

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 496**

51 Int. Cl.:

A01N 1/00 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2016 PCT/NL2016/050228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16159773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2016 E 16727247 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3277083**

54 Título: **Utilización de una composición para conservación de órganos para la conservación de un órgano o partes del mismo**

30 Prioridad:

03.04.2015 NL 2014584

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

03.04.2025

73 Titular/es:

VIVALYX GMBH (100.00%)

**Philipsstrasse 8
52068 Aachen, DE**

72 Inventor/es:

DOORSCHODT, BENEDICT MARIE

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 3 010 496 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

Utilización de una composición para conservación de órganos para la conservación de un órgano o partes del mismo

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención abarca la utilización de soluciones acuosas para la conservación de órganos en la conservación oxigenada de órganos humanos y/o partes de los mismos con una solución acuosa para la conservación de órganos que comprende taurina y L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico. La conservación de órganos humanos es útil para fines de trasplante en pacientes que necesitan un órgano de donante y/o partes del mismo.

Antecedentes de la invención

Las soluciones acuosas para la conservación de órganos son bien conocidas en la técnica. Las composiciones acuosas para la conservación de órganos según la invención son composiciones que pueden utilizarse con fines de conservación de órganos, pero también para la conservación de partes de órganos. Las soluciones acuosas para la conservación de órganos se utilizan para mantener la viabilidad de órganos o partes de órganos sin suministro de sangre fuera del cuerpo. (Churchill et al, "Investigation of a Primary Requirement of Organ Preservation Solutions", Transplantation, vol. 65, 551-559, n.º 4, 1998). Una solución para la conservación para órganos sólidos es fundamentalmente diferente de una solución para conservación de tejido y/o células, ya que la solución debe ser aplicable para la conservación de diferentes tipos de células y tejidos en un órgano, tales como células y tejidos parenquimales, mesenquimales y endoteliales que están comprendidos en arquitecturas tridimensionales intrincadas.

Al mantener la viabilidad, los órganos o partes de órganos pueden utilizarse para trasplantes. Por ejemplo, para trasplantes de riñones. La solución acuosa para conservación de órganos puede utilizarse para lavar órganos y partes de órganos mediante perfusión gravitacional, por ejemplo, para lavar los restos de sangre restantes, durante o después de la recuperación de un órgano de un donante. Por ejemplo, para perfundir continuamente el órgano con una solución para la conservación y para proporcionar oxígeno al órgano, se aplica una perfusión mecánica con una solución para la conservación para riñones, hígados y corazones. La perfusión mecánica puede aplicarse a temperaturas entre 0 y 40 grados centígrados. Se entiende que una solución para la conservación para la perfusión de órganos es fundamentalmente diferente de una solución para la conservación para el almacenamiento estático de órganos en la que los órganos pueden simplemente sumergirse en una solución para la conservación. Un ejemplo bien conocido por los expertos en la materia es la solución para la conservación de la Universidad de Wisconsin, que se encuentra disponible comercialmente en una composición para perfusión mecánica (Kidney Perfusion Solution-1, KPS-1, Organ Recovery Systems, Itasca, IL, EE. UU.) y en una composición para almacenamiento estático (Static Preservation Solution-1, SPS-1, Organ Recovery Systems, Itasca, IL, EE. UU.). Ambas soluciones están destinadas a su propósito de aplicación designado.

La solución para la conservación de órganos se puede utilizar para el almacenamiento de un órgano. Por ejemplo, mediante conservación estática en frío o conservación oxigenada. La conservación oxigenada puede ser una perfusión pulsátil o continua de dicha solución a través del órgano o parte del mismo. La conservación oxigenada también puede ser mediante persuflación directa con gas oxígeno o una mezcla de gases a través de la vasculatura del órgano. La base detrás de la intervención de la persuflación de oxígeno es proporcionar un suministro de oxígeno adecuado a un órgano durante la conservación. Los datos recopilados durante décadas han confirmado que una oxigenación mejorada es mejor para mantener la calidad de un órgano y, en algunos casos, permite la recuperación y reanimación de tejido dañado de forma reversible. La persuflación de oxígeno en particular muestra la capacidad de mejorar la calidad metabólica del tejido, medida utilizando una serie de procedimientos y en una variedad de órganos (T.M. Suszynski et al., Persufflation (or gaseous oxygen perfusion) as a method of organ preservation. Cryobiology 2012, junio; 64(3):125-43) Los órganos que pueden perfundirse mecánicamente, persuflarse o almacenarse estáticamente durante la conservación pueden incluir el riñón, el hígado, el corazón, el pulmón, el intestino y el páncreas.

En la medicina de trasplantes se acepta generalmente que mantener una alta calidad del órgano del donante dará como resultado una mejor función y/o una vida útil más larga del órgano después del trasplante en el receptor. Las soluciones acuosas para conservación de órganos también están destinadas a disminuir la cantidad de radicales libres de oxígeno circulantes, evitar la hinchazón celular, mantener una acidez fisiológica y evitar la lesión por isquemia/reperfusión y el daño isquémico. Las soluciones acuosas para conservación de órganos se mantienen habitualmente a temperaturas hipotérmicas cuando se utilizan para el lavado, la perfusión, la persuflación y/o el almacenamiento de un órgano o partes de un órgano. La solución está destinada a reducir la temperatura del órgano durante el lavado con el fin de disminuir el metabolismo y ralentizar la descomposición del órgano, tejido o células isquémicos (Belzer et al. "Combination Perfusion-Cold Storage for Optimum Cadaver Kidney Function and Utilization", Transplantation 39(2) 1985 pág. 118-12).

A temperaturas hipotérmicas, subnormotérmicas o normotérmicas, los expertos en la materia saben que un suministro continuo de oxígeno mejora la calidad de conservación del órgano y puede ser necesario para mantener la viabilidad del órgano, tejido o células (Belzer FO, "Evaluation of preservation of the intra abdominal organs", Transplantation Proceedings, vol 25, No 4 (agosto) 1993, P 2527-2530)(Hoffmann T, Minor T. New Strategies and concepts in organ

preservation. Eur Surg Res. 2015;54(3-4):114-26. Por encima de 0 grados centígrados, el suministro de oxígeno al órgano perfundido puede resultar esencial.

5 Una solución acuosa para conservación de órganos puede tener una presión oncótica similar a la presión oncótica del plasma humano para evitar la extravasación de dicha solución desde los vasos sanguíneos hacia el intersticio, lo que puede provocar edema tisular y obstrucción del lecho vascular. En la práctica clínica, las soluciones de conservación empleadas actualmente fueron introducidas por Collins en 1969, Marshall en 1976 y Brettschneider en 1988 (Changani et al, "Improved Preservation Solutions for Organ Storage", Transplantation, vol. 68, 345-355, n.º 3, 1999).

10 La referencia clínica para la conservación de órganos y tejidos para trasplante es la solución de la Universidad de Wisconsin (UW), que fue introducida en 1988 por Belzer.

15 La solución de la Universidad de Wisconsin es una solución para la conservación de almacenamiento estático hipotérmico comercial original estándar con una osmolaridad de 320 mosmol/L y un pH de 7,4 que comprende 100 mmol/L de ácido lactobiónico, 0,01 mmol/L de alopurinol, 3 mmol/L de glutatión reducido, 5 mmol/L de adenosina, 30 mmol/L de rafinosa, 5 mmol/L de pentastarch, 5 mmol/L de KCl, 25 mmol/L de KHPO₄ y 5 mmol/L de MgSO₄.

20 El documento US 4.784.852 (año de presentación 1981) describe el aporte de selenio a una solución para el almacenamiento de órganos, en medios para el cultivo de células y en soluciones nutritivas para el almacenamiento de componentes sanguíneos. También se describe la adición de vitaminas E, B2, B6 y B12 para permitir que el organismo asimile el selenio.

25 El documento US 4.920.044 (año de presentación 1988) describe soluciones de conservación para órganos que contienen tampones, tales como fosfato de potasio y bicarbonato de sodio, iones de magnesio y calcio y adenosina. Las soluciones tienen un pH de 7,20-7,50 y una osmolaridad de 255-425 mosm/L.

30 El documento US 4.923.442 (año de presentación 1989) describe un sustituto de la sangre en cuerpos de mamíferos o partes de los mismos que comprende dextrano con un peso molecular de 40.000 dalton para lograr una presión osmótica fluida esencialmente equivalente al plasma humano. La solución también comprende el tampón ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) para mantener un pH de alrededor de 7,4, esencialmente equivalente al plasma humano.

35 El documento US 5.405.742 (año de presentación 1995) describe soluciones de sustitución de la sangre para la purga o el mantenimiento de órganos durante la cirugía o para la conservación de órganos para trasplantes. Las soluciones contienen solutos, manitol, tampones, glutatión, un anión impermeable que es el lactobionato, agentes quelantes de hierro, bloqueadores de los canales de calcio, tales como la nicardipina y el alopurinol.

40 El documento US 6.641.992 (año de presentación 1999) describe una solución acuosa para conservar tejidos y órganos que comprende el coloide polietilenglicol como agente oncótico. La solución es además básicamente equivalente a la solución UW de Belzer y Southard (US 4879283 y US 4873230, 1988) mediante la incorporación de glutatión reducido, adenosina, rafinosa, magnesio, fosfato de potasio, sodio, cloruro y calcio.

45 El documento US 2004/0029096 (año de presentación 2000) describe una solución de evaluación y conservación de órganos humanos y animales que comprende, entre otros componentes, albúmina sérica, dextrano, sodio, potasio y magnesio.

50 El documento US6524785 divulga una solución de perfusión y/o conservación y/o reperfusión durante el trasplante de órganos, en particular el órgano cardíaco, que contiene los siguientes elementos: K⁺ en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 mM; Ca²⁺ en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3 mM; Mg²⁺ en el intervalo de aproximadamente 13 a aproximadamente 16 mM; glutamato en el intervalo de aproximadamente 18 a aproximadamente 22 mM; arginina en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 mM; adenosina en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 1 mM.

55 El documento US2009226876 describe la conservación de tejidos para trasplantes autólogos y heterólogos. En particular, el documento proporciona composiciones y procedimientos para el almacenamiento a largo plazo de conductos quirúrgicos ex vivo para su utilización posterior en injertos de derivación de arteria coronaria.

60 El documento US5182299 divulga un procedimiento para tratar una alteración osmótica en un animal que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de un osmolito orgánico, en el que el osmolito orgánico es un poliol.

Kingston et al. (Current Pharmaceutical Design, 2004, 10, 2401-2410) analiza el papel terapéutico de la taurina en la lesión por isquemia-reperfusión.

65 Bessems et al (Liver Transplantation, Vol 11, No 11 (noviembre), 2005: págs. 1379-1388) analiza la conservación por perfusión mecánica del hígado de una rata donante sin latidos cardíacos utilizando polisol.

Tolba (Ann Transplant, 2015; 20: 233-242) analiza la conservación de riñones porcinos dañados por isquemia caliente después del almacenamiento en frío en ecosol.

5 Schuster et al. (Clinical Nutrition 28 (2009) 331-337) analiza los efectos protectores del dipéptido de glutamina y el octocofeol contra la lesión por isquemia-reperusión en el hígado de rata aislado.

Con el fin de mejorar las soluciones acuosas para conservación de órganos empleadas clínicamente, el presente inventor ideó la solución de polisol en 2004 (WO2006052133). Esta solución de perfusión y conservación de órganos para mantener la viabilidad de órganos de donantes que comprende un medio de cultivo de tejidos comprendía las características de a) la capacidad tampón de la solución que comprende el medio de cultivo de tejidos se incrementó a al menos un Beta de 20, y, b) se añadió al menos un compuesto de alto peso molecular para aumentar la presión oncótica, seleccionado del grupo de compuestos que consiste en: dextrano, PEG, hidroxietilalmidón (HES) y albúmina, c) la solución tiene una concentración de $[Na^+]$ de < 140 mM, una concentración de $[K^+]$ de < 25 mM, mientras que la relación de $[Na^+]$ con respecto a $[K^+]$ era al menos 2:1. La presión oncótica fisiológica se mantuvo preferiblemente entre 20 y 35 mmHg y la osmolaridad fisiológica se mantuvo preferiblemente entre 300 y 400 mOsm. El medio de cultivo de tejidos se seleccionó preferiblemente de medio esencial mínimo Eagle (MEM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio RPMI 1640, medio DMEM/F-12, Hams F-10, Hams F 12, medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio L-15 de Leibovitz, medio esencial mínimo con sales de Earle y medio Williams E, con preferencia por el medio Williams E. Se descubrió que la solución de polisol inducía el rechazo del órgano del donante en un estudio que involucraba el trasplante de riñones humanos (Schreinemachers M.C. et al. "First Clinical Experience with polysol solution: pilot study in living kidney transplantation". Transplant Proc. 2013 enero-febrero; 45(1):38-45) y, por lo tanto, se suspendió la utilización de esta solución. Esta solución de polisol se basó en el medio de cultivo Williams E, muy conocido en la técnica.

25 **Breve descripción de la invención**

La presente invención es tal como se establece en las reivindicaciones y se relaciona en la reivindicación 1 con la utilización de una solución acuosa para conservación de órganos que comprende taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico para la conservación de un órgano o partes de un órgano, en la que dicha utilización comprende la perfusión oxigenada de dicho órgano o parte del mismo con dicha solución acuosa para conservación de órganos, y en la que dicha utilización es ex vivo.

35 Reivindicación 2: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según la reivindicación 1, en la que la solución acuosa para conservación de órganos, tal como se utiliza, comprende un coloide, un antioxidante, un electrolito, un impermeabilizante, un aminoácido, una vitamina y al menos 2 compuestos tampón.

Reivindicación 3: Utilización de una solución acuosa para la conservación de órganos, según la reivindicación 1 o 2, en la que la solución acuosa para la conservación de órganos, tal como se utiliza, comprende al menos 2 impermeabilizantes y al menos 2 antioxidantes.

40 Reivindicación 4: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos, tal como se utiliza, comprende glutatión y/o disulfuro de glutatión.

45 Reivindicación 5: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según la reivindicación 4, en la que la relación entre glutatión y disulfuro de glutatión, tal como se utiliza la reivindicación 4, está en el intervalo entre 1:10 y 10:1.

50 Reivindicación 6: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos, tal como se utiliza, comprende taurina en una concentración en el intervalo de 100 - 10000 mg/L.

55 Reivindicación 7: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos, tal como se utiliza, comprende L-alanina-L-glutamina en una concentración en el intervalo de 50 - 3000 mg/L.

Reivindicación 8: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos, tal como se utiliza, comprende ácido glutámico en una concentración en el intervalo de 50 - 3000 mg/L.

60 Reivindicación 9: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en la que en la solución acuosa para conservación de órganos
 - el coloide es polietilenglicol con un peso molecular en el intervalo de 10.000 - 55.000 Dalton; y/o
 - el coloide es polietilenglicol con una concentración en el intervalo de 1000 - 50000 mg/L, preferiblemente en el
 65 intervalo de 10000-30000 mg/L.

Reivindicación 10: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en la solución acuosa para conservación de órganos está comprendido al menos un electrolito seleccionado entre

sodio, en el que preferiblemente la concentración es de 50-200 mmol/L;
 potasio, en el que preferiblemente la concentración es de 0-25 mmol/L;
 calcio, en el que preferiblemente la concentración es de 0-10 mmol/L;
 magnesio, en el que preferiblemente la concentración es de 0-20 mmol/L; y/o
 iones cloruro, en el que preferiblemente la concentración es de 0-50 mmol/L.

Reivindicación 11: Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que

- en la solución acuosa para conservación de órganos están comprendidos al menos dos impermeabilizantes que se seleccionan entre gluconato de calcio, gluconato de sodio, gluconato de magnesio, gluconato de potasio, ácido lactobiónico, trehalosa, ribosa y/o rafinosa;

- la solución acuosa para conservación de órganos comprende uno o más aminoácidos y/o péptidos;

- la solución acuosa para conservación de órganos comprende cisteína, glutamato, carnitina, ornitina, arginina, histidina, triptófano y/o glicina;

- la solución acuosa para conservación de órganos comprende al menos uno del siguiente grupo: glucosa, ribosa, piruvato y/o ácido graso;

- la solución acuosa para conservación de órganos tiene una presión oncótica en el intervalo de 10 a 40 mmHg;

- la solución acuosa para conservación de órganos tiene un pH en el intervalo de 7,2-7,6;

- la solución acuosa para conservación de órganos tiene una osmolaridad en el intervalo de 300-420 mosm; y/o

- la temperatura de la solución acuosa para conservación de órganos está en el intervalo de 0°C - 20°C o 20°C - 40°C.

Reivindicación 12: Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que

- el órgano o parte de un órgano es de origen humano, preferiblemente un riñón de origen humano, hígado de origen humano, pulmón de origen humano, corazón de origen humano, páncreas de origen humano y/o intestino de origen humano.

Divulgación adicional

Los presentes inventores han descubierto que para preparar un medio de cultivo de tejidos para su utilización como solución para la conservación de órganos, adecuada para la conservación de órganos a bajas temperaturas, se deben realizar varios ajustes, omisiones y/o adiciones en comparación con las soluciones conocidas de la técnica anterior. Estos ajustes han demostrado ser particularmente útiles para la conservación oxigenada y estática de órganos obtenidos de donantes normalmente menos preferidos y subóptimos. Se entiende que una solución acuosa para conservación de órganos de acuerdo con la divulgación es adecuada para su utilización en la perfusión de un órgano o una parte del mismo. Una solución acuosa para conservación de órganos de acuerdo con la divulgación también puede denominarse en cambio una solución acuosa para conservación de órganos por perfusión. Los términos solución acuosa para conservación de órganos o solución acuosa para conservación de órganos por perfusión pueden usarse indistintamente en el presente documento. Dichas soluciones acuosas para conservación de órganos de acuerdo con la divulgación como se describen en el presente documento son, por tanto, para su utilización en la conservación de órganos seleccionados del grupo que consiste en riñón, hígado, pulmones, corazón, páncreas, intestino, siendo dichos órganos preferiblemente órganos humanos. Se entiende que son útiles tanto los órganos como las partes de los órganos. Por ejemplo, en lugar de un hígado entero, se puede utilizar una parte del hígado para el trasplante o, en el caso de un trasplante de pulmón, se puede trasplantar una parte del pulmón. Por lo tanto, se entiende que "los órganos, así como las partes de los órganos, son adecuados para la utilización de las soluciones acuosas para conservación de órganos según la divulgación. Siempre que dicha parte de un órgano tenga una estructura como la que está presente en un órgano entero y comprenda vasos sanguíneos que permitan que se realice la perfusión, se entiende que dichas partes de órganos son adecuadas. También se entiende que el término "una parte" dentro del contexto de órganos, por ejemplo, una parte de un órgano, se entiende que no se refiere a células aisladas o capas de tejidos que se derivan de órganos. Dichas células aisladas o en capas de tejidos se pueden cultivar in vitro sin perfusión mecánica. Por lo tanto, también se proporciona la utilización de una solución para la conservación de órganos según la divulgación para la conservación de órganos o una parte de los mismos para su utilización en el trasplante de órganos. Preferiblemente, dicha utilización comprende la perfusión de dicho órgano o parte del mismo. Preferiblemente, dicha perfusión comprende perfusión gravitacional o mecánica. Preferiblemente, dicho órgano (o parte del mismo) se selecciona del grupo que consiste en riñón, hígado, pulmones, corazón, intestino y páncreas, en donde preferiblemente dichos órganos son órganos humanos.

La presente invención proporciona la utilización de una solución acuosa mejorada para la conservación de órganos para su aplicación en la conservación oxigenada de órganos que comprende taurina y L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico. La solución acuosa para la conservación de órganos puede tener una composición tal como la utilizada en soluciones acuosas conocidas para la conservación de órganos y comprende además dichos compuestos. Preferiblemente, la solución acuosa para la conservación de órganos comprende un coloides, un antioxidante, al menos 2 electrolitos, un impermeabilizante, al menos 2 aminoácidos, una vitamina y al menos 2 compuestos tampón, más

preferiblemente la solución acuosa para la conservación de órganos comprende al menos 2 impermeabilizantes y al menos dos antioxidantes.

Los inventores descubrieron en experimentos realizados utilizando órganos de donantes animales que dichos compuestos son ventajosos en dichas composiciones para la conservación de órganos (Kalenski J et al., Improved Preservation of Warm Ischemia-Damaged Porcine Kidneys after Cold Storage in Ecosol, a Novel Preservation Solution. *Ann Transplant*; 20:233-242). Además, se encontró que la adición de taurina y L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico a dicha solución era esencial para la aplicación de dicha solución en la persuflación oxigenada y la conservación de la perfusión mecánica oxigenada de dichos órganos.

Además, se descubrió que proporcionar una composición para conservación de órganos en un estado sólido, por ejemplo en forma de partículas pequeñas (por ejemplo, un polvo o un polvo micronizado) puede ser ventajoso. Dicha composición para conservación de órganos se puede disolver en agua, proporcionando así instantáneamente una solución para conservación de órganos lista para usar. De esta manera, se puede evitar el posible deterioro de los ingredientes presentes en las composiciones para conservación de órganos, asegurando así una calidad óptima de la solución acuosa para conservación de órganos, aumentando así la viabilidad de los órganos.

Con dicha solución acuosa para conservación de órganos, se puede mejorar la conservación oxigenada de órganos, partes de órganos y se puede prevenir el daño a los órganos que tiene lugar habitualmente por isquemia, hipoxia, hiperoxia, agotamiento de energía, hipotermia y lesión por reperfusión.

Definiciones

La "micronización" es el proceso de reducción del diámetro promedio de las partículas de un material sólido. El término micronización se utiliza cuando las partículas que se producen tienen un tamaño en el rango de micrómetros, por ejemplo, 100 micrómetros o menos. La micronización también incluye la escala nanométrica, por ejemplo, 100 nm o menos. Las técnicas de micronización pueden basarse en la fricción para reducir el tamaño de las partículas. Dichos procedimientos pueden incluir molienda, golpeteo y trituración. Un molino industrial típico está compuesto por un tambor metálico cilíndrico que normalmente contiene esferas de acero. A medida que el tambor gira, las esferas del interior chocan con las partículas del sólido, aplastándolas así hacia diámetros más pequeños. En el caso de la trituración, las partículas sólidas se forman cuando las unidades de trituración del dispositivo se frotan entre sí mientras que las partículas del sólido quedan atrapadas entre ellas. Las "partículas micronizadas", es decir, las partículas obtenidas después de la micronización, pueden disolverse rápidamente en agua.

La "osmolaridad" es una medida de la presión osmótica ejercida por una solución a través de una membrana semipermeable en comparación con el agua pura. La osmolaridad depende del número de partículas en solución, pero es independiente de la naturaleza de las partículas. La osmolaridad se define como el número de osmoles (Osm) de soluto por (L) de solución (osmol/L u Osm/L). La osmolaridad de una solución se expresa habitualmente como Osm/L, de la misma manera que la molaridad de una solución se expresa como "M" (molar). Mientras que la molaridad mide el número de moles de soluto por unidad de volumen de solución, la osmolaridad mide el número de osmoles de partículas de soluto por unidad de volumen de solución.

"Presión oncótica", en el plasma sanguíneo los compuestos disueltos producen una presión osmótica. Una pequeña parte de la presión osmótica total se debe a la presencia de moléculas de proteínas grandes e impermeabilizantes; esto se conoce como "presión osmótica coloidal" o "presión oncótica". Debido a que las proteínas plasmáticas grandes y las impermeabilizantes no pueden atravesar fácilmente las paredes capilares, su efecto sobre la presión osmótica de los interiores capilares equilibrará, en cierta medida, la tendencia del líquido a filtrarse fuera de los capilares. En condiciones en las que las proteínas plasmáticas están reducidas, por ejemplo, por pérdida en la orina (proteinuria) o por desnutrición, o en el caso de órganos extraídos de un cuerpo para trasplante y almacenados en un líquido, el resultado de la baja presión oncótica puede ser un edema (acumulación excesiva de líquido en los tejidos). La presión oncótica se expresa en mmHg (milímetros de presión de mercurio). La presión oncótica se puede medir fácilmente en el laboratorio con un oncómetro (por ejemplo, el WEIL 186 Oncometer, Instrumentation Laboratory GmbH, München, Alemania). El principio consiste en disponer de dos cámaras cerradas y separadas entre sí por una membrana semipermeable que es permeable al agua y a las sustancias de bajo peso molecular, pero no a las moléculas con un peso molecular superior a 30.000 (es decir, los coloides). Como la pared capilar es permeable al agua, pero esencialmente impermeable a las proteínas plasmáticas de mayor tamaño y a las sustancias impermeables, estas moléculas generan una presión osmótica. Además, como estas proteínas tienen carga negativa, tienden a retener cationes adicionales en el plasma (efecto Gibbs-Donnan), lo que mejora aún más el gradiente osmótico entre el plasma y el líquido intersticial (ISF, *interstitial fluid*). El efecto combinado (presión osmótica y efecto Gibbs-Donnan) da como resultado una presión que extrae agua del intersticio y la introduce en el plasma. Esta presión es proporcional a la diferencia de concentración de proteínas entre el plasma y el líquido intersticial. En comparación con la solución salina pura, el plasma humano ejerce una presión oncótica de aproximadamente 28 mmHg, mientras que el líquido intersticial tiene solo aproximadamente 3 mmHg. La presión oncótica neta es, por tanto, de aproximadamente 25 mmHg. Este valor se mantiene aproximadamente constante a lo largo de la mayoría de los lechos capilares.

Los "impermeabilizantes" son moléculas grandes con carga negativa, tales como los carbohidratos (por ejemplo,

rafínosa, trehalosa, manitol), que aumentan la presión oncótica de una solución para la conservación. El fenómeno de la hinchazón celular se puede contrarrestar añadiendo impermeabilizantes a la solución para la conservación. La extravasación de la solución durante el lavado, que crea una expansión del espacio intersticial, puede comprimir el sistema capilar y puede conducir a una distribución desigual de la solución de lavado por todo el órgano. Esto se puede evitar incorporando un coloide a la solución que permita el libre intercambio de los componentes de la solución de lavado sin expansión del espacio intersticial.

Un "coloide" es una sustancia dispersa microscópicamente en otra sustancia. Para la solución acuosa de la presente invención, se dispersan partículas microscópicas en toda la solución acuosa. Las soluciones que contienen coloides pertenecen al grupo de expansores de volumen y se pueden utilizar para la reposición de fluidos intravasculares. Los coloides conservan una alta presión osmótica coloide en la sangre y, por lo tanto, pueden aumentar el volumen intravascular cuando se utilizan en soluciones para conservación de órganos.

Un "tampón", es decir, un tampón de pH o tampón de iones de hidrógeno, es una solución acuosa que consiste en una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, o una base débil y su ácido conjugado. El pH de un tampón cambia poco cuando se le añade un ácido o una base fuerte. Los tampones se utilizan para evitar cambios en el pH de una solución. Los tampones son, por tanto, componentes muy importantes en las soluciones para conservación y perfusión de órganos, al mantener un pH constante, es decir, iones de hidrógeno, dentro del intervalo fisiológico. El pH de la sangre de mamíferos se mantiene cerca de 7,38, es decir, cerca de un intervalo de 7 mediante un sistema tampón que incluye $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-}$ y $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$.

Los tampones de acuerdo con la presente invención que son universalmente aplicables y biológicamente aceptables para la solución de acuerdo con la presente invención deben mostrar solubilidad en agua, no interferir con los procesos biológicos o tendencia conocida a la formación de complejos con iones metálicos, no ser tóxicos y no interferir con las membranas biológicas (tales como penetración, solubilización, adsorción en la superficie). La capacidad tampón está influenciada por la temperatura y otros solutos en la composición. La actividad y los efectos de la sal tienen una marcada influencia en el valor de pH de una solución de acuerdo con la ecuación:

$$\text{pH} = \text{pKa}' + \log \frac{[B]}{[BM]} \quad (1)$$

donde $\text{pKa}' = \text{pKa} + \text{factor de corrección}$. La fuerza iónica de una solución se define como en

$$I = \frac{1}{2} \sum (c_i z^2)$$

donde c_i es la concentración de la especie i y z es la carga correspondiente. Se puede calcular. La capacidad tampón es la relación entre el incremento de la base fuerte o el ácido fuerte y el cambio de pH.

$$B = \Delta B / \Delta \text{pH}$$

donde el pequeño incremento en equivalentes de gramos/litro de base (o ácido) fuerte añadidos a la solución tampón produce un cambio de pH de ΔpH .

$$B = (2,3 \times C \times K_a [\text{H}^+]) / (K_a [\text{H}^+])^2$$

$$B = (2,3 \times C_a (1-a))$$

$$C = [\text{Ácido}] + [\text{Sal}] \text{ o } C = [\text{Base}] + [\text{Sal}]$$

La capacidad tampón máxima Beta-max de una especie monovalente se encuentra en $\text{pH} = \text{pKa}'$, el valor pK práctico. Beta max en el intervalo de pH 3-11 se calcula según la ecuación: $\text{Beta max} = 0,576 c$, donde c es la concentración total de la sustancia tampón.

Por lo tanto, una capacidad tampón útil se encuentra dentro de un intervalo de pH de $\text{pKa} \pm 1$ unidad. Si se debe alcanzar más del 50% de la capacidad tampón máxima, el intervalo correspondiente es solo $\text{pKa}' + 0,75$ unidades. La capacidad tampón de una solución también se puede expresar en unidades Slykes. La capacidad tampón, medida en slykes, se define como los mmoles de base necesarios para titular el pH de 1 g de masa húmeda de músculo/tejido en 1 unidad de pH, en el intervalo de pH de 6 a 7 (Van Slyke, Biol. Chem. 52, 525-570, 1922). Para esta solicitud, la Beta se define como los μmoles de hidróxido de sodio o cloruro de hidrógeno necesarios para cambiar el pH de un gramo de tejido en una unidad, es decir, de 6 a 7 o de 6,5 a 7,5.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es tal como se establece en las reivindicaciones.

Divulgación adicional

Según la divulgación, se describe una solución acuosa para conservación de órganos que no cae dentro del alcance

de las reivindicaciones per se que comprende taurina y L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico. Preferiblemente, la solución para la conservación de órganos comprende además un coloide, antioxidantes, electrolitos, impermeabilizantes, aminoácidos, vitaminas y un compuesto tampón. La solución acuosa para conservación de órganos se puede utilizar para lavar órganos, por ejemplo, para eliminar los restos de sangre restantes, durante o después de la recuperación de un órgano, o una parte del mismo, de un donante. Por lo tanto, la solución acuosa para conservación de órganos se puede utilizar como una solución de perfusión. Después del lavado, los órganos se pueden conservar en la solución acuosa para conservación de órganos durante períodos más largos que los posibles con las técnicas y soluciones de conservación utilizadas actualmente. En el Ejemplo 3, se muestra que los órganos que han sufrido un daño extenso se pueden mantener vitales para el trasplante durante 24 horas mediante perfusión oxigenada y/o perfusión mecánica oxigenada utilizando dicha solución, a diferencia del procedimiento de conservación de órganos estático, no oxigenado, de referencia clínica utilizado actualmente. La solución acuosa para conservación de órganos de acuerdo con la invención también puede denominarse solución acuosa para conservación de órganos por perfusión. Como se ha dicho, los términos solución acuosa para conservación de órganos o solución acuosa para conservación de órganos por perfusión se pueden utilizar indistintamente en el presente documento. Además, dicha solución acuosa para conservación de órganos de acuerdo con la divulgación está destinada a utilizarse en la perfusión, tal como la perfusión gravitacional y/o mecánica, de órganos o partes de órganos, tal como se muestra en los ejemplos.

Por lo tanto, también se describe la utilización de una solución acuosa para conservación de órganos según la descripción que comprende taurina y L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico para la conservación de un órgano o parte del mismo para trasplante.

Además, se proporciona la utilización de una solución acuosa para conservación de órganos según la divulgación que comprende taurina y L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico para la conservación de un órgano o una parte del mismo para trasplante, en donde dicha conservación de órganos comprende la perfusión con la solución acuosa para conservación de órganos de dicho órgano o dicha parte del mismo. Dicha perfusión puede comprender perfusión gravitacional y/o mecánica. O bien, dicha perfusión puede comprender perfusión oxigenada. Tal perfusión se describe en los ejemplos. La perfusión gravitacional se puede realizar en el órgano cuando se ha obtenido del cuerpo, por ejemplo, el cuerpo humano, cuando el órgano se ha separado del cuerpo. Al órgano proporcionado, se une un tubo, por ejemplo, a una arteria principal, estando el otro extremo unido a un recipiente que tiene la solución acuosa para conservación de órganos. Al sostener el recipiente por encima del órgano, por ejemplo, aproximadamente un metro más arriba, la solución acuosa para conservación de órganos perfunde el órgano. Una vez que el órgano ha sido perfundido, el órgano puede almacenarse, por ejemplo, en un recipiente refrigerado. La perfusión también puede ser mecánica. En la perfusión mecánica se puede utilizar una bomba para perfundir el órgano. Esto resulta útil, por ejemplo, para el transporte del órgano. El órgano (o parte del mismo) puede entonces perfundirse continuamente durante el transporte y/o almacenamiento hasta el trasplante. La solución acuosa para conservación del órgano puede entonces recircularse a través del órgano. En tal escenario, la oxigenación de la solución acuosa para conservación del órgano puede ser ventajosa.

Según la divulgación, la taurina, la L-alanina-L-glutamina y el ácido glutámico son adecuados para su inclusión en cualquier solución para la conservación acuosa para su utilización en la conservación de órganos o partes de órganos mediante almacenamiento en frío estático, almacenamiento oxigenado o conservación por perfusión gravitacional o mecánica de dichos órganos o partes de órganos, lo que puede resultar muy ventajoso. En particular, según la divulgación, la taurina, la L-alanina-L-glutamina y el ácido glutámico son adecuados para su inclusión en soluciones de conservación acuosas para su utilización en la conservación de órganos o partes de órganos mediante almacenamiento en frío estático, almacenamiento oxigenado o conservación por perfusión mecánica de dichos órganos o partes de órganos, lo que puede resultar muy ventajoso.

La solución acuosa para conservación de órganos utilizada comprende taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico.

En la conservación oxigenada de órganos y partes de órganos, la terapia antioxidante es esencial para la protección contra el daño causado por la formación de radicales libres de oxígeno y la peroxidación lipídica. La aplicación exitosa de la conservación oxigenada de órganos y partes de órganos puede requerir un antioxidante apropiado y la aplicación apropiada de dicho antioxidante.

La taurina, el principal aminoácido libre intracelular que se encuentra en altas concentraciones en las células de los mamíferos, es un antioxidante endógeno y un agente estabilizador de la membrana. En un estudio previo, se demostró que la taurina puede ser eficaz para reducir el daño oxidativo y la lesión por isquemia-reperfusión después del trasplante de pulmón (Guler L et al., Taurine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in rats. Anesth. 6 de noviembre de 2013). Tres días antes del procedimiento de extracción del pulmón, se administró taurina intraperitonealmente al animal donante. A continuación, se extrajo el órgano del animal donante, se lavó con una solución acuosa para conservación y se trasplantó a un animal receptor. Se demostró que el tratamiento intraperitoneal del animal donante con taurina dio como resultado la conservación del pulmón trasplantado con respecto a los hallazgos histopatológicos y bioquímicos. En la presente invención, se incorpora taurina a la solución acuosa para conservación para proteger el órgano y/o tejido contra el daño oxidativo durante la conservación y contra

la posterior lesión por reperfusión hiperóxica cuando el órgano o tejido se trasplanta al receptor. Además, dado que el tratamiento previo de un donante de órganos humanos antes de la extracción no es factible y está prohibido por las leyes actuales, el tratamiento antioxidante de un órgano o tejido para trasplante solo se puede aplicar mediante la adición de un agente antioxidante a la solución acuosa de lavado y conservación.

En la conservación de órganos (y partes de los mismos) y en particular en la conservación oxigenada de órganos, el suministro de oxígeno a células, tejidos o un órgano aumenta el metabolismo celular y tisular como lo saben los expertos en la materia y se demuestra en el Ejemplo 3. Un aumento del metabolismo celular y tisular da como resultado el agotamiento de nutrientes para la producción de energía, por lo tanto, la restauración de las fuentes de energía es esencial para mantener la viabilidad del órgano, en particular con respecto a la conservación oxigenada de órganos y/o partes de órganos para trasplante.

La L-glutamina es un aminoácido condicionalmente esencial y un nutriente vital en cultivos celulares para la producción de energía, así como para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. La L-glutamina también desempeña un papel en la regulación del equilibrio ácido-base, la energía celular como fuente junto a la glucosa, la donación de nitrógeno para procesos anabólicos, incluida la síntesis de purinas, y la donación de carbono, como fuente para rellenar el ciclo del ácido cítrico.

La L-alanina desempeña un papel esencial en el ciclo de la glucosa-alanina. En los tejidos que degradan los aminoácidos para obtener combustible, los grupos amino se recogen en forma de ácido glutámico mediante transaminación. El ácido glutámico puede entonces transferir su grupo amino mediante la acción de la alanina-aminotransferasa al piruvato, formando alanina y α -cetoglutarato.

La L-glutamina y la L-alanina en soluciones acuosas se degradan espontáneamente, generando amoníaco y ácido carboxílico de pirrolidona como subproductos. La L-alanina-L-glutamina es más estable en soluciones acuosas y no se degrada espontáneamente (Oguz et al. "L-alanin-L-glutamine, supplementation improves the outcome after colorectal surgery for cancer", *Colorectal Dis.* 2007 Jul; 9(6):515-20). El mecanismo de utilización de los dipéptidos implica la liberación gradual de peptidasa para permitir la hidrólisis gradual del dipéptido en el medio. Esto se puede comparar con la estrategia de un cultivo de lotes alimentados en el que se introduce L-glutamina de forma continua en el cultivo, pero se mantiene a baja concentración. El resultado es un metabolismo energético eficiente.

El ácido glutámico es un compuesto clave en el metabolismo celular. En los seres humanos, las proteínas de la dieta se descomponen mediante la digestión en aminoácidos, que sirven como combustible metabólico para otras funciones del cuerpo. Un proceso clave en la degradación de aminoácidos es la transaminación, en la que el grupo amino de un aminoácido se transfiere a un α -cetoácido, normalmente catalizado por una transaminasa. La reacción se puede generalizar de la siguiente manera:

R_1 -aminoácido + R_2 - α -cetoácido \rightleftharpoons R_1 - α -cetoácido + R_2 -aminoácido. Un α -cetoácido muy común es el α -cetoglutarato, un intermedio en el ciclo del ácido cítrico. La transaminación del α -cetoglutarato proporciona ácido glutámico. El producto α -cetoácido resultante puede contribuir como combustible o como sustrato para procesos metabólicos adicionales. Un ejemplo es el siguiente: alanina + α -cetoglutarato \rightleftharpoons piruvato + ácido glutámico. Tanto el piruvato como el α -cetoglutarato son componentes clave del metabolismo celular, contribuyendo como sustratos o intermedios en procesos fundamentales, tales como la glucólisis, la gluconeogénesis y el ciclo del ácido cítrico.

Una solución acuosa que comprende al menos taurina y L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico no ha sido ideada previamente para la conservación de órganos y/o partes de órganos y/o tejidos para aplicaciones de trasplante.

En el Ejemplo 2, se proporciona un estudio para la evaluación de la Solución de Ejemplo 2 (ES2), una solución para la conservación de órganos según la divulgación, y no según lo reivindicado, utilizada sin comprender taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico. Los resultados se compararon con CS utilizando Histidina-Triptófano-Cetoglutarato, la solución para la conservación en frío de referencia clínica. Con este fin, ambas soluciones para la conservación se evaluaron utilizando el modelo de riñón porcino perfundido aislado (IPPK, *isolated perfused porcine kidney*) empleando riñones isoquímicamente dañados (WI, *warm ischemically*) calientes. La solución para la conservación ES2 se comparó con HTK para la conservación en CS de 24 horas de injertos de riñón dañados WI durante 45 minutos, empleando riñones no dañados WI, almacenados en frío durante 24 horas en HTK como controles. La función renal fue significativamente menor en ES2-WI y HTK-WI en comparación con los controles, como se expresó por tasas de depuración de creatinina más bajas y producción de orina más baja. Además, la función tubular renal fue significativamente menor en ES2-WI y HTK-WI en comparación con los controles, tal como lo reflejó la excreción fraccional de sodio. Los injertos dañados por WI conservados con ES2 demostraron una IRR y concentraciones de proteína urinaria significativamente menores y un mayor consumo de oxígeno en comparación con HTK-WI.

En el Ejemplo 3, se probó la misma composición de solución para la conservación de órganos en comparación con el Ejemplo 2 pero ahora incluye taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico, y por lo tanto no de acuerdo con la utilización reivindicada.

Se realizó una evaluación de la Solución de Ejemplo (ES) para la persuflación oxigenada sistémica venosa (VSOP, *venous systemic oxygenated persufflation*), la perfusión mecánica oxigenada (MP, *mechanic perfusion*) y la conservación en frío (CS, *cold storage*) de riñones para trasplante. Los resultados se compararon con CS utilizando la solución para la conservación de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK), la solución para la conservación de órganos de referencia clínica en todo el mundo. Se compararon VSOP, MP y CS utilizando la solución para la conservación ES con HTK para la conservación durante 24 horas de injertos renales dañados por isquemia caliente (WI) durante 45 minutos, empleando riñones no dañados por WI, almacenados en frío durante 24 horas en HTK como controles. La función renal y la lesión tubular renal no difirieron significativamente en los grupos VSOP-ES, MP-ES y CS-ES de los controles no dañados por isquemia caliente. La producción de orina fue significativamente mayor en los grupos VSOP-ES, MP-ES y CS-ES en comparación con CS-HTK. Se observó una reducción de la peroxidación lipídica en VSOP-ES y CS-ES en comparación con CS-HTK, con concentraciones similares a los controles. Este estudio demostró la superioridad de la solución para la conservación ES para VSOP, MP y CS en comparación con la solución de HTK de referencia clínica, así como la mejora del estado oxidativo y la recuperación metabólica y funcional de los injertos renales dañados por WI. La solución para la conservación ES, en particular en combinación con VSOP, dio como resultado una mejor calidad de conservación de los riñones dañados por WI, que fue comparable a la de los riñones no dañados por WI utilizando HTK.

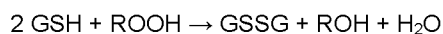
A partir de las comparaciones realizadas en los Ejemplos 2 y 3, se puede concluir que la inclusión de taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico en una solución para la conservación de órganos resultó ser altamente ventajosa ya que la función renal mejoró significativamente y resultó en un menor estrés oxidativo resultando en una calidad de riñones dañados por WI comparable a los riñones no dañados por WI.

En un aspecto, la solución acuosa para conservación de órganos que no cae dentro del alcance de protección también comprende biotina (vitamina H). La biotina es una vitamina soluble en agua que generalmente se clasifica como una vitamina del complejo B. Después del descubrimiento inicial de la biotina, se requirieron casi 40 años de investigación para establecerla como una vitamina. La biotina es necesaria para todos los organismos, pero solo puede ser sintetizada por bacterias, levaduras, mohos, algas y algunas especies de plantas. La biotina está unida al sitio activo de cinco enzimas de mamíferos conocidas como carboxilasas. La unión de la biotina a otra molécula, tal como una proteína, se conoce como "biotinilación". La holocarboxilasa sintetasa (HCS) cataliza la biotinilación de las apocarboxilasas (es decir, la forma catalíticamente inactiva de la enzima) y de las histonas (véase a continuación). La biotinidasa cataliza la liberación de biotina a partir de las histonas y de los productos peptídicos de la descomposición por la carboxilasa. Cada carboxilasa cataliza una reacción metabólica esencial:

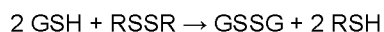
- Las acetil-CoA carboxilasas I y II catalizan la unión del bicarbonato a la acetil-CoA para formar malonil-CoA. La malonil-CoA es necesaria para la síntesis de ácidos grasos. La primera es crucial en la síntesis de ácidos grasos citosólicos y la segunda funciona en la regulación de la oxidación de ácidos grasos mitocondriales.
- La piruvato carboxilasa es una enzima fundamental en la gluconeogénesis, la formación de glucosa a partir de fuentes distintas de los carbohidratos, por ejemplo, los aminoácidos.
- La metilcrotonil-CoA carboxilasa cataliza una etapa esencial en el catabolismo de la leucina, un aminoácido esencial.
- La propionil-CoA carboxilasa cataliza etapas esenciales en el metabolismo de ciertos aminoácidos, colesterol y ácidos grasos de cadena impar (ácidos grasos con un número impar de moléculas de carbono) (4).

Las histonas son proteínas que se unen al ADN y lo empaquetan en estructuras compactas para formar nucleosomas (componentes estructurales integrales de los cromosomas). El empaquetamiento compacto del ADN debe relajarse un poco para que se produzca la replicación y transcripción del ADN. Se ha demostrado que la modificación de las histonas mediante la unión de grupos acetilo o metilo (acetilación o metilación) afecta la estructura de las histonas, afectando así la replicación y transcripción del ADN. Cada vez hay más pruebas de que la biotinilación de las histonas desempeña un papel en la regulación de la replicación y transcripción del ADN, así como en la proliferación celular y otras respuestas celulares. La biotina no se ha incorporado anteriormente en soluciones para la conservación de órganos ni para otras aplicaciones de trasplante.

En un aspecto, la solución acuosa para conservación de órganos que no se encuentra dentro del alcance de protección también comprende disulfuro de glutatión (GSSG). La solución acuosa para conservación de órganos puede comprender glutatión (GSH) y (GSSG). La solución acuosa para conservación de órganos puede comprender glutatión (GSH) y/o disulfuro de glutatión (GSSG). El GSSG es un disulfuro derivado de dos moléculas de GSH. En las células vivas, el GSSG se reduce a dos moléculas de GSH con equivalentes reductores de la coenzima NADPH. Esta reacción es catalizada por la enzima glutatión reductasa. Las enzimas antioxidantes, tales como las glutatión peroxidasas y las peroxirredoxinas, generan GSSG durante la reducción de peróxidos, tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH)



Otras enzimas, tales como las glutaredoxinas, generan disulfuro de glutatión a través del intercambio de disulfuro de tiol con enlaces disulfuro de proteínas u otros compuestos de baja masa molecular, tales como el disulfuro de coenzima A o el ácido deshidroascórbico



Entre otros, el documento US 4873230 (fecha de presentación 1989)) describe la incorporación de GSH como antioxidante en soluciones para conservación de órganos. No se sabe que el GSSG tenga propiedades antioxidantes. Sin limitarnos a ninguna teoría, se sugiere que el GSSG es un sustrato para la formación de antioxidantes en el hígado y puede cambiar el equilibrio de la degradación del GSH, lo que resulta en una mayor disponibilidad de GSH en el tejido. El GSSG no se ha incorporado previamente en soluciones para conservación de órganos ni para otras aplicaciones médicas.

En otro aspecto, se encontró que una solución acuosa para la conservación de órganos cuando comprende varios aminoácidos, péptidos y/o coloides puede aumentar la eficacia de la solución para su utilización en la conservación de órganos y puede evitar la respuesta inmunológica del receptor del injerto.

En otro aspecto, se encontró que una solución acuosa para la conservación de órganos, cuando comprende varios impermeabilizantes, puede aumentar la eficacia de la solución y puede evitar la extravasación de la solución en el intersticio del órgano del donante y puede evitar la hinchazón celular, lo que puede dar como resultado vasos sanguíneos permeables y un lavado altamente efectivo de los restos de sangre del donante del órgano del donante. Una solución acuosa para la conservación de órganos que comprende más de un impermeabilizante no se ha descrito previamente en soluciones para la conservación de órganos o para otros usos médicos.

Una solución acuosa para la conservación de órganos, que no cae dentro del alcance de protección, que también puede usarse como una solución de perfusión, de acuerdo con la presente divulgación, también puede tener un equilibrio específico y optimizado de concentraciones de $[\text{Na}^+]$ con respecto a $[\text{K}^+]$. En circunstancias fisiológicas normales, la concentración intracelular de $[\text{K}^+]$ es significativamente mayor que la concentración intracelular de $[\text{Na}^+]$, mientras que la situación en el lumen intersticial es la inversa. La solución para la conservación y perfusión de órganos de acuerdo con la presente divulgación está diseñada preferiblemente para imitar la concentración extracelular fisiológica, de modo que se pueda facilitar que el órgano, los tejidos y las células mantengan un equilibrio fisiológico de $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ que es importante para impulsar, entre otros, el transporte iónico realizado por bombas de sodio. El desequilibrio en las concentraciones intracelulares y extracelulares de $[\text{Na}^+]$ sobre $[\text{K}^+]$ crea un gradiente tanto eléctrico como químico a través de la membrana plasmática. Esto puede ser importante no solo para la célula sino, en muchos casos, también para el movimiento direccional de fluidos y electrolitos a través de las láminas epiteliales.

La $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ es una proteína de membrana integral altamente conservada que se expresa en prácticamente todas las células de organismos superiores. Proporciona la fuerza impulsora para varios transportadores facilitadores, que importan glucosa, aminoácidos y otros nutrientes a la célula. Sin limitarse a la teoría, este transporte ha demostrado ser importante para la conservación y perfusión a baja temperatura de órganos, en particular para órganos de donantes con corazón en asistolia, mediante los experimentos realizados por los presentes inventores. La translocación de sodio de un lado de un epitelio al otro lado crea un gradiente osmótico que impulsa la absorción de agua. Se pueden encontrar casos importantes de este fenómeno en la absorción de agua, por ejemplo, del lumen del intestino delgado y en el riñón. Por lo tanto, preferiblemente, la solución acuosa para conservación de órganos según la presente divulgación imita el equilibrio extracelular fisiológico $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ de al menos 2:1, preferiblemente 3:1 y más preferiblemente 5:1.

Otro compuesto que puede estar comprendido en la solución acuosa para conservación de órganos y la solución de perfusión según la presente divulgación es un compuesto de alto peso molecular para proporcionar presión oncótica. En la técnica se conocen varios aditivos de alto peso molecular que pueden usarse de forma ventajosa en soluciones para la conservación y perfusión de órganos, tales como polietilenglicoles (PEG) y modificaciones de los mismos (Patente de EE.UU. No. 4.938.961 y Patente de EE.UU. No. 5.599.659), dextranos, proteínas séricas, tales como albúminas, hidroxietilalmidón (HES) y otros azúcares de alto peso molecular y polímeros biocompatibles de carga neta negativa en soluciones de pH neutro.

Debido a que las proteínas plasmáticas grandes no pueden atravesar fácilmente las paredes capilares, su efecto sobre la presión osmótica de los interiores capilares puede, hasta cierto punto, equilibrar la tendencia de que el líquido se escape de los capilares. En condiciones en las que las proteínas plasmáticas están reducidas, por ejemplo, en el caso de órganos extraídos de un cuerpo con fines de trasplante y almacenados en un líquido de conservación, el resultado de una presión oncótica demasiado baja es la acumulación de líquido en exceso por edema en los tejidos. Este problema debe abordarse, en particular para los órganos obtenidos de donantes con el corazón en asistolia y que a menudo se encuentran en un estado ligeramente deteriorado. Por lo tanto, se pueden añadir moléculas de alto peso molecular cargadas negativamente para mantener una presión oncótica fisiológica, que se expresa en mm Hg (milímetros de presión de mercurio). Preferiblemente, la solución para la conservación y perfusión de órganos de la presente divulgación produce una presión oncótica de 20 a 30 mm Hg, preferiblemente alrededor de los niveles fisiológicos, cerca de 25 mm Hg. En una realización, se utiliza PEG como aditivo de alto peso molecular en soluciones de conservación de órganos de la presente divulgación. En una realización más preferida, se utiliza PEG de un peso molecular en el intervalo de 25.000 a 50.000 Dalton, preferiblemente en concentraciones en el intervalo de 1 a 50 gramos por litro, de 10 a 50 gramos por litro, de 10 a 35 gramos por litro, o entre 10 y 30 gramos por litro. También se

pueden utilizar ventajosamente otros compuestos de alto peso molecular, tales como HES, albúminas y dextranos, para generar presión oncótica, opcionalmente en combinación con PEG.

5 El control del pH para evitar un aumento o disminución no deseados del pH intracelular es importante para las soluciones acuosas de conservación de órganos y las soluciones de perfusión. La isquemia, la hipoxia, el agotamiento de energía y la hipotermia son factores que pueden dar lugar a una caída de los niveles de pH y pueden conducir a la acidificación de las células, los tejidos y los órganos que se van a trasplantar. La acidificación es un peligro ampliamente reconocido para los órganos, los tejidos y las células y puede dar lugar a un rápido deterioro de la condición del órgano que se va a trasplantar (Baicu y Taylor, 2002 *Cryobiology* 45 pág. 33-48). La acidez es, en particular, un problema que puede ser necesario abordar en el caso de órganos obtenidos de donantes con el corazón en asistolia, que ya han experimentado isquemia, hipoxia y agotamiento de nutrientes. Las soluciones acuosas para la conservación de órganos según la divulgación están optimizadas de modo que puedan abordar y superar dichos problemas.

15 Proporcionar capacidad de tampón adicional a la solución acuosa para conservación de órganos para evitar la acidificación del órgano almacenado a baja temperatura y sin perfusión artificial o con una perfusión artificial disminuida, puede ser otra característica de la solución acuosa para conservación de órganos y de la solución de perfusión.

20 Aunque los medios de cultivo de tejidos a menudo tienen un tampón biológicamente aceptable optimizado para un pH fisiológico entre el intervalo de pH 7,0 y pH 7,8, preferiblemente alrededor de pH 7,4 a temperaturas fisiológicas de alrededor de 37° C, puede requerirse una capacidad de tampón adicional por las razones mencionadas anteriormente (Baicu et al. "Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency", *Cryobiology* 2002, 45 págs. 33-48). Por lo tanto, una solución acuosa para conservación de órganos y una solución de perfusión para bajas temperaturas, entre 0° Centígrados y 21° Centígrados, según la presente invención, está provista de un sistema tampón con una capacidad mínima (Beta) de al menos 20, más preferiblemente al menos 25, 30, 35, 40 o 50 y lo más preferiblemente al menos 30 a 35, medida en unidades Slykes (unidad Slykes = (milimoles de ácido añadido por unidad de cambio de pH)).

30 Los tampones biológicamente y fisiológicamente aceptables que tienen un intervalo de pKa adecuado y que pueden usarse de manera ventajosa en soluciones de acuerdo con la presente divulgación pueden seleccionarse del grupo que consiste en HEPES, PIPES, MOPS, TES, BES, Bicina, Tricina, Tris, Citrato, Histidina, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaHCO_3 y otros tampones de fosfato, citrato y carbonato, conocidos y bien documentados en la técnica (Current Protocols, Wiley Interscience, 2004). HEPES es el tampón más preferido en soluciones según la presente divulgación para proporcionar la capacidad de tampón (adicional) deseada, preferiblemente en concentraciones entre 1000-10000 mg/L, más preferiblemente entre 2500 y 7500 mg/L.

35 El pH de la conservación de órganos se puede ajustar utilizando $\text{Mg}(\text{OH})_2$, NaOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o combinaciones de los mismos, para obtener un pH entre 7 y 8, más preferiblemente entre 7,3 y 7,5 a 0-21 grados centígrados.

40 Además, se divulga una solución acuosa para conservación de órganos (que no forma parte de la invención reivindicada) que comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en, o todos seleccionados del grupo que consiste en:

- I) al menos un coloide, tal como un dextrano o polietilenglicol;
- 45 II) al menos dos compuestos tampón con propiedades tampón de pH, tales como fosfato de potasio, fosfato de sodio, bicarbonato de sodio, citrato de sodio, histidina o ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico;
- III) al menos uno, preferiblemente dos componentes con propiedades impermeables, tales como gluconato de sodio, gluconato de magnesio, gluconato de potasio, gluconato de calcio, manitol, rafinosa, ácido lactobiónico, ribosa o trehalosa;
- 50 IV) al menos una vitamina, tal como la vitamina B1, la vitamina B3, la vitamina B6, la vitamina B12, la vitamina C o la vitamina E;
- V) al menos un electrolito, tal como iones de sodio, potasio, calcio, cloruro o magnesio;
- VI) al menos un componente del sistema de suministro de energía, tal como 5'-(N-etilcarboxamido)adenosina, adenosina, glucosa, adenina y piruvato;
- 55 VII) al menos un sustrato para la formación de antioxidantes, tales como disulfuro de glutatión; y/o glutatión; y/o taurina
- VIII) uno o más aminoácidos, tales como histidina, cisteína, carnitina, glicina, glicil-glutamina, arginina, ornitina y triptófano

La composición puede comprender todos los I)-VIII) tal como se enumeran.

60 En otro aspecto, la solución acuosa para conservación de órganos que no cae dentro del alcance de protección puede comprender uno o más compuestos seleccionados entre:

- I) al menos un componente con propiedades quelantes de hierro, tales como la deferoxamina o el EDTA; y
- 65 II) al menos uno o más inhibidores de radicales libres de oxígeno, tales como trolox, alopurinol o glutatión reducido.

La concentración de los electrolitos preferiblemente puede ser: sodio: 50-150 mmol/L; potasio: 0-25 mmol/L; cloruro:

0-50 mmol/L; calcio: 0-5 mmol/L; magnesio: 0-10 mmol/L.

5 En un aspecto, un compuesto tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, citrato de sodio, histidina, fosfato de potasio o ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico, preferiblemente ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico. La solución acuosa para conservación de órganos descrita en el presente documento tiene un pH preferiblemente en el intervalo de 7,0 a 7,8, más preferiblemente en el intervalo de 7,3 a 7,5 y lo más preferiblemente 7,4.

10 Preferiblemente, la solución descrita en el presente documento o solución preparada pueden tener una osmolaridad en el intervalo de 250 - 420 mosmol/L, más preferiblemente en el intervalo de 380 - 410 y lo más preferiblemente en el intervalo de 390 - 400 mosmol/L.

15 Se puede seleccionar un antioxidante o una combinación de los mismos entre cualquier antioxidante conocido, tal como taurina, vitamina C, vitamina E, glutatión reducido, glutatión oxidado o vitamina C, preferiblemente taurina.

20 Todos los compuestos como se describen en este documento se clasifican como sustancias no farmacopeas que pueden tener la ventaja de que se facilita la certificación para la aplicación clínica.

25 La composición para la conservación de órganos puede fabricarse mediante procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento, por ejemplo, mediante la mezcla de los componentes y posteriormente la micronización en polvo en condiciones aceptables según la farmacopea. El proceso de micronización puede tener la ventaja de que dicho polvo puede almacenarse durante períodos prolongados sin una pérdida significativa de calidad. Antes de la aplicación, el polvo puede disolverse rápidamente y completamente en agua.

30 La presente divulgación divulga un kit, la utilización de una solución acuosa para la conservación de órganos o una composición para la conservación de órganos para su utilización en la conservación del riñón, hígado, pulmón, corazón, páncreas e intestino, así como para la conservación de partes de estos órganos.

35 La presente divulgación divulga un kit que comprende una solución acuosa para la conservación de órganos o una composición para la conservación de órganos según la invención para su utilización en la conservación del riñón, hígado, pulmón, corazón, páncreas e intestino o una parte de dichos órganos. Dicha utilización es preferentemente para su utilización en perfusión mecánica.

40 Además, se describe un procedimiento para la conservación de dichos órganos o partes de órganos a temperaturas hipotérmicas. Estos procedimientos pueden ser a temperaturas subnormotérmicas o a temperaturas normotérmicas. Las soluciones para la conservación de órganos actualmente disponibles no permiten la aplicación a un amplio intervalo de temperaturas, siendo las temperaturas hipotérmicas, subnormotérmicas y normotérmicas.

45 Además, se describe un procedimiento para la conservación de dichos órganos o partes de órganos mediante conservación mediante almacenamiento estático hipotérmico así como en combinación con perfusión mecánica de un órgano o partes de un órgano. Los expertos en la materia saben que las soluciones de conservación disponibles en el mercado actualmente no tienen la capacidad de conservación de órganos, partes de órganos, tejidos y células mediante tanto almacenamiento en frío estático como conservación mediante perfusión mecánica de dichos órganos o partes de órganos.

50 Además, se describe un procedimiento para la conservación de dichos órganos, por medio de conservación de almacenamiento estático hipotérmico, preferiblemente en combinación con perfusión mecánica de un órgano, o parte de un órgano. En la técnica se proporcionan soluciones acuosas para conservación y se ha descrito la base para las soluciones para conservación con también la adición de componentes para la utilización específica en condiciones hipotérmicas o normotérmicas y la aplicación en conservación estática o perfusión mecánica. De acuerdo con la descripción, se puede proporcionar una solución para la conservación acuosa de órganos, no proporcionando una solución lista para usar, sino más bien proporcionando una composición para conservación de órganos. Dicha composición se puede disolver fácilmente, por ejemplo en agua estéril, obteniendo de ese modo una solución acuosa para la conservación de órganos. Por lo tanto, la composición para conservación de órganos puede comprender todos los solutos y/o componentes presentes en la solución acuosa para la conservación de órganos, es decir, sin tener una cantidad significativa de agua (no hay agua líquida presente). También se entiende que la solución acuosa para la conservación de órganos se puede preparar utilizando cualquier componente adecuado, y que dicho componente puede estar comprendido en la composición para conservación de órganos. Los componentes se pueden proporcionar en forma libre o en cualquier sal o ácido apropiado de los mismos. Por ejemplo, el ácido glutámico puede proporcionarse en forma libre o como glutamato de sodio. Se puede utilizar cualquier forma apropiada y adecuada de componentes, teniendo en cuenta los parámetros y límites de las soluciones para conservación de órganos con respecto a la compatibilidad fisiológica (por ejemplo, composición electrolítica, pH, osmolaridad, presión oncótica) bien conocidos por el experto y tal como se describen y definen en el presente documento.

65 Además, en particular, la composición puede estar en forma de un polvo micronizado. La composición descrita en este documento comprende por lo tanto sustancias que se sabe que son biocompatibles, estables a temperaturas entre 0

y 40 grados centígrados y no tóxicas para el hígado, los riñones, el corazón, los pulmones, el páncreas y el intestino. El suministro en forma sólida, por ejemplo, polvo micronizado, tiene la ventaja de una vida útil de dos años como mínimo. A partir de la técnica anterior y las soluciones de conservación aplicadas comercialmente, se sabe que la vida útil está limitada a un año como máximo. Se sabe que varios componentes vitales utilizados en las soluciones de conservación actuales, por ejemplo, glutatión reducido y glutamina, se degradan u oxidan poco después de la fabricación de la solución para la conservación en forma líquida (Gnaiger et al., "Autooxidation of Glutathione in organ preservation solutions", Transplantation Proceedings, 32 (2000) 14). La presente divulgación presenta la ventaja de que la solución para la conservación almacenada en forma de polvo micronizado puede disolverse rápidamente y almacenarse durante períodos prolongados sin degradación ni oxidación de sus componentes. Otra ventaja puede ser que el volumen necesario para el almacenamiento puede reducirse significativamente.

Además, la presente divulgación también contempla cualquier solución acuosa para conservación de órganos que se utilice actualmente en la práctica clínica (que no forma parte de la invención reivindicada), para preparar una forma sólida (tal como un polvo o un polvo micronizado) de la misma, es decir, proporcionar una composición para conservación de órganos de la misma. Dichas composiciones pueden tener la ventaja sobre las soluciones existentes que se proporcionan actualmente de tener una vida útil más larga, pero también de tener un efecto mejorado sobre la viabilidad de los órganos (o tejidos o células), ya que la solución se prepara en el momento y, por lo tanto, no sufre deterioro.

La composición para la conservación de órganos que no cae dentro del alcance de protección per se puede disolverse en agua estéril a temperaturas hipotérmicas (entre 0 y 10 grados centígrados), a temperaturas subnormotérmicas (entre 10 y 34 grados centígrados) o a temperaturas fisiológicas normotérmicas (entre 34 y 40 grados centígrados), pero se pueden contemplar temperaturas más altas, hasta el punto de ebullición del agua, siempre que no sean perjudiciales para los componentes.

Se describe una utilización de una solución acuosa para la conservación de órganos o una composición para la conservación de órganos según la descripción para la conservación de un órgano o partes de un órgano. Preferiblemente, dicha solución acuosa para la conservación de órganos o composición para la conservación de órganos según la descripción es para la conservación de un órgano o una parte de un órgano. Dicha utilización descrita puede ser para la conservación de un órgano o partes de un órgano, en la que estos son de origen humano. Preferiblemente, dicha utilización proporcionada es para la conservación de un órgano, o una parte de un órgano, en la que estos son de origen humano. Los órganos o partes de los mismos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en riñón, hígado, pulmón, corazón, páncreas y/o intestino. Preferiblemente, dicha utilización de una solución acuosa para la conservación de órganos o una composición para la conservación de órganos según la invención es para la conservación de un órgano o una parte de este, en la que dicha conservación comprende perfusión mecánica o gravitacional.

Ejemplos Ejemplo 1

Ejemplo de la solución acuosa para conservación de órganos utilizada en la presente invención (solución de ejemplo, ES). En la tabla siguiente se enumeran la concentración, así como el intervalo de concentración de los compuestos. Las cantidades utilizadas (mg/L) en los ejemplos 2 y 3 se enumeran como referencia en la solución de ejemplo 2 (ES2) y la solución de ejemplo (ES).

Los compuestos se disolvieron en agua estéril para inyección.

Compuesto	mg/L (ES y ES2)	Intervalo (mg/L)
Polietilenglicol-PEG 10-35.000 Dalton	19000	1000-50000
Gluconato de sodio	6100	1000-15000
D-gluconato de magnesio	5000	1000-10000
Taurina (no está en ES2)	4600	1000-10000
Glutatión reducido (GSH)	4300	1000-9000
Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES)	4000	1000-10000
Ácido lactobiónico	2100	1000-9000
Histidina	1550	50-4000
D-trehalosa	1000	50-4000
D-rafinosa pentahidratada	1000	100-3000
D-gluconato de calcio	1000	100-3000
Cloruro de sodio	960	50-3000
Citrato de sodio	900	50-3000
Cloruro de potasio	890	50-2000
L-Alanina-L-Glutamina (no está en ES2)	880	50-3000
Ácido glutámico (no está en ES2)	700	50-3000

Cisteína	700	50-3000
Arginina	600	50-2000
Ribosa	460	50-2000
Triptófano	450	20-2000
Piruvato de sodio	420	20-2000
Carnitina	400	20-2000
Ácido ascórbico (vitamina C)	380	20-1500
KH ₂ PO ₄	300	50-2000
Glucosa	200	20-1500
Ornitina	200	20-1000
Glicina	40	5-500
Disulfuro de glutatión (GSSG)	20	5-500
Adenina	10	1-100
Biotina (vitamina H)	10	1-100

Ejemplo 2

5 El objetivo de este estudio fue evaluar el almacenamiento en frío de riñones porcinos utilizando ES2, una solución para la conservación de órganos de referencia como se describe en el Ejemplo 1, que no incluye taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico. Los resultados se compararon con el almacenamiento en frío utilizando Histidina-Triptófano-Cetoglutarato, la solución para la conservación en frío de referencia clínica. Con este fin, ambas soluciones de conservación se evaluaron utilizando el modelo de riñón porcino perfundido aislado (IPPK) empleando riñones dañados isoquímicamente en caliente (WI).

10

	HTK	ES2
Electrolitos	bajo contenido de sodio, bajo contenido de potasio	alto contenido de sodio, bajo contenido de potasio
Coloide	-	polietilenglicol (PEG)
Impermeabilizantes	manitol	rafinosa, trehalosa, ácido lactobiónico, Na, Ca, Mg-gluconato
Tampones	histidina	HEPES, KH ₂ PO ₄ , citrato de sodio
Antioxidantes	-	Glutatión reducido, disulfuro de glutatión
Metabolitos	alfa-cetoglutarato	adenina, glucosa, ribosa, piruvato
Aminoácidos	triptófano	arginina, carnitina, cisteína, glicina, histidina, ornitina, triptófano
Vitaminas	-	Vitamina C, H
Viscosidad a 21°C (centiPoise)	1,8	2,8
Osmolaridad (mmol/l)	316	390
Presión oncótica (mmHg)	4	25

15 Introducido por Hemingway en 1931, el modelo de riñón porcino aislado perfundido (IPPK) puede proporcionar información útil para pruebas preclínicas de nuevos estudios de técnicas de conservación, ya que el riñón porcino es comparable al riñón humano en lo que respecta a fisiología, inmunidad y tamaño. Además, se pueden emplear riñones de matadero o riñones de animales utilizados en otros experimentos, lo que está de acuerdo con el principio 3R (reemplazo, refinamiento, reducción) postulado por Russell y Burch en 1959.

Materiales y procedimientos

20 Los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación alemana que rige los estudios con animales siguiendo la 'Guide for the care and use of Laboratory Animals' (publicación del NIH, 8.ª edición, 2011)) y la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Diario Oficial de la Unión Europea, 2010) El permiso oficial fue otorgado por la oficina gubernamental de cuidado y utilización de animales (LANUV Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen, Alemania).

25 Se estudiaron tres grupos (n=5 por grupo) con riñones recuperados sin WI, lavados y almacenados en frío durante 24 h en HTK que sirvió como grupo de control. En los grupos ES2-WI y HTK-WI, los riñones se sometieron a 45 min de WI y, en consecuencia, se lavaron y almacenaron en frío en sus respectivas soluciones.

30 Cerdas Landrace hembras (45,7 ± 1,1 kg) de una instalación de cría de barrera libre de enfermedades se alojaron en habitaciones con aire acondicionado (22 °C) y se les permitió aclimatarse a su entorno durante un mínimo de siete días y ayunaron durante 12 h antes de la cirugía. Los animales fueron premedicados con 8 mg/kg de azaperona (Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Alemania), 15 mg/kg de ketamina (Ceva GmbH, Duesseldorf, Alemania) y 10

mg de atropina (1 ml/1 % de sulfato de atropina, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Alemania) administradas por vía intramuscular. La anestesia general se indujo con 2 mg/kg de propofol (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Alemania) administrado por vía intravenosa (IV), seguido de intubación y ventilación mecánica con isoflurano al 1,5 % en volumen (Forene®, Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Alemania) y oxígeno con infusión IV

5 continua de 0,02 mg/h/kg de fentanilo (KG Rotexmedica GmbH, Trittau, Alemania). Después de una laparotomía media, ambos riñones fueron explantados con o sin inducción de WI. Inmediatamente después de la recuperación, se recogió 1 litro de sangre completa en bolsas CPD (Fenwal Inc., Illinois, EE. UU.) y se almacenó a 4 °C para reperfusión ex vivo. Los animales fueron sacrificados mediante la administración IV de 1 ml/kg de peso corporal de pentobarbital (Narcoren®, MERIAL GmbH, Hallbergmoss, Alemania).

10 Explantación y lavado de riñón

Para la inducción de la WI, tanto la arteria como la vena renales se sujetaron durante 45 min seguido de la recuperación y el lavado directamente o después de 45 min de WI a través de la arteria renal. Para el lavado, se utilizaron 500 ml

15 de solución fría de HTK o ES2 a una presión hidrostática de 100 cm H₂O. Durante el lavado, la vena renal así como el uréter se canularon para la recolección de muestras durante la reperfusión. A continuación, los riñones se pesaron y se almacenaron en las respectivas soluciones de conservación a 4 °C. Después de 24 h de CS, se evaluaron la función renal y los parámetros de daño utilizando el modelo IPPK.

20 Reperfusión

Como medio de reperfusión, se disolvieron tampón de Krebs-Henseleit modificado (9,6 g/L, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), cloruro de calcio (0,37 g/L, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), bicarbonato de sodio al 8,4 % (25 ml/L, Fresenius, Alemania), creatinina (1 mmol/L, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), heparina (3000 IU/L, Ratiopharm GmbH, Ulm, Alemania) y Fibrisol (3 g/L, Muscalla, Vierheim, Alemania) en 800 ml de agua para inyección

25 (Ampuwa, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Alemania) y se añadieron a la mezcla 200 ml de sangre entera autóloga no desleucocitada.

Después de CS, los riñones se pesaron y se colocaron en un depósito de órganos, se llenaron con 1 L de medio de reperfusión precalentado a 38 °C utilizando un baño de calentamiento (HAAKE DC30, W13, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Alemania) y se reperfundieron a presión controlada durante 60 min a una presión arterial media preestablecida de 85 mmHg. El medio de reperfusión se hizo circular mediante una bomba de rodillos pulsátiles controlada por ordenador (ISMATEC®, MPC Standard, Gladburg, Suiza) a través de un oxigenador (Hilite® 2400 LT, MEDOS, Stolberg, Alemania) y una trampa de burbujas hasta la arteria renal y salió del riñón libremente hacia el

30 depósito de órganos. Se conectaron a la arteria renal un sensor de presión (MLT844, AD Instruments GmbH, Spechbach, Alemania) y un sensor de flujo (sensor ME2PXL1072, módulo de caudalímetro TS410, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, EE. UU.) y los datos se recopilaron utilizando un sistema de adquisición de datos (PowerLab 8/30, AD Instruments GmbH, Spechbach, Alemania). El flujo sanguíneo renal (RBF, *renal blood flow*), la presión arterial media (MAP, *mean arterial pressure*) y la temperatura se registraron y almacenaron de forma continua utilizando el software Lab Chart 7 (AD Instruments GmbH). La resistencia vascular intrarrenal (IRR, *intrarenal vascular resistance*) se calculó como MAP/RBF/100 g.

El medio de reperfusión se oxigenó continuamente con carbógeno (95% oxígeno/5% dióxido de carbono), logrando una presión parcial de oxígeno arterial (pO₂) de más de 500 mmHg durante todo el tiempo de reperfusión. Los niveles

45 de pO₂ arterial y venoso y pH se midieron utilizando un analizador de gases en sangre (ABL 725, Radiometer GmbH, Willich, Alemania). La orina se recogió por separado y el volumen de perfusión se repuso cada 15 minutos para compensar el volumen de orina excretada. Se registró la producción de orina y se recogieron muestras a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos durante la reperfusión para la determinación de las concentraciones de sodio, creatinina y proteína en la orina. Se tomaron muestras de perfusión venosa a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos y se analizaron para determinar los niveles de sodio y creatinina. Utilizando los niveles de perfusión venosa y orina, se calcularon la depuración de creatinina (CrCl, creatinina en orina × flujo urinario/creatinina plasmática) y la excreción fraccional de sodio (FENa, sodio urinario × creatinina plasmática)/(sodio plasmático × creatinina urinaria) × 100%). La actividad metabólica renal se aproximó mediante el cálculo del consumo de oxígeno utilizando valores de pO₂ arterial y venoso ((p_aO₂ - p_vO₂) × caudal/peso del riñón).

55 Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos

Los niveles urinarios del marcador de lesión tubular aguda lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL-*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, Kit 044, BioPorto Diagnostics, Gentoft, Dinamarca) se determinaron

60 utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia se detectó a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

65 Estado oxidativo

Para la evaluación del estado oxidativo del tejido renal, se determinaron los niveles de glutatión reducido (GSH) y

oxidado (GSSG). Además, se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como subproducto de la peroxidación lipídica. El tejido congelado se homogeneizó en tejido salino tamponado con fosfato enfriado en hielo (10 % p/v), a continuación se centrifugó durante 5 min a 4000 g y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C. Las concentraciones de TBARS, GSH y GSSG se expresaron en μmol por gramo de proteína. El contenido de proteína del tejido renal se evaluó utilizando un ensayo de ácido bicinonínico (BCA, Fermentas, Lituania). Todas las mediciones se realizaron utilizando un espectrofluorómetro Sapphire II (Tecan Austria GmbH). A continuación, se calculó la relación entre glutatión reducido y oxidado.

Histología

Después de la reperusión, los cortes de tejido renal se fijaron en formalina al 10% y se almacenaron en formalina al 4% antes de la inclusión en parafina. Las muestras se tiñeron mediante la reacción de ácido peryódico-Schiff (PAS) y se examinaron sin conocer las condiciones experimentales. Se midieron veinte áreas de la sección transversal de la cápsula de Bowman y glomerular, así como el diámetro exterior tubular por portaobjetos con un aumento de 20x utilizando el software del sistema de patología digital Nanozoomer (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Alemania).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de corrección con la prueba posterior de Bonferroni utilizando el paquete de software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se presentan como media \pm SEM. El área bajo la curva (AUC) se calculó individualmente y se comparó utilizando Kruskal-Wallis con la prueba posterior de Dunn. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Los pesos de los riñones después de la recuperación de órganos no difirieron significativamente (Control frente a HTK-WI frente a ES2-WI; 115 ± 8 frente a 119 ± 12 frente a 116 ± 9 g resp.), sin embargo, los riñones tanto en el grupo de control lavado de HTK como en el grupo HTK-WI aumentaron de peso después del lavado, lo que difirió del grupo ES2-WI. El tiempo necesario para el lavado de 500 ml de solución para la conservación no difirió (Control frente a HTK-WI frente a ES2-WI; 13 ± 1 frente a 26 ± 6 frente a 18 ± 3 min resp.).

Parámetros de reperusión

Durante la reperusión, la resistencia intrarrenal fue significativamente menor en los grupos de control y ES2-WI en comparación con el grupo HTK-WI.

Función renal

En el grupo de control, la tasa de CrCl fue mayor en comparación con los grupos ES2-WI y HTK-WI. Como marcador de insuficiencia renal aguda, la FENa fue mejor en el grupo de control en comparación con los grupos ES2-WI y HTK-WI.

El consumo de oxígeno fue mayor en el grupo de control y en los grupos ES2-WI en todos los puntos temporales en comparación con HTK-WI, mientras que los controles no difirieron de ES2-WI.

Tanto el grupo Control como el grupo ES2-WI mantuvieron un equilibrio ácido-base metabólico fisiológico durante la reperusión a diferencia de HTK-WI, que demostró niveles de pH venoso significativamente más bajos en comparación con ES2-WI en todos los puntos temporales.

A los 5 minutos de reperusión, ambos grupos WI demostraron concentraciones de proteína urinaria más altas en comparación con el control. A partir de entonces, las concentraciones de proteína urinaria de CS-HTK fueron más altas que las del control y ES2-WI, y ES2-WI no difirió de los controles.

La producción total de orina fue mayor en los controles en comparación con ambos grupos WI, sin embargo se observó una menor producción de orina en los riñones en el grupo HTK-WI en comparación con ES2-WI.

La lesión tubular aguda fue más grave en el grupo HTK-WI en comparación con los controles, como se expresó por niveles de NGAL urinario significativamente más altos. Se observó una mayor peroxidación lipídica, como se reflejó en los niveles de TBARS tisulares posteriores a la reperusión, en el grupo HTK-WI en comparación con el grupo de control. Además, se observó una proporción menor de glutatión reducido con respecto a oxidado tanto en los grupos de control como en los de HTK-WI en comparación con los de ES2-WI.

Histología

Solo en el grupo HTK-WI se encontraron microtrombos en los glomérulos. Además, el área de la sección transversal

de la cápsula de Bowman se agrandó significativamente en el grupo HTK-WI en comparación con el grupo de control y el grupo ES2-WI. Se observó la misma tendencia con el diámetro tubular. Solo en el grupo HTK-WI se encontró proteína intratubular debido a la mayor permeabilidad de las paredes capilares glomerulares.

5 Conclusión

La solución para la conservación ES2 se comparó con HTK para la conservación CS de 24 h de injertos renales dañados por WI de 45 min, empleando riñones no dañados por WI, almacenados en frío durante 24 h en HTK como controles. La función renal fue significativamente menor en ES2-WI y HTK-WI en comparación con los controles, como se expresó por tasas de depuración de creatinina más bajas. Además, la función tubular renal fue significativamente menor en ES2-WI y HTK-WI en comparación con los controles, como se reflejó por la excreción fraccionada de sodio. Los injertos dañados por WI conservados con ES2 demostraron una IRR, concentraciones de proteína urinaria y niveles de marcadores de estrés oxidativo significativamente menores, así como un mayor consumo de oxígeno en comparación con HTK-WI. Además, se observó una mayor producción de orina y un mejor mantenimiento del equilibrio ácido-base en ES2-WI en comparación con HTK-WI. En conclusión, este estudio demostró ventajas de la solución ES2 en comparación con la solución HTK para la conservación de injertos renales dañados por WI, almacenados en frío.

20 Ejemplo 3

El objetivo de este estudio fue la evaluación de la Solución de Ejemplo (ES), una solución para la conservación de órganos como la utilizada en la presente invención y como se describe en el Ejemplo 1, para la conservación de riñones para trasplante mediante persuflación oxigenada sistémica venosa (VSOP) y perfusión mecánica oxigenada (MP). Los resultados se compararon con el almacenamiento en frío (CS) utilizando ES y solución para la conservación de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK), la solución para la conservación de órganos de referencia clínica en todo el mundo. Con este fin, se utilizó el modelo de riñón porcino perfundido aislado (IPPK) empleando riñones isoquímicamente dañados en caliente (WI).

	HTK	ES
Electrolitos	bajo contenido de sodio, bajo contenido de potasio	alto contenido de sodio, bajo contenido de potasio
Coloide	-	polietilenglicol (PEG)
Impermeabilizantes	manitol	rafinosa, trehalosa, ácido lactobiónico, Na, Ca, Mg-gluconato
Tampones	histidina	HEPES, KH ₂ PO ₄ , citrato de sodio
Antioxidantes	-	Taurina, glutatión reducido, disulfuro de glutatión
Metabolitos	alfa-cetoglutarato	adenina, glucosa, ribosa, piruvato
Aminoácidos	triptófano	L-alanina-L-glutamina, ácido glutámico, arginina, carnitina, cisteína, glicina, histidina, ornitina, triptófano
Vitaminas	-	Vitamina C (ácido ascórbico), vitamina H (biotina)
Viscosidad a 21°C (centiPoise)	1,8	2,9
Osmolaridad (mmol/l)	316	395
Presión oncótica (mmHg)	4	25

30 Introducido por Hemingway en 1931, el modelo de riñón porcino aislado perfundido (IPPK) puede proporcionar información útil para pruebas preclínicas de nuevos estudios de técnicas de conservación, ya que el riñón porcino es comparable al riñón humano en lo que respecta a fisiología, inmunidad y tamaño. Además, se pueden emplear riñones de matadero o riñones de animales utilizados en otros experimentos, lo que está de acuerdo con el principio 3R (reemplazo, refinamiento, reducción) postulado por Russell y Burch en 1959. En este estudio, la eficacia de la solución para la conservación de ES en combinación con aerobiosis por VSOP o MP oxigenada se comparó con CS utilizando ES o HTK para la conservación durante 24 horas de riñones dañados por isquemia caliente (WI) extensa utilizando el modelo de riñón porcino perfundido aislado (IPPK). Para este fin, se empleó una solución para la conservación ES que constituye taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico, así como un coloide, impermeables y potentes tampones, permitiendo su aplicación en VSOP, MP, así como la conservación en CS.

40 Material y procedimientos

Protocolos experimentales

45 Los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación alemana que rige los estudios con animales siguiendo

la 'Guide for the care and use of Laboratory Animals' (publicación del NIH, 8.^a edición, 2011)) y la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Diario Oficial de la Unión Europea, 2010) El permiso oficial fue otorgado por la oficina gubernamental de cuidado y utilización de animales (LANUV Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen, Alemania).

5 Cerdas Landrace alemanas hembras (48 ± 2 kg) de una instalación de cría de barrera libre de enfermedades se alojaron en habitaciones con aire acondicionado completo (temperatura ambiente de 22 °C, humedad relativa del 50 % y se les permitió aclimatarse a su entorno durante un mínimo de siete días y ayunaron durante 12 h antes de la cirugía con libre acceso al agua. Los animales fueron premedicados con 8 mg/kg de peso corporal (BW, body weight) de azaperona (Stresnil[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Alemania), 15 mg/kg de peso corporal de ketamina (Ceva GmbH, Düsseldorf, Alemania) y 10 mg de atropina (1 ml/1 % de sulfato de atropina, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Alemania) administradas por vía intramuscular. La anestesia general se indujo con 2 mg /kg de peso corporal de propofol (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Alemania) administrado por vía intravenosa, seguido de intubación y ventilación mecánica con isoflurano al 1,5% en volumen (Forene[®], Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Alemania) y oxígeno con infusión intravenosa continua de 0,02 mg/h/kg de peso corporal de fentanilo (KG Rotexmedica GmbH, Trittau, Alemania).

En los grupos CS-HTK, CS-ES, MP-ES y VSOP-ES, los riñones se sometieron a isquemia caliente durante 45 min y posteriormente se lavaron y se conservaron durante 24 h utilizando sus respectivos procedimientos (n = 5 por grupo). Los riñones recuperados sin isquemia caliente, lavados y almacenados en frío durante 24 h en HTK sirvieron como grupo de control negativo (n = 5). Después del período de conservación, se evaluaron los parámetros de daño y función renal utilizando el modelo IPPK. Directamente después de la recuperación, se recolectó 1 L de sangre completa en bolsas de citrato-fosfato-dextrosa (Fenwal Inc., Illinois, EE. UU.) y se almacenó a 4 °C para reperfusión ex vivo. Los animales fueron sacrificados mediante la administración intravenosa de 1 ml/kg de peso corporal de pentobarbital (Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoss, Alemania).

Recuperación de riñón

Después de una laparotomía media, ambos riñones fueron explantados directamente o con exposición a isquemia caliente sujetando tanto la arteria como la vena renales durante 45 min, seguido de recuperación y lavado a través de la arteria renal. Para el lavado, se utilizaron 500 ml de solución ES o HTK fría a una presión hidrostática de 100 cm de H₂O. Durante el lavado, se canularon la vena renal y el uréter para la recolección de muestras durante la reperfusión. A continuación, se pesaron los riñones y, para los grupos CS-HTK, CS-ES y de control, almacenados durante 24 h en hielo derretido en sus respectivas soluciones de conservación.

VSOP

En el grupo VSOP-ES, los riñones almacenados a 4 °C en ES se persuflaron a través de la vena renal durante 24 h. Se humedeció oxígeno puro de grado médico utilizando una botella de lavado y se introdujo en el riñón a una presión constante de 18 mmHg y un flujo de 1 L/min.

MP

Directamente después del lavado, los riñones en el grupo MP-ES se oxigenaron y perfundieron de manera pulsátil a una presión arterial media de 25 mmHg utilizando una bomba de rodillo pulsátil controlada por ordenador (ISMATEC[®], MPC Standard, Gladburg, Suiza) a través de un oxigenador (Hilite[®] 2400 LT, MEDOS, Stolberg, Alemania) y una trampa de burbujas hasta la arteria renal y salieron del riñón libremente hacia el depósito del órgano. Se conectaron un sensor de presión (MLT844, AD Instruments GmbH, Spechbach, Alemania) y de flujo (ME2PXL1072, módulo de medidor de flujo TS410, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, EE. UU.) a la arteria renal y los datos se recopilaron utilizando un sistema de adquisición de datos (PowerLab 8/30, AD Instruments GmbH, Spechbach, Alemania). La temperatura del perfundido se mantuvo a 4 °C utilizando un sistema de enfriamiento (enfriador de inmersión refrigerado C1G, Grant Instruments, Shepreth, Inglaterra), baño térmico (HAAKE W13, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Alemania) con un termostato (HAAKE DC30) y un intercambiador de calor integrado en el oxigenador. El perfundido se oxigenó continuamente con oxígeno de grado médico, logrando una presión parcial de oxígeno arterial (pO₂) de más de 700 mmHg durante todo el período de MP. Los niveles de pO₂ arterial se midieron utilizando un analizador de gases en sangre (ABL 725, Radiometer GmbH, Willich, Alemania). El flujo de perfundido, la presión arterial media y la temperatura se registraron y almacenaron continuamente utilizando el software Lab Chart 7 (AD Instruments GmbH).

Reperfusión

Como medio de reperfusión se utilizó un tampón de Krebs-Henseleit modificado y una mezcla de sangre entera autóloga no desleucocitada. Después del período de conservación, los riñones se pesaron y se colocaron en un depósito de órganos, se llenaron con 1 L de medio de reperfusión precalentado a 38 °C y se perfundieron a presión controlada durante 60 min a una presión arterial media preestablecida de 85 mmHg utilizando la misma configuración de perfusión que se aplicó para MP.

El medio de reperfusión se oxigenó continuamente con carbógeno (95% oxígeno/5% dióxido de carbono), logrando una presión parcial de oxígeno arterial (pO_2) de más de 500 mmHg durante todo el período de reperfusión. Los niveles de pO_2 arterial y venoso y pH se midieron a los 5, 15, 30, 45 y 60 min utilizando un analizador de gases en sangre (ABL 725, Radiometer GmbH). La actividad metabólica renal se aproximó mediante el cálculo del consumo de oxígeno utilizando valores de pO_2 arterial y venoso ($(p_aO_2 - p_vO_2) \times \text{flujo/peso del riñón}$). La resistencia intrarrenal se calculó como presión arterial media/flujo renal/100 g. Se recogieron muestras de orina a los 5, 15, 30, 45 y 60 min durante la reperfusión para la determinación de las concentraciones de sodio, creatinina y proteína en la orina y se registró la producción total de orina. El volumen de perfusión se reponía cada 15 minutos para compensar el volumen de orina excretada. Se tomaron muestras de perfundido venoso a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos y se analizaron los niveles de sodio y creatinina. Utilizando el perfundido venoso y los niveles de orina, se calcularon la depuración de creatinina ($\text{creatinina en orina} \times \text{flujo urinario/creatinina plasmática}$) y la excreción fraccional de sodio ($(\text{sodio urinario} \times \text{creatinina plasmática})/(\text{sodio plasmático} \times \text{creatinina urinaria}) \times 100\%$).

15 Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos

Los niveles urinarios del marcador de lesión tubular aguda lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, Kit 044, BioPorto Diagnostics, Gentofte, Dinamarca) se determinaron al final de la reperfusión utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia se detectó a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

Estado oxidativo

Para la evaluación del estado oxidativo, las muestras de tejido congeladas tomadas después de la reperfusión se homogeneizaron en solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo (10 % p/v), a continuación se centrifugaron durante 5 min a 4000 g y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C . Las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) se determinaron tal como se describió anteriormente. A continuación, se calculó la relación de GSH con respecto a GSSG. Además, las muestras de tejido se analizaron para detectar sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como un subproducto de la peroxidación lipídica y se expresaron en μmol por gramo de proteína. El contenido de proteína del tejido renal se evaluó utilizando un ensayo de ácido bicinconínico (BCA, Fermentas, Vilnius, Lituania). Todas las mediciones se realizaron utilizando un espectrofluorómetro Sapphire II (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

Histología

Después de la reperfusión, los cortes de tejido renal se fijaron en formalina al 10 % durante 24 h y se incluyeron en parafina. Los cortes de cuatro micrones se tiñeron con el reactivo de ácido peryódico-Schiff y se contratiñeron con hematoxilina (PAS) y se digitalizaron utilizando un escáner de portaobjetos completo (Hamamatsu NanoZoomer 2.0HT). Se midieron veinte áreas de la cápsula de Bowman por portaobjeto con un aumento de 20x utilizando el software del sistema de patología digital Hamamatsu (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Alemania). Todos los análisis se realizaron de forma ciega.

Análisis estadístico

Los valores se presentan como media \pm SEM. Después de comprobar el supuesto de normalidad, se realizó un análisis estadístico mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, utilizando el paquete de software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE. UU.). El área bajo la curva (AUC) se calculó individualmente para los parámetros continuos y se comparó la AUC media utilizando Kruskal-Wallis con la prueba posterior de Dunn. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Después de la explantación, los pesos de los riñones no difirieron significativamente (126 ± 11 frente a 120 ± 8 frente a 121 ± 11 frente a 124 ± 7 frente a 108 ± 2 g; CS-HTK frente a CS-ES frente a MP-ES frente a VSOP-ES frente a control respectivamente). Durante el lavado, los riñones en los grupos CS-ES, MP-ES y VSOP-ES perdieron peso a diferencia de los riñones en los grupos CS-HTK y control que ganaron peso, lo que sugiere la formación de edema intrarrenal por extravasación de la solución HTK (-17 ± 2 frente a -17 ± 4 frente a -11 ± 2 frente a 22 ± 2 frente a 27 ± 4 g respectivamente, $p < 0,0001$). El tiempo necesario para el lavado de 500 ml de solución para la conservación no difirió significativamente (CS-HTK frente a CS-ES frente a MP-ES frente a VSOP-ES frente a control; 26 ± 6 frente a 18 ± 3 frente a 18 ± 4 frente a 17 ± 4 frente a 15 ± 2 min, respectivamente).

Función renal

El AUC para la depuración de creatinina fue menor en el grupo CS-HTK en comparación con los controles. Como marcador de lesión tubular aguda, la excreción fraccional de sodio fue mayor en CS-HTK en comparación con VSOP-

ES y los controles. Además, tanto para la depuración de creatinina como para la excreción fraccional de sodio, CS-ES, MP-ES y VSOP-ES no difirieron significativamente del grupo de control isquémico no caliente. Los riñones conservados por CS-ES y VSOP-ES mantuvieron una homeostasis ácido-base metabólica fisiológica durante la reperfusión a diferencia de CS-HTK, que demostró niveles de pH venoso significativamente más bajos durante todo el período de reperfusión.

La producción total de orina de los riñones en el grupo CS-HTK fue menor en comparación con los grupos CS-ES, MP-ES, VSOP-ES y control (Tabla 1). El grupo CS-HTK demostró concentraciones de proteína urinaria más altas en comparación con VSOP-ES y controles. A partir de los 15 minutos de reperfusión, las concentraciones de proteína urinaria fueron más de 3 veces más altas en CS-HTK que en CS-ES, MP-ES, VSOP-ES y controles. La lesión tubular aguda fue más grave en el grupo CS-HTK en comparación con los controles, tal como se expresó por los niveles urinarios más altos de NGAL (Tabla 1).

La resistencia intrarrenal fue mayor en CS-HTK en comparación con CS-ES y los controles. Aunque no es estadísticamente significativa, la resistencia intrarrenal fue aproximadamente 5 veces menor en el grupo VSOP-ES en comparación con CS-HTK ($p = 0,0524$) y se observó una tendencia al aumento de la resistencia intrarrenal en el grupo MP-ES. La actividad metabólica expresada por el consumo de oxígeno fue menor en CS-HTK en comparación con CS-ES y los controles durante todo el período de reperfusión. El grupo VSOP-ES demostró un consumo de oxígeno 3 veces mayor en comparación con CS-HTK y no difirió de los controles.

Estado oxidativo

Se observó una peroxidación lipídica reducida, tal como se refleja en las concentraciones de TBARS en el tejido posterior a la reperfusión, en VSOP-ES en comparación con MP-ES, y VSOP-ES y CS-ES tenían concentraciones similares a los controles (Tabla 1). Se observó una relación GSH/GSSG más baja tanto en el grupo CS-HTK como en el grupo control en comparación con CS-ES, MP-ES y VSOP-ES, con una relación más baja en MP-ES que en VSOP-ES (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros posteriores a la reperfusión

	CS-HTK	CS-ES	MP-ES	VSOP-ES	control
Orina total (ml)	86 ± 41 ^a	196 ± 28	332 ± 54	304 ± 43	443 ± 58
NGAL (ng/ml)	74,8 ± 9,0 ^b	52,7 ± 3,7	57,4 ± 12,9	50,1 ± 5,0	29,2 ± 6,1
TBARS (µmol/g)	0,63 ± 0,05	0,48 ± 0,06	0,67 ± 0,09 ^c	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,03
Relación GSH/GSSG	1,6 ± 0,1 ^d	4,9 ± 0,5	3,6 ± 0,4 ^e	5,6 ± 0,5	1,7 ± 0,1 ^f

^aCS-HTK frente a CS-ES $p < 0,05$; CS-HTK frente a MP-ES $p < 0,001$, CS-HTK frente a VSOP-ES $p < 0,01$, CS-HTK frente a control $p < 0,0001$; ^bCS-HTK frente a control $p < 0,01$; ^cMP-ES frente a VSOP-ES $p < 0,05$; ^dCS-HTK frente a CS-ES y VSOP-ES $p < 0,0001$, CS-HTK frente a MP-ES $p < 0,01$, ^eMP-ES frente a VSOP-ES $p < 0,01$; ^fCS-ES y VSOP-ES frente a control $p < 0,0001$, MP-ES frente a control $p < 0,01$. Histología

Las secciones transversales de los riñones después de 1 h de reperfusión mostraron restos de sangre tanto macroscópicamente como microscópicamente en las regiones medular y cortical solo en los riñones conservados con CS-HTK. Además, en el grupo con CS-HTK, el espacio de Bowman se agrandó significativamente en comparación con los grupos con CS-ES, MP-ES, VSOP-ES y control. Además, se observó proteína intratubular en el grupo con HTK, lo que concuerda con las altas concentraciones de proteína en la orina durante la reperfusión.

Conclusiones

Se compararon VSOP, MP y CS utilizando una solución para la conservación ES con HTK para la conservación durante 24 horas de injertos renales dañados por isquemia caliente (WI) durante 45 minutos, empleando riñones no dañados por WI, almacenados en frío durante 24 horas en HTK como controles. La función renal y la lesión tubular renal no difirieron significativamente en los grupos VSOP-ES, MP-ES y CS-ES de los controles no dañados por isquemia caliente. La producción de orina fue significativamente mayor en los grupos VSOP-ES, MP-ES y CS-ES en comparación con CS-HTK. Se observó una peroxidación lipídica reducida en VSOP-ES y CS-ES en comparación con CS-HTK, con concentraciones similares a los controles. Este estudio demostró la superioridad de la solución para la conservación ES para VSOP, MP oxigenada y CS en comparación con la solución HTK de referencia y la mejora del estado oxidativo, así como la recuperación metabólica y funcional de los injertos renales dañados por WI. La solución para la conservación ES en combinación con VSOP dio como resultado una mejor calidad de conservación de los injertos de riñón porcino dañados por WI, que fue comparable a la de los riñones no dañados por WI utilizando HTK. Por lo tanto, la ES aplicada para la conservación oxigenada tiene el potencial de resucitar riñones extensamente dañados por isquemia caliente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos que comprende taurina, L-alanina-L-glutamina y ácido glutámico para la conservación de un órgano o partes de un órgano, en la que dicha utilización comprende la perfusión oxigenada de dicho órgano o parte del mismo con dicha solución acuosa para conservación de órganos, y en la que dicha utilización es ex vivo.
- 10 2. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según la reivindicación 1, en la que la solución acuosa para conservación de órganos comprende un coloide, un antioxidante, un electrolito, un impermeabilizante, un aminoácido, una vitamina y al menos 2 compuestos tampón.
- 15 3. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según la reivindicación 1 o 2, en la que la solución acuosa para conservación de órganos comprende al menos 2 impermeabilizantes y al menos 2 antioxidantes.
- 20 4. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos comprende glutatión y/o disulfuro de glutatión.
5. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según la reivindicación 4, en la que la relación entre glutatión y disulfuro de glutatión está en el intervalo entre 1:10 y 10:1.
- 25 6. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos comprende
- taurina en una concentración en el intervalo de 100 - 10000 mg/L.
- 30 7. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos comprende:
- L-alanina-L-glutamina en una concentración en el intervalo de 50 - 3000 mg/L.
8. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución acuosa para conservación de órganos comprende:
- ácido glutámico en una concentración en el intervalo de 50 - 3000 mg/L.
- 35 9. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en la que en la solución acuosa para conservación de órganos
- el coloide es polietilenglicol con un peso molecular en el intervalo de 10.000 - 55.000 Dalton; y/o
- el coloide es polietilenglicol con una concentración en el intervalo de 1000 - 50000 mg/L, preferiblemente en el intervalo de 10000-30000 mg/L.
- 40 10. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que en la solución acuosa para conservación de órganos está comprendido al menos un electrolito seleccionado entre sodio, en el que preferiblemente la concentración es de 50-200 mmol/L; potasio, en el que preferiblemente la concentración es de 0-25 mmol/L; calcio, en el que preferiblemente la concentración es de 0-10 mmol/L; magnesio, en el que preferiblemente la concentración es de 0-20 mmol/L; y/o iones cloruro, en el que preferiblemente la concentración es de 0-50 mmol/L.
- 45 11. Utilización de una solución acuosa para conservación de órganos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que
- en la solución acuosa para conservación de órganos están comprendidos al menos dos impermeabilizantes que se seleccionan entre gluconato de calcio, gluconato de sodio, gluconato de magnesio, gluconato de potasio, ácido lactobiónico, trehalosa, ribosa y/o rafinosa;
- la solución acuosa para conservación de órganos comprende uno o más aminoácidos y/o péptidos;
- la solución acuosa para conservación de órganos comprende cisteína, glutamato, carnitina, ornitina, arginina, histidina, triptófano y/o glicina;
55 - la solución acuosa para conservación de órganos comprende al menos uno del siguiente grupo: glucosa, ribosa, piruvato y/o ácido graso;
- la solución acuosa para conservación de órganos tiene una presión oncótica en el intervalo de 10 a 40 mmHg;
- la solución acuosa para conservación de órganos tiene un pH en el intervalo de 7,2-7,6;
- la solución acuosa para conservación de órganos tiene una osmolaridad en el intervalo de 300-420 mosm; y/o
60 - la temperatura de la solución acuosa para conservación de órganos está en el intervalo de 0°C - 20°C o 20°C - 40°C.
- 65 12. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que
- el órgano o parte de un órgano es de origen humano, preferiblemente un riñón de origen humano, hígado de origen humano, pulmón de origen humano, corazón de origen humano, páncreas de origen humano y/o intestino de origen humano.