de los resultados anteriores, se encontró sorprendentemente que se observa un efecto de supresión del trastorno tisular extremadamente alto cuando un órgano para trasplante se perfunde con un perfundido complementado con eritrocitos. En otras palabras, se encontró que mediante la perfusión de un órgano o tejido para trasplante con un perfundido complementado con eritrocitos, el trastorno del órgano o tejido después del aislamiento se puede inhibir significativamente, lo que permite así un mantenimiento a largo plazo mientras se mantiene la función del órgano o tejido.

También se encontró que mediante la perfusión de un hígado que ha llegado a estar en un estado isquémico caliente

debido a un paro cardíaco con un perfundido complementado con eritrocitos, se puede inhibir el desarrollo de un trastorno hepático, y se pueden restaurar los hepatocitos y la estructura sinusoidal a un estado cercano al hígado inmediatamente después de un paro cardíaco.

- 5 Además, cuando se empleó el hígado perfundido con un perfundido complementado con eritrocitos para el trasplante, se mostró una tasa de injerto extremadamente alta en el receptor en comparación con el hígado que se conservó con la tecnología de conservación de órganos convencional o cuando el hígado perfundido con un perfundido no complementado de eritrocitos se empleó para trasplante. También se demostró que cuando se empleó el hígado perfundido con un perfundido complementado con eritrocitos para el trasplante, puede actuar como un hígado que
- 10 tiene una función y estructura normales.

A partir de estos resultados, se demostró que la presente invención es extremadamente útil como una tecnología para mantener y/o restaurar un órgano o tejido de un paciente con paro cardíaco en/a un nivel compatible para el trasplante.

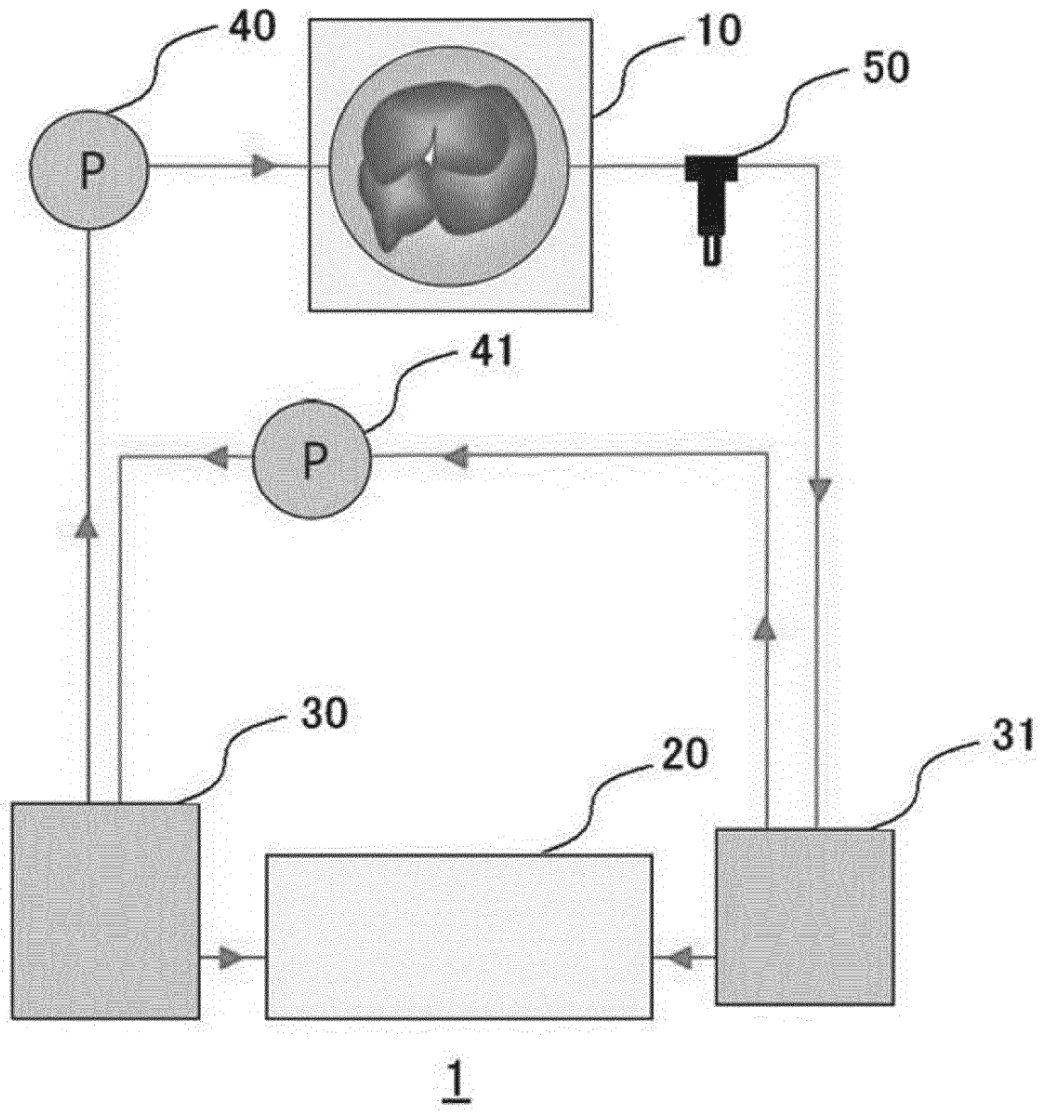
15 **Descripción de los símbolos**

- 1: Circuito de perfusión;
10, 11: Recipientes de perfusión para inmovilización de órganos;
20: Dispositivo de cultivo celular animal simplificado;
30, 31, 32, 33: Recipientes;
40, 41: Bombas peristálticas; y
50, 51: Puertos de recuperación perfundidos

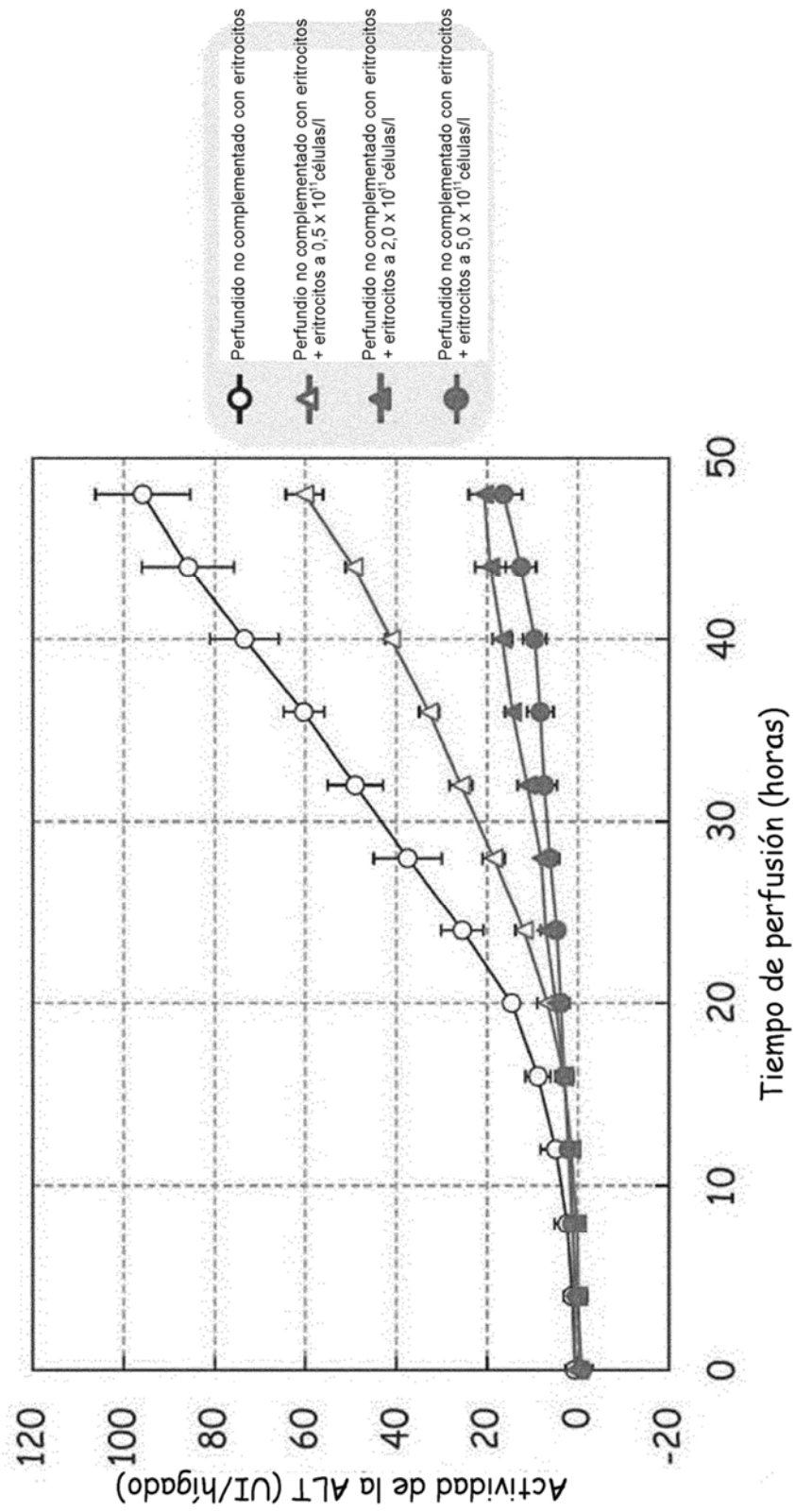
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para restaurar y mantener la función de un órgano o tejido de mamífero para trasplante de un donante que falleció por paro cardíaco que emplea perfusión mediante un perfundido, que comprende cada una de las siguientes etapas de:
- 10 (a) conectar una cánula de entrada de perfundido para transmitir dicho perfundido en dicho órgano o tejido,
(b) conectar una cánula de salida de perfundido para transmitir dicho perfundido desde dicho órgano o tejido y
(c) perfundir un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de coagulación de la sangre en dicho órgano o tejido mientras se mantiene la temperatura del órgano o tejido en un estado de 20 °C - 25 °C,
- en donde el portador de oxígeno es $0,5 \times 10^{11}$ células/l - $50,0 \times 10^{11}$ células/l de eritrocitos.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el perfundido en dicha etapa (c) circula.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** comprende además una etapa posterior adicional de:
- 20 (d) antes de dicha etapa (c), que perfunde dicho órgano o tejido con un perfundido que comprende un portador de oxígeno y un inhibidor de la coagulación de la sangre para lavar dicho órgano o tejido, y luego eliminar el perfundido empleado para dicho lavado.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que**
- 25 en dicha etapa (c), dicho órgano o tejido se aísla junto con un segundo órgano o tejido que es continuo *in vivo* para dicho órgano o tejido, y la perfusión se realiza con dicho órgano o tejido en un estado suspendido mediante la inmovilización de dicho segundo órgano o tejido.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** en dicha etapa (c), dicho órgano o tejido se sumerge en un líquido para que al menos una parte del mismo reciba flotabilidad.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** dicho inhibidor de la coagulación de la sangre es heparina.
- 35 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho órgano o tejido se selecciona del grupo que consiste en el hígado, el riñón, el páncreas, el corazón, el pulmón, el estómago, el testículo, el ovario y el globo ocular.

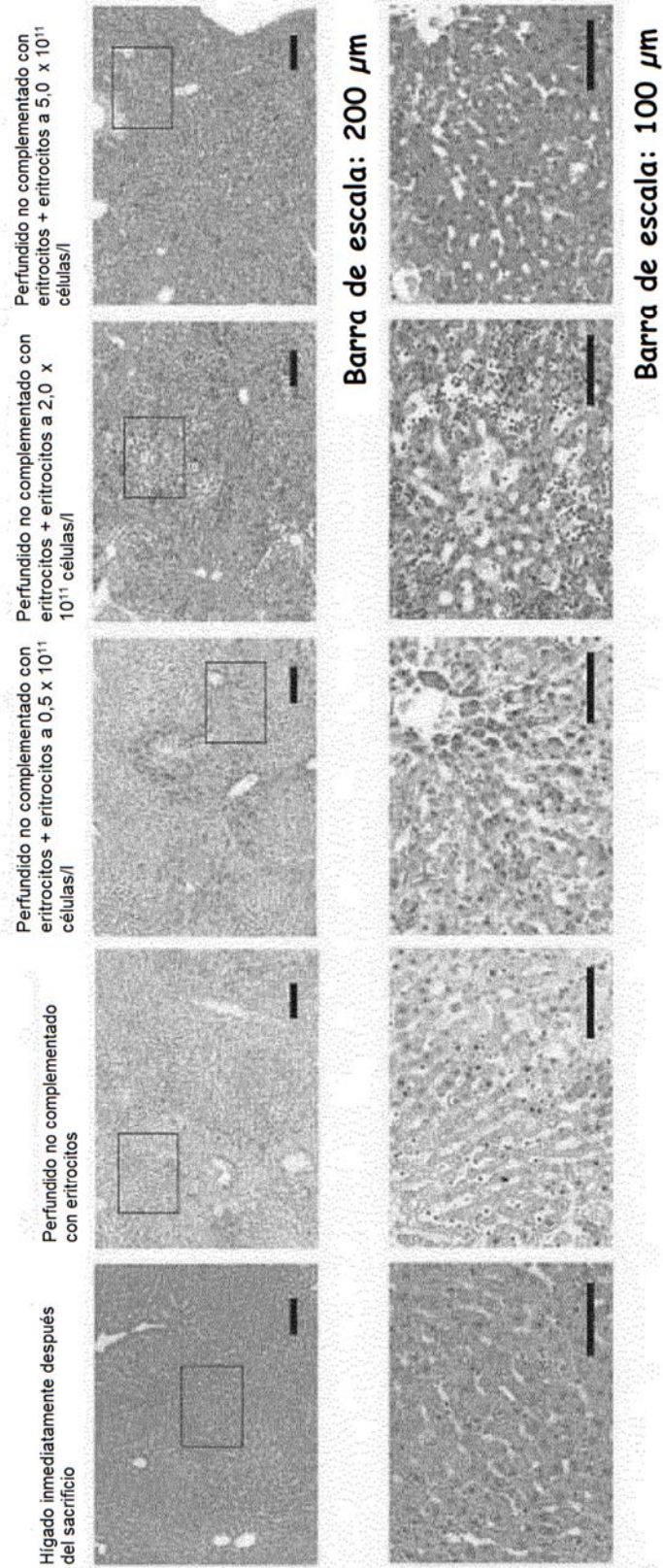
[Figura 1]



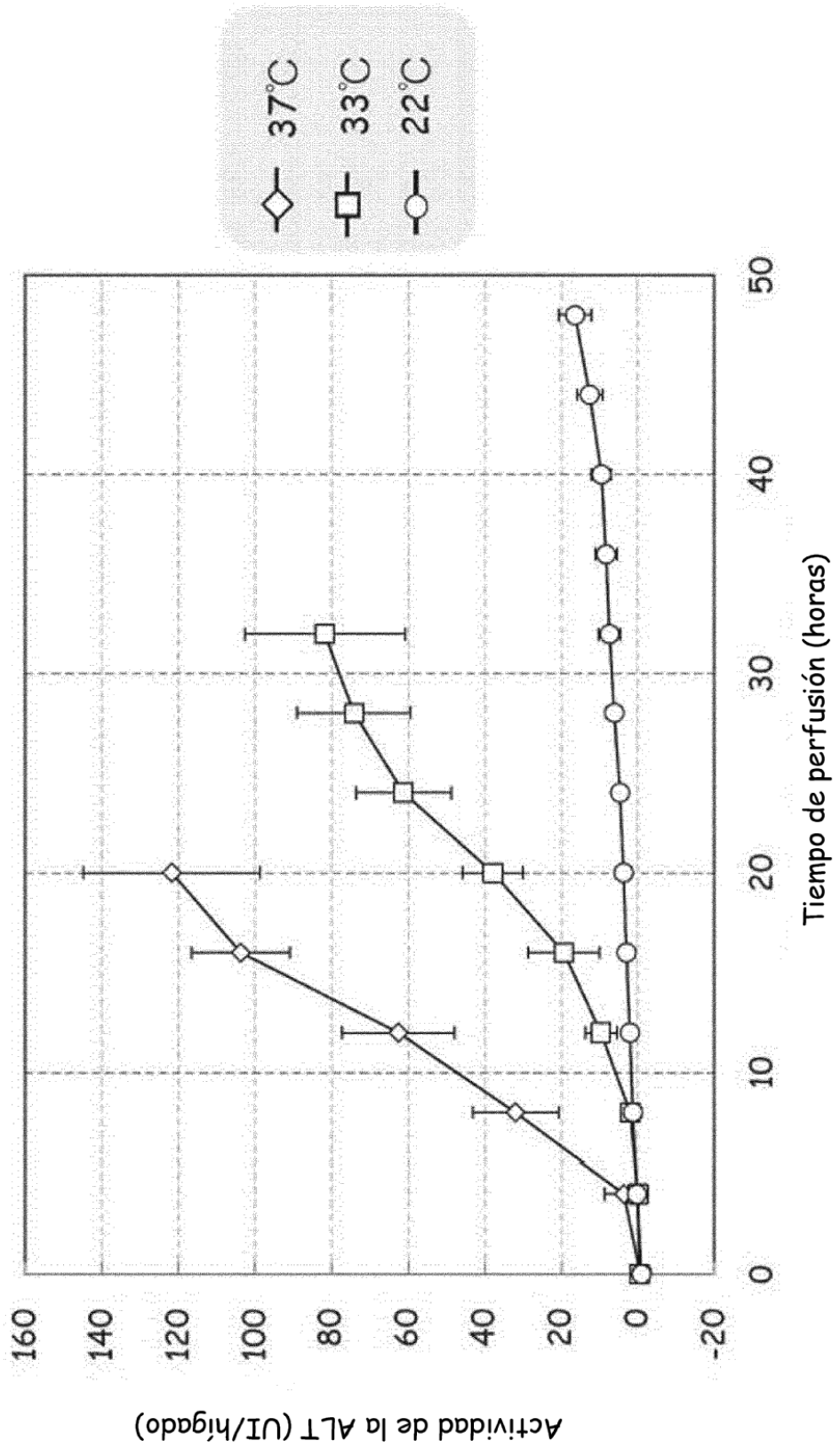
[Figura 2]



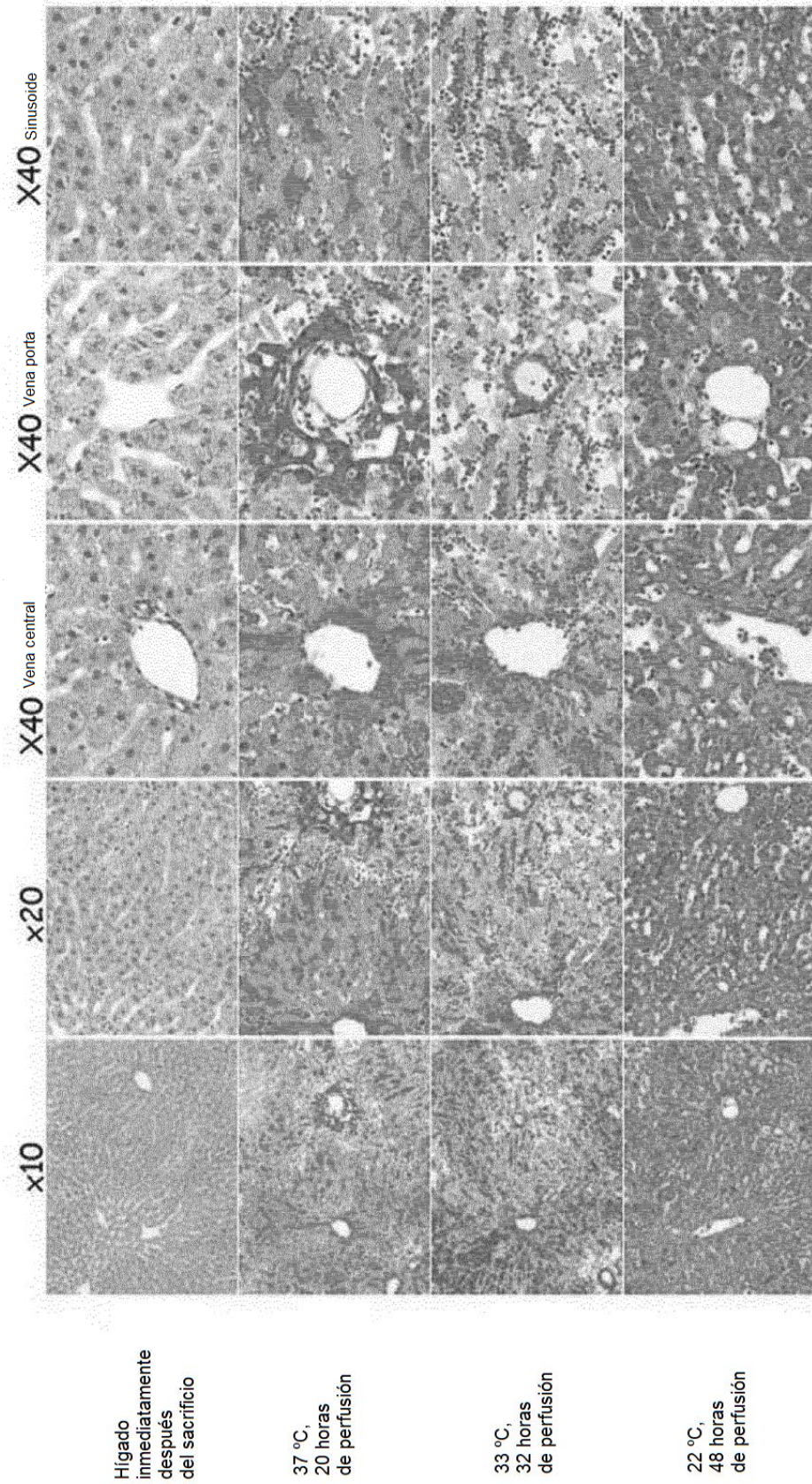
[Figura 3]



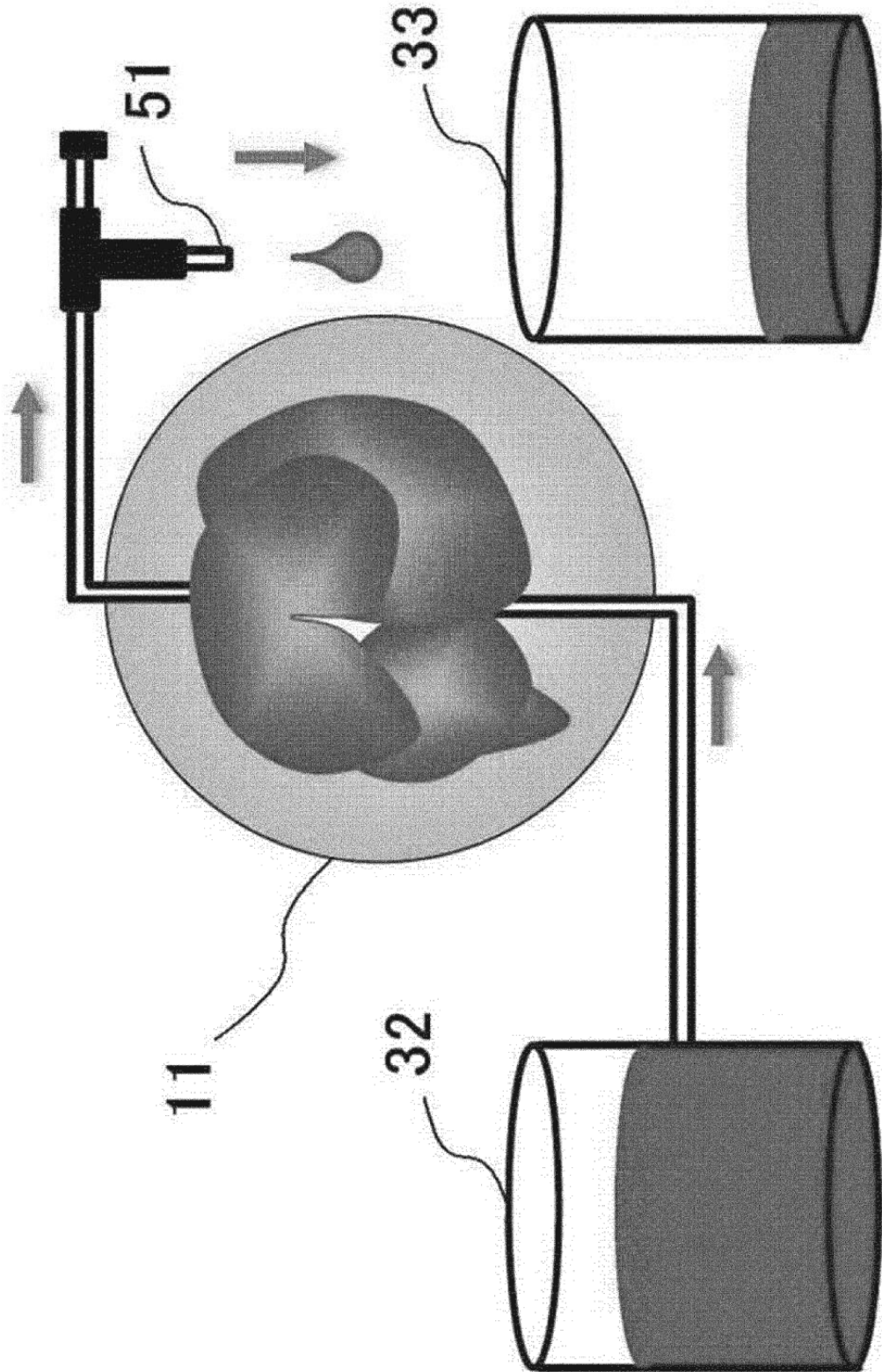
[Figura 4]



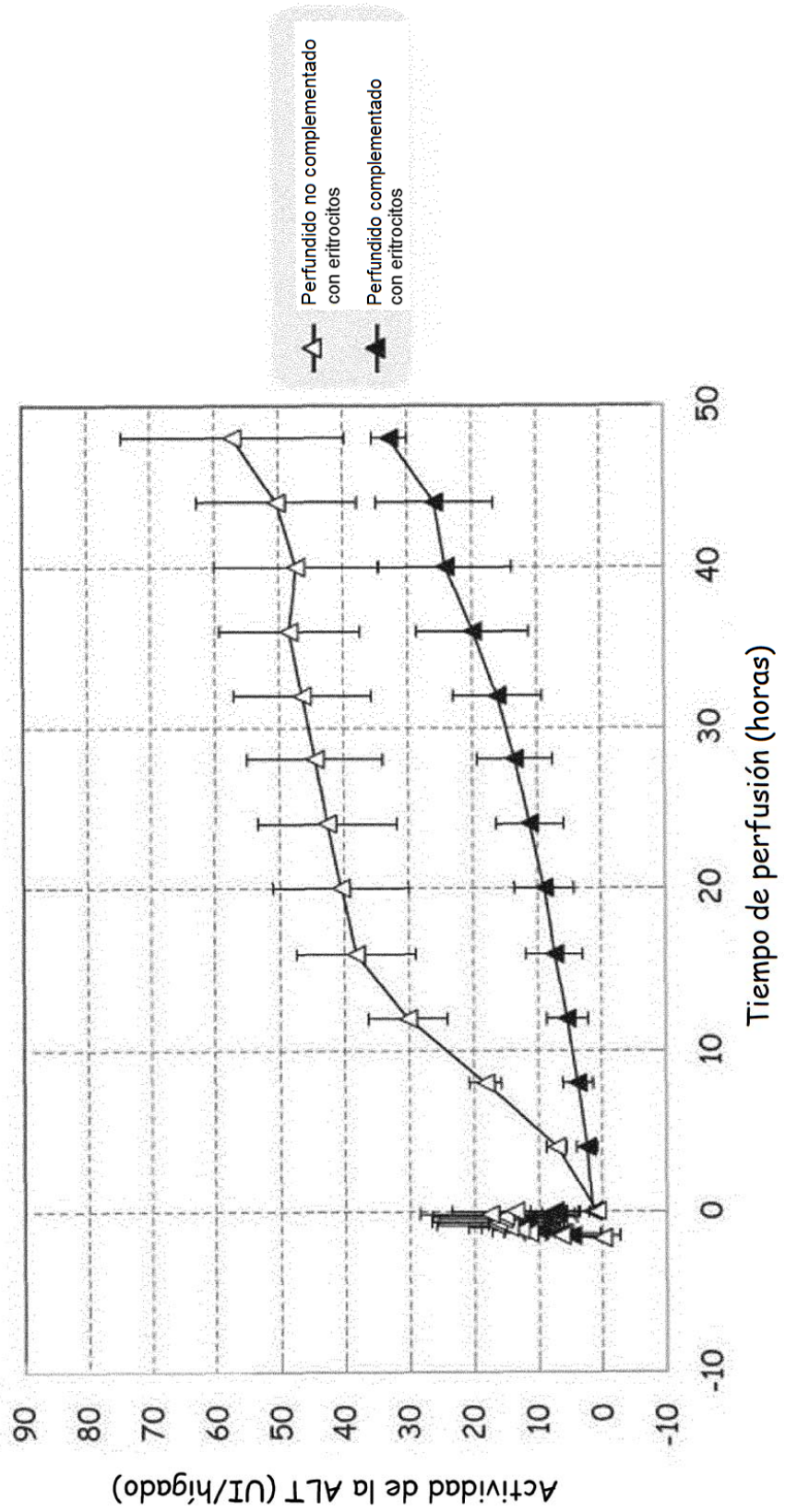
[Figura 5]



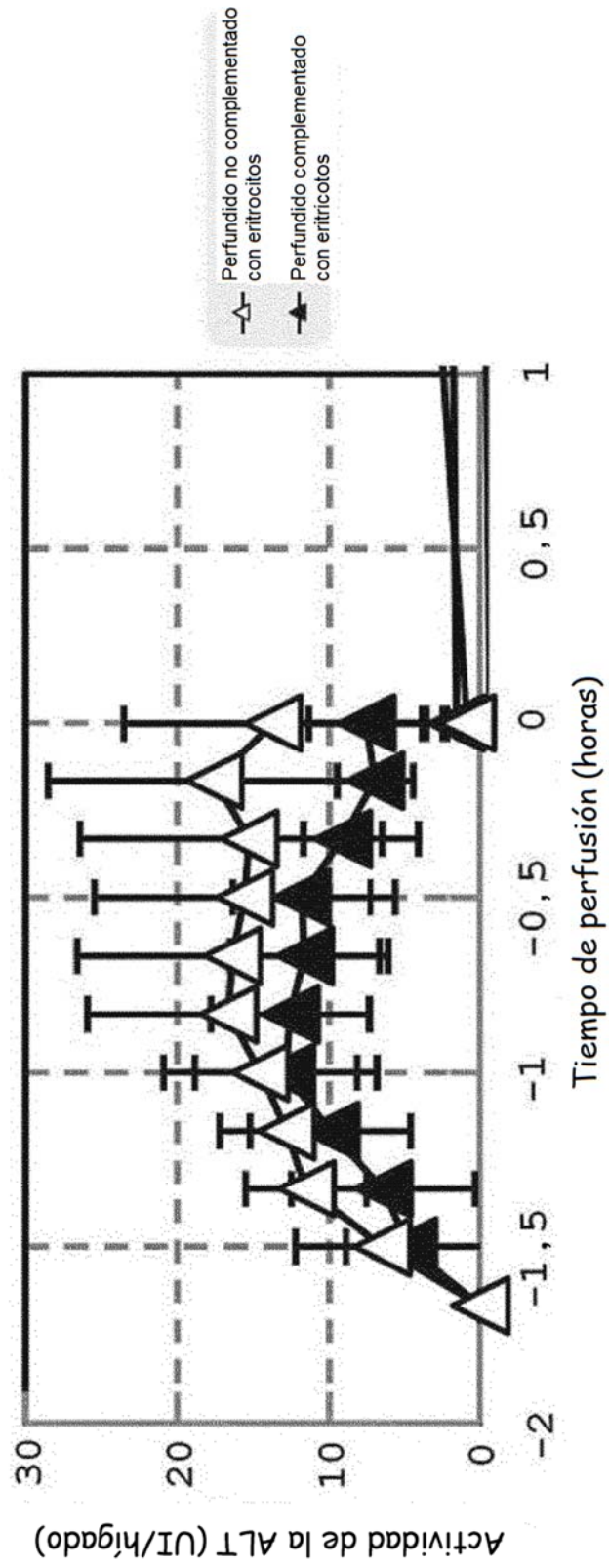
[Figura 6]



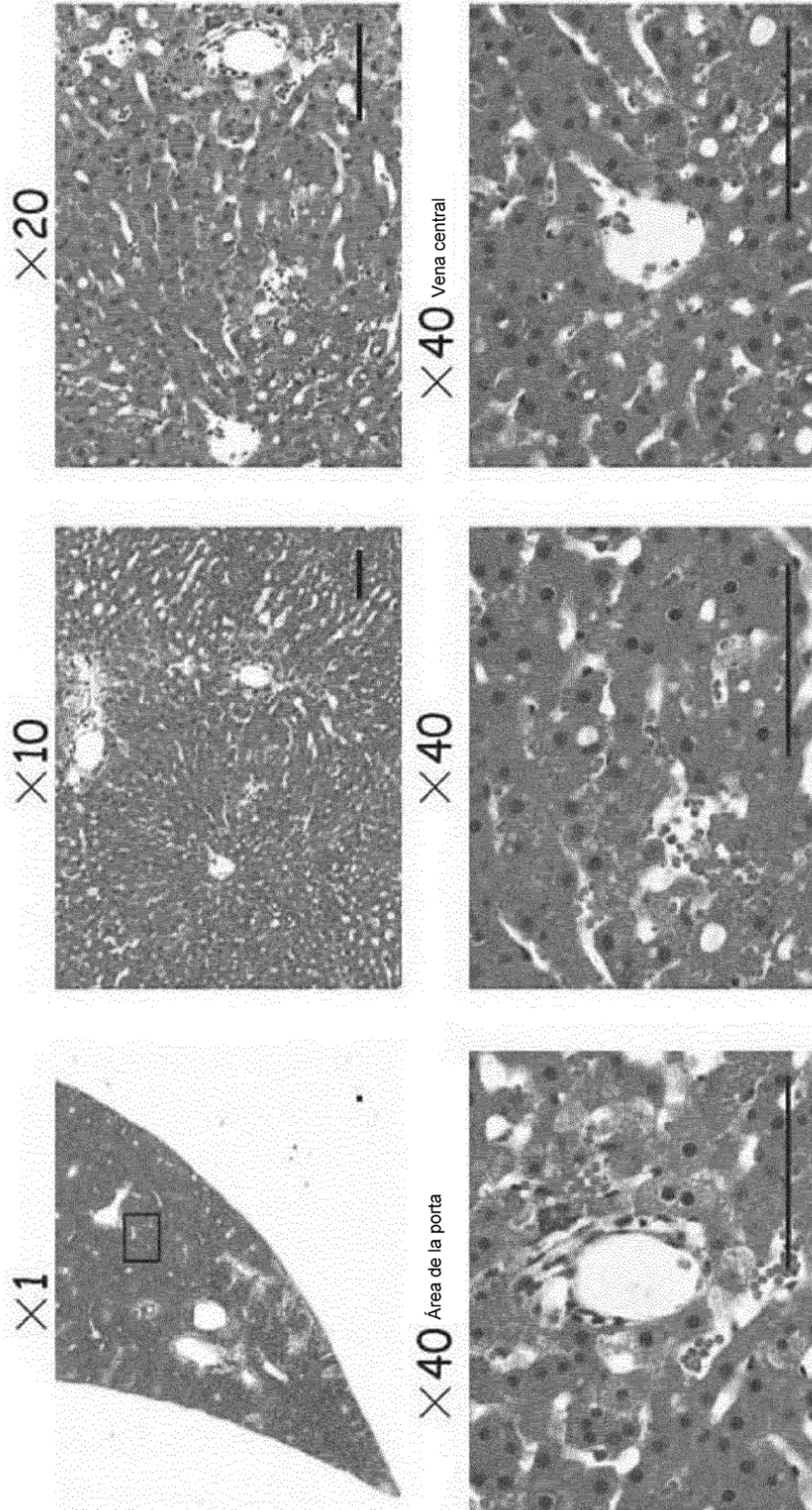
[Figura 7]



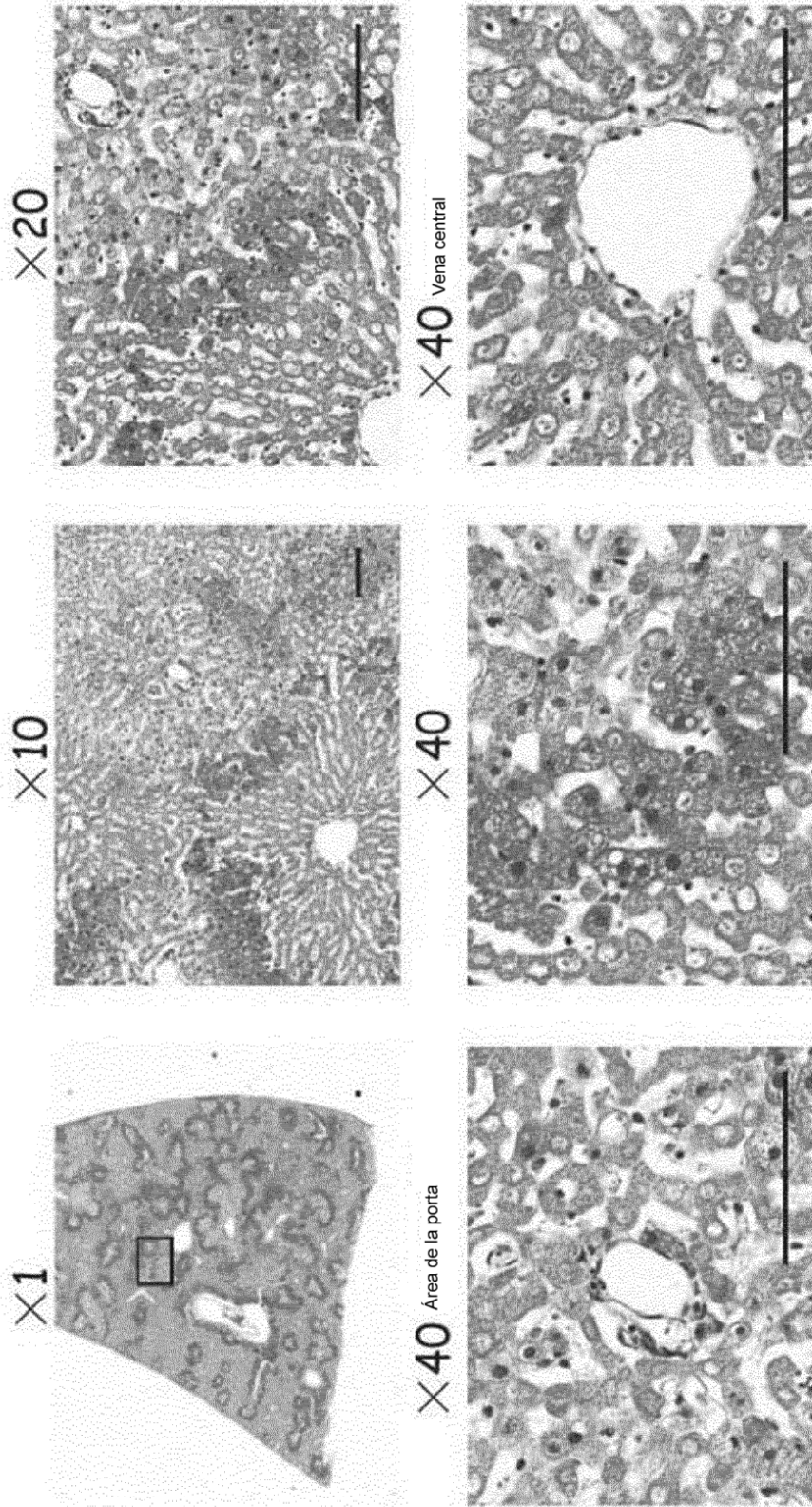
[Figura 8]



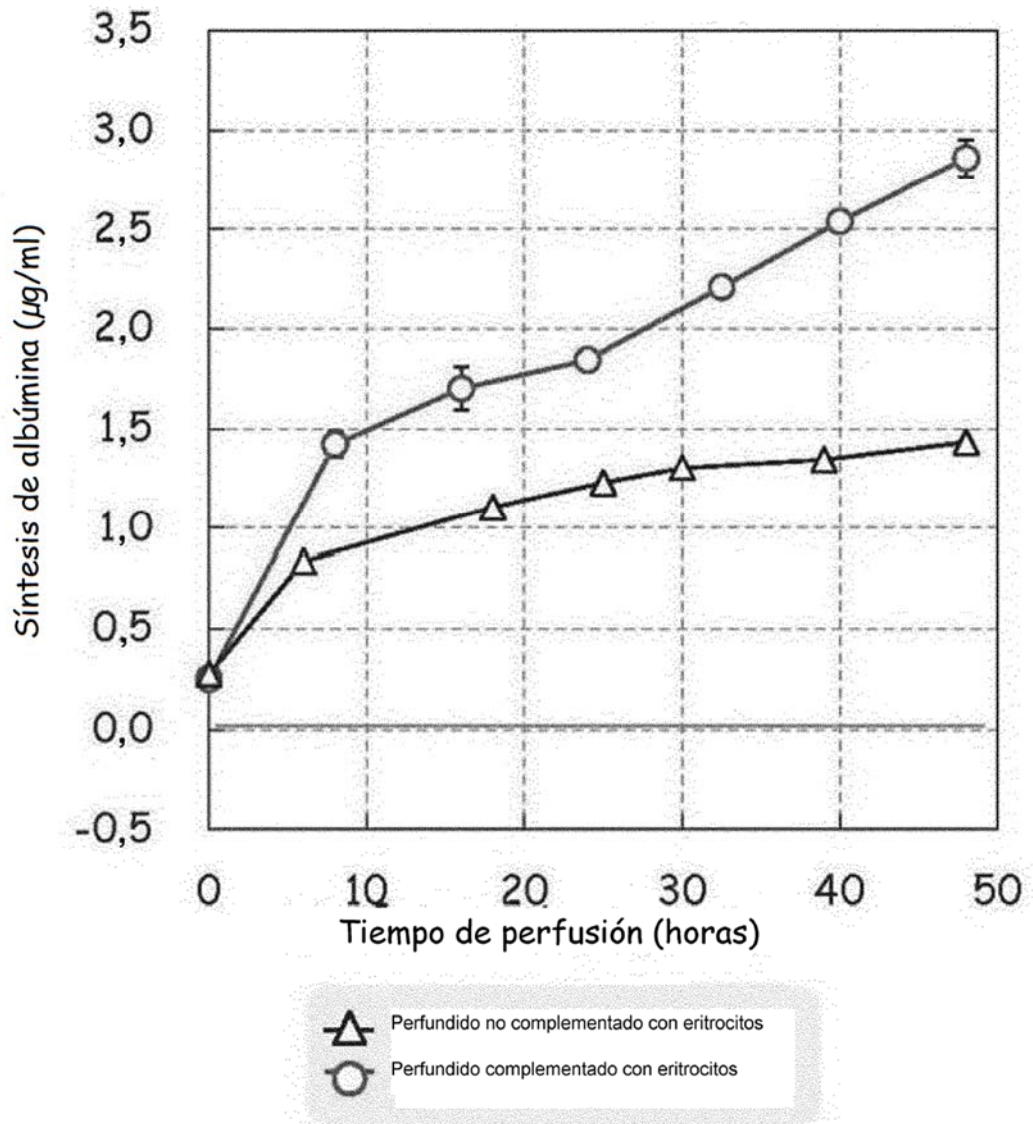
[Figura 9]



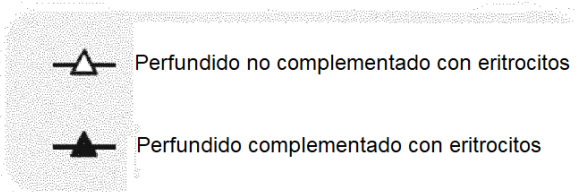
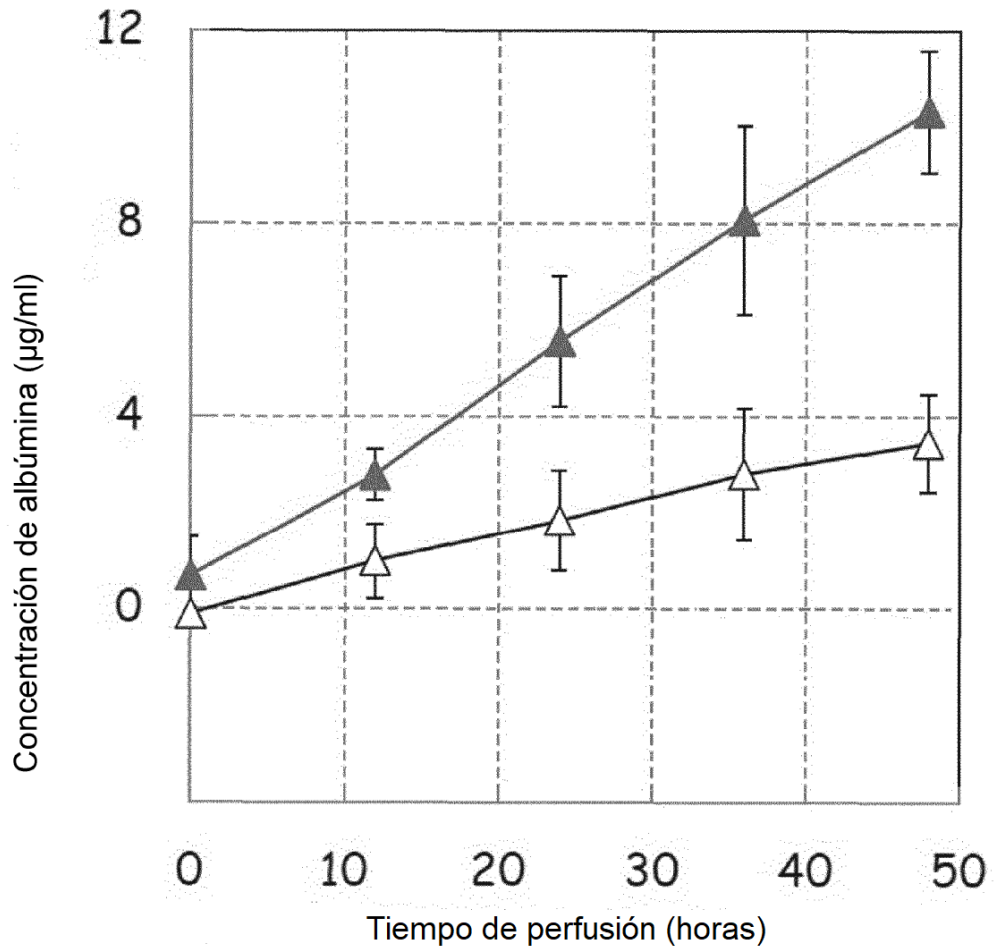
[Figura 10]



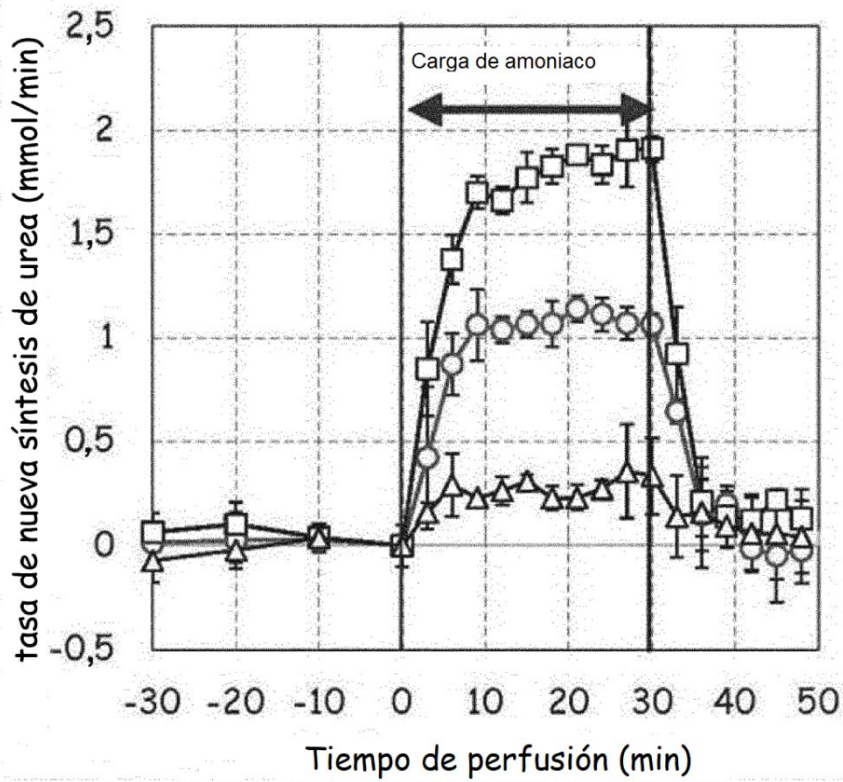
[Figura 11]



[Figura 12]

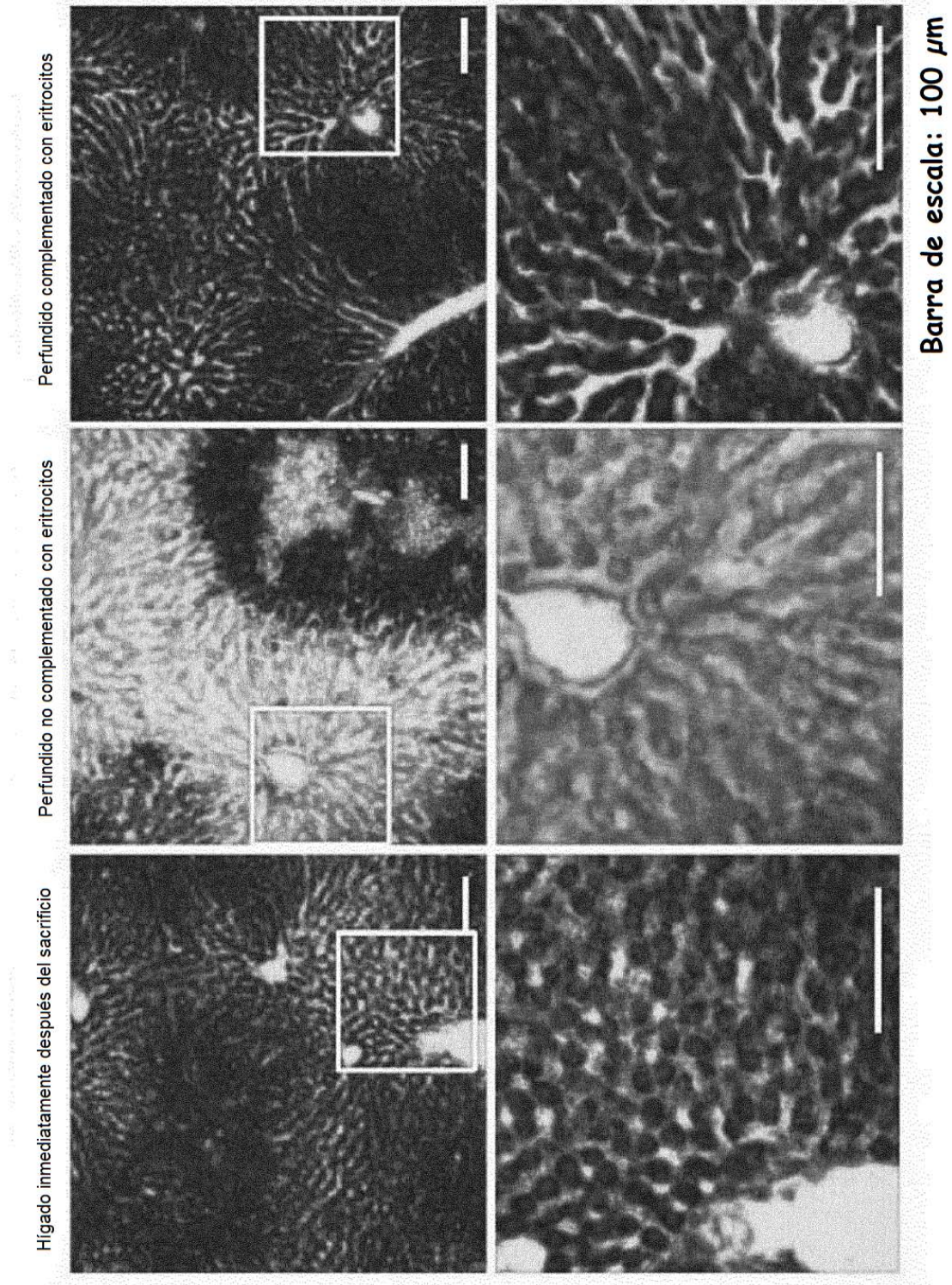


[Figura 13]

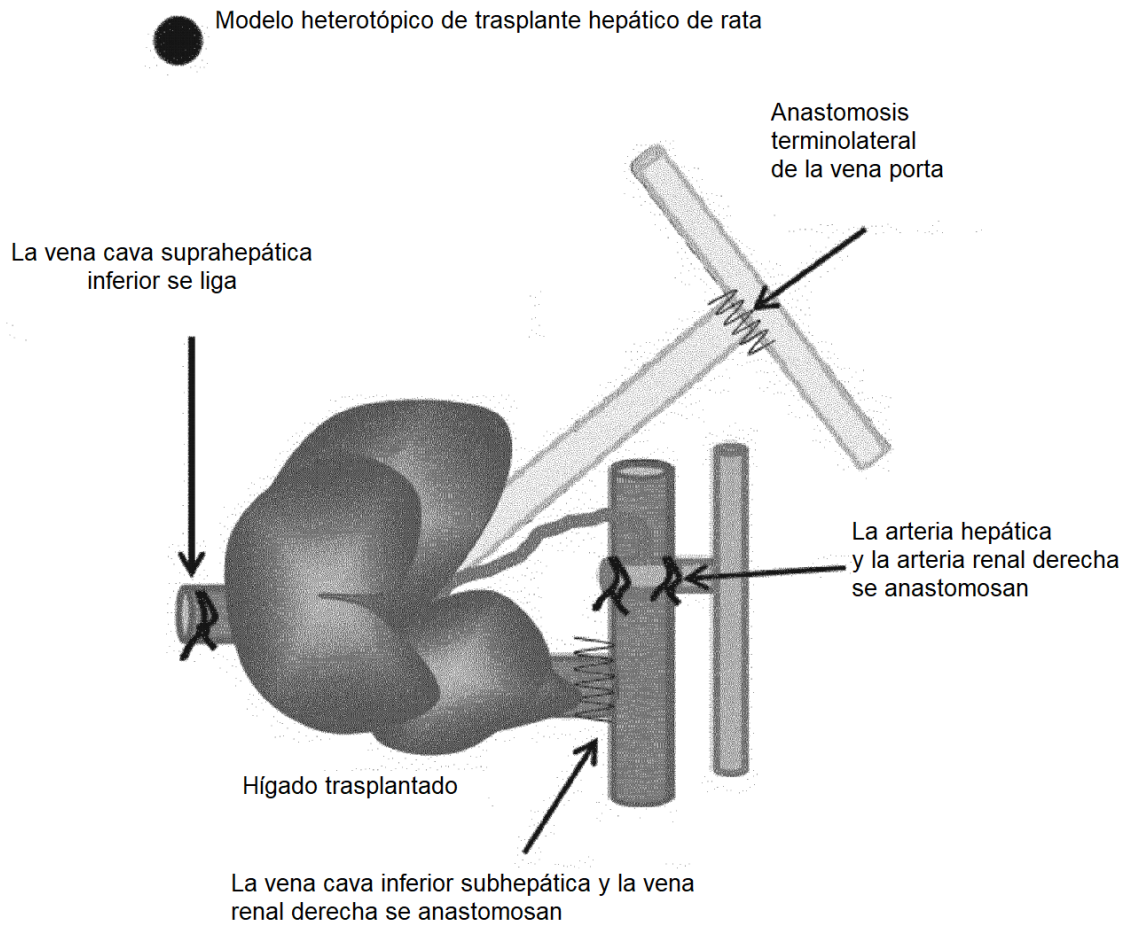


Hígado inmediatamente después del sacrificio
 Perfundido no complementado con eritrocitos
 Perfundido complementado con eritrocitos

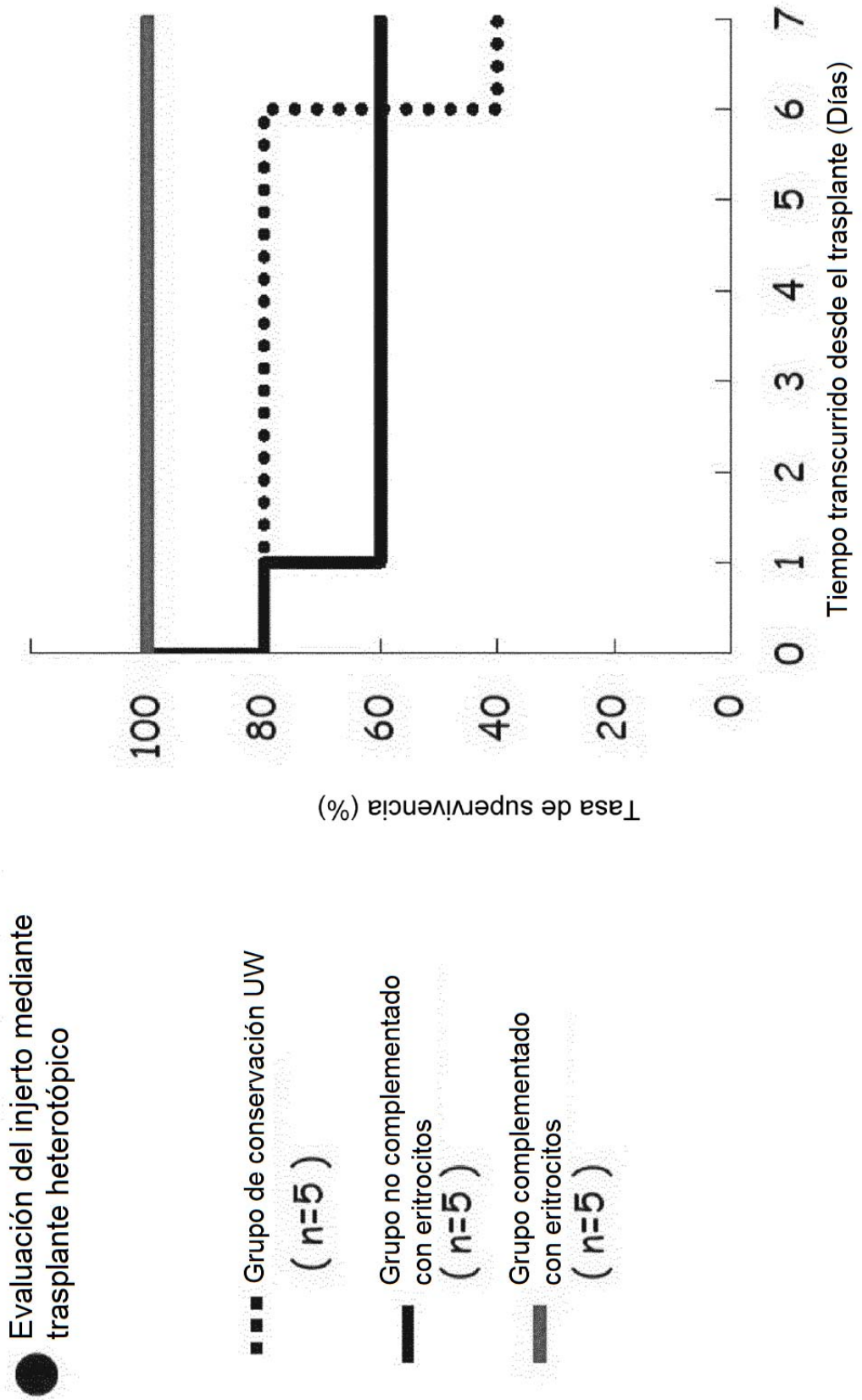
[Figura 14]



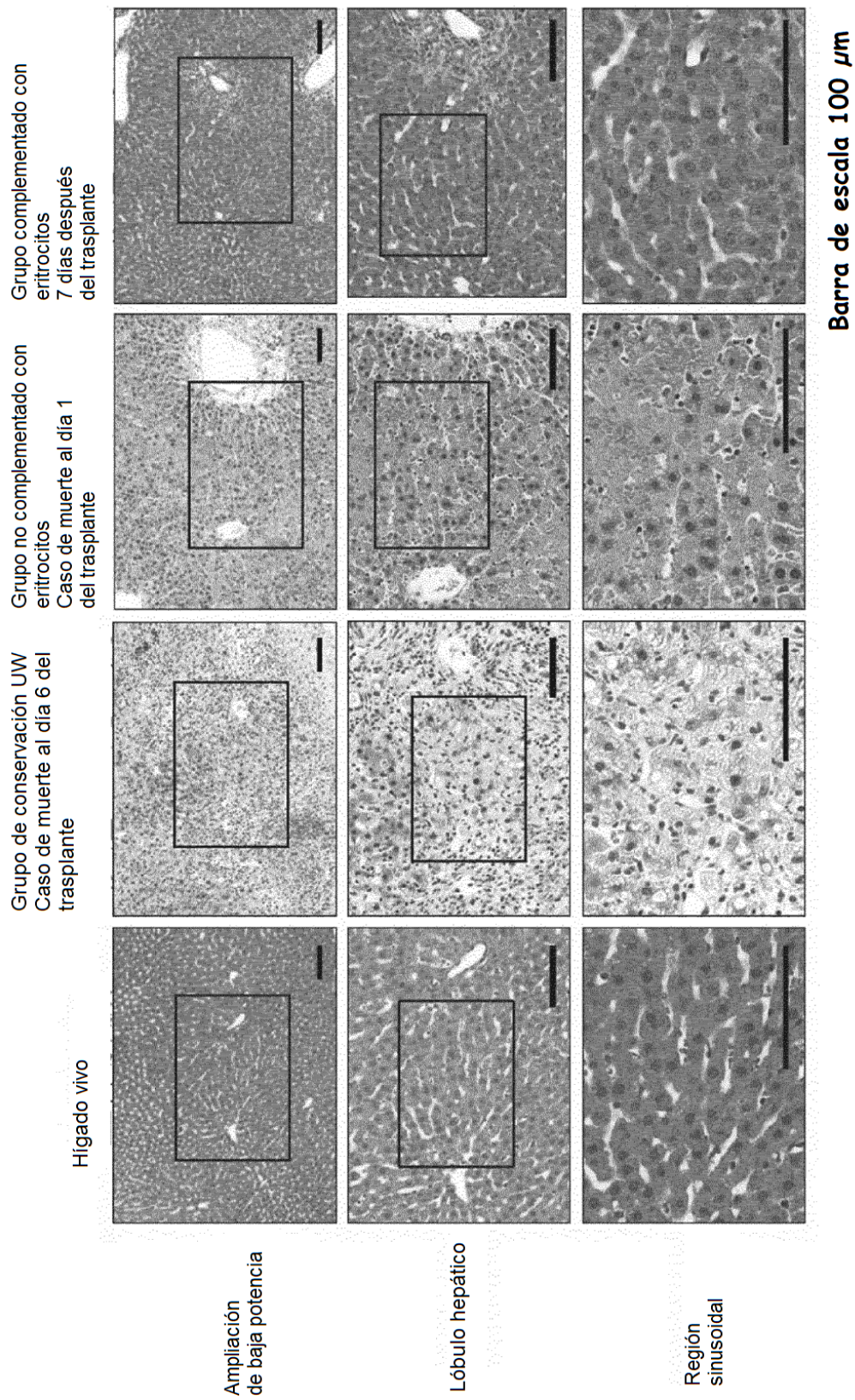
[Figura 15]



[Figura 16]

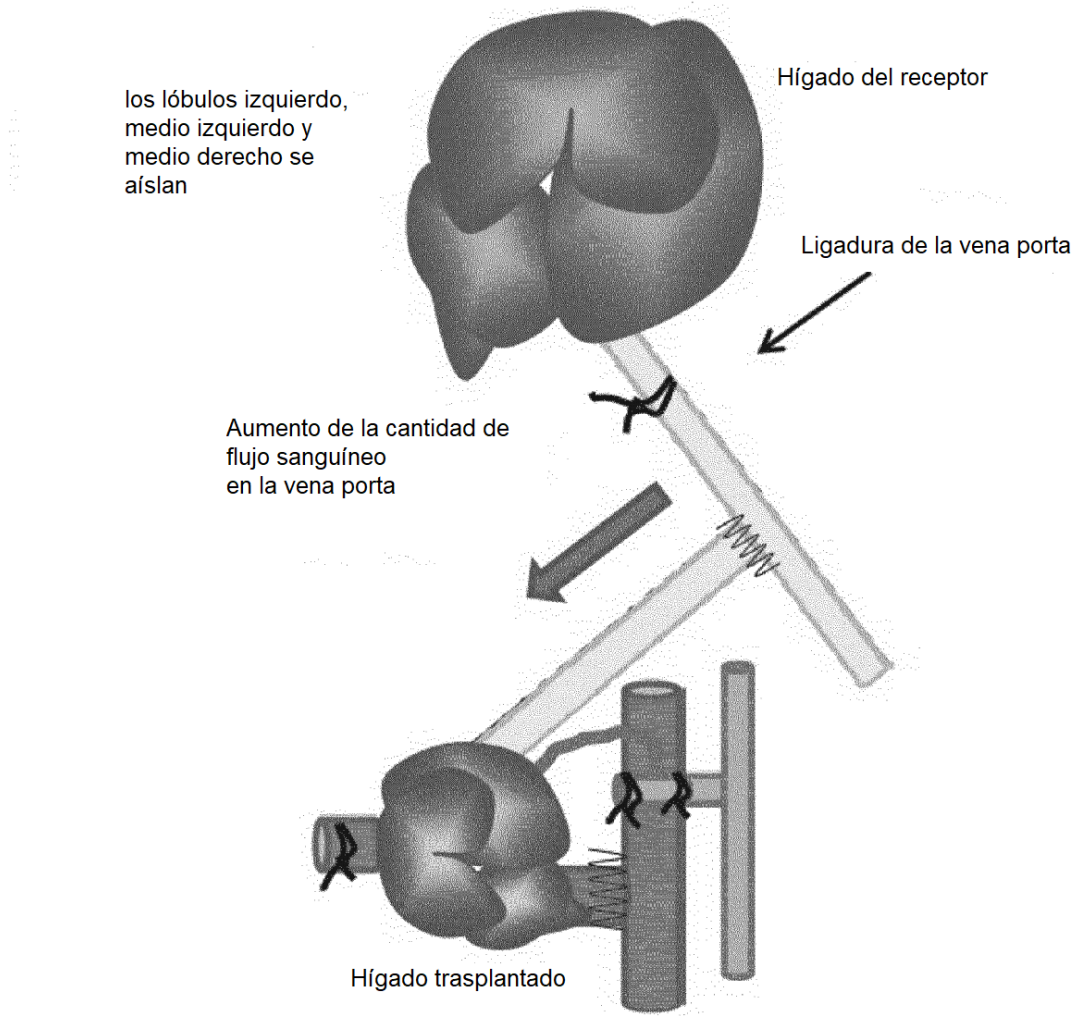


[Figura 17]



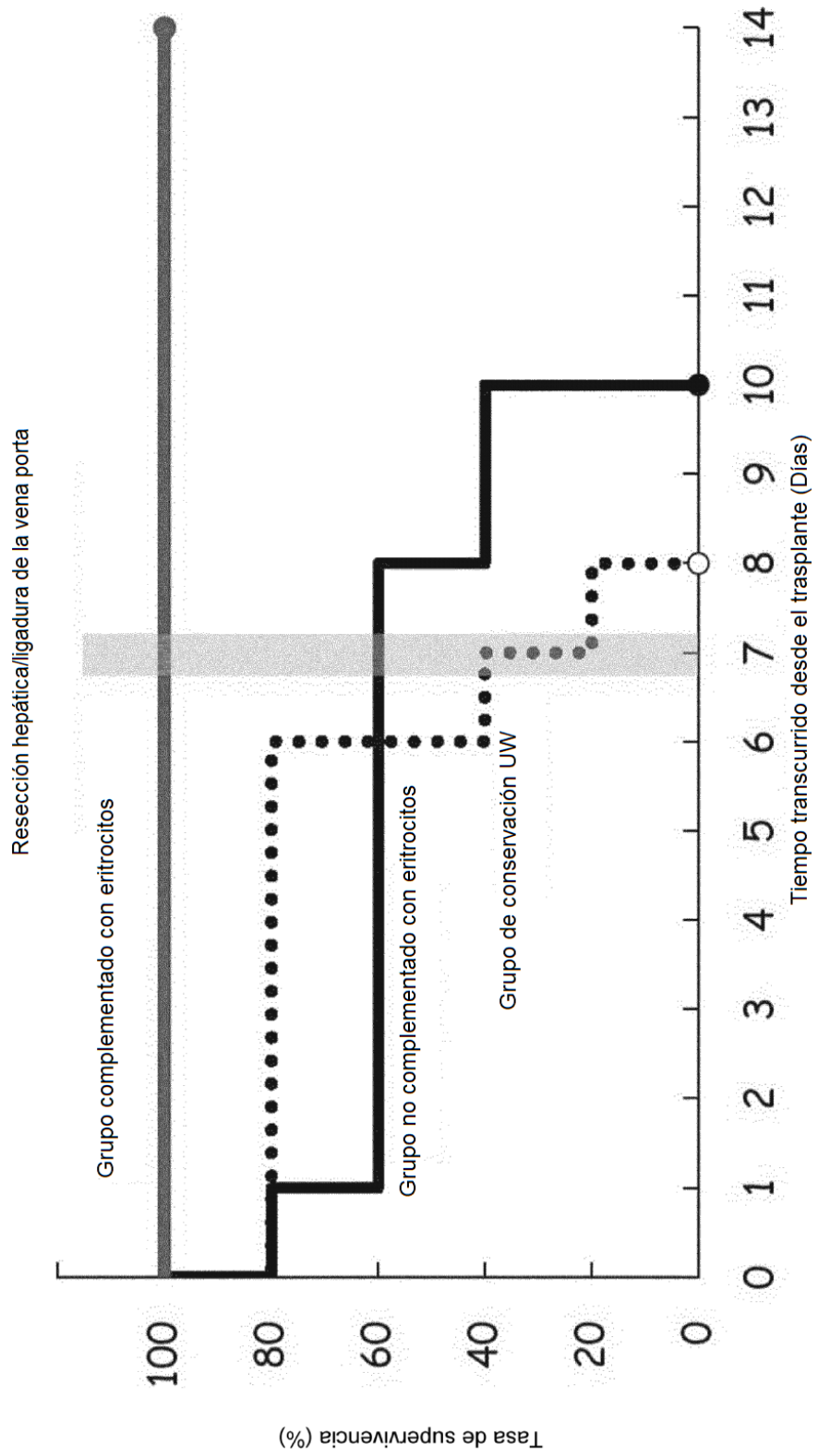
[Figura 18]

● Modelo de resección hepática-ligadura de la vena porta

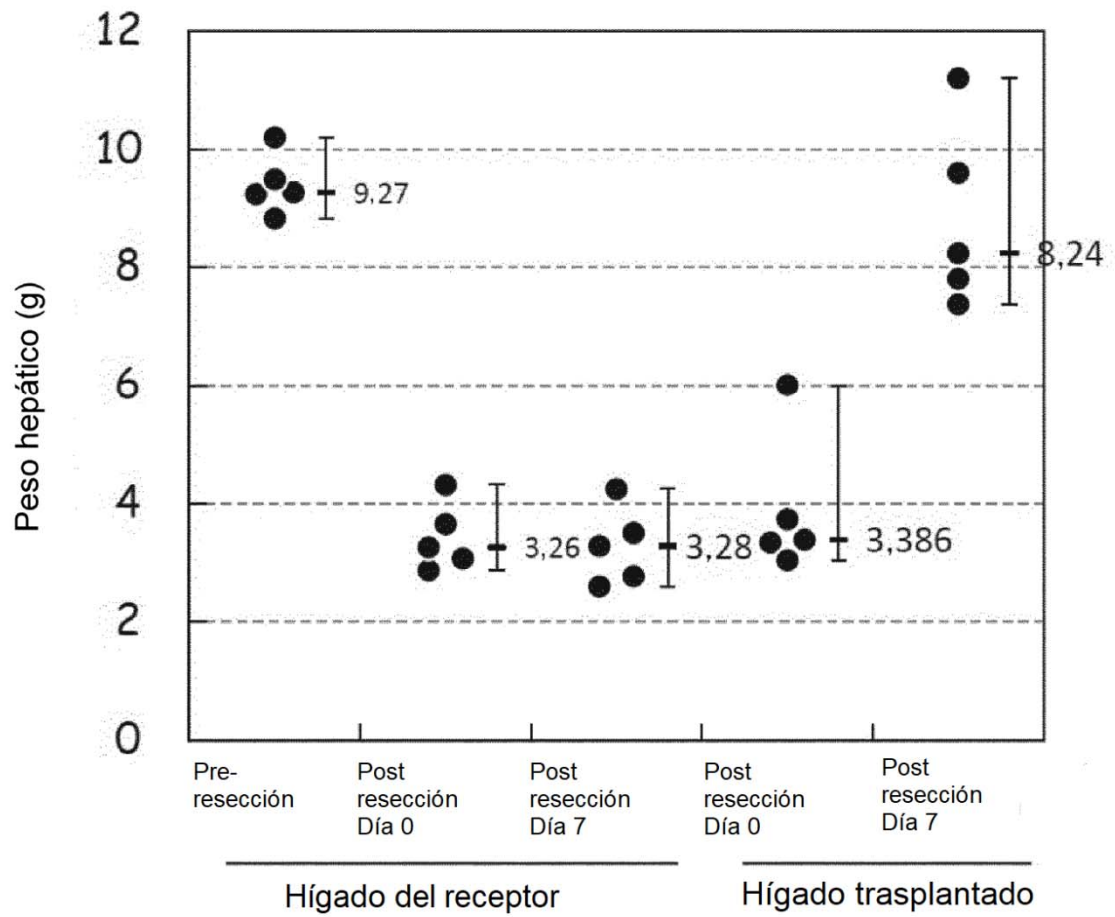


[Figura 19]

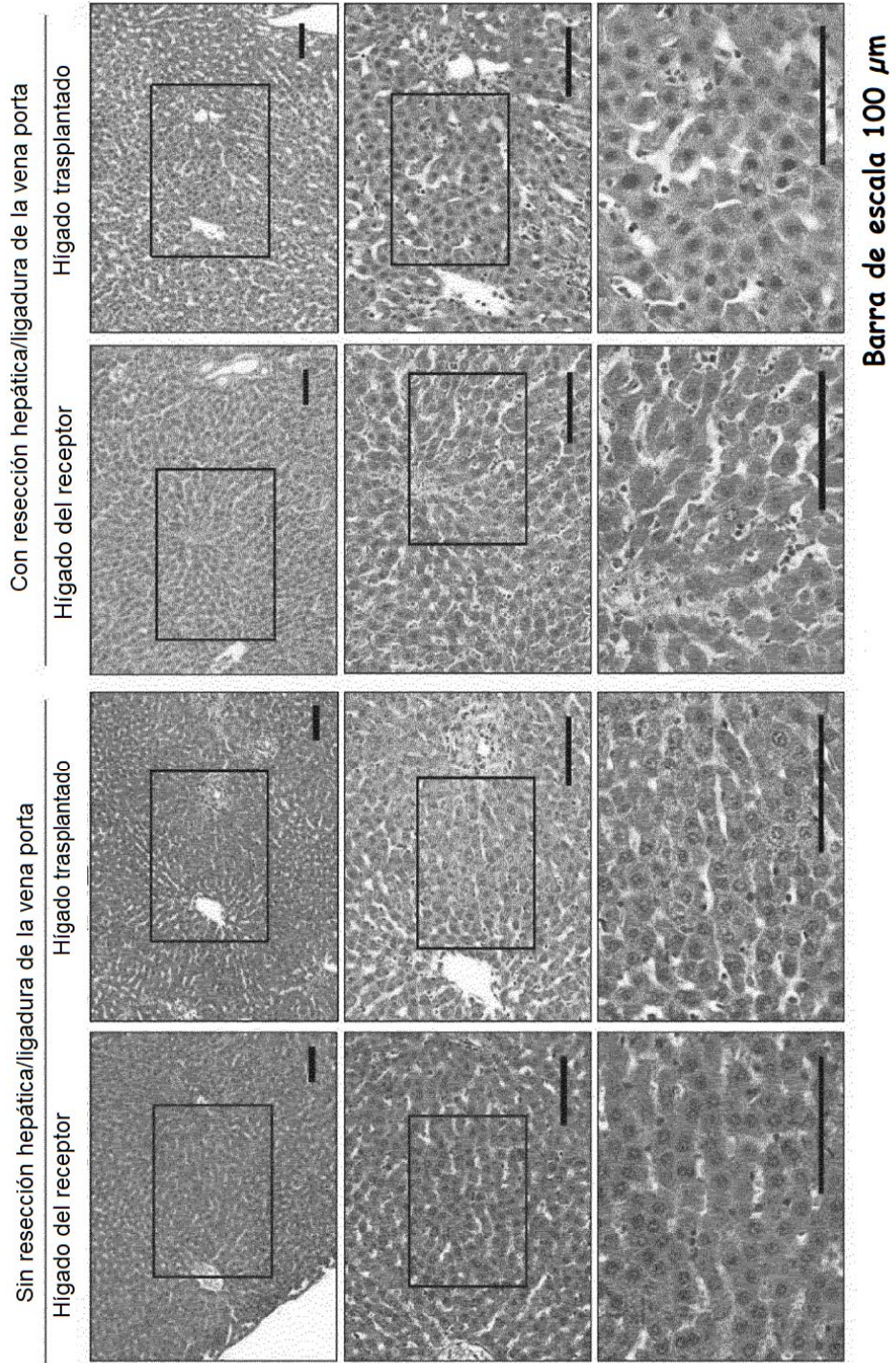
● Análisis de supervivencia después de la resección hepática-ligadura de la vena porta



[Figura 20]



[Figura 21]



Ampliación de baja potencia

Región del lóbulo hepático

Región sinusoidal

[Figura 22]

