

PROCEDIMIENTO PARA LA QUIMERIZACIÓN DE ÓRGANOS MEDIANTE TRATAMIENTO CELULAR

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere al campo de la conservación de cuerpos humanos o animales o parte de ellos y conservación de partes vivas. Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Existen en el estado de la técnica diversos tipos de métodos que se implementan con el fin de superar las reacciones presentadas por el sistema inmunológico de los pacientes sometidos a procedimientos de trasplante de órganos.

Por otro lado, al quimerizar se transmite la información genética contenida en las células madres del receptor al tejido u órgano a trasplantar, con el propósito de
15 disminuir las probabilidades de rechazo y la utilización de drogas inmunosupresoras, medicamentos que hacen que el organismo humano disminuya la producción de los anticuerpos para prevenir el rechazo de órganos trasplantados, pero que pueden presentar efectos colaterales en el organismo.

En el campo de las patentes relacionadas con procesos de quimerización se
20 observa, dentro del estado del arte cercano a la invención la solicitud CN1576364, la cual, divulga un método de trasplante de piel heterogéneo a largo plazo mediante células mesuradas heterogéneas para formación de tolerancia. La presente invención también se refiere al método de inducción de quimeras estables en células heterogéneas.

- 25 La patente US7892578B2 divulga un procedimiento para el tratamiento de trastornos hematológicos, tanto neoplásicos (cánceres hematológicos) como en condiciones no neoplásicas, mediante la inducción de quimerismo mixto utilizando células mieloreactivas.

OBJETO DE LA INVENCION

- La presente invención divulga un procedimiento para la quimerización de órganos y tejidos humanos mediante tratamiento celular previo a procedimientos de trasplante, el cual, evita el rechazo de los órganos trasplantados y disminuye o
suspende el uso de drogas Inmunosupresoras en pacientes sometidos a
35 procedimientos de trasplante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: Muestra una secuencia de las etapas comprendidas dentro del procedimiento de quimerización de órganos objeto de la invención.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Cuando un órgano deja de funcionar en un paciente, éste debe ser reemplazado por uno funcional. Para ello se requiere de un procedimiento conocido como trasplante de órganos. Sin embargo, el procedimiento enfrenta la posibilidad de rechazo por parte del receptor del órgano implantado, debido a que el sistema inmunológico reacciona a todo lo ajeno al cuerpo (virus, bacterias, células, etc).

Lo que se busca en los trasplantes es lograr superar al sistema inmunológico y esto se ha logrado hasta ahora de 3 formas:

- a) Emparejamiento.
- b) Inmunosupresión no específica
- 15 c) inducción de tolerancia al trasplante.

El emparejamiento es la vía más usada y con mayores probabilidades de éxito. Por ejemplo, si una persona necesita un trasplante, y cuenta con una familia numerosa, específicamente hermanos, un cuarto de esos hermanos podría poseer el mismo perfil de los antígenos de HLA, el sistema más importante de antígenos para determinar si un trasplante será compatible o no. En estas circunstancias, se necesita una inmunosupresión baja, y los injertos del órgano se aceptan a largo plazo con muy buenos resultados. Sin embargo, el emparejamiento sólo es aplicable a los órganos que se pueden trasplantar sin afectar la vida del donante, como es el caso de riñón o médula ósea. Desafortunadamente, la mayoría de los trasplantes se deben realizar de donantes no emparejados.

El segundo método (inmunosupresión no específica), se centra en superar la barrera inmunológica. Este se realiza con drogas inmunosupresoras no específicas, que han sido una pieza clave en el campo del trasplante de órganos en las últimas tres décadas.

Estas drogas incluyen esteroides, antimetabolitos, y anticuerpos monoclonales. Aunque no sean específicas, tienen selectividad para modificar el comportamiento de las células T del sistema inmunológico y por esa razón son particularmente útiles para suprimir la inmunorespuesta a los trasplantes. Sin embargo, al disminuir la respuesta inmune el paciente trasplantado tiene mayor susceptibilidad a desarrollar infecciones y malignidades. Además, incluso con la mejor de las

medicaciones inmunosupresoras específicas, hay una pérdida inexorable de los injertos, cerca del 7% por año, debido al rechazo crónico.

El tercer método que es la inducción de tolerancia al trasplante, se define como la ausencia específica de respuesta del sistema inmunológico frente a un antígeno, ya sea propio o extraño, inducida por el contacto previo con dicho antígeno. La inducción de tolerancia consiste en, exponer al paciente previamente a células madre hematopoyéticas del donante y posteriormente trasplantar el órgano.

Esta técnica ha tenido resultados variables, en pacientes que han recibido previamente trasplante de médula ósea, y luego se les ha trasplantado un órgano diferente que proviene del mismo donante de las células de médula ósea. Sin embargo no se ha podido aplicar a otro tipo de pacientes. Ésta forma de “Quimerismo” es una de las técnicas utilizadas en la búsqueda del no rechazo de órganos en pacientes trasplantados. Hasta ahora lo que se ha realizado es tratar de sensibilizar el sistema inmune del receptor para que no rechace el órgano trasplantado.

En estas condiciones, la presente invención incorpora un novedoso método mediante el cual, a través de un tratamiento celular previo, se logra la Quimerización del órgano donado.

En medicina, se denomina «quimera» al organismo formado por células procedentes de distintos individuos. Su formación se ha descrito como un evento espontáneo en escenarios tales como, el inicio de la gestación, el trasplante de órganos o transfusión.

El método *in vitro* para la formación de quimeras se ha denominado Quimerización, un proceso por el cual se pretende transferir al órgano la identidad genómica del receptor.

El éxito del proceso se determina mediante la evaluación de los perfiles de microsatélites (STRs) de los genomas del donante y el receptor, con el fin de identificar una combinación de estos perfiles únicos en el órgano quimerizado, hasta alcanzar una identidad del 100% del genoma del receptor. Con este método se busca evitar el rechazo por activación del sistema inmune, y por ende, disminuir el uso de medicamentos inmunosupresores, dando como resultado una mejor calidad de vida al paciente.

Este método se desarrolló en el laboratorio de Cultivos Celulares IN VITRO, Farmacología de la Universidad del Valle. El órgano a trasplantar es mantenido en condiciones adecuadas de temperatura, humedad, y oxigenación. Se realiza un lavado del órgano que remueve células sanguíneas del donante, y posteriormente, se cultiva el órgano en presencia células madre de médula ósea del receptor, en

un medio de cultivo provisto de nutrientes vitales y factores de crecimiento, para posteriormente trasplantarlo en el paciente receptor.

El novedoso método de quimerización de órganos y tejidos comprende las etapas que se describen a continuación:

5

1. Extracción de células de médula ósea.

Las células de médula ósea se caracterizan por ser pluripotenciales, esto significa que estas células tiene la capacidad de diferenciarse en una gran variedad de líneas celulares, lo cual, las convierte en la primera elección para llevar a cabo este tipo de procedimientos.

La extracción de células de médula ósea es realizada por un médico hematólogo, en un quirófano bajo estrictas condiciones de asepsia, y anestesia general.

El procedimiento se lleva a cabo 24 horas antes del proceso de quimerización, guardando la muestra en bolsas de transferencia tipo TERUFLEX Blood Bags®.

Con la aspiración se obtienen células madre y otros progenitores de la sangre. Se obtiene médula ósea en un volumen aproximado de 200 ml hasta 1 Litro.

2. Preparación de medios para el procedimiento de quimerización del órgano.

2.1 Solución electrolítica.

Se prepara el medio de lavado del órgano objeto de quimerización mediante una solución electrolítica balanceada diseñada para mantenimiento de órganos, la cual, para un volumen final de 1 Litro, consta de los siguientes elementos:

- Cloruro de sodio 0,8766 g (15 mmol)
- Cloruro de potasio 0,6710 g (9 mmol)
- Ácido α-cetoglutarico monopotásico 0,1842 g (1 mmol)
- Cloruro de magnesio hexahidratado 0,8132 g (4 mmol)
- L-histidina clorhidrato monohidratado 3,7733 g (18 mmol)
- L-histidina 27,9289 g (180 mmol)
- L-triptófano 0,4085 (2 mmol)
- Manitol 5,4651 (30 mmol)

- Cloruro de calcio dihidratado 0,0022 g (0,015 mmol)
- Solución acuosa 1 000 mL.

Esta solución puede ser preparada a partir de los compuestos anteriormente mencionados, o adquirirse comercialmente con los nombres de: HenRoss,
5 Perfadex, Wisconsin, Custodiol, etc.

2.2. Medio de Lavado.

Se adiciona el medio de lavado del órgano objeto de quimerización mediante una solución, la cual, para un volumen final de 4 Litros, consta de los siguientes
10 elementos:

- 2 L de HBSS sin rojo de fenol (1X)
- 2 L de RPMI sin rojo de fenol (1X)
- 40 ml Glutamato (10%)
- 40 ml Piruvato de sodio (10%)
- 100 ml Albumina bovina (2.5%)
- 10 ml vitamina C (0.25 mg/ml)
- 8 ml N-acetilcisteína (0.2%)
- 976 mg Nicotinamida
- 40 ml de penicilina/Streptomicina (1000 U/L)
- 2 ml Anfotericina B (2.5 mg/L)

La composición de la solución HBSS comprende los siguientes elementos en las proporciones que se detallan a continuación:

Componentes	Concentración (g/L)
SALES INORGÁNICAS	
Cloruro de calcio (CaCl2)	0.14
Cloruro de potasio (KCl)	0.40
Fosfato de potasio monobásico (KH2PO4)	0.06
Cloruro de magnesio (MgCl2 - 6H 2O)	0.10
Sulfato de magnesio (MgSO4 - 7H2 O)	0.10
Cloruro de sodio (NaCl)	8.00
Bicarbonato de sodio (NaHCO3)	0.35
Fosfato Sódico Dibásico (Na2HPO4)	0.048
OTROS COMPONENTES:	
Glucosa	1.00

La composición de la solución RPMI comprende los siguientes elementos en las proporciones que se detallan a continuación:

Componentes	Concentración (g/L)
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Bicarbonato de sodio	1
Cloruro de sodio	6.4
Fosfato Sódico Dibásico (anhidro)	0.8
L-Arginina	0.2
L - Asparagina (anhidra)	0.05
Ácido L-aspártico	0.02
L - cistina • 2HCl	0.0652
Ácido L-glutámico	0.02
Glicina	0.01
L - histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-isoleucina	0.05
L-Leucina	0.05
L - lisina • HCl	0.04
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02
L-Serina	0.03
L-Treonina	0.02
L-triptófano	0.005
L - tirosina • 2Na • 2H2O	0.02883
L-valina	0.02
D-biotina	0.0002
Cloruro de colina	0.003
Ácido fólico	0.001
Mio-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Ácido p-aminobenzoico	0.001
Ácido D-pantoténico (hemicalcium)	0.00025
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
D-Glucosa	2
Glutati6n (reducido)	0.001
HEPES	4.77
L-glutamina	0.3

2.3. Medio de cultivo para mantenimiento del órgano con células de médula ósea.

Para un volumen total de 4 Litros:

- 4L de RPMI sin rojo de fenol (1X)
- 5 • 20 ml Glutamato (5%)
- 20 ml Piruvato de sodio (5%)
- 100 ml Peptona (2.5%)
- 10 ml vitamina C (0.125 mg/ml)
- 8 ml N-acetilcisteína (0.1%)
- 10 • 488 mg Nicotinamida
- 40 ml de penicilina/Streptomicina (1000 U/L)
- ml Anfotericina B (2.5 mg/L)

3. Procedimiento de quimerización

- 15 El órgano a trasplantar, es lavado, usando el medio para el lavado de órganos, *In situ* antes de su explante, para extraer todo resto celular de líneas blancas y rojas del sistema vascular.

- Posteriormente, se canula la arteria principal del órgano, y se empaca en el quirófano para ser enviado al Laboratorio de procesamiento de órganos, en
- 20 condiciones de esterilidad y refrigeración idóneas. Una vez en el laboratorio, se extrae el órgano de la bolsa de transporte al interior de la cabina de bioseguridad en un ambiente estéril, y se inicia el proceso de quimerización, que consta de tres partes: Lavado, cultivo/mantenimiento en medio nutritivo, y quimerización por co - cultivo con células madres de médula ósea procedentes del paciente receptor del
- 25 trasplante.

3.1 Lavado de Órgano a trasplantar, Proceso Hipotérmico 3°C.

- Se coloca el órgano en un recipiente de vidrio adecuado para su tamaño, el cual se conecta a un intercambiador de calor que posee dos extremos, y por medio de
- 30 un sistema de mangueras se conecta de la siguiente forma: un extremo se conecta a la arteria canulada del órgano, el otro extremo pasa por un sistema hidráulico que mantiene el flujo al interior de la manguera constante conectado al

recipiente de vidrio que contiene la solución de lavado. El órgano permanece sumergido en la solución de lavado durante todo el proceso.

Para lavado se utiliza el mismo medio para lavado de órganos descrito en el punto 2.1.

- 5 El volumen de flujo de perfusión de la bomba peristáltica debe estar entre 15 - 75 ml/min, dependiendo del órgano.

Se mantiene todo el sistema a 3°C por medio de un intercambiador de calor.

- Adicionalmente, se conecta al recipiente de vidrio que contiene el órgano un aireador el cual suministra oxígeno de manera constante, durante todo el proceso,
10 para obtener una saturación del 100%.

El recipiente de vidrio se muestra conectado a un intercambiador de calor en espiral, que en su otro extremo se conecta por medio de otra manguera plástica siliconada a una bomba peristáltica que regula el flujo de la solución en la que está embebido el órgano.

- 15 El tiempo de perfusión de lavado dura aproximadamente dos horas.

3.2 Cultivo y mantenimiento de Órgano a trasplantar, Proceso Hipotérmico 3°C.

- Se extrae del recipiente de vidrio que contiene el órgano toda la solución de
20 lavado.

Se incorpora la solución de medio de cultivo para el órgano (ver sección 2.2) con volumen de perfusión aproximado de 15 -75 ml/min, dependiendo del órgano.

Se continúa oxigenando para mantener una saturación del 100%, durante todo el proceso.

- 25 Tiempo de perfusión de cultivo y mantenimiento aproximadamente dos horas.

3.3 Cultivo con células de médula ósea del Receptor a 30°C.

Se extrae del recipiente de vidrio que contiene el órgano toda la solución de medio de cultivo para el órgano.

- 30 Se coloca el medio de cultivo para mantenimiento del órgano con células de médula ósea (ver sección 2.3).

Se agregan las células de médula ósea obtenidas del paciente (receptor) para que se resuspendan en la toda la solución de cultivo.

Se continúa oxigenación para mantener la saturación de la solución al 100% durante todo el proceso.

Se continúa perfundiendo el medio de cultivo y las células de médula ósea con un volumen de perfusión entre 15 - 75 ml/min (dependiendo del órgano).

- 5 El tiempo de perfusión de cultivo y mantenimiento con células, tiene una duración aproximada de cuatro horas

4. Empaque en Bolsas de transporte de órgano y envío, a temperatura ambiente, a Sala de Operaciones para trasplante

10

Los ejemplos que se describen a continuación son presentados con el objetivo de describir los aspectos preferidos de la invención pero no constituyen una limitación al alcance de la misma.

15 **EJEMPLO 1.**

Se realizaron tres trasplantes de órganos no vitales (Tráquea), las cuales estaban quimerizadas por el proceso de quimerización de órganos descrito, obteniendo como resultado la aceptación del órgano en un 100% por parte del receptor, y suspendiendo la inmunosupresión en su totalidad. A los tres meses de realizado el trasplante del órgano, se retiró toda medicación inmunosupresora a la paciente, sin presentar hasta la fecha de hoy evidencia de rechazo agudo o crónico, sin enfermedad de injerto contra huésped, ni recidiva de la neoplasia original, después de meses de seguimiento. Los electroferogramas realizados a los 5 meses demostraron 49,93 % de quimerización, con un 100% a los cinco años y medio después del trasplante. Adicional a este primer proceso se han realizado dos procedimientos mas de quimerización en tráquea, con similares resultados.

Aunque la presente invención ha quedado descrita con las realizaciones preferentes mostradas, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven el espíritu y el alcance de esta invención se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35

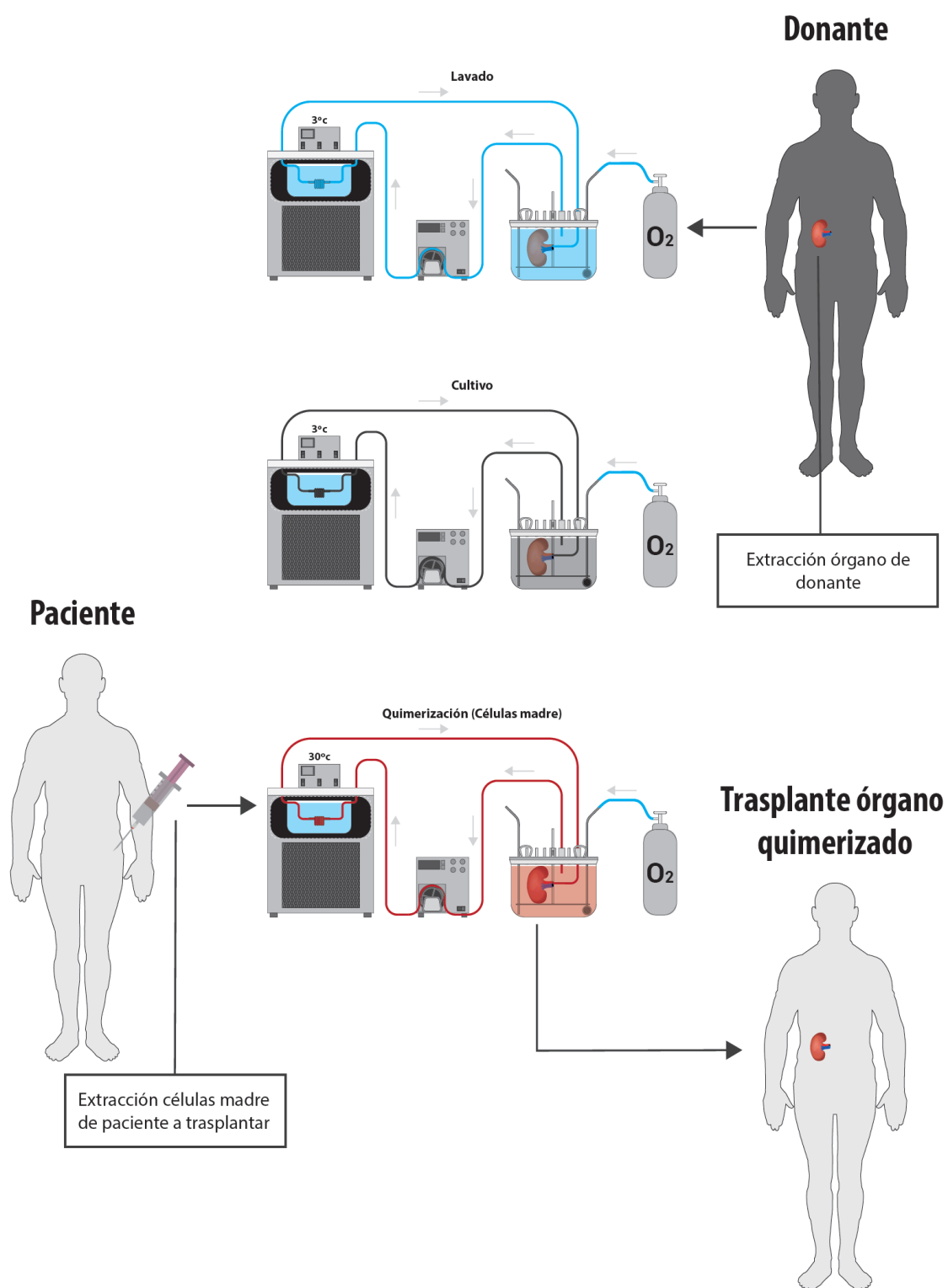


FIGURA 1

