

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 977**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2019 PCT/SE2019/051215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2020 WO20112018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2019 E 19889740 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3886579**

54 Título: **Tratamiento de órganos ex vivo con moléculas de PEG-fosfolípido**

30 Prioridad:

30.11.2018 SE 1851492

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

04.10.2023

73 Titular/es:

**ICOAT MEDICAL AB (100.0%)
c/o WeWork Malmkillnadsgatan 32, 6th Floor
Stockholm 111 51, SE**

72 Inventor/es:

**NILSSON, BO;
NILSSON EKDAHL, KRISTINA;
JENSEN WAERN, MARIANNE;
TERAMURA, YUJI y
BIGLARNIA, ALIREZA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 949 977 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

Tratamiento de órganos *ex vivo* con moléculas de PEG-fosfolípido

Campo técnico

5 La invención se refiere en general a tratamientos de órganos *ex vivo*, y en particular a tales tratamientos de órganos *ex vivo* capaces de inhibir o prevenir la tromboinflamación e hipotensión inducidas por la reperfusión de órganos.

Antecedentes

La lesión por reperfusión por isquemia (I/R) (IRI) es un contribuyente importante para la patología de varias afecciones incluyendo trasplantes, trastornos trombóticos, sepsis y baipás cardiopulmonar, que inducen la tromboinflamación.

10 Hasta la fecha, el trasplante de riñón es el tratamiento más efectivo para los pacientes con enfermedad renal en estadio terminal. A pesar de las impresionantes mejoras en los resultados del tratamiento en comparación con la introducción en la década de 1960, todavía hay una pérdida del injerto del 25 % después de 5 años y casi el 50 % después de 10 años. La diana principal para mejorar los resultados del trasplante de riñón es la IRI, ya que la IRI evoca insuficiencia renal aguda, retraso en la función del injerto e insuficiencia de órganos remotos. La inmunosupresión no afecta en gran medida al sistema inmunitario innato humoral y, por lo tanto, no atenúa la IRI. El campo de los trasplantes también se ve obstaculizado por la escasez de órganos. Una opción para aumentar el grupo de donantes es un mayor uso de órganos marginales, tales como los de donantes fallecidos después de muerte cardíaca (DCD). Sin embargo, estos órganos también se ven gravemente afectados por la IRI.

20 Durante la isquemia, el metabolismo cambia a una condición anaeróbica que finalmente da como resultado un estado inflamatorio, que se desencadena por la regulación al alza y a la baja de una serie de genes, incluyendo el potenciador de la cadena ligera kappa de factor nuclear de las células B activadas (NF-κB) y, por lo tanto, citoquinas, quimioquinas y factor tisular (TF), pero también genes que protegen contra la isquemia, tales como la hemooxigenasa 1 (HO-1), factores inducibles por hipoxia (HIF) 1 y 2 y nitrotirosina. En condiciones de normoxia, la superficie de las células endoteliales está cubierta por una malla "pilosa" cargada negativamente llamada glicocalix (GCX), que comprende una red compleja de proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas que incorpora proteínas antiinflamatorias y anticoagulantes para asegurar la homeostasis microvascular y prevenir la tromboinflamación. Además, la GCX gruesa protege la superficie celular y las moléculas de adhesión, tales como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y E-selectina, evitando así el reclutamiento de leucocitos y plaquetas en la superficie endotelial. La GCX es muy sensible al estrés oxidativo y al daño estructural inducido por isquemia, que a menudo da lugar a una rápida pérdida de la capa de GCX. Esto está causado por la expresión de heparinasa y metaloproteinasas en el revestimiento de células endoteliales, lo que da lugar a la escisión y degradación de la GCX que protege las células endoteliales del ataque inmune innato. La GCX alberga una serie de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que de ese modo se liberan durante la degradación de GCX. Esto también dará como resultado que los reguladores del complemento, coagulación y los sistemas de contacto se liberen de la superficie celular. Dichos reguladores son, por ejemplo, antitrombina (AT), proteína C, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), proteína de unión a C4b (C4BP), factor H e inhibidor de C1 (C1-INH) con la consecuencia de que la superficie de las células endoteliales estará desprotegida contra los ataques del complemento, coagulación y sistemas de contacto. Finalmente, si la isquemia persiste, las reservas de trifosfato de adenosina (ATP) se agotan, lo que conduce a la apoptosis y la necrosis.

40 La reperfusión del órgano isquémico induce un proceso de reparación, pero inicialmente inicia una lesión devastadora en el órgano debido a los cambios patológicos ya inducidos por la isquemia. La rápida oxigenación genera una lesión que implica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la superficie endotelial desprotegida desencadena una activación destructora del complemento y los sistemas de contacto. En el trasplante, la expresión de colectina-11/12 (CL-11/12) en el injerto renal reconoce las células isquémicas y contribuye a la activación del complemento a través de la vía de la lectina (LP). Otras moléculas de reconocimiento, tales como la lectina de unión a manosa (MBL) y Ficolina-2, de la LP también se han vinculado a la activación del complemento. La evidencia de activación del complemento es la deposición de C4d sobre las células endoteliales combinada con la deposición de complejo de ataque de membrana (MAC) en el parénquima cerca de los vasos, que indica daño celular en estas zonas. Desencadenada por la expresión de TF regulada al alza y la activación del sistema de contacto, la deposición de fibrina revela que el sistema de coagulación está activado. En combinación con la activación del complemento, la regulación al alza y exposición del factor von Willebrand (vWF) seguido de la unión y activación de las plaquetas y neutrófilos polimorfonucleares (PMN) a la superficie endotelial, se desencadena la tromboinflamación. Gran parte de esta tromboinflamación está dirigida por factores del complemento producidos localmente, claramente demostrado en un modelo de ratón de trasplante de riñón, donde la desactivación génica de C3 protege al órgano trasplantado del rechazo.

55 La reperfusión del órgano trasplantado también se asocia con la inestabilidad hemodinámica posterior a la reperfusión. Este fenómeno, que previamente se ha descrito como síndrome posterior a la reperfusión (PRS), se describió por primera vez en receptores de trasplante de hígado que experimentaron una inestabilidad hemodinámica grave

después de la reperfusión del injerto de hígado. Sin embargo, este fenómeno también se observa en los receptores de trasplantes de riñón y páncreas, que a menudo sufren de inestabilidad hemodinámica instantánea después de la reperfusión. En consecuencia, la rápida disminución de la presión arterial sistémica da como resultado una perfusión alterada del injerto y prolongación de la isquemia caliente del injerto. Estos pacientes pueden sufrir retraso en la función del injerto, mayor riesgo de rechazo y pérdida prematura del injerto.

El polímero anfifílico polietilenglicol)-fosfolípido (fosfolípido conjugado con PEG o simplemente PEG-fosfolípido) se incorpora espontáneamente en la membrana bicapa lipídica de las membranas celulares mediante interacciones hidrófobas [1, 2]. Además, la creación de una capa de superficie celular artificial por PEG-fosfolípido podría atenuar la reacción inflamatoria mediada por sangre instantánea (IBMIR) y prolongar tanto la supervivencia como la función de los islotes después de la infusión intraportal en ratones diabéticos [3, 6].

Se ha mostrado previamente que el PEG-fosfolípido conjugado con reguladores inmunes innatos, tales como apirasa y Factor H, protege las células y las superficies materiales contra el ataque inmune innato *in vitro* [4, 5].

Ekdahl et al., Protective role of PEG conjugated phospholipid in reducing ischemic reperfusion injury in two allogenic pig kidney transplant models, *Immunology* 221(10): 1184, 2016, divulga que los recubrimientos con PEG-lípido tienen mucho éxito en la disminución de la respuesta inmune innata durante el trasplante alogénico en modelos de animales grandes.

Sin embargo, existe la necesidad de mejoras en relación con el trasplante de órganos.

Resumen

Un objetivo general es proporcionar mejoras en relación con el trasplante de órganos.

Este y otros objetivos se cumplen mediante las realizaciones que se describen en la presente memoria.

La invención se define en las reivindicaciones independientes. Otras realizaciones de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

Un método *ex vivo* para tratar un órgano o una parte del órgano comprende infundir *ex vivo* una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en un sistema vascular del órgano o la parte del órgano. El método también comprende incubar *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular para permitir el recubrimiento de al menos una porción del revestimiento endotelial del sistema vascular con las moléculas de PEG-fosfolípido mientras se mantiene el órgano o parte del órgano sumergido en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.

La invención también se refiere a PEG-fosfolípido para su uso en la inhibición o prevención de la hipotensión asociada con el desarrollo de reperfusión después de la reperfusión de un injerto de órgano en un sujeto receptor. Un injerto de órgano *ex vivo* tratado con moléculas de PEG-fosfolípido tenía significativamente menos tromboinflamación en comparación con los injertos de órgano de control no tratados, como se refleja por los niveles en plasma de marcadores de coagulación, tales como TAT, y marcadores del complemento, tales como C3a y sC5b-9. También la expresión de citoquinas, particularmente IL-6 e IL-10, se suprimió mucho en los injertos de órganos tratados con PEG-fosfolípido.

La función del órgano mejoró en los injertos de órganos tratados con PEG-fosfolípido. Los injertos de órganos tratados con PEG-fosfolípido también mostraron una deposición reducida de los marcadores del complemento, tales como C3b y MAC, y expresión de C5aR. Un efecto muy sorprendente, pero médicamente significativo, del tratamiento *ex vivo* de un injerto de órgano con moléculas de PEG-fosfolípido fue que tal tratamiento con PEG-fosfolípido fue capaz de reducir la devastadora caída de la presión arterial en el receptor que se asocia frecuentemente con la reperfusión del injerto de órgano. Además, después de 4 días, el tratamiento con PEG-fosfolípido fue capaz de reducir el aumento de las citoquinas IL-4 e IL-12 dependientes de las células T, que están asociadas con la activación de la respuesta inmune adaptativa.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones, junto con otros objetos y ventajas de las mismas, pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con las figuras adjuntas, en las que:

La Fig. 1 ilustra esquemáticamente el mecanismo de interacción hidrófoba de la molécula de PEG-lípido con las bicapas lipídicas de las membranas celulares.

Las Fig. 2A a 2C ilustran el efecto de varios grupos funcionales de PEG-fosfolípido en la coagulación (Fig. 2A) y complemento (Fig. 2B y 2C) cuando se analizaron las MSC recubiertas en un modelo de bucle de Chandler *in vitro* en comparación con el control (células no recubiertas).

La Fig. 3 ilustra la concentración en fase fluida durante 60 min durante la perfusión con 25 mL de 2 mg/mL de FITC-PEG-fosfolípido. Los círculos indican sin riñón conectado y los cuadrados indican con riñón conectado. La captación calculada de PEG-fosfolípido fue del 76 %.

- Las Fig. 4A a 4F ilustran las biopsias recuperadas de los riñones de control y tratados en el punto de tiempo de 5 min (Fig. 4A: control, Fig. 4B: tratado), 60 min (Fig. 4C: control, Fig. 4D: tratado) y 360 min (Fig. 4E: control, Fig. 4F: tratado) posterior a la reperusión. Los riñones fueron perfundidos con solución de biotina-PEG-fosfolípido y la validación del recubrimiento del endotelio renal con PEG-fosfolípido se realizó por contratinción con estreptavidina-488. Las secciones se analizaron por microscopía confocal.
- Las Fig. 5A a 5E ilustran la activación del complemento en el modelo de trasplante de riñón porcino alogénico a corto plazo. Fig. 5A C3a en plasma, Fig. 5B sC5b-9, Fig. 5C C4d, Fig. 5D C3b y Fig. 5E deposición de MAC en biopsias del riñón. Los cuadrados y barras con flechas representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y los círculos y barras sin flechas representan el control no tratado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.
- Las Fig. 6A a 6D ilustran la activación de la coagulación en el modelo de trasplante de riñón alogénico a corto plazo. Fig. 6A TAT en plasma, Fig. 6B TF, Fig. 6C FXII/AT y Fig. 6D FXII/C1 INH. Los cuadrados representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y los círculos representan el control no tratado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.
- Las Fig. 7A a 7C ilustran la concentración de citoquinas proinflamatorias en el modelo de trasplante de riñón alogénico a corto plazo. Fig. 7A IL-1 β en plasma, Fig. 7B IL-6, y Fig. 7C TNF. Los cuadrados representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y los círculos representan el control no tratado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.
- Las Fig. 8A a 8C ilustran la activación del complemento y de la coagulación en el modelo de trasplante de riñón alogénico a largo plazo. Fig. 8A C3a en plasma, Fig. 8B sC5b-9 y Fig. 8C TAT. Los cuadrados representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y los círculos representan el control no tratado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.
- Las Figs. 9A a 9L ilustran la concentración de citoquinas/quimioquinas en el modelo de trasplante de riñón alogénico a largo plazo. Fig. 9A INF γ en plasma, Fig. 9B IL-1 β , Fig. 9C IL-1 α , Fig. 9D IL-1R, Fig. 9E IL-2, Fig. 9F IL-4, Fig. 9G IL-6, Fig. 9H IL-10, Fig. 9I IL-8, Fig. 9J IL-12, Fig. 9K IL-18 y Fig. 9L TNF. Los cuadrados representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y los círculos representan el control no tratado.
- Las Fig. 10A y 10B ilustran la evaluación funcional del riñón tratado con PEG-fosfolípido en los modelos de trasplante de riñón alogénico a corto plazo (Fig. 10A) y a largo plazo (Fig. 10B). En la Fig. 10A, se evaluó la diuresis y, en la Fig. 10B, se midieron los niveles de creatinina. Los cuadrados representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y los círculos representan el control no tratado. * $p < 0,05$.
- La Fig. 11 ilustra la evaluación funcional con respecto al aumento compensatorio en la frecuencia del pulso inmediatamente después de la reperusión en los cerdos trasplantados con los riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los animales trasplantados con los riñones de control en los modelos de trasplante de riñón alogénico a largo plazo. * $p < 0,05$.
- La Fig. 12 ilustra la morfología macroscópica de los riñones porcinos posterior a (1) obtención, (2) perfusión hipotérmica estática y (3) perfusión con PEG-fosfolípido.
- La Fig. 13 ilustra la retención de moléculas de PEG-fosfolípido con diferentes longitudes de la subunidad de PEG (círculos de 1 kDa, cuadrados de 5 kDa y triángulos de 40 kDa) usando células CCRF-CEM.
- La Fig. 14 ilustra la síntesis de [⁶⁸Ga]NO₂A-propil-azida.
- La Fig. 15 ilustra la síntesis de ⁶⁸Ga-NO₂A-PEG-lípido.
- Las Fig. 16A y 16B ilustran los valores de TAT y los valores de creatinina en plasma después de la incubación de riñones de cerdo durante 24 horas en solución de HTK suplementada con PEG-fosfolípido (tratado) o solución de HTK solamente (control) a 4 °C.
- Las Fig. 17A a 17D ilustran la activación del complemento y de la coagulación, y los niveles de creatinina en el modelo de trasplante de riñón alogénico a largo plazo, TAT en plasma (Fig. 17A), C3a (Fig. 17B), sC5b-9 (Fig. 17 C) y creatinina (Fig. 17D). Las líneas con cuadrados representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y las líneas con círculos representan el control no tratado. * $p < 0,05$.
- Las Fig. 18A a 18G ilustran la concentración de citoquinas/quimioquinas en el modelo de trasplante de riñón alogénico a largo plazo, IL-1 β en plasma (Fig. 18A), IL-2 (Fig. 18B), IL-4 (Fig. 18C), IL-6 (Fig. 18D), IL-8 (Fig. 18E), IL-10 (Fig. 18F) y TNF (Fig. 18G). Los cuadrados representan los riñones tratados con PEG-fosfolípido y los círculos representan el control no tratado. * $p < 0,05$.
- La Fig. 19 ilustra la captación de PEG-lípido 5 kDa y PEG-lípido 40 kDa después de la infusión de las moléculas de PEG-lípido en los riñones de cuatro cerdos diferentes con un riñón usados para PEG-lípido 5 kDa y la otra para PEG-lípido 40 kDa. Los riñones se perfundieron con solución de FITC-PEG-fosfolípido y se visualizó la validación del recubrimiento del endotelio y parénquima de riñón con PEG-fosfolípido. Las secciones se analizaron mediante microscopía confocal.

La Fig. 20 ilustra la capacidad de mezclado de moléculas de PEG-lípido en tres líquidos de perfusión comúnmente usados (HTK, IGL-1 y UW). No se observó precipitación en ninguna de estas mezclas a una concentración de 2 mg/ml de PEG-lípido.

Descripción detallada

5 La invención se refiere en general a tratamientos de órganos *ex vivo*, y en particular a tales tratamientos de órganos *ex vivo* capaces de tratar, inhibir o prevenir la tromboinflamación, que precede a la activación del sistema inmune adaptativo, y la hipotensión inducida por reperfusión de órganos.

10 El método *ex vivo* de la invención conduce a una mejora significativa en trasplantes de órganos y tratamientos de órganos al proporcionar un blindaje o recubrimiento protector del revestimiento endotelial o endotelio del sistema vascular y del parénquima de tales órganos o partes de tales órganos. Este recubrimiento protector constituye una protección efectiva contra la tromboinflamación y los efectos deletéreos de lesión por reperfusión por isquemia (I/R) (IRI).

15 El glucocáliz es esencial para asegurar la hemostasia microvascular y la prevención de la tromboinflamación. Sin embargo, este glucocáliz es muy sensible al estrés oxidativo y al daño inducido por isquemia. Por lo tanto, el recubrimiento protector del glucocáliz se pierde rápidamente durante la isquemia que se produce en relación con la obtención de órganos y la conservación de órganos *in vitro*. Una vez trasplantado y reperfundido el injerto de órgano, se induce un proceso de reparación, que da inicio a una lesión devastadora en el injerto de órgano debido a la ausencia o daños al glucocáliz. Por lo tanto, el sistema de contacto y complemento se activan. Las plaquetas se consumen y los leucocitos se activan y se infiltran en el injerto de órgano. Como consecuencia de la activación de estos sistemas, se generan citoquinas que en última instancia conducen a la muerte celular y la pérdida del injerto o a un retraso en la función del injerto. Esta devastadora lesión al injerto de órgano es una tromboinflamación, que se desencadena principalmente por el sistema inmune innato humoral que consiste principalmente en los sistemas en cascada de la sangre, es decir, los sistemas del complemento, contacto/coagulación y fibrinolíticos. La activación de estos sistemas posteriormente induce la activación de células endoteliales, leucocitos y plaquetas, dando como resultado finalmente a reacciones trombóticas e inflamatorias.

20 Como se muestra en la presente memoria, mediante el tratamiento *ex vivo* de un órgano o una parte del órgano con moléculas de polietilenglicol)-fosfolípido (PEG-fosfolípido), el órgano o la parte del órgano puede protegerse contra la tromboinflamación. Por lo tanto, las moléculas de PEG-fosfolípido son capaces de unirse a las membranas celulares del revestimiento endotelial del sistema vascular del órgano o de la parte del órgano y compensar así la pérdida del glucocáliz. Por lo tanto, las moléculas de PEG-fosfolípido forman un recubrimiento protector del endotelio que inhibe o al menos reduce significativamente los efectos deletéreos de la tromboinflamación, incluyendo los niveles más bajos de coagulación y activación del complemento, supresión de la expresión de citoquinas y mejora general de la función del injerto.

35 En particular, el tratamiento *ex vivo* del órgano con moléculas de PEG-fosfolípido condujo a una reducción significativa de las citoquinas, tales como las citoquinas específicas de las células T, incluyendo la interleuquina 4 (IL-4) e IL-12. En los órganos de control no tratados, hubo un alto nivel de tales citoquinas varios días después del trasplante, lo que tiene un efecto negativo sobre la inmunización continua y la inmunosupresión futura. Por lo tanto, el recubrimiento del endotelio por moléculas de PEG-fosfolípido inhibe los efectos y daños inducidos por citoquinas en el órgano o la parte del órgano después del trasplante y también mejora el resultado de la inmunosupresión después del trasplante.

40 Otro efecto muy sorprendente logrado por el tratamiento *ex vivo* de órganos o parte de órganos con moléculas de PEG-fosfolípido fue el tratamiento, inhibición o prevención de la inestabilidad hemodinámica con aumento de la frecuencia cardíaca e hipotensión asociada con la reperfusión que se desarrolla después de la reperfusión del injerto de órgano. Tal hipotensión en relación con el trasplante puede dar lugar a una mala perfusión, fallo orgánico e incluso conducir a la muerte del paciente. La hipotensión se induce cuando el injerto de órgano se conecta al sistema vascular del paciente y, por lo tanto, se reperfunde. El tratamiento de tal hipotensión es hoy una tarea importante durante el trasplante de órganos, ya que, si no se puede tratar la hipotensión, existe un riesgo significativo de muerte del paciente durante el trasplante. Sin embargo, mediante el tratamiento *ex vivo* del injerto de órgano antes del trasplante con moléculas de PEG-fosfolípido, la hipotensión podría prevenirse o al menos inhibirse o reducirse significativamente. Por lo tanto, el riesgo de daños inducidos por hipotensión en relación con el trasplante de órganos se reduce usando moléculas de PEG-fosfolípido de la invención. Por lo tanto, las moléculas de PEG-fosfolípido de la invención son útiles para tratar, prevenir y/o inhibir el síndrome de post-reperfusión (PRS).

50 Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un método *ex vivo* para tratar un órgano o una parte de un órgano. El método comprende infundir *ex vivo* una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en un sistema vascular y, opcionalmente, en un parénquima, del órgano o de la parte del órgano. El método también comprende incubar *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular, y opcionalmente el parénquima, para permitir recubrir al menos una porción del revestimiento endotelial del sistema vascular, y preferiblemente del parénquima, con las moléculas de PEG-fosfolípido manteniendo el órgano o la parte del órgano sumergido en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.

Por lo tanto, el método *ex vivo* comprende introducir moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular del órgano o una parte del órgano y allí permitir que las moléculas de PEG-fosfolípido interactúen y se unan a las membranas celulares del endotelio y el parénquima. La Fig. 1 ilustra esquemáticamente este principio con las moléculas de PEG-fosfolípido que interactúan hidrófobamente con la membrana de la bicapa lipídica del endotelio para anclar o unir de ese modo las moléculas de PEG-fosfolípido en la membrana celular a través del grupo fosfolípido.

La interacción entre las moléculas de PEG-fosfolípido con la membrana de la bicapa lipídica del endotelio y opcionalmente del parénquima, tal como el parénquima renal en el caso de un riñón, tiene lugar *ex vivo* mientras el órgano o la parte del órgano está sumergido o sumergida en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido. Los datos experimentales tal como se presentan en la presente memoria indican que mantener el órgano sumergido en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido da como resultado una expresión de citoquinas y activación del sistema de cascada significativamente menor en comparación con simplemente mantener el órgano o la parte del órgano sumergido en una solución de conservación de órganos que carece de cualquier molécula de PEG-fosfolípido incluso si el sistema vascular, y opcionalmente el parénquima, del órgano o la parte del órgano está recubierto con moléculas de PEG-fosfolípido.

Por lo tanto, con el fin de lograr un tratamiento *ex vivo* eficiente de órganos o partes de órganos, el sistema vascular y, opcionalmente, el parénquima del órgano o parte del órgano deben exponerse a moléculas de PEG-fosfolípido y el órgano o la parte del órgano debe sumergirse en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido. El efecto anti-tromboinflamatorio de tal tratamiento *ex vivo* mejora significativamente en comparación con la infusión meramente *ex vivo* de una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular y, opcionalmente, en el parénquima, del órgano o la parte del órgano. De hecho, los efectos anti-tromboinflamatorios del tratamiento *ex vivo* de la invención ya se indujeron durante el periodo de isquemia en frío cuando se mantiene el órgano o la parte del órgano sumergido en la solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido, es decir, incluso antes de la reperfusión del órgano o la parte del órgano.

En una realización particular, el órgano o la parte del órgano primero se infunde *ex vivo* con la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular y, opcionalmente, en el parénquima, del órgano o la parte del órgano. Esta infusión *ex vivo* tiene lugar ventajosamente tan pronto como sea posible después del explante y extracción del órgano o la parte del órgano del cuerpo del donante. El órgano perfundido o parte del órgano luego es sumergido en la solución de conservación de órganos que comprende PEG-fosfolípido y se mantiene en esta, preferiblemente a temperatura reducida tal como aproximadamente 4 °C, que se discute adicionalmente en la presente memoria.

En otra realización particular, el órgano o la parte del órgano primero se sumerge en la solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido y luego la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido se infunde *ex vivo* en el sistema vascular y, opcionalmente, en el parénquima, del órgano o de la parte del órgano. Esta infusión *ex vivo* se puede realizar mientras se mantiene el órgano o la parte del órgano sumergido en la solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido. Alternativamente, el órgano o la parte del órgano se retira temporalmente de la solución de conservación de órganos para realizar la infusión *ex vivo* y luego se vuelve a poner en la solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.

En una realización, el método también comprende infundir *ex vivo* una solución de conservación de órganos en el sistema vascular para eliminar por lavado las moléculas de PEG-fosfolípido no unidas del sistema vascular. Por lo tanto, las moléculas de PEG-fosfolípido no unidas se eliminan por lavado preferiblemente en una o múltiples, es decir, al menos dos, etapas de lavado usando una solución de conservación de órganos.

Tal solución de conservación de órganos también puede usarse para lavar el sistema vascular del órgano o la parte del órgano antes de infundir la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en una o múltiples etapas de lavado. En tal realización, el método también comprende infundir *ex vivo* una solución de conservación de órganos en el sistema vascular antes de infundir *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular. La infusión inicial de la solución de conservación de órganos antes de añadir moléculas de PEG-fosfolípido lavará el sistema vascular del órgano o la parte del órgano para facilitar así un recubrimiento eficiente del endotelio con moléculas de PEG-fosfolípido.

En una realización, la infusión *ex vivo* de la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido comprende pinzar *ex vivo* una de una arteria y una vena del sistema vascular. Esta realización también comprende infundir *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en la otra arteria y la vena y pinzar *ex vivo* la otra arteria y la vena.

Por lo tanto, en una realización, una vena (o arteria) del sistema vascular del órgano o la parte del órgano es pinzada inicialmente para evitar que la solución que se añade fluya fuera del sistema vascular. La solución con moléculas de PEG-fosfolípido se añade a una arteria (o vena) del sistema vascular y luego esta arteria (o vena) se pinza para evitar que la solución que se añade fluya fuera del sistema vascular. Por lo tanto, los vasos sanguíneos de entrada y salida del sistema vascular en el órgano o la parte del órgano se cierran mediante pinzamiento para mantener así la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido dentro del sistema vascular y permitir así que las moléculas de PEG-fosfolípido se unan al endotelio del sistema vascular.

En otra realización, la solución con moléculas de PEG-fosfolípido se infunde en una arteria (o vena) del sistema vascular del órgano o la parte del órgano hasta que la solución aparece en una vena (o arteria) del órgano o la parte del órgano. Esto confirma que la solución con moléculas de PEG-fosfolípido ha llenado el sistema vascular. En ese momento, se pinzan la arteria y la vena.

- 5 La solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido se puede añadir a través de una vena o a través de una arteria. En una realización particular, la solución se infunde en una arteria. En tal realización particular, el pinzamiento inicial opcional se realiza entonces preferiblemente de una vena del sistema vascular.

10 Las realizaciones de pinzamiento descritas anteriormente son particularmente útiles cuando la solución infundida *ex vivo* en el sistema vascular es diferente de la solución de conservación de órganos, en la que se sumerge el órgano o la parte del órgano, y/o las moléculas de PEG-fosfolípido comprendidas en la solución son diferentes de las moléculas de PEG-fosfolípido contenidas en la solución de conservación de órganos. En otros casos, no se necesita pinzamiento ya que la misma solución de conservación de órganos que contiene PEG-fosfolípido se infundirá *ex vivo* en la que se sumerge el órgano o la parte del órgano.

15 La solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido se incuba preferiblemente *ex vivo* en el sistema vascular durante un periodo de tiempo desde 10 minutos hasta 48 horas para permitir que las moléculas de PEG-fosfolípido interactúen hidrófobamente con las membranas celulares del endotelio y de ese modo recubran al menos una porción del sistema vascular del órgano o la parte del órgano. La incubación *ex vivo* se realiza preferiblemente desde 20 minutos hasta 36 horas y más preferiblemente desde 30 minutos hasta 24 horas, tal como desde 30 minutos hasta 12 horas, hasta 8 horas, hasta 4 horas o hasta 1 hora.

20 La cantidad de solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido infundida en el sistema vascular depende del tipo de órgano y tamaño del órgano (adulto frente a niño). Generalmente, el volumen de la solución debe ser suficiente para llenar el sistema vascular del órgano. En la mayoría de las aplicaciones prácticas, desde 5 mL hasta 250 mL de la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido se infunden *ex vivo* en el sistema vascular. En una realización preferida, desde 5 mL hasta 100 mL y preferiblemente desde 5 mL hasta 50 mL de solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido se infunden *ex vivo* en el sistema vascular.

25 En una realización, la solución comprende desde 0,25 mg/mL hasta 25 mg/mL de moléculas de PEG-fosfolípido. En una realización preferida, la solución comprende desde 0,25 mg/mL hasta 10 mg/mL, preferiblemente desde 0,25 mg/mL hasta 5 mg/mL, tal como 2 mg/mL de moléculas de PEG-fosfolípido.

30 Las concentraciones descritas anteriormente de moléculas de PEG-fosfolípido también pueden usarse para la solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.

35 Según la invención, la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido se incuba *ex vivo* en el sistema vascular mientras se mantiene el órgano o la parte del órgano sumergido o sumergida en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido. Además, el órgano o la parte del órgano también se mantiene preferiblemente a una temperatura por encima de 0°C, pero por debajo de 8 °C, preferiblemente por encima de 0 °C, pero igual o por debajo de 6 °C, y más preferiblemente por encima de 0 °C, pero igual o por debajo de 4 °C.

40 En esta realización, el órgano o la parte del órgano se sumerge en la solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido durante el tiempo de incubación cuando se permite que las moléculas de PEG-fosfolípido interactúen con y se unan a la membrana celular del endotelio en el sistema vascular. El órgano o la parte del órgano preferiblemente también se mantiene frío, es decir, a una temperatura cercana a, pero por encima de 0 °C.

Según la invención, el órgano o la parte del órgano se mantiene sumergido en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.

45 Se ha mostrado que la temperatura teórica perfecta para la conservación de órganos es de 4 °C a 8 °C. Mientras que las temperaturas más altas conducen a una lesión hipóxica del órgano porque el metabolismo no se reduce de manera eficiente, las temperaturas más bajas de 4 °C aumentan el riesgo de lesión por frío con la desnaturalización de proteínas.

50 Actualmente, el estándar de oro para la conservación de órganos de donantes en el trasplante clínico de órganos usa tres bolsas de plástico y una caja de hielo. La primera bolsa de plástico incluye el propio órgano sumergido en una solución de conservación de órganos. Esta primera bolsa de plástico se coloca en una segunda bolsa de plástico llena de solución salina, y luego estas dos bolsas de plástico se colocan en una tercera bolsa de plástico llena de solución salina, que luego se coloca en la caja de hielo. Se encuentran disponibles y podrían usarse dispositivos de conservación de órganos más avanzados para mantener los órganos en un ambiente de temperatura controlada, tales como los sistemas de transporte Sherpa Pak™ de Paragonix Technologies, Inc. Waves de Waters Medical Systems, transportadores LifePort de Organ Recovery Systems, etc.

55 La solución que comprende las moléculas de PEG-fosfolípido podría ser una solución salina, una solución tampón acuosa o una solución de conservación de órganos.

Los ejemplos ilustrativos, pero no limitantes, de soluciones tampón acuosas que podrían usarse incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS) y una solución de citrato.

5 La solución de conservación de órganos que podría usarse para infundir las moléculas de PEG-fosfolípido y/o lavar el sistema vascular del órgano o la parte del órgano antes o después de la infusión *ex vivo* de las moléculas de PEG-fosfolípido y/o en la que el órgano o la parte del órgano se puede sumergir puede seleccionarse de soluciones de conservación de órganos conocidas. Los ejemplos ilustrativos, pero no limitantes, de tales soluciones de conservación de órganos incluyen una solución de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK), una solución de citrato, una solución de la Universidad de Wisconsin (UW), una solución de Collins, una solución de Celsior, una solución de la Universidad de Kioto y una solución del Instituto Georges Lopez-1 (IGL-1).

10 Los datos experimentales que se presentan en la presente memoria muestran que las moléculas de PEG-fosfolípido se pueden mezclar fácilmente en soluciones de conservación de órganos sin ninguna precipitación (Fig. 20).

En una realización, las moléculas de PEG-fosfolípido son moléculas de PEG-fosfolípido no funcionalizadas que consisten en PEG-fosfolípidos. Por lo tanto, en esta realización, las moléculas de PEG-fosfolípido no contienen ningún grupo funcional. Esto corresponde a tener R igual a CH₂ o H en la Fig.1.

15 En otra realización, las moléculas de PEG-fosfolípido son moléculas de PEG-fosfolípido funcionalizadas que comprenden una molécula funcionalizada respectiva unida al PEG de las moléculas de PEG-fosfolípido.

En una realización adicional, la solución comprende una mezcla de moléculas de PEG-fosfolípido no funcionalizadas que consiste en PEG-fosfolípidos y moléculas de PEG-fosfolípido funcionalizadas que comprenden una molécula funcionalizada respectiva unida al PEG de las moléculas de PEG-fosfolípido.

20 En las realizaciones que comprenden solo moléculas de PEG-fosfolípido funcionalizadas o una mezcla de moléculas de PEG-fosfolípido funcionalizadas y no funcionalizadas, la molécula funcionalizada se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un inhibidor del complemento, un inhibidor de la coagulación, un inhibidor de plaquetas, una molécula capaz de unirse a un inhibidor del complemento, una molécula capaz de unirse a un inhibidor de la coagulación, una molécula capaz de unirse a un inhibidor de plaquetas y una mezcla de los mismos.

25 Los ejemplos ilustrativos, pero no limitantes, de inhibidores del complemento incluyen Factor H; proteína de unión a C4b (C4BP); 4 a 6 repeticiones de consenso cortas N-terminales (SCR) del receptor del complemento 1 (CR1), también conocido como receptor C3b/C4b o grupo de diferenciación 35 (CD35); proteína reguladora del complemento de CD46 (CD46), también conocida como proteína de cofactor de membrana (MCP); y factor de aceleración del decaimiento del complemento (DAF), también conocido como CD55.

30 Un ejemplo ilustrativo, pero no limitante, de inhibidores de la coagulación incluye la heparina.

Un ejemplo ilustrativo, pero no limitante, de un inhibidor de plaquetas es una enzima que degrada el difosfato de adenosina (ADP), tal como una apirasa y ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (NTPDasa1), también conocida como CD39.

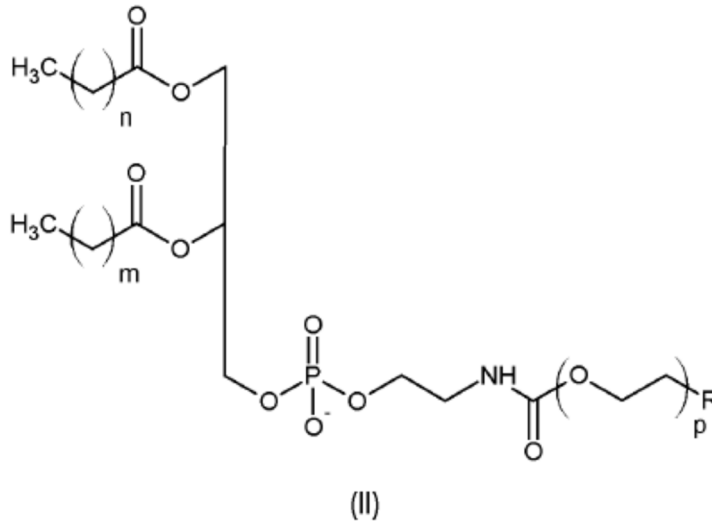
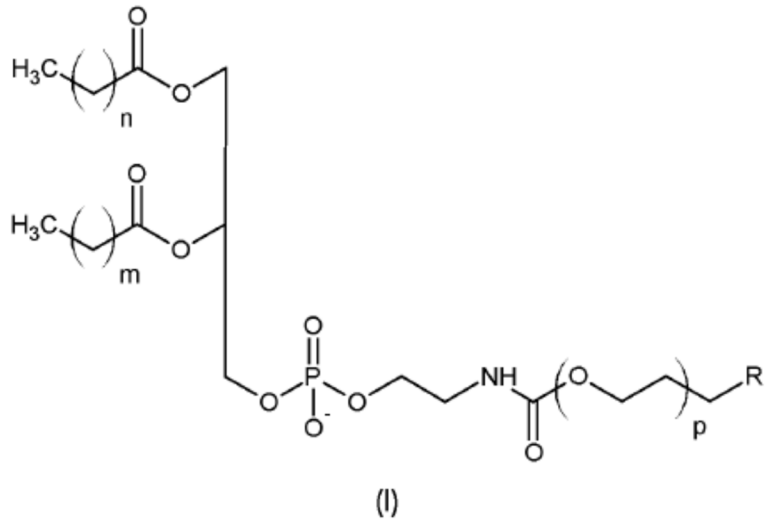
35 Los ejemplos ilustrativos, pero no limitantes, de una molécula capaz de unirse a un inhibidor del complemento es un péptido de unión al Factor H, tal como el 5C6 divulgado en [4]; y un péptido de unión a C4BP, tal como el péptido derivado de la proteína de *Streptococcus* M M2-N, M4-N o M22-N como se divulga en [5].

Un ejemplo ilustrativo, pero no limitante, de una molécula capaz de unirse a un inhibidor de la coagulación es un péptido de unión a la heparina, como se divulga en [7].

40 Por lo tanto, en una realización, la molécula funcionalizada se selecciona del grupo que consiste en un péptido de unión a la heparina, 4 a 6 SCR N-terminales de CR1, CD46, DAF, una molécula de unión al Factor H, una enzima que degrada ADP y una mezcla de los mismos.

En una realización particular, la molécula funcionalizada se selecciona del grupo que consiste en el péptido 5C6, apirasa, CD39, C4BP y una mezcla de los mismos.

En una realización, las moléculas de PEG-fosfolípido tienen una fórmula (I) o una fórmula (II):



- 5 En una realización, n, m son números enteros independientemente seleccionados dentro del rango desde 10 hasta 16. Los parámetros n, m son preferiblemente de manera independiente 10, 12, 14 o 16, y más preferiblemente n = m = 14.
- En una realización, p se selecciona de modo que la cadena de PEG tenga un peso molecular promedio seleccionado dentro del rango desde 1.000 Da hasta 40.000 Da. El parámetro p se selecciona preferiblemente de modo que la cadena de PEG tenga un peso molecular promedio desde 3.000 a 10.000 Da y más preferiblemente 5.000 Da.
- 10 El peso molecular promedio como se define en la presente memoria indica que las moléculas de PEG-fosfolípido individuales pueden tener un peso molecular diferente de este peso molecular promedio, pero que el peso molecular promedio representa el peso molecular medio de las moléculas de PEG-fosfolípido. Esto implica además que habrá una distribución natural de pesos moleculares alrededor de este peso molecular promedio para una muestra de PEG-fosfolípido.
- 15 El grupo terminal R es, en una realización, H, CH₂, NH₂, un grupo maleimida, un grupo biotina, un grupo estreptavidina, un grupo avidina o una molécula funcionalizada. En el caso de una molécula funcionalizada, esta se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un inhibidor del complemento, un inhibidor de la coagulación, un inhibidor de plaquetas, una molécula capaz de unirse a un inhibidor del complemento, una molécula capaz de unirse a un inhibidor de la coagulación, una molécula capaz de unirse a un inhibidor de plaquetas y una mezcla de los mismos.
- 20 Las cadenas de ácidos grasos de la molécula de PEG-fosfolípido pueden estar saturadas. Al menos una o ambas cadenas de ácidos grasos alternativamente pueden estar insaturadas, es decir, comprender al menos un grupo -CH=CH-, al menos un grupo -C≡C- o una combinación de los mismos. Cada cadena de ácido graso puede ser lineal o ramificada.

Las moléculas de PEG-fosfolípido infundidas *ex vivo* en el sistema vascular, y opcionalmente el parénquima, del órgano o de la parte del órgano, podrían ser del mismo tipo de moléculas de PEG-fosfolípido comprendidas en la solución de conservación de órganos, en la que el órgano o la parte del órgano se mantiene sumergido. En otra realización, se podrían usar diferentes tipos de moléculas de PEG-fosfolípido en la solución infundida *ex vivo* en el sistema vascular, y opcionalmente el parénquima, del órgano o la parte del órgano en comparación con la solución de conservación del órgano, en la que el órgano o la parte del órgano se mantiene sumergido. Por ejemplo, el tamaño de la cadena de PEG podría ser diferente para las moléculas de PEG-fosfolípido con el tamaño de la cadena de PEG de las moléculas de PEG-fosfolípido seleccionadas para alcanzar el tamaño objetivo en el sistema vascular y, opcionalmente el parénquima, del órgano o la parte del órgano. Como se muestra en la Fig. 19, el tamaño de la cadena de PEG limita las porciones del sistema vascular y el parénquima, a las que pueden llegar las moléculas de PEG-fosfolípido. En particular, las moléculas de PEG-fosfolípido de 5 kDa pueden alcanzar partes más grandes del sistema vascular y el parénquima en comparación con las moléculas de PEG-fosfolípido de 40 kDa más grandes.

Por lo tanto, en una realización, las moléculas de PEG-fosfolípido comprendidas en la solución que se infunde *ex vivo* en el sistema vascular y, opcionalmente el parénquima, del órgano o la parte del órgano pueden tener un tamaño promedio diferente de la cadena de PEG en comparación con las moléculas de PEG-fosfolípido comprendidas en la solución de conservación de órganos, en la que se sumerge el órgano o la parte del órgano.

Además, o alternativamente, las moléculas de PEG-fosfolípido en la solución de infusión *ex vivo* y las moléculas de PEG-fosfolípido en la solución de conservación de órganos pueden tener diferentes grupos funcionales, es decir, el grupo terminal R en la fórmula (I) y (II).

El método *ex vivo* de la invención se puede aplicar a cualquier órgano, o parte de un órgano, que tenga un sistema vascular y que pueda usarse como injerto de órgano, es decir, trasplantado a un receptor. Los ejemplos ilustrativos, pero no limitantes, de tales órganos incluyen riñón, hígado, páncreas, corazón, pulmón, útero, vejiga urinaria, timo e intestino.

En una realización particular, el órgano es un riñón. En esta realización particular, la incubación *ex vivo* de la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular permite el recubrimiento no solo del endotelio renal del sistema vascular renal sino preferiblemente también de los túbulos del parénquima renal con las moléculas de PEG-fosfolípido. Por lo tanto, los datos experimentales presentados en la presente memoria muestran que las moléculas de PEG-fosfolípido se distribuyeron uniformemente en los vasos peritubulares, glomerulos y túbulos del riñón cuando se inyectó *ex vivo* una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido a través del muñón de la aorta.

Los datos experimentales que se presentan en la presente memoria muestran que los injertos de órganos tratados con PEG-fosfolípido tenían significativamente menos tromboinflamación en comparación con los injertos de órganos de control no tratados, como se refleja por los niveles en plasma de marcadores de coagulación, tales como TAT, y marcadores del complemento, tales como C3a y sC5b-9. También la expresión de citoquinas, particularmente IL-6 e IL-1 β , se suprimió mucho en los injertos de órganos tratados con PEG-fosfolípido. La función de los órganos mejoró en los injertos de órganos tratados con PEG-fosfolípido. Los injertos de órganos tratados con PEG-fosfolípido también mostraron una deposición reducida de marcadores del complemento, tales como C3b y complejos de ataque a la membrana, y expresión de C5aR.

Por lo tanto, el recubrimiento *ex vivo* de injertos de órganos con moléculas de PEG-fosfolípido protege contra la tromboinflamación inducida por I/R, lo que indica que es un potencial contra la lesión por I/R en el trasplante clínico.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a PEG-fosfolípido para su uso en el tratamiento, inhibición o prevención de la hipotensión asociada con la reperfusión que se desarrolla después de la reperfusión de un injerto de órgano.

Otro aspecto más de la invención se refiere a PEG-fosfolípido para su uso en el tratamiento, inhibición o prevención de PRS.

Una complicación durante y de manera inmediata, típicamente hasta 24 horas, después del trasplante de órganos es una caída significativa de la presión sanguínea después de la reperfusión del injerto de órgano en el receptor. Este cambio hemodinámico en el receptor puede, en casos graves, conducir a isquemia en los órganos del receptor y en el injerto trasplantado provocando daño a cualquiera de estas entidades e incluso la muerte del paciente si el tratamiento no tiene éxito.

La protección observada contra la inestabilidad vascular por el PEG-fosfolípido puede deberse a la inhibición del sistema de contacto/caliceína. Se encontró inesperadamente que el sistema de contacto/caliceína se activaba después de la reperfusión. El sistema de contacto/caliceína genera bradiquinina, un péptido altamente vasoactivo que induce vasodilatación y aumento de la permeabilidad que conduce a hipotensión, lo que provoca una taquicardia compensadora. Intraoperatoriamente, la disminución de la presión sanguínea se trata con productos farmacéuticos y líquidos, aun así, puede ocurrir una situación potencialmente mortal. Por lo tanto, la posibilidad de prevenir la hipotensión es de gran valor clínico.

Por lo tanto, prevenir, tratar o al menos reducir tal hipotensión y caída de la presión sanguínea asociada con la reperfusión de un injerto de órgano es una mejora significativa en relación con el trasplante de órganos. Los datos experimentales presentados en la presente memoria muestran que el tratamiento *ex vivo* del injerto de órgano antes del trasplante con una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido protegió al receptor contra tal hipotensión o caída de la presión sanguínea cuando el injerto de órgano se reperfundió.

En una realización, el PEG-fosfolípido se formula como una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido y está destinada a la infusión *ex vivo* en un sistema vascular del injerto de órgano para permitir el recubrimiento del revestimiento endotelial del sistema vascular y el parénquima con las moléculas de PEG-fosfolípido.

Un aspecto relacionado de la invención define el uso de PEG-fosfolípido para la fabricación de un medicamento para tratar, inhibir o prevenir la hipotensión asociada con la reperfusión que se desarrolla después de la reperfusión de un injerto de órgano. Un aspecto también se refiere a un método para el tratamiento, inhibición o prevención de la hipotensión asociada con la reperfusión que se desarrolla después de la reperfusión de un injerto de órgano. Este método comprende las etapas del método anteriormente descritas de infundir *ex vivo* una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en un sistema vascular del injerto de órganos e incubar *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular para permitir el recubrimiento de al menos una porción del revestimiento endotelial del sistema vascular con las moléculas de PEG-fosfolípido, opcionalmente, pero preferiblemente, mientras se mantiene el injerto de órgano sumergido en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.

Experimentos

Experimento 1

Materiales, métodos y experimentos con animales

Síntesis de derivados de PEG-fosfolípido

a. FITC-PEG-fosfolípido

La síntesis de PEG-fosfolípidos se realizó mediante los métodos descritos anteriormente [1]. Brevemente, se disolvió 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina (NOF Corporation, Tokio, Japón, DPPE, 21 mg) en 3 mL de diclorometano (Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.)). Se añadieron α -*N*-hidroxisuccinimidil-co-terc-butoxicarbonil polietilenglicol (NHS-PEG-Boc, Pm: 5.000 de NOF, 185 mg) y trietilamina (3 μ L, Nacalai Tesque (Kioto, Japón)) a la solución de reacción y después se agitó durante 4 días a temperatura ambiente (RT, \sim 20 °C). El grupo NHS de NHS-PEG-Boc reaccionó fácilmente con un grupo amino de los fosfolípidos. El grupo protector, Boc, un grupo amino, se eliminó después de la adición de 2 mL de ácido trifluoroacético al 99 % (Wako Pure Chemical (Osaka, Japón)) y una incubación adicional a 4 °C durante 30 min. El producto crudo se purificó mediante reprecipitación en éter dietílico (Nacalai Tesque). Después de la extracción con cloroformo (Nacalai Tesque) y evaporación, los PEG-fosfolípidos se obtuvieron como sólidos blancos. El rendimiento fue del 85 %. Para el marcaje fluorescente con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japón)), se dejó que los PEG-fosfolípidos (200 mg) reaccionaran con FITC (31 mg) en acetona durante 12 h. El FITC-PEG-fosfolípido se purificó mediante cromatografía de permeación en gel (Sephadex G-25, GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido)).

La síntesis de FITC-PEG-fosfolípido (40 kDa) fue según lo siguiente. Se disolvieron α -*N*-hidroxisuccinimidil- ω -maleimidil poli(etilenglicol) (NHS-PEG (40k)-Mal, Pm: 40.000) y DPPE (9,6 mg) en 3 mL de diclorometano y se añadió trietilamina (3 μ L, Nacalai Tesque) a la solución de reacción y después se agitó durante 4 días a temperatura ambiente (RT, \sim 20 °C). El producto crudo se purificó mediante reprecipitación en éter dietílico. Después de la extracción con cloroformo y evaporación, se obtuvieron los Mal-PEG-fosfolípidos (40 kDa) como sólidos blancos. El rendimiento fue del 80 %. Para el marcaje fluorescente con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se disolvieron Mal-PEG-fosfolípidos (40 kDa) (1.200 mg) en DMSO (Nacalai Tesque, 20 mL) y luego se añadió FITC-glicina-cisteína (FITC-GC, BEX Co., Ltd., Tokio, Japón, 12 mg) y se incubó durante 24 h a 37 °C. El producto crudo se purificó por reprecipitación en éter dietílico. Después de la extracción con cloroformo y evaporación, los FITC-PEG-fosfolípidos (40 kDa) se obtuvieron como sólidos amarillos.

b. Biotina-PEG-fosfolípido

El biotina-PEG-fosfolípido se sintetizó combinando polietileno glicol (5-pentanoato de *N*-hidroxisuccinimida) éter 2-(biotinilamino)etano (biotina-PEG-NHS, Pm: 5.000 de NOF, 180 mg) y 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE) (20 mg) con trietilamina (50 μ L) y diclorometano (4 mL) y agitando durante 48 h a RT. La precipitación con éter dietílico rindió biotina-PEG-fosfolípido como un polvo blanco (165 mg; 80 % de rendimiento). Se usó biotina-PEG-fosfolípido para la visualización sin purificación adicional.

c. PEG-fosfolípido

El PEG-fosfolípido se sintetizó combinando α -succinimidiloxisuccinil- ω -metoxi, polioxietileno (MeO-PEG-NHS, Pm: 5.000 de NOF, 171 mg) y DPPE (22 mg) con trietilamina (25 μ L) y diclorometano (5 mL) y agitando durante 72 h a RT.

La precipitación con éter dietílico rindió PEG- fosfolípido como un polvo blanco (160 mg; 80 % de rendimiento). Se usó PEG- fosfolípido para el tratamiento renal sin purificación adicional.

Evaluación funcional de varios tipos de PEG-fosfolípidos

5 Con el fin de evaluar si el resto funcional tenía algún impacto en sus propiedades protectoras, se realizó una serie de experimentos en células madre mesenquimales humanas primarias (hMSC). Las hMSC se recubrieron con PEG-fosfolípido, FITC-PEG-fosfolípido y biotina-PEG- fosfolípido. Después de la modificación de la superficie, la viabilidad de las células recubiertas se analizó mediante el ensayo de azul de Allmar (Life Technologies, Estocolmo; Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células recubiertas se cultivaron en medio de cultivo MSC en una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos. Después de 6 horas de cultivo, se añadieron 10 µL de reactivo de azul de Allmar a 100 µL de medios de cultivo seguido de 4 horas de incubación a 37 °C. Posteriormente, se midió la emisión de fluorescencia a 580-610 nm.

15 Para determinar la hemocompatibilidad de las hMSC, las MSC modificadas en la superficie se expusieron a sangre completa en un modelo de bucle como se describió anteriormente [7]. En resumen, se extrajo sangre completa de voluntarios sanos en tubos recubiertos de heparina (Corline AB, Uppsala; Suecia). Se usó un tubo de PVC heparinizado (30 cm). Cada tubo se llenó con 3 mL de sangre a los que se añadieron 10.000 MSC/mL. El tubo se hizo girar a una velocidad de 30 rpm a 37 °C durante 60 min. Después de la incubación, se recogieron 1,2 mL de sangre en tubos de 2 mL (Eppendorf, Alemania) que contenían EDTA a una concentración final de 10 mM. Posteriormente, la sangre se centrifugó a $4.200 \times g$ durante 15 min a 4 °C para obtener plasma. El plasma se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta los análisis adicionales.

20 Retención de PEG-fosfolípido con diferente longitud de la subunidad de PEG

Las células (CCRF-CEM, línea celular en suspensión; n = 3) se incubaron con FITC-PEG- fosfolípido (2 mg/mL en PBS) durante 30 min a RT, seguido de lavado con medio de cultivo. Aquí, se usaron FITC-PEG-fosfolípidos con diferente peso molecular de cadena de PEG, 1 kDa, 5 kDa y 40 kDa. Las células tratadas se cultivaron en medio de cultivo a 37 °C, y se recogieron para el análisis de citometría de flujo a las 0, 1, 3, 6, 24, y 48 h.

25 Modelo de trasplante alógeno porcino

El cerdo fue elegido como modelo animal grande debido a su anatomía y fisiología, que se parecen mucho a las de los seres humanos. Específicamente, la estructura y función renal es muy similar al órgano de los primates. En todos los estudios con cerdos se usaron razas convencionales con un alto estándar sanitario. En los experimentos de supervivencia a largo plazo, los animales se aclimataron durante un periodo de dos semanas y se sometieron a un programa de entrenamiento y socialización. Con frecuencia se realizaron exámenes clínicos, que incluían ecografías del tracto urinario, hematología y patología clínica, y antes del trasplante se realizó la tipificación de SLA con el fin de diferenciar donantes y receptores. Los cerdos receptores se recuperaron rápidamente después de la cirugía, pero no fueron tratados con fármacos inmunosupresores. La administración de tales fármacos interfiere con la respuesta inmune y fue excluida de los experimentos. Por lo tanto, los cerdos fueron sacrificados después de 96 h con el fin de evitar el rechazo agudo del trasplante. Se realizó una necropsia completa después de la eutanasia. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación en Animales, Uppsala, Suecia.

A. Modelo a corto plazo (perfusión del riñón con PEG-fosfolípido solo durante 40 min)

40 La lesión por reperfusión por isquemia (lesión por I/R) es un contribuyente importante en la patología de varias afecciones que incluyen trasplantes, trastornos tromboticos, sepsis y baipás cardiopulmonar. El presente experimento ensayó si el recubrimiento *ex vivo* de las superficies de las células isquémicas de los injertos de riñón porcino con PEG-fosfolípido protege contra la lesión por I/R en un modelo de trasplante de riñón alógeno en bloque.

45 *Animales.* El estudio se realizó en las instalaciones experimentales de Hedenstierna, Hospital Universitario de Uppsala, Suecia. Se incluyeron seis cerdos donantes y seis receptores de ambos sexos. El peso y la edad de los cerdos variaron entre 30-35 kg y 10-12 semanas, respectivamente. Se aplicaron procedimientos de no supervivencia y los animales se sacrificaron después de un periodo de observación postrasplante de 8 horas.

50 *Anestesia.* A su llegada al laboratorio, se administró una inyección intramuscular de 2,2 mg/kg de xilacina (Rompun; Bayer, Leverkusen, Alemania) en combinación con zolazepam 6 mg/kg (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) para la sedación. Posteriormente, los animales se aseguraron en una posición boca abajo. Se introdujeron catéteres venosos periféricos en ambas venas del oído para la inducción y el mantenimiento de la anestesia y para la administración de fluidos. Se realizó una mini-incisión epitraqueal para la exposición de la tráquea y la intubación transtraqueal para la ventilación mecánica Ventilador Servo-IMEchanical, MAQUET, Medical Systems, EE. UU. Los animales se ventilaron con oxígeno al 30 % en aire para obtener 5,0-5,5 kPa de CO₂. Se tuvo como objetivo una presión arterial media (MAP) de > 60 mmHg para asegurar una perfusión de órganos suficiente.

55 *Modelo de trasplante.* Se desarrolló un modelo de trasplante porcino que permite una recuperación e implantación en bloque dual de ambos riñones de un donante en un animal receptor. Mediante la incubación aislada *ex vivo con* PEG-fosfolípido de un solo riñón seleccionado al azar dentro del paquete en bloque, esta técnica nos permitió cotrasplantar

el órgano tratado con su tejido de control perfectamente emparejado en un cerdo receptor, lo que no solo redujo el número de animales experimentales, sino también minimizó las variables de confusión experimentales.

Se movilizó el tronco de la aorta supra e infrarrenal, así como la vena cava inferior, por lo que se creó un paquete en bloque que consistió en los dos riñones, los uréteres y la vasculatura renal completa. El paquete en bloque se retiró inmediatamente y se lavó en frío con solución de HTK (Custodiol; Köhler Chemie GmbH, Alemania). Después, el paquete en bloque se almacenó en frío en una solución de HTK a 4 °C durante 24 horas.

Posterior a la conservación, se seleccionó aleatoriamente un riñón dentro de cada paquete en bloque para la incubación con PEG-fosfolípido. Se pinzaron la vena y la arteria del riñón contralateral (control), así como la vena del riñón seleccionado. Se infundió lentamente un total de 10-15 mL de solución de PEG-fosfolípido con una concentración de 2 mg/mL en el riñón seleccionado. La arteria del riñón tratado luego se pinzó y el paquete en bloque se almacenó en frío durante otros 40 min a 4 °C en HTK. Después de la incubación y antes de la implantación, el PEG-fosfolípido redundante se purgó del riñón tratado con HTK sin retirar las pinzas del control.

Los cerdos receptores se manipularon y anestesiaron como se describió anteriormente. El paquete en bloque se colocó horizontalmente de manera intra-abdominal. El extremo distal de la vena cava y la aorta del trasplante se sometió a anastomosis de extremo a lado con la cava y aorta del receptor, respectivamente. Tras el despinzamiento, el riñón tratado y el de control se volvieron a perfundir secuencialmente mediante el desbloqueo retardado del riñón de control con segundos en el medio, mientras que el efluente del riñón tratado se eliminó con un chorro de agua. Esto se hizo con el fin de evitar la contaminación del riñón de control de la solución de PEG-fosfolípido restante dentro del conducto aórtico. Ambos uréteres de trasplante se cateterizaron por separado para documentar la salida urinaria.

B. Modelo a largo plazo (perfusión del riñón con PEG-fosfolípido solo durante 40 min)

Animales. Con base en los resultados de la tipificación de SLA, se eligieron cerdos cruzados donantes (n = 12) y receptores (n = 21) para el trasplante no concordante. Los animales se alojaron en corrales individuales de 3 m², a la vista y el sonido unos de otros. Se usaron paja y virutas de madera como ropa de cama. Se aplicó un programa de luz/oscuridad de 14:10 h (luces encendidas a las 06:00 h) y se proporcionó una lámpara de infrarrojos (24 h) en cada corral. La temperatura fue de 16-18 °C. Los animales fueron alimentados con una dieta comercial de finalización sin promotores del crecimiento (SOLO 330, Lantmännen, Suecia) dos veces al día, la cantidad dependía del peso corporal y de acuerdo con el régimen de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas para cerdos en crecimiento. Se proporcionó agua *ad libitum*. Los cerdos donantes se anestesiaron con una combinación de medetomidina (Domitor® vet, 1 mg/mL; Orion Pharma Animal Health, Sollentuna, Suecia) a una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal, butorfanol (Butomidol vet, 10 mg/mL; Salfarm Escandinavia, Helsingborg, Suecia) a una dosis de 0,2 mg/kg de peso corporal y ketamina (Ketaminol® vet, 100 mg/mL; Intervet International BV, Boxmeer, Países Bajos) a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal por vía intramuscular (i.m.) y los riñones se examinaron con ultrasonido (Logiq e R6, GE Healthcare, Wauwatosa, EE. UU.) usando sondas lineales (10 MHz) y curvilíneas (4 MHz) para excluir cerdos con quistes renales. Se evaluaron la longitud del riñón, ecogenicidad y definición corticomedular, se evaluó la región pélvica renal en busca de evidencia de pielectasia y se utilizó Doppler en color para evaluar la presencia de flujo sanguíneo en los riñones. Durante un periodo de aclimatación de dos semanas, los cerdos fueron manipulados diariamente y entrenados para que se realizaran diferentes exámenes sin restricciones después del trasplante.

Modelo de trasplante. La anestesia se indujo con una combinación de medetomidina (Domitor® vet, 1 mg/mL; Orion Pharma Animal Health, Sollentuna, Suecia) a una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal, y tiletamina y zolazepam (Zoletil®, 50 mg + 50 mg/mL; Virbac, Reading, Carros, Francia) a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal i.m. Se administraron buprenorfina (Vetergesic® vet, 0,3 mg/ml; Orion Pharma Animal Health, Sollentuna, Suecia) a una dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal por vía intramuscular y la morfina epidural (Morfina epidural Meda, 2 mg/ml; Meda, Solna, Suecia) a una dosis de 0,1 mg/kg preoperatoriamente para la analgesia adicional. Se administró bencilpenicilina procaína (Penovet® vet, 300 mg/mL; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim am Rhein, Alemania) preoperatoriamente a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal i.m. Después de la inducción de anestesia, se insertaron catéteres venosos para uso a largo plazo (Careflow™, 3Fr, 200 mm, BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) en la *vena auricularis* mediante la técnica de Seldinger. Posterior a la operación, los catéteres facilitaron la toma de muestras de sangre sin estrés. Los catéteres se lavaron una vez al día con solución salina heparinizada 100 IE/mL (Heparina LEO, 5.000 IE/mL; Leo Pharma, Ballerup, Dinamarca). La anestesia se mantuvo con isoflurano (IsoFlo® vet; Orion Pharma Animal Health, Sollentuna, Suecia) vaporizado en oxígeno. Los cerdos recibieron fluidoterapia con cristaloides (Ringer-acetat; Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Alemania) de forma continua. Se administraron coloides (Gelofusine® 40 mg/mL; Braun, Melsungen, Alemania) y dobutamina (Dobutamin Carino, 250 mg/mL; Carinopharm, Elze, Alemania) cuando fue necesario para mantener la presión sanguínea dentro de los valores de referencia. Durante la anestesia, se monitorizaron parámetros respiratorios y cardiovasculares.

Procedimiento del donante. En una primera serie de experimentos (3 + 3 donantes y 6 + 5 receptores), se obtuvieron ambos riñones, se trataron de manera similar con perfusión con HTK (n = 11), se mantuvieron en hielo durante la noche y luego uno de los riñones se trató aleatoriamente con PEG-fosfolípido 60 min antes de la inserción, mientras que el otro riñón no se trató. Se aplicó una administración alternativa de PEG-fosfolípido en otros diez riñones (5 donantes y 10 receptores) que fueron tratados con perfusión con HTK que contenía PEG-fosfolípido o solución de perfusión HTK regular. Después del procedimiento, los cerdos donantes fueron sacrificados mediante inyección i.v de

pentobarbital sódico (Allfatal vet, 100 mg/mL; Omnidea AB, Estocolmo, Suecia) bajo anestesia general.

5 *Cirugía de trasplante.* Los cerdos receptores se sometieron a un trasplante de riñón alogénico único. Todos los procedimientos se realizaron por vía intraabdominal a través de una incisión en la línea media de 15-20 cm, y los vasos ilíacos en la fosa ilíaca derecha se identificaron y movilizaron suavemente. El segmento distal de la vena cava, así como la arteria ilíaca (desde su salida de la aorta) se movilizaron sellando el tejido linfóide circundante. Posteriormente, se colocó el injerto renal en la fosa ilíaca derecha en las proximidades de los vasos ilíacos. La vena renal y la arteria se recortaron y posteriormente se anastomosaron de una manera de extremo a lado a la arteria ilíaca derecha del receptor y vena cava distal usando una sutura continua de polipropileno 7/0 (PROLENE®, Ethicon, EE. UU.). Los uréteres se implantaron mediante ureteroneocistostomía extravesical en la parte superior de la vejiga mediante sutura de polidioxanona 6-0 (PDS®, Ethicon, EE. UU.). Después, se realizó una nefrectomía bilateral de los riñones nativos. La incisión de la línea media se cerró mediante sutura de fascia y clips cutáneos de poliglactina 2/0 (VICRYL® Ethicon, EE. UU.). La duración media de la cirugía fue de 3 h (2,5 – 5,5 h).

15 Hacia el final de la cirugía, se suspendió la administración de isoflurano, se aumentó la fracción de oxígeno inspirado (FiO₂ 1,0) y se desconectó a los cerdos del ventilador mecánico y se restableció la respiración espontánea. Los cerdos fueron colocados en una jaula de cuidados intensivos donde el personal podía monitorizarlos fácilmente de forma continua. Se suministró oxígeno suplementario y se monitorizaron la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, la saturación de oxígeno y la temperatura corporal hasta que los cerdos estuvieron conscientes. Durante el primer día, los cerdos fueron alimentados con frutas a mano y apoyados para beber agua si era necesario. También se les ayudó a estar de pie y caminar y se les masajó el glúteo medio, el bíceps femoral y el glúteo mayor varias veces. Para la analgesia postoperatoria, se administró buprenorfina i.v. durante dos días.

20 *Eutanasia y necropsia.* Los receptores fueron sacrificados por eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (Allfatal vet, 100 mg/mL; Omnidea AB, Estocolmo, Suecia) después de 96 h. Las biopsias de riñón para exámenes histológicos se recogieron inmediatamente *post mortem* y todos los cerdos se sometieron a exámenes *post mortem* en el Departamento de Ciencias Biomédicas y Salud Pública Veterinaria, División de Patología, SLU.

25 *Pretratamiento con solución de HTK.* En otro conjunto de experimentos, cuatro cerdos fueron trasplantados con riñones tratados con PEG-fosfolípidos y cinco cerdos con riñones de control. En este conjunto de experimentos, después de la obtención, los riñones se perfundieron con una solución de HTK (Custodiol; Köhler Chemie GmbH, Alemania) con 2 mg/mL de PEG-fosfolípido (riñones tratados) o sin PEG-fosfolípido (riñones de control). Los riñones también se almacenaron sumergidos en la solución de HTK con 2 mg/mL de PEG-fosfolípido (riñones tratados) o en la solución de HTK sin ningún PEG-fosfolípido (riñones de control) a 4 °C durante 24 horas.

C. Modelo a largo plazo para la evaluación de la separación de PEG-fosfolípido del endotelio renal

35 Los riñones se obtuvieron de cerdos donantes y se trasplantaron a cerdos receptores después de dos semanas de aclimatación y entrenamiento como se describió anteriormente. Los riñones se trataron usando el mismo procedimiento que para los trasplantes que recibieron PEG-fosfolípido 60 min antes de la inserción. Con el fin de medir la separación del endotelio, se marcó con fluorescencia el PEG-fosfolípido. Se usó el mismo protocolo anestésico y quirúrgico, pero los riñones nativos se dejaron en los receptores (n = 4). Los cerdos fueron sacrificados por eutanasia después de 12, 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Todos los cerdos se sometieron a una necropsia y se recogieron biopsias para histología y monitorización de la fluorescencia.

Muestreo de sangre

40 En el modelo a corto plazo, se obtuvieron muestras de sangre de las venas de trasplante de riñón izquierda y derecha a los 5, 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos después del inicio de la reperfusión. En el modelo a largo plazo, la sangre se obtuvo después de 1, 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras se tomaron en tubos EDTA Vacutainer (Becton Dickinson AB, Suecia) y se centrifugaron inmediatamente a RT durante 15 minutos. El plasma recogido se almacenó a -80 °C para su análisis adicional.

45 EIA de TAT, C3a y sC5b-9

Se midieron TAT, C3a y sC5b-9 en plasma mediante EIA en sándwich como se describió anteriormente [7]. En resumen, para la evaluación de TAT, las muestras de plasma se diluyeron 1/100 en plasma normal de citrato fosfato dextrosa (CPD). Se usó un anticuerpo monoclonal anti-trombina humana para la captura y se usó un anticuerpo anti-trombina humana (AT) acoplado a HRP para la detección (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, EE. UU.). El estándar se preparó diluyendo suero humano combinado en plasma CPD normal. Los valores se expresaron como µg/L. Para la evaluación de C3a, el plasma se diluyó 1/1.000 en tampón de trabajo (PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, 10 mg/mL de BSA y EDTA 10 mM). Se usó mAb 4SD17.1 anti-C3a humano para capturar C3a y anticuerpo anti-C3a de conejo policlonal biotinilado seguido de estreptavidina conjugada con HRP para la detección de C3a en plasma. El suero activado con zimosán, calibrado frente a C3a purificado, sirvió como estándar. Los valores se expresaron como ng/mL. sC5b-9, el plasma se diluyó 1/50 en tampón de trabajo (como antes). sC5b-9 se capturó por mAb anti-C5b-9 humano (a9e) y se detectó por anticuerpo policlonal de conejo anti-C5 humano (Dako) e IgG anti-conejo conjugada con HRP (Dako). Se usó como estándar suero activado con zimosán que contenía 6 x 10⁴ AU/ml. Los valores se expresaron como AU/mL.

Análisis histológicos

Se tomaron biopsias de tejido renal del riñón de control y tratado con biotina-PEG-fosfolípido a los 5, 60 y 360 minutos después de la reperusión. Para la detección de PEG-fosfolípido, las biopsias se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis adicional. Se incubaron secciones congeladas (4 µm de espesor) de riñón tratadas con biotina-PEG-fosfolípido en Alexa488-estreptavidina (GE Healthcare, 1:500) a RT durante 10 min. Las secciones se analizaron mediante microscopía confocal de barrido láser (LSM510, META, Carl Zeiss, Alemania). Se evaluaron tanto biotina-PEG-fosfolípido como FITC-PEG-fosfolípido (5 kDa, 40 kDa).

Las muestras de tejido también se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4 % durante la noche y se almacenaron en etanol al 70 % hasta que se embebieron en parafina. Las secciones de parafina (5 µm de espesor) se desparafinaron en xileno y se rehidrataron con etanol. La recuperación de antígeno inducida por calor se realizó hirviendo las secciones dos veces en tampón cítrico de sodio. Bloqueado con suero de cabra antes de la incubación del anticuerpo primario. Las secciones cortadas se tiñeron con hematoxilina y eosina (tinción HE) y anticuerpos para marcadores del complemento tales como C5aR (Acris Antibodies, Herford, Alemania), C3b (Bioss Antibodies, Woburn, MA, EE. UU.), C4d (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y C5b-9 (MAC; Abcam). Como experimento de control, se usaron IgG de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) e IgG de ratón (Abcam). La detección de anticuerpos primarios se realizó con el Sistema de Detección de rojo fosfatasa alcalina Dako real (Dako) seguido de contratinción con hematoxilina. Los portaobjetos se visualizaron usando un microscopio Zeiss Axio Imager A1. La lente era un objetivo de 10X y los campos evaluados fueron de 800.000 µm². Las regiones cuadradas se cuantificaron para la intensidad y el área de las regiones inmunes reactivas usando el software Axio Visio (rel. 4.8) (Zeiss, Jena, Alemania). Los resultados se presentan como suma densitométrica media de rojo. El análisis histológico fue realizado por un patólogo doble ciego a las muestras para la detección de dilatación y necrosis tubular, lesión glomerular y vacuolización.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias ± SEM. La representación gráfica de los datos y el análisis estadístico se realizaron usando Prism versión 6 para el software Macintosh (Graphpad, San Diego, CA, EE. UU.). Las diferencias entre las medias de dos grupos se evaluaron estadísticamente usando la prueba de pares de Wilcoxon, mientras que la significación estadística entre más de dos grupos se analizó mediante ANOVA bidireccional de medidas repetidas seguido de una evaluación post Hoc Bonferroni. La comparación entre grupos se considera significativa cuando $p < 0,05$, mientras que los valores superiores se consideraron no significativos (ns).

Resultados

30 Comparación de las propiedades funcionales de las diversas preparaciones de PEG-fosfolípido

Las hMSC se trataron con los diversos tipos de preparación de PEG-fosfolípido. La viabilidad de las hMSC estaba inalterada después de la modificación de la superficie con PEG-fosfolípidos solos (97,3 %), PEG-fosfolípidos marcados con FITC (98,3 %), así como con PEG-fosfolípido marcado con biotina (97 %), lo que indica que los PEG-fosfolípidos no afectan la viabilidad.

35 La retención de PEG-fosfolípido con diferente longitud de la subunidad PEG se ensayó usando células en suspensión CCRF-CEM. Las células se recubrieron con PEG-fosfolípido con subunidades de PEG de 1 kDa, 5 kDa y 40 kDa conjugadas con FITC. Las células se incubaron a 37 °C y la unión se monitorizó mediante citometría de flujo. Se mostró que la unión de todas las preparaciones se perdió un 90 % después de 24 h, pero la preparación de 5 kDa fue la que se retuvo durante más tiempo (Fig. 13).

40 Los niveles de TAT se redujeron significativamente cuando las células recubiertas con PEG-fosfolípido en comparación con las células no recubiertas se expusieron a sangre completa. Esta reducción en la generación de TAT fue similar para las células recubiertas con PEG-fosfolípido solo ($61,5 \pm 2,9$ frente a $110 \pm 7,6$), PEG-fosfolípido marcado con FITC ($60,1 \pm 2,7$) o con PEG-fosfolípido marcado con biotina ($61,4 \pm 5,1$) en comparación con los controles sin recubrimiento con PEG-fosfolípido ($110 \pm 7,6$) (Fig. 2A).

45 Se observó una tendencia similar para los marcadores de activación del complemento cuando las células recubiertas y no recubiertas se expusieron a sangre completa. A los 60 min de la exposición a la sangre, los niveles en plasma de C3a y sC5b-9 se redujeron significativamente si las células se recubrieron con PEG-fosfolípido ($50,8 \pm 3,2$, $37,7 \pm 1,5$), PEG-fosfolípido marcado con FITC ($51,3 \pm 3,8$, $35,0 \pm 2,1$) y PEG-fosfolípido marcado con biotina ($49,8 \pm 4,1$, $38,3 \pm 2,0$) en comparación con las células no recubiertas ($104 \pm 7,7$, $104 \pm 6,2$) (Fig. 2A y 2B).

50 Distribución de fosfolípido marcado con FITC en riñones de cerdo tratados con PEG-fosfolípidos

55 Los riñones alogénicos se trasplantaron en bloque a los receptores ($n = 6$) como se describe en los materiales y métodos. La distribución de PEG-fosfolípido en el tejido renal posterior a la reperusión en el receptor se analizó en biopsias tomadas a los 5, 60 y 360 min. Como se muestra en la Fig. 4, la fluorescencia antes de la reperusión del PEG-fosfolípido marcado con FITC se distribuyó uniformemente en los vasos peritubulares, los glomérulos y los túbulos de todo el riñón, lo que refleja que el tejido renal se modificó por igual con PEG-fosfolípido mediante la inyección de solución de PEG-fosfolípido a través del muñón de la aorta. Por el contrario, no hubo fluorescencia en

los tejidos del riñón de control, lo que indica que no hubo una fuga significativa entre los riñones de ensayo y control.

Cuando se compararon los tejidos renales a los 5, 60 y 360 min, la fluorescencia de, en particular, los glomérulos, pero también los vasos peritubulares y los túbulos, en los tejidos renales tratados con PEG-fosfolípido marcado con FITC disminuyó gradualmente con el tiempo, lo que indicó que el PEG-fosfolípido se separó de las células, aunque todavía quedaba algo de PEG-fosfolípido unido a los túbulos a los 360 min.

En el estudio a largo plazo para la evaluación de separación (C. Modelo a largo plazo para la evaluación de la separación de PEG-fosfolípido del endotelio renal), solamente fue visible una fluorescencia menor después de 24 h y después de 48 h, no se observó fluorescencia lo que muestra que todo el PEG-fosfolípido se había separado. El PEG-fosfolípido marcado con FITC *ex vivo* también se adhiere al endotelio de los vasos cardíacos.

10 A. El modelo de trasplante alogénico a corto plazo

Análisis inmunohistoquímico de los riñones trasplantados

Los riñones trasplantados se analizaron por inmunohistoquímica para la fuga de albúmina, la deposición del complemento y la expresión del receptor (C3a, sC5b-9, C4d, C3b; Fig. 5A a 5D). La evaluación histológica reveló niveles más bajos de depósito de marcadores de activación del complemento tales como C3b/iC3b y C5b-9 y expresión del receptor del complemento C5aR en injertos de riñón tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los riñones de control. Hubo una reducción significativa en la deposición de C3b/iC3b a los 5 min en el riñón tratado con PEG-fosfolípido después de la perfusión. Para la albúmina, o los marcadores de estrés oxidativo HO-1, iNOS y nitrotirosina, hubo una tendencia (ns) de que esos marcadores fueran más bajos en los riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los riñones de control. Así, los resultados de la clasificación histológica apoyan que el tratamiento de la superficie del injerto renal con PEG-fosfolípido protege contra la activación del complemento y que existe una tendencia hacia un estrés oxidativo suprimido.

Activación de la coagulación y del complemento

Con el fin de evaluar la influencia del tratamiento con PEG-fosfolípido sobre el sistema inmune innato vascular tras la reperfusión de los riñones en el modelo de trasplante alogénico en bloque porcino a corto plazo, se analizaron los marcadores de la activación de la coagulación (TAT, Fig.6A) y activación del complemento (C3a, sC5b-9, Fig. 5A y 5B) en sangre. Los niveles de TAT fueron más bajos en la sangre de los receptores con riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los receptores de control. Se observó una reducción significativa de los niveles de TAT en los riñones tratados con PEG-fosfolípido frente a los controles no recubiertos a los 5 min ($46,1 \pm 5,2$ frente a $73 \pm 12,3$, p: 0,01), 15 min ($48 \pm 8,4$ frente a 73 ± 9 , p: 0,02), 30 min ($41 \pm 9,1$ frente a $57 \pm 4,9$, ns), 60 min ($32 \pm 4,8$ frente a $58 \pm 3,7$, p: 0,02) y 120 min ($28,6 \pm 5,1$ frente a 53 ± 4 , p: 0,02), pero no después de 240 min (32 ± 4 frente a $49 \pm 6,1$, ns) y 360 min (29 ± 9 frente a 41 ± 14 , ns) posterior a la reperfusión. Estos resultados indicaron que la activación de la coagulación se suprimió significativamente por la modificación de la superficie después del trasplante de riñón.

Se observaron resultados similares para los marcadores del complemento (C3a y sC5b-9). Hubo una reducción significativa en los niveles de C3a en la sangre de los receptores trasplantados con riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los receptores de control después de 5 min ($40 \pm 2,8$ frente a $63,6 \pm 5,4$, p: 0,03), 15 min (39 ± 4 frente a $61 \pm 7,2$, p: 0,04), 60 min ($41 \pm 5,2$ frente a $68 \pm 5,1$, p: 0,01), 120 min ($44 \pm 6,1$ frente a $67 \pm 3,1$, p: 0,03), 240 min (45 ± 12 frente a 93 ± 3 , p < 0,0001) y 360 min (45 ± 12 frente a 80 ± 16 , p < 0,001), pero no a los 30 min ($39 \pm 5,8$ frente a $54 \pm 5,9$, ns) posterior a la reperfusión. Además, también se observó una reducción significativa en el nivel de sC5b-9 en comparación con los receptores de control. La generación de sC5b-9 en muestras de los riñones tratados se redujo en todos los puntos de tiempo, excepto después de 5 min, en comparación con los controles. Los niveles en plasma de sC5b-9 a los 5 min después de la reperfusión de los riñones tratados y de control fueron (16 ± 6 frente a 31 ± 5 , p: 0,2), después de 15 min (15 ± 3 frente a 45 ± 11 , p: 0,01), después de 30 min (16 ± 4 frente a 45 ± 3 , p: 0,01), después de 60 min (25 ± 7 frente a 54 ± 4 , p: 0,01), después de 120 min (36 ± 12 frente a 64 ± 9 , p: 0,01), después de 240 min (45 ± 11 frente a 75 ± 11 , p: 0,01) y después de 360 min (44 ± 14 frente a 79 ± 11 , p = 0,008). Por lo tanto, estos resultados mostraron que la activación del complemento se suprimió significativamente al recubrir el endotelio con PEG-fosfolípido.

Función renal

La función renal se analizó evaluando la diuresis después del trasplante de riñón con y sin tratamiento con PEG-fosfolípido (Fig. 10A). Hubo un aumento significativo en la producción total de orina de los receptores con riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los receptores de control a los 360 minutos después de la reperfusión ($48,3 \pm 22,2$ mL frente a $33,5 \pm 18,2$ mL, p < 0,05). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos con respecto al tiempo de diuresis o los niveles de creatinina sérica, ya que no se extrajo el riñón de los receptores.

B. El modelo de trasplante alogénico a largo plazo

Activación de la coagulación y del complemento

Con el fin de evaluar la influencia del tratamiento con PEG-fosfolípido sobre el sistema inmune innato vascular después de la reperusión de los riñones en el modelo de trasplante alogénico porcino a largo plazo, se analizaron los marcadores de la activación del complemento (C3a, sC5b-9, Fig. 8A y 8B) y activación de la coagulación (TAT, Fig. 8C) en sangre. Los niveles de TAT fueron más bajos en la sangre de los receptores con riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los receptores de control. Se observó una reducción significativa de los niveles de TAT en los riñones tratados con PEG-fosfolípido frente a los controles no recubiertos a las 24 horas (372 ± 123 frente a 137 ± 21 , $p < 0,05$), 48 horas (365 ± 82 frente a 152 ± 17 , $p < 0,05$), 72 horas (467 ± 96 frente a 135 ± 18 , $p < 0,001$), y 96 ($428,6 \pm 111$ frente a 168 ± 23 , $p < 0,01$), pero no después de 1 hora (378 ± 82 frente a 176 ± 24 , ns) posterior a la reperusión. Estos resultados indicaron que la activación de la coagulación se suprimió significativamente por la modificación de la superficie después del trasplante de riñón.

Se observaron resultados similares para los marcadores del complemento (C3a y sC5b-9). Hubo una reducción significativa en los niveles de C3a en la sangre de los receptores trasplantados con riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los receptores de control después de 48 horas (119 ± 40 frente a 67 ± 9 , $p < 0,001$), 72 horas (95 ± 13 frente a 63 ± 10 , $p < 0,01$) pero no después de 1 hora (68 ± 11 frente a 54 ± 4 , ns), 24 horas mín, (128 ± 54 frente a 63 ± 18 , ns) o 96 horas (103 ± 21 frente a 74 ± 8 , ns), posterior a la reperusión. Además, también se observó una reducción significativa en el nivel de sC5b-9 en comparación con los receptores de control. La generación de sC5b-9 en muestras de los riñones tratados se redujo en todos los puntos de tiempo, excepto después de 5 min, en comparación con los controles. Los niveles en plasma de sC5b-9 a los 5 min después de la reperusión de los riñones tratados y de control fueron 24 horas mín (73 ± 29 frente a 33 ± 16 , $p < 0,05$), 48 horas (94 ± 33 frente a 33 ± 11 , $p < 0,001$), 72 horas (126 ± 46 frente a 41 ± 18 , $p < 0,0001$) y 96 (108 ± 23 frente a 51 ± 11 , $p < 0,01$), pero no después de 1 hora (63 ± 11 frente a 33 ± 16 , ns). Por lo tanto, estos resultados mostraron que la activación del complemento se suprimió significativamente al recubrir el endotelio con PEG-fosfolípido.

Citoquinas proinflamatorias

Se evaluó la concentración de citoquinas/quimioquinas en el trasplante de riñón alogénico a largo plazo. Usando un ensayo multiplex, se evaluó la concentración en plasma de INF γ , IL-10, IL-2, IL-1 α , IL-1R, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IL-8, IL-12 y TNF, véanse las Fig. 9A a 9L. Los niveles de IL-10, IL-1R, IL-4, IL-6, IL-12, IL-18 y TNF fueron significativamente más bajos en los animales trasplantados con los riñones tratados con PEG-lípido después de 4 días.

Función renal

Todos los animales se recuperaron bien después del trasplante y comenzaron a comer dentro de las 24 h. La producción de orina se confirmó con un examen de ultrasonido y se encontró orina en la vejiga dentro de las 72 h en todos los cerdos. La función renal se analizó evaluando los niveles de creatina después del trasplante de riñón con y sin tratamiento con PEG-fosfolípido (Fig. 10B). Hubo un nivel significativamente más bajo en los receptores con riñones tratados con PEG-fosfolípido en comparación con los receptores de control durante todo el periodo de cuatro días.

Necropsia

No se observaron signos de enfermedad aparte de los cambios relacionados con el trasplante renal. Los exámenes *post mortem* se realizaron en la Sección de Patología, SLU, Uppsala.

Síndrome de posperusión

En nuestros estudios de supervivencia a largo plazo en cerdos, se mostró que los animales, que fueron trasplantados con riñones tratados con PEG-fosfolípidos, tuvieron cambios mínimos o nulos en la frecuencia cardíaca y la presión arterial después de la reperusión. Por lo tanto, el producto de PEG-fosfolípido también previno la activación del sistema de contacto y finalmente PRS, véase la Fig.11.

Pretratamiento de la solución de HTK

Las Fig. 16A y 16B muestran los resultados de la evaluación de la incubación de los riñones de cerdo durante 24 horas en solución de HTK suplementada con PEG-fosfolípido a 4 °C. Los valores de TAT se presentan en la Fig. 16A, y los valores de creatinina en plasma se presentan en la Fig. 16B. Hubo una mejora significativa al mantener los riñones de cerdo en la solución de HTK suplementada con PEG-fosfolípido en comparación con el control con solo solución de HTK y sin tratamiento con PEG-fosfolípido. Los niveles bajos de creatinina en plasma observados en los riñones de los cerdos tratados se obtuvieron incluso sin inmunosupresión añadida.

Almacenamiento de órganos

Cuando se disolvió el PEG-lípido en líquido de perfusión en combinación con un almacenamiento prolongado del injerto a +4 °C, hubo una activación del sistema de cascada (Fig. 17A a 17D) y niveles en la expresión de citoquinas (Fig. 18A a 18G) significativamente menores en los riñones tratados con PEG-lípido tras la reperusión.

Análisis histológico de FITC-PEG-fosfolípido

La Fig. 19 ilustra imágenes microscópicas confocales de biopsias de riñones tratados con FITC-PEG-fosfolípido (5 kDa) y FITC-PEG-fosfolípido (40 kDa) junto con el control. Por lo tanto, estas imágenes muestran la captación de PEG-lípido de 5 kDa y PEG-lípido de 40 kDa después de la infusión *ex vivo* de PEG-lípido en los riñones de cuatro cerdos diferentes donde se usó un riñón para el PEG-lípido de 5 kDa y el otro para el PEG-lípido de 40 kDa. Como se muestra en la Fig. 19, el PEG-lípido de 5 kDa penetró más eficientemente en el parénquima del riñón en comparación con el PEG-lípido de 40 kDa. Por consiguiente, las moléculas de PEG-lípido de 40 kDa se filtraron menos eficientemente a través de los glomérulos de las nefronas que las moléculas de PEG-lípido de 5 kDa.

Discusión

En muchas enfermedades y afecciones patológicas, la isquemia induce los cambios patológicos. En principio, cuatro tipos de mecanismos inducen isquemia en el tejido, a saber, trombosis, trasplante, pinzamiento de la arteria que conduce a un órgano y sepsis. La IRI es un evento inevitable durante el trasplante de órganos, pero también ocurre en una amplia gama de otras situaciones clínicamente relevantes, tales como muerte cerebral, sepsis, cirugía cardíaca, así como después de la reperfusión del área isquémica en casos de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. En el presente experimento, demostramos que el recubrimiento del revestimiento endotelial y el sistema tubular con una construcción de PEG-fosfolípido antes del trasplante en un modelo de trasplante alogénico porcino a corto y largo plazo, reemplaza funcionalmente a la GXC y atenúa fuertemente la respuesta inicial a la lesión I/R *in vivo*.

El riñón trasplantado está expuesto a una lesión isquémica en varias etapas, desde el periodo de tiempo en el donante hasta el evento del trasplante real. Dado que los donantes cadavéricos son los principales contribuyentes de la donación de órganos, la inestabilidad hemodinámica de la circulación en los donantes cadavéricos es una de las principales causas de isquemia. Se experimenta isquemia cálida durante la obtención de órganos de donantes cadavéricos y se produce una lesión isquémica fría durante la conservación del órgano a temperatura más baja. La reperfusión del órgano en el receptor finaliza la lesión I/R.

Con el fin de superar estos problemas, presentamos un método nuevo de protección local contra el ataque inmune innato en el trasplante de riñón. El endotelio y los túbulos del riñón se recubrieron con PEG-fosfolípidos mediante interacciones hidrófobas con la membrana de la bicapa de lípidos celulares, reemplazando así la capa de GXC. Las cadenas de PEG son inertes y proporcionan una alta biocompatibilidad. Por lo tanto, el PEG-fosfolípido solo protege contra la lesión por I/R protegiendo las membranas de las células endoteliales y tubulares e impidiendo que las proteínas alcancen y se activen en las superficies de las células endoteliales del riñón.

Los riñones tratados con PEG-fosfolípido en los receptores mostraron menos activación inmune como se refleja en los niveles en plasma atenuados de TAT, FXIIa, TF, C3a y sC5b-9, y la deposición de C3b en la superficie endotelial de los injertos renales. Esto mostró que las cadenas de PEG que sobresalen de la membrana de la bicapa lipídica podrían inhibir la activación del complemento y proteger la membrana celular del depósito de componentes del complemento después de la reperfusión de sangre fresca de los receptores. También dio lugar a la supresión de la activación de la coagulación. La activación del complemento y la coagulación es el sello distintivo de I/R y los niveles reducidos de los marcadores del complemento corroboran el concepto de un efecto protector contra la lesión de I/R que conduce al rechazo.

En el estudio a corto plazo, el trasplante se siguió durante hasta 6 horas para evaluar la función renal y la hemocompatibilidad local. Cuando la suspensión de PEG-fosfolípido se inyectó a través del segmento de aorta común de los dos injertos de riñón, el tejido del riñón de ensayo completo fue igualmente recubierto con PEG-fosfolípido incluyendo los glomérulos (Fig. 4B, 4D, 4F). La morfología macroscópica de los injertos de riñón no se modificó, lo que indica que el tratamiento del injerto de riñón con PEG-fosfolípido no tiene efectos adversos sobre la viabilidad celular. Además, cuando se comparó la producción total de orina entre el riñón de control y el riñón tratado con PEG-fosfolípido, se observó una mejora significativa de la diuresis en el riñón de ensayo. Estos resultados indican que no solo el endotelio renal estaba protegido del ataque de inmunidad innata, sino también que la función renal estaba bien conservada a pesar de que los glomérulos estaban recubiertos con PEG-fosfolípido. Dado el vínculo establecido entre los cambios morfológicos después del daño isquémico y la función renal como herramienta para distinguir entre riñones viables y no viables *ex vivo*, nuestro estudio de observación a corto plazo demuestra la eficacia del recubrimiento de PEG-fosfolípido para atenuar el ataque de I/R sin efectos adversos sobre la función renal.

El efecto del PEG-fosfolípido se limita a la superficie celular, ya que la unión está mediada por una interacción hidrófoba. A partir del seguimiento de la fluorescencia del PEG-fosfolípido unido en el riñón, tanto en los modelos a corto como a largo plazo, se mostró que hubo una disminución en la intensidad durante el periodo de observación, lo que indica que el PEG-fosfolípido se separó del endotelio. La fluorescencia pareció migrar desde los glomérulos al sistema tubular y finalmente llegó a la base de las células tubulares 6 horas después del trasplante. La fluorescencia se encontró en la orina durante el periodo de observación, lo que apoya que las moléculas de PEG-fosfolípido fueron metabolizadas por el riñón. En el estudio a largo plazo, se detectó una fluorescencia significativa hasta 12-24 horas después de la reperfusión y se perdió por completo después de 48 horas. Puede ser que inicialmente haya una sobresaturación de PEG-fosfolípido, que se elimina fácilmente por lavado y que la protección real de las células

endoteliales sea ejercida por moléculas que dan solo una tenue fluorescencia. Esto se ve corroborado por la fluorescencia de PEG-fosfolípido relativamente baja en el estudio a corto plazo después de 6 horas después del trasplante combinado con un efecto protector sobre el ataque inmune innato como lo indican las diferencias significativas en los niveles de TAT, C3a y sC5b-9 en la sangre y en la deposición de C3b en el injerto renal. Esto también está respaldado por el hecho de que la eficacia permaneció en el estudio a largo plazo hasta 72 horas a pesar de que se observó una menor densidad de PEG-fosfolípido insertado en la superficie endotelial. Por lo tanto, la estabilidad a largo plazo de los PEG-fosfolípidos es suficiente.

Este estudio a corto plazo proporciona una prueba del concepto de la eficacia del recubrimiento de PEG-fosfolípido solitario para atenuar los eventos de lesión de I/R al suprimir directamente la tromboinflamación. El PEG-fosfolípido se desarrolló para actuar como un enlace y un espaciador para los reguladores de la inmunidad innata unidos a las células. Las moléculas de PEG-fosfolípido funcionalizadas son muy eficientes en la atenuación de diversos tipos de reacciones inmunes y trombóticas innatas, tales como la activación del complemento, activación del sistema de contacto y activación de las plaquetas. Por ejemplo, un péptido con afinidad por el Factor H inhibe la activación del complemento y una apirasa es capaz de reducir las reacciones trombóticas asociadas con la activación de plaquetas. Combinados, estos dos reguladores pueden inhibir totalmente la tromboinflamación desencadenada en un sistema xenogénico cuando las células endoteliales aórticas porcinas entran en contacto con sangre humana en un sistema *in vitro* de sangre completa. Teniendo en cuenta el inmenso efecto del PEG-fosfolípido solo, la adición de reguladores al PEG-fosfolípido mejorará adicionalmente la construcción con respecto a la inhibición de la lesión de I/R en el trasplante de riñón alogénico.

La activación del sistema de contacto, que es parte de la inmunidad innata, puede causar complicaciones intraoperatorias graves, tales como alteraciones cardiovasculares e inestabilidad hemodinámica posterior a la reperfusión. Este fenómeno, que se ha descrito previamente como síndrome posterior a la reperfusión (PRS), se observó por primera vez en receptores de trasplante de hígado que experimentaron una inestabilidad hemodinámica grave después de la reperfusión del injerto de hígado. Sin embargo, este fenómeno también se observa en los receptores de trasplantes de riñón y páncreas, que a menudo sufren de inestabilidad hemodinámica instantánea después de la reperfusión. Durante la PRS, la proteína plasmática factor XII, precalicreína y cininógeno de alto peso molecular se activan, lo que da como resultado el inicio de la cascada de coagulación y la producción de bradiquinina, que es un vasodilatador muy potente que causa inestabilidad hemodinámica. En consecuencia, la rápida disminución de la presión arterial sistémica da como resultado una perfusión alterada del injerto y una prolongación de la isquemia caliente del injerto. Estos pacientes pueden sufrir retraso en la función del injerto, mayor riesgo de rechazo y pérdida prematura del injerto. En individuos sanos, un aumento de la frecuencia cardíaca puede compensar en parte la caída de la presión sanguínea.

En nuestros estudios de supervivencia a largo plazo en cerdos, se mostró que los animales, que fueron trasplantados con riñones tratados con PEG-fosfolípido, tuvieron cambios mínimos o nulos en la frecuencia cardíaca y la presión arterial después de la reperfusión. Por lo tanto, el producto PEG-fosfolípido también impidió la activación del sistema de contacto y finalmente el PRS.

La diferencia entre los diferentes experimentos a largo plazo fue que el injerto en los experimentos anteriores se almacenó en un refrigerador a +4 °C durante 24 h sin estar sumergido en líquido de perfusión y que el PEG-fosfolípido se administró por perfusión en el sistema vascular 40 min antes del trasplante de riñón. En los últimos experimentos, el injerto se perfundió inmediatamente con PEG-fosfolípido después de la obtención y luego se sumergió en PEG-fosfolípido disuelto en líquido de perfusión durante 24 h a +4 °C hasta el trasplante y la reperfusión. Ya en el primer estudio, hubo una activación del sistema de cascada (Fig. 8A a 8C) y expresión de citoquinas (Fig. 9A a 9L) significativamente menores en los animales tratados con PEG-fosfolípido. Sin embargo, en el segundo estudio, la activación del sistema de cascada (Fig. 17A a 17D) y la expresión de citoquinas (Fig. 18A a 18G) fueron mucho menores en comparación con el primer estudio y, además, el tratamiento con PEG-fosfolípido dio lugar a una reducción significativa de la activación del sistema de cascada (Fig. 17A a 17D) y la expresión de citoquinas (Fig. 18A a 18G). Por lo tanto, el presente experimento demostró claramente que la combinación de líquido de perfusión y PEG-fosfolípido era la combinación superior. En este experimento, también se mostró que la expresión de citoquinas era claramente menor directamente después de la reperfusión del injerto de los injertos tratados con PEG-fosfolípido (Fig. 18A a 18G), lo que indica que el efecto antiinflamatorio ya fue inducido durante el periodo de isquemia fría antes de la reperfusión, posiblemente debido a un efecto inhibitorio sobre CL-11 durante la isquemia mencionada anteriormente.

Experimento 2

El objetivo del experimento es una evaluación de seguridad de PEG conjugado con fosfolípido (1,2-di-palmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina, DPPE) en ratas. Se administró una dosis única del compuesto por vía intravenosa seguida de un periodo de recuperación de 14 días. En el entorno clínico, 2 g del compuesto PEG (PM 5,0 kDa)/fosfolípido se diluirán en 1.000 mL de solución de perfusión, que se administra rutinariamente a trasplantes de órganos *ex vivo*, antes de la inserción en el receptor. Las ratas del grupo de dosis baja recibieron la misma concentración y las del grupo de dosis alta 10 veces esa concentración, respectivamente.

Diseño del estudio

Se compraron treinta ratas Sprague Dawley de ambos sexos en Charles River y se transportaron a Uppsala. El experimento se desarrolló durante un total de cuatro semanas, comenzando con un periodo de aclimatación de dos semanas, después de lo cual a los animales se les inyectó en un orden aleatorio ya sea NaCl, dosis baja o dosis alta de PEG-fosfolípido (día 1). Las inyecciones se realizaron en la vena lateral de la cola. Luego, las ratas se observaron repetidamente en sus jaulas durante 6 horas usando una prueba de observación de Irwin, que incluye un examen clínico extendido de las funciones neurológicas y motoras en busca de signos de toxicidad aguda. Los observadores estaban cegados al tratamiento. Los exámenes clínicos de cinco días a la semana continuaron luego durante dos semanas. Al final del estudio, se extrajo sangre mediante punción cardíaca con anestesia terminal. Después de la eutanasia, todos los animales se sometieron inmediatamente a la necropsia (día 15).

Grupo 1: 10 animales de control (5 hembras, 5 machos) recibieron NaCl, 1 mL

Grupo 2: 10 ratas (5 hembras machos, 5 machos) recibieron 2 mg/mL de PEG-fosfolípido, 1 mL

Grupo 3: 10 ratas (5 hembras, 5 machos) recibieron 20 mg/mL de PEG- fosfolípido, 1 mL

Observaciones clínicas

A lo largo del estudio, todos los animales fueron examinados y manipulados 5 días a la semana. Los sacaron de la jaula y les pusieron en un trozo de vellón sintético uno o dos a la vez. Tres veces a la semana, se dejó entrar a todas las ratas en un área de juego grande, 5 ratas a la vez, para trepar, bañarse y explorar. El refuerzo positivo se usó en forma de copos de maíz inmediatamente después de su manipulación. Se sometieron a un examen clínico exhaustivo a su llegada a la instalación animal y antes de la inyección de la sustancia. Inmediatamente después de la inyección, se observó a las ratas en busca de signos de toxicidad durante seis horas a rangos de tiempo establecidos. Posteriormente, fueron examinados regularmente por un veterinario experimentado. No se observaron signos clínicos de enfermedad o toxicidad en ningún animal durante el periodo de aclimatación y experimental.

Peso corporal

Los pesos corporales de todos los animales se registraron antes de la inyección intravenosa y posteriormente dos veces por semana durante el resto del estudio. El aumento de peso de los animales fue de una magnitud similar en los tres grupos.

Examen oftalmológico

Todos los animales se sometieron a un examen oftalmológico con biomicroscopía (KOWA-SL17) y oftalmoscopia (Heine Omega 500) una semana antes y una semana después de la inyección del PEG-fosfolípido. Las ratas recibieron gotas para los ojos Mydracil® (tropicamida), 0,5 %, 5 mg/mL antes del examen. Se sujetaron con una suave sujeción manual durante todo el procedimiento.

No se observaron signos de toxicidad en el examen oftalmológico. Antes de la administración de la sustancia, una rata hembra tenía opacidad corneal en el ojo derecho y dos ratas hembra tenían opacidades nucleares del cristalino, una en ambos ojos y la otra solo en el ojo derecho. No se observaron cambios oftalmológicos después de la administración de la sustancia, a excepción de una leve irritación epitelial en una de las hembras. Dos ratas macho tenían degeneración corneal, una bilateral y la otra solo de la córnea derecha antes de la inyección de la sustancia. Un macho tenía defectos nucleares del cristalino y otro tenía cataratas. Se pudo observar hemorragia intravítrea en el ojo izquierdo en una rata macho. Después de la administración de la sustancia, no se pudieron observar cambios en las ratas macho y la hemorragia se reabsorbió.

Patología clínica

Al finalizar el estudio, se extrajo sangre de todos los animales mediante punción cardíaca, se dividió un ml de sangre en tubos con EDTA y heparina de Li. Después de centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min, se recogió el plasma y se almacenó a -20 °C hasta el análisis de bioquímica clínica. La sangre con EDTA se analizó inmediatamente para hematología con el instrumento sanitario Advia 2120 Siemens y el plasma con Architect c4000, Abbott Laboratories, de acuerdo con los manuales de usuario y los SOP del Departamento de Patología Clínica, SLU, Uppsala. Los análisis están validados para roedores. Se realizaron los siguientes exámenes hematológicos: trombocitos B (B-TPK), eritrocitos B (B-EPK), hemoglobina B (B-Hb), volumen corpuscular medio B (B-MCV), concentración de hemoglobina corpuscular media B (B-MCHC), eri-reticulocitos, amplitud de la distribución de glóbulos rojos (RDW), hemoglobina corpuscular media (MCH), volumen medio de plaquetas (MPV), eri-morfología, leucocitos B (B-LPK), neutrófilos B, eosinófilos B, basófilos B, linfocitos B, monocitos B, y para bioquímica clínica se realizaron las siguientes determinaciones: sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteína y albúmina total, alanina aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT) y ácidos biliares. Cuando fue posible, se realizaron los siguientes análisis de orina: pH, proteínas, glucosa y sangre.

Los resultados de todos los análisis de sangre y plasma estuvieron dentro del rango de referencia para ratas Sprague Dawley de 8 a 16 semanas de edad. En cinco muestras de orina se detectó sangre.

Patología

- 5 Todos los animales fueron sacrificados por eutanasia para la necropsia programada el día 15 mediante exanguinación bajo anestesia con isoflurano y oxígeno. Los pesos corporales se registraron después de la eutanasia y se realizó la patología macroscópica. No se encontraron anomalías macroscópicas en ninguno de los animales.

Conclusión

- 10 Los exámenes clínicos, incluyendo las investigaciones oftalmológicas, no revelaron ningún signo de toxicidad en los grupos de animales de dosis baja, dosis alta ni de control. Los análisis hematológicos y bioquímicos estuvieron todos dentro de los rangos de referencia y no se encontraron anomalías macroscópicas en la necropsia en ningún animal. Se puede concluir que el PEG-fosfolípido administrado por vía intravenosa se tolera bien en ratas a una concentración de hasta 20 mg/mL.

Experimento 3

- 15 El Galio-68 (^{68}Ga) es un emisor de positrones con una semivida de 68 min, que se usa comúnmente como un radionúclido de diagnóstico en tomografía de emisión de positrones y (PET)/tomografía computarizada (CT). Se produjo una molécula de PEG-fosfolípido radiomarcada, ^{68}Ga -NO2A-PEG-fosfolípido, en una síntesis de dos etapas.

Preparación de tampones y soluciones madre.

- 20 *Ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M para elución de ^{68}Ga .* Se añadió HCl concentrado (9,00 mL, $d = 1,17 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$, 11,23 M, 32-35 % Ultrapuro NORMATOM para análisis de trazas de metales) a agua (1.000 mL, Thermo Fisher, Ultra Trace Analytical Grade) y se mezcló y almacenó a 4 °C en la oscuridad directamente en el matraz de agua. Se mantuvo una alícuota a RT en un matraz de plástico (resina de bajo metal de Polietileno de Alta Densidad Nalgene, Thermo Fischer) antes de la elución del generador.

- Agua libre de metales.* Se obtuvo agua desionizada en un matraz de vidrio de un purificador de agua (MillieQ). Se transfirió una alícuota a un recipiente de plástico y se almacenó sobre Chelex-100 para secuestrar los iones metálicos.

- 25 *Solución de NO2A-azida 1,0 M en DMSO y agua.* Se añadió trihidrocloruro de 1,4,7-triazacilononan-1,4-bis(ácido acético)-7-(3-azidopropilacetamida) (NO2A-azida, Macrocylics, peso de fórmula 494,8 g/mol) (1,0 mg, 2,0 μmoles) a un tubo Eppendorf (2 mL). El sólido se disolvió primero en dimetilsulfóxido (DMSO, 50 μL) y se diluyó gota a gota muy lentamente con agua libre de metales (1.950 μL) hasta que se obtuvo una solución homogénea 1,0 M.

- 30 *Tampón de acetato de sodio 1,0 M pH 3,5.* Se usó agua libre de metales en todas las etapas de la preparación del tampón. Se disolvió acetato de sodio (8,203 g, 0,100 moles, 99,995 % de base de traza de metales, TraceSELECT) en agua (100 mL) en una botella de plástico (Nalgene, resina de HDPE de bajo contenido metálico) y el pH se ajustó a 4,5, 4,0 o 3,5 por adición de ácido acético concentrado ($\geq 99\%$, TraceSELECT para análisis de trazas) usando una pipeta de plástico. El volumen final fue superior a 100 mL debido a la adición de la sal y el ácido, por lo que la molaridad de la solución final fue inferior a 1,0 M. Se extrajeron secuencialmente alícuotas de aproximadamente 5 mL del tampón y se midió el pH con un medidor de pH calibrado (Mettler Toledo). Las alícuotas se descartaron después de la medición del pH para evitar cualquier contaminación por metales de la sonda de pH. El tampón final se almacenó sobre Chelex 100 y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,5 μm antes de uso posterior.

- Solución de hidróxido de sodio 1,0 M.* Se diluyó una solución de hidróxido de sodio (100 μL , 10 M, grado biológico extra, Sigma Aldrich) con agua libre de metales (900 μL) en un tubo Eppendorf.

40 Elución del generador de ^{68}Ga

Se eluyó ^{68}Ga del generador de $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ (generador de 50 mCi, Obninsk, Rusia) con HCl 0,1 M (5,0 mL, aprox. 0,8 mL/min) usando una jeringa de plástico de 10 mL y un controlador de jeringa motorizado (Univentor 864, Malta). La solución resultante se fraccionó en tubos Eppendorf para obtener un volumen pequeño y una alta concentración de radiactividad.

- 45 Fracción 1: tiempo 0 - 45 s, 600 μL , 0 MBq - residuo

Fracción 2: tiempo 45 - 1 min, 15 s, 400 μL , 212 MBq - guardado para marcaje

Fracción 3: tiempo 1 min, 15 s - 6 min, 15 s, 4.000 μL , 281 MBq - residuo

Método de HPLC

Sistema HPLC LaPrep Sigma (Hitachi), equipado con un inyector manual (Rehodyne 7225i, tamaño de bucle de 20 μL), detector UV (4D LWL, Knauer) con una celda de flujo UV analítica externa (2 μL) conectada con cables ópticos y un detector de radiactividad (Flow Count, Bioscan) equipado con un módulo de rango extendido FC 6106 (Eckert y Ziegler) y un detector de cavidad PMT/NaI FC-3300 (Eckert y Ziegler) que se unió en serie después del detector UV. Se prefirió un bucle de acero inoxidable a un bucle de plástico dentro del radiodetector debido a la pegajosidad de los materiales radiactivos analizados. El aparato de HPLC se controló por software usando OpenLAB (Agilent) y los resultados se analizaron usando el mismo software.

Cámara de iones (VDC 202, Veenstra Instruments, el factor de calibración para ^{68}Ga usado fue 751).

Método A: Fase inversa, columna C18 YMC-Pack ODS-AL, AL12S05-1046WT, AL-301, (YMC Europe GmbH) 100 \times 4,6 mm (D.I), 5 μm , 120A. Disolvente A: agua y TFA al 0,1 %, disolvente B: acetonitrilo y TFA al 0,1 %. Gradiente de solvente 5-70 % de B durante 5 min, luego 70 % de B durante 3 min. Velocidad de flujo 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Método B: Cromatografía de exclusión por tamaño, columna: Superdex™ Péptido 10/300 GL, GE Healthcare. Eluyente isocrático 30 % de B. Velocidad de flujo 0,80 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Síntesis de [^{68}Ga] NO2A-azida

Se mezclaron hidróxido de sodio 1,0 M (40 μL , 40 μmoles) y tampón de acetato de sodio 0,10 M (25 μL , pH 3,5) en un tubo Eppendorf (2 mL), y se añadió a ^{68}Ga (179 MBq) en HCl 0,1 M (400 μL). Después de eso, se añadió una solución de NO2A-azida (10 μL , 1,0 M en una mezcla de DMSO/agua pura (1/39) en volumen) (volumen de reacción total 250 μL) y el vial se agitó con vórtex, se centrifugó y se calentó hasta 80 $^{\circ}\text{C}$ en un bloque de calentamiento durante 15 min para formar la NO2A-azida marcada con ^{68}Ga , véase la Fig. 14. La mezcla de reacción cruda se analizó usando el método A de radio-HPLC, longitud de onda $\lambda = 215 \text{ nm}$, t_{R} : sin señal (UV), 3,7 min (radio) y se usó para reacciones posteriores sin purificación adicional. Se usó radio-HPLC, Método B, para tener una referencia de sin reacción 1 en la reacción de clic, t_{R} : sin señal (UV) t_{R} : 25,7 min (radio).

Síntesis de DBCO-PEG-Lípido

Se hizo reaccionar mal-PEG-lípido (20 mg) con cisteína (2 mg) en PBS (1 mL) durante 1 h a RT y se purificó mediante columna de centrifugación (Columna de Centrifugación de Desalinización de Proteínas, Thermo Fisher Scientific) para obtener Cys-PEG-lípido después de liofilización. Luego, se hizo reaccionar Cys-PEG-lípido (10 mg en PBS) con éster DBCO-C6-NHS (6 mg, Click Chemistry Tools LLC) en DMSO (1 mL) durante 1 h a RT. Después de añadir 10 mL de agua pura, la precipitación se retiró por filtración (tamaño de poro: 0,2 μm , Millex®-GV, Merck Millipore Ltd.), seguido de secado al vacío para obtener DBCO-PEG-lípido (5 mg). La eficacia del marcaje de DBCO fue del 80 %, que se calculó a partir de la absorción UV de DBCO.

Síntesis de ^{68}Ga -NO2A-PEG-Lípido

Se añadió DBCO-PEG-Lípido, (2,0 mg, 333 nmoles de lípido, 75 % de funcionalidad de DBCO, 250 nmoles de DBCO) y PBS (50 μL) a un tubo Eppendorf (2 mL). Se usó una centrífuga para mover todo el material al fondo del vial. Posteriormente, se añadieron 450 μL de la solución de [^{68}Ga]NO2A-azida preparada previamente (116 MBq, 9,0 nmoles). La relación final de DBCO/azida en la mezcla de reacción fue de 1/ 28 por relación molar. La reacción se dejó a RT durante 10 min y luego se calentó hasta 60 $^{\circ}\text{C}$ en un bloque de calentamiento durante 10 min.

Se transfirieron 450 μL de la mezcla de reacción a una columna NAP-5 (columna Grado ADN Sephadex® G-25 preequilibrada con 5 mL de PBS, punto de corte de 5 kDa, GE Healthcare), que se eluyó con PBS en fracciones de 200 μL . El producto deseado ^{68}Ga -NO2A-PEG-Lípido, véase la Fig. 15, se eluyó en las fracciones 2-4 (35,0 MBq, rendimiento radioquímico corregido por desintegración del 32 % en la reacción de clic basado en la cantidad de [^{68}Ga]NO2A-azida añadida, rendimiento radioquímico corregido sin desintegración del 7 % basado en la cantidad total eluida de ^{68}Ga) y se analizó en radio-HPLC equipada con una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex™ Peptide 10/300 GL, GE), longitud de onda $\lambda = 254 \text{ nm}$, t_{R} : 21,5 min, > 92 % de pureza radioquímica. La impureza principal fue [^{68}Ga]NO2A-azida sin reaccionar (5 %) t_{R} : 25,7 min.

Experimento 4

Se realizaron exámenes por PET/Imagenología de Resonancia Magnética (MRI) sobre la base de los resultados de estudios *in vitro* con el fin de seguir la distribución de la construcción de PEG-fosfolípido en riñones de cerdo y para estimar la cantidad de PEG-fosfolípido que se distribuye en los riñones.

Se mezcló ^{68}Ga -NO2A-PEG-lípido (en PBS) con MeO-PEG-lípido no marcado (en solución de HTK) justo antes del uso (^{68}Ga -NO2A-PEG-lípido/MeO-PEG-lípido = 1/4 por relación molar, [PEG-lípido] = 2,0 mg/mL).

La sangre del riñón de cerdo se retiró por lavado con PBS frío y, luego, el riñón se lavó abundantemente con solución de HTK a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se colocó en una bolsa de plástico llena de solución de HTK durante la noche. Una solución de ^{68}Ga -NO2A-PEG-Lípido (2 mg/mL, en HTK, 20 mL, al menos 10 MBq) se inyectó cuidadosamente a través de la arteria del

riñón del cerdo mediante una jeringa, y se incubó durante 30 min en hielo. Después de lavar el riñón con una solución de HTK fría (50 mL), el riñón tratado se colocó en la plataforma del aparato PET/MRI (nanoScan®, Mediso Medical Imaging Systems, Budapest, Hungría). La plataforma fue para una rata grande de un escáner preclínico PET/3T MRI de un animal pequeño. Se usó explorador de barrido por MR (GRE Multi-FOV) para establecer la posición del lecho para el barrido de todo el riñón en PET. Se realizó un examen PET estático, múltiples barridos de lecho, durante 40 minutos. Las mediciones de MRI se realizaron a 3 T usando un cuerpo completo de bobina transmisora-receptora de riñón de cerdo. La secuencia de Eco de Gradiente (GRE MultiFOV) se adquirió con los siguientes parámetros: Número de excitaciones (NEX): 2; Tiempo de repetición (TR): 396 ms; Tiempo de eco (TE): 4,15 ms; Vuelta: 45; Secciones: 180; Espesor de la sección: 1 mm; Campo de visión (FOV): $64 \times 64 \text{ mm}^2$; Resolución espacial: $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$; Tiempo de adquisición: 14 min. Los datos de PET en modo lista se reconstruyeron usando el algoritmo Tera tomo 3D (4 iteraciones, tamaño de vóxel: 0,40 mm, matriz: $212 \times 212 \times 582$).

Las imágenes de PET y MRI se analizaron usando PMOD (versión 3.510; PMOD Technologies Ltd.). Los volúmenes de interés se extrajeron manualmente en imágenes de PET-RM fusionadas, para incluir todo el riñón y alrededor de la región de la médula. La distribución del marcador en el resto del riñón se estimó restando los valores de todo el riñón y alrededor de la región de la médula.

La captación en cada tejido se expresó en MBq, la desintegración se corrigió respecto al tiempo de la inyección. La cantidad de radiactividad inyectada y los efluentes de la vena, de todas las etapas de lavado, se midieron en un calibrador de dosis (VDC-405, Veenstra Instrumenten, Países Bajos) y se corrigió la desintegración respecto al tiempo de la inyección. Todas las mediciones se realizaron a RT. Después de la primera medición por PET/MRI y contador gamma, el riñón se lavó nuevamente con una solución fría de HTK (50 mL), y luego, el riñón se colocó en la plataforma del aparato PET/MRI para la segunda medición.

Resultados

Un riñón de cerdo se trató con $^{68}\text{Ga-NO}_2\text{A-PEG-lípido}$ de la misma manera que el trasplante de riñón para los receptores de cerdo y luego se sometió a imagenología PET/MRI. Después del tratamiento del riñón con $^{68}\text{Ga-NO}_2\text{A-PEG-lípido}$ por inyección y eliminación por lavado a través de la arteria, se realizó una imagenología para evaluar la distribución de $^{68}\text{Ga-NO}_2\text{A-PEG-lípido}$. La señal de $^{68}\text{Ga-NO}_2\text{A-PEG-lípido}$ se distribuyó a través del riñón completo, y también se detectó en particular una señal más alta en el área de la médula (81 %) en comparación con el área de la corteza (19 %). Cuando se volvieron a tomar imágenes del mismo riñón a los 90 min después de un lavado adicional con solución de HTK, el resultado de la imagenología fue casi el mismo. La señal de $^{68}\text{Ga-NO}_2\text{A-PEG-lípido}$ todavía estaba distribuida a través del riñón completo, y se detectó una señal más alta en el área de la médula (93 %) en comparación con el área de la corteza (7 %). Estos resultados mostraron que todos los tejidos y los vasos en el riñón se recubrieron con $^{68}\text{Ga-NO}_2\text{A-PEG-lípido}$ por inyección, y los tejidos y los vasos en el área de la médula se modificaron bien con $^{68}\text{Ga-NO}_2\text{A-PEG-lípido}$.

REFERENCIAS

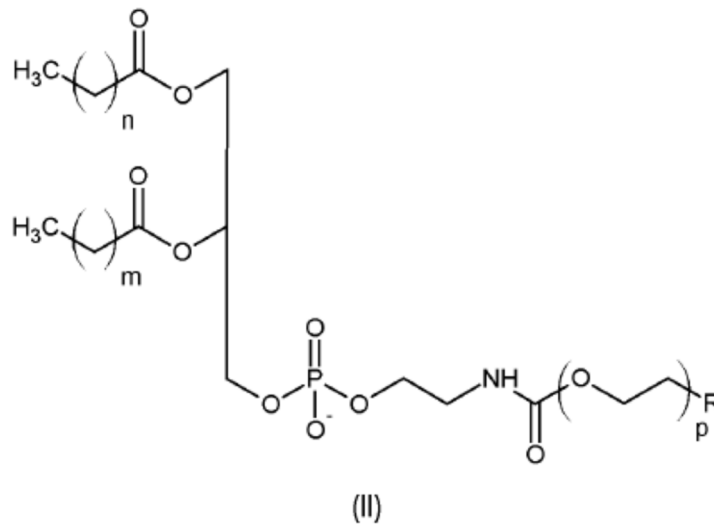
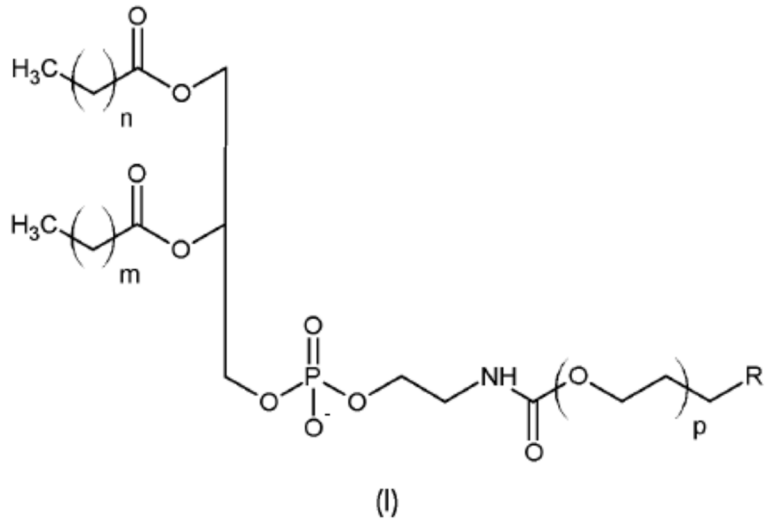
- [1] Miura et al., Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane. *Biomaterials*, 2006, 27:5828-5835.
- 5 [2] Teramura et al., Behavior of Synthetic Polymers Immobilized on Cell Membrane. *Biomaterials*, 2008, 29:1345-1355.
- [3] Teramura e lwata, Improvement of graft survival by surface modification with poly(ethylene glycol)-lipid and urokinase in intraportal islet transplantation. *Transplantation*. 2011, 91(3):271-278.
- [4] Nilsson et al., Autoregulation of thromboinflammation on biomaterial surfaces by a multicomponent therapeutic coating. *Biomaterials*. 2013, 34(4):985-994.
- 10 [5] Engberg et al., Inhibition of complement activation on a model biomaterial surface by streptococcal M protein-derived peptides. *Biomaterials*. 2009, 30(13):2653-2659.
- [6] Teramura e lwata, Surface Modification of Islets With PEG-Lipid for Improvement of Graft Survival in Intraportal Transplantation. *Transplantation*. 2009, 88(5):624-630.
- 15 [7] Asif et al., Heparinization of cell surfaces with short peptide-conjugated PEG-lipid regulates thromboinflammation in transplantation of human MSCs and hepatocytes. *Acta Biomateriala*. 2016, 35:194-205.

REIVINDICACIONES

1. Poli(etilenglicol)-fosfolípido (PEG-fosfolípido) para su uso en la inhibición o prevención de la hipotensión asociada con el desarrollo de la reperfusión después de la reperfusión de un injerto de órgano en un sujeto receptor.
- 5 2. El PEG-fosfolípido para su uso según la reivindicación 1, en donde el PEG-fosfolípido se formula como una solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido y está destinada a la infusión *ex vivo* en un sistema vascular del injerto de órgano para permitir el recubrimiento del revestimiento endotelial del sistema vascular con las moléculas de PEG-fosfolípido.
- 10 3. Un método de tratamiento *ex vivo* de un órgano o una parte del órgano, comprendiendo el método:
 infundir *ex vivo* una solución que comprende moléculas de polietilenglicol)-fosfolípido (PEG-fosfolípido) en un sistema vascular del órgano o la parte del órgano; e
 incubar *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular para permitir el recubrimiento de al menos una porción del revestimiento endotelial del sistema vascular con las moléculas de PEG-fosfolípido, mientras se mantiene el órgano o la parte del órgano sumergido en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.
- 15 4. El método según la reivindicación 3, que comprende, además:
 infundir *ex vivo* una solución de conservación de órganos en el sistema vascular para eliminar por lavado las moléculas de PEG-fosfolípido no unidas del sistema vascular.
5. El método según la reivindicación 3 o 4, que comprende, además:
 20 infundir *ex vivo* una solución de conservación de órganos en el sistema vascular antes de infundir *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la infusión *ex vivo* de la solución comprende:
 pinzar *ex vivo* una de una arteria y una vena del sistema vascular;
 infundir *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en la otra de la arteria y la vena; y
 pinzar *ex vivo* la otra de la arteria y la vena.
- 25 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde la infusión *ex vivo* de la solución comprende infundir *ex vivo* una solución que comprende desde 0,25 mg/mL hasta 25 mg/mL, preferiblemente desde 0,25 mg/mL hasta 10 mg/mL, y más preferiblemente desde 0,25 mg/mL hasta 5 mg/mL, tal como 2 mg/mL, de moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular.
- 30 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde la infusión *ex vivo* de la solución comprende infundir *ex vivo* desde 5 mL hasta 250 mL, preferiblemente desde 5 mL hasta 100 mL, y más preferiblemente desde 5 mL hasta 50 mL, de la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular.
- 35 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde la incubación *ex vivo* comprende incubar *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular, mientras se mantiene el órgano o la parte de la órgano sumergido en la solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido y en una temperatura por encima de 0 °C, pero por debajo de 8 °C, preferiblemente por encima de 0 °C, pero por debajo de 6 °C, y más preferiblemente por encima de 0 °C, pero igual a o por debajo de 4 °C.
- 40 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde la solución de conservación de órganos se selecciona del grupo que consiste en solución de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK), una solución de citrato, una solución de la Universidad de Wisconsin (UW), una solución de Collins, una solución de Celsior, una solución de la Universidad de Kioto y una solución del Instituto Georges Lopez-1 (IGL-1).
- 45 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde la incubación *ex vivo* comprende incubar *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular durante un periodo de tiempo desde 10 minutos hasta 48 horas, preferiblemente desde 20 minutos hasta 36 horas, y más preferiblemente desde 30 minutos hasta 24 horas.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en donde
 las moléculas de PEG-fosfolípido se seleccionan del grupo que consiste en moléculas de PEG-fosfolípido no funcionalizadas que consisten en PEG-fosfolípidos, moléculas de PEG-fosfolípido funcionalizadas que comprenden una molécula funcionalizada respectiva unida a PEG de las moléculas de PEG-fosfolípido, y una mezcla de los mismos; y

5 la molécula funcionalizada se selecciona del grupo que consiste en un péptido de unión a heparina, 4 a 6 repeticiones de consenso cortas N-terminales (SCR) del receptor del complemento 1 (CR1), proteína reguladora del complemento CD46 (CD46), factor de aceleración de la desintegración de complemento (DAF), una molécula de unión al Factor H, una enzima que degrada el difosfato de adenosina (ADP) y una mezcla de los mismos, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en el péptido 5C6, apirasa, grupo de diferenciación 39 (CD39), proteína de unión a C4b (C4BP), y una mezcla de los mismos.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde las moléculas de PEG-fosfolípido tienen una fórmula (I) o una fórmula (II):



10 en donde
 n, m son números enteros seleccionados independientemente dentro del rango desde 10 hasta 16, preferiblemente n, m son independientemente 10, 12, 14 o 16, y más preferiblemente n = m = 14;

15 p se selecciona de modo que la cadena de PEG tenga un peso molecular promedio seleccionado dentro del rango desde 1.000 Da hasta 40.000 Da, preferiblemente desde 3.000 a 10.000 Da y más preferiblemente 5.000 Da; y

20 R es H, CH₃, NH₂, un grupo maleimida, un grupo biotina, un grupo estreptavidina, un grupo avidina o una molécula funcionalizada seleccionada del grupo que consiste en un péptido de unión a heparina, 4 a 6 repeticiones de consenso cortas N-terminales (SCR) del receptor del complemento 1 (CR1), proteína reguladora del complemento CD46 (CD46), factor de aceleración de la desintegración de complemento (DAF), una molécula de unión al Factor H, una enzima que degrada el difosfato de adenosina (ADP) y una mezcla de los mismos, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en el péptido 5C6, apirasa, grupo de diferenciación 39 (CD39), proteína de unión a C4b (C4BP), y una mezcla de los mismos.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, en donde el órgano se selecciona del grupo que consiste en riñón, hígado, páncreas, corazón, pulmón, útero, vejiga urinaria, timo e intestino.

15. El método según la reivindicación 14, en donde

el órgano es un riñón; y

- 5 la incubación *ex vivo* comprende incubar *ex vivo* la solución que comprende moléculas de PEG-fosfolípido en el sistema vascular para permitir el recubrimiento del endotelio renal del sistema vascular renal y recubrimiento de los túbulos del parénquima renal con las moléculas de PEG-fosfolípido mientras se mantiene el riñón sumergido en una solución de conservación de órganos que comprende moléculas de PEG-fosfolípido.

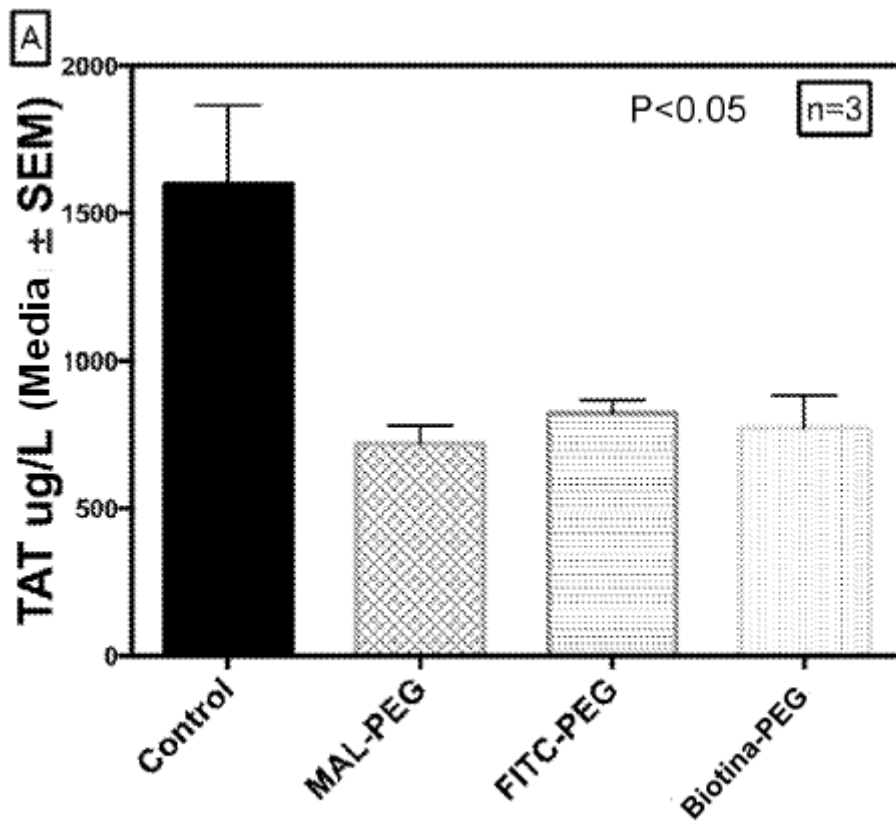


Fig. 2A

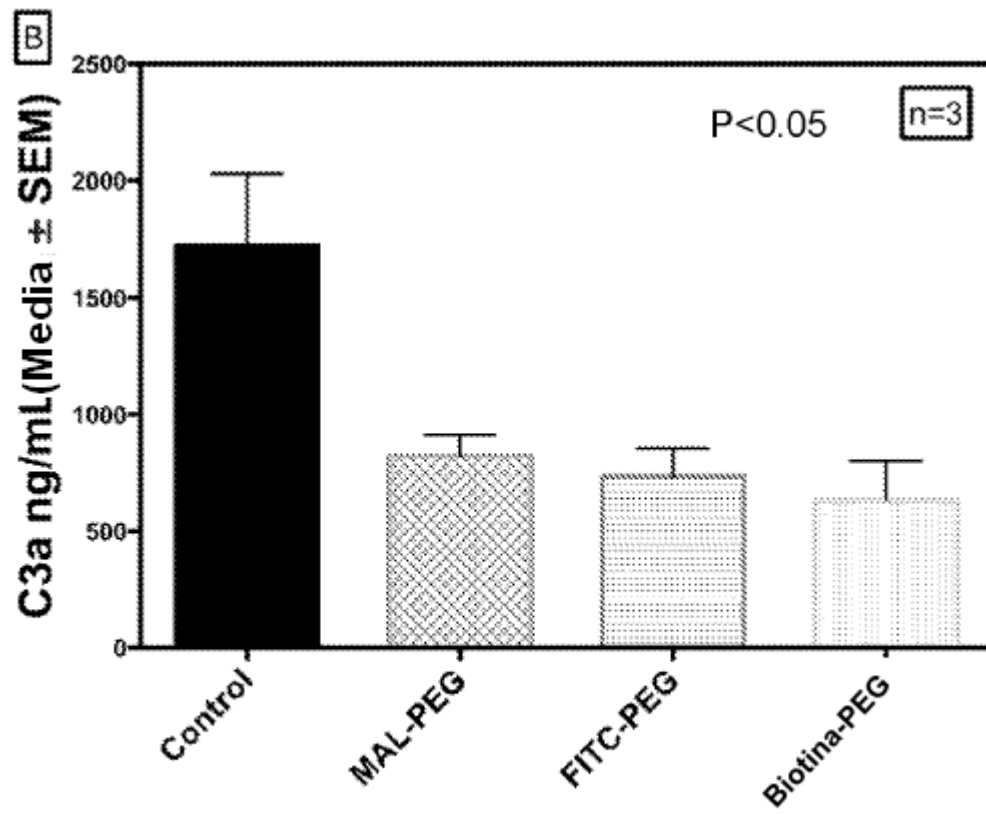


Fig. 2B

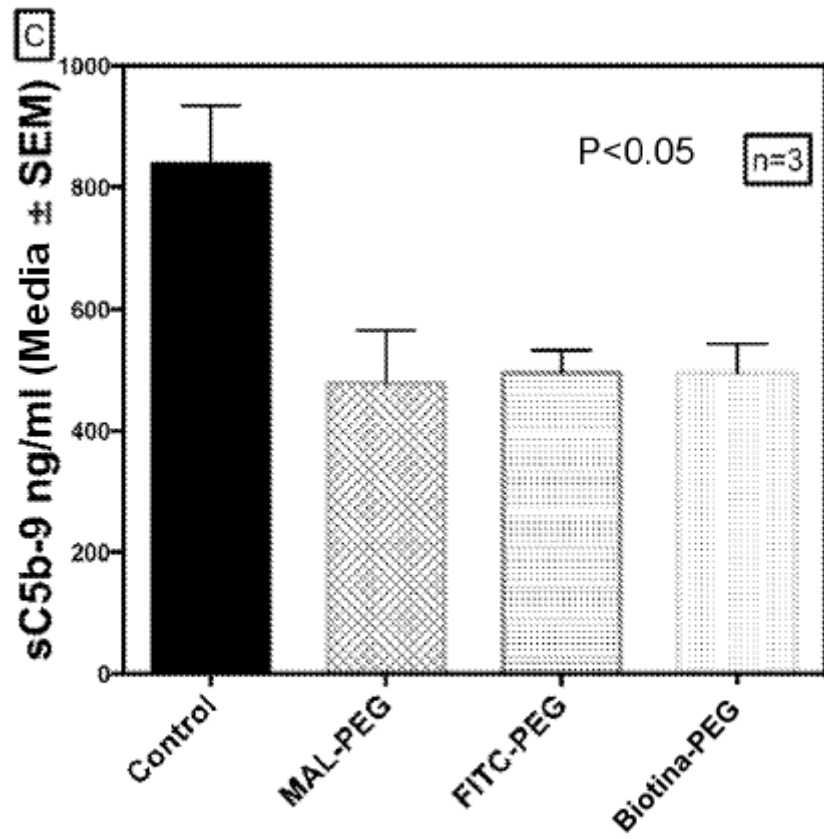


Fig. 2C

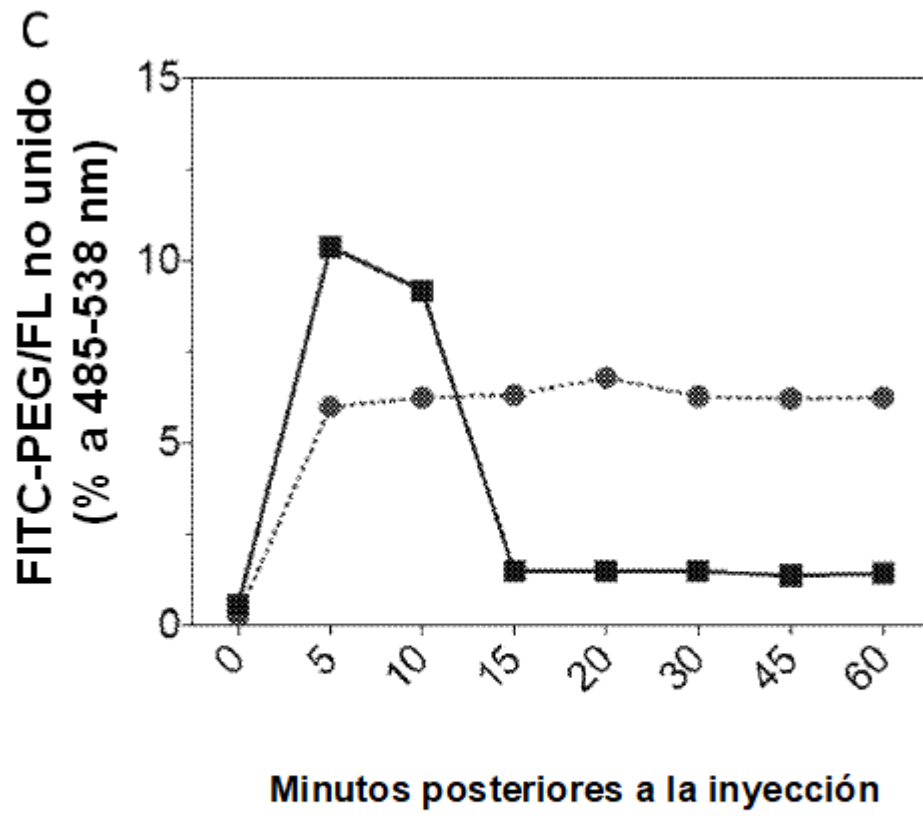


Fig. 3

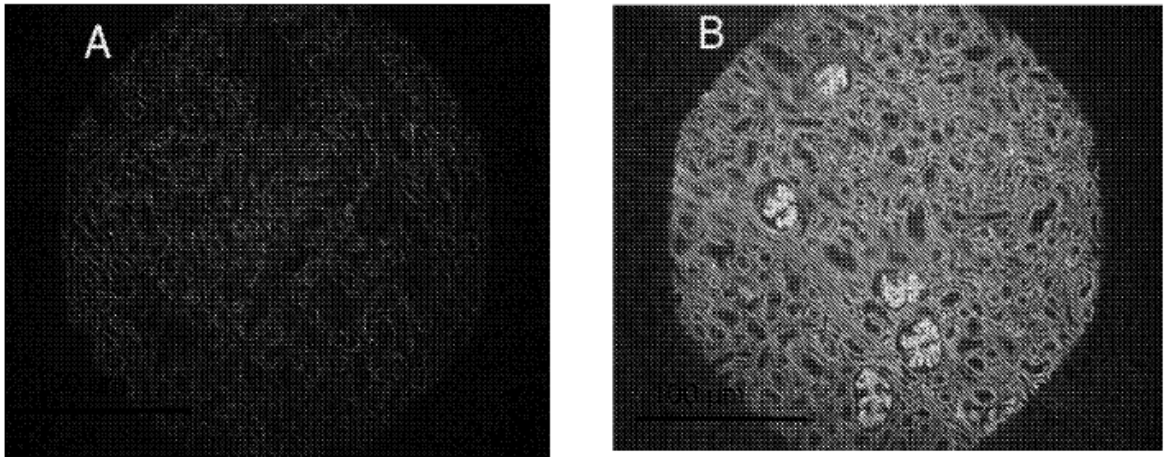


Fig. 4

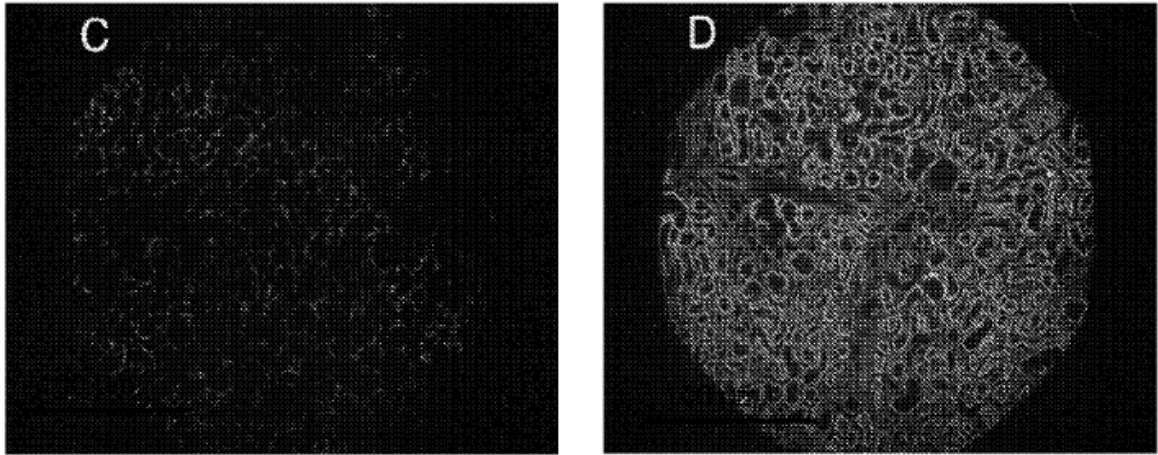


Fig. 4

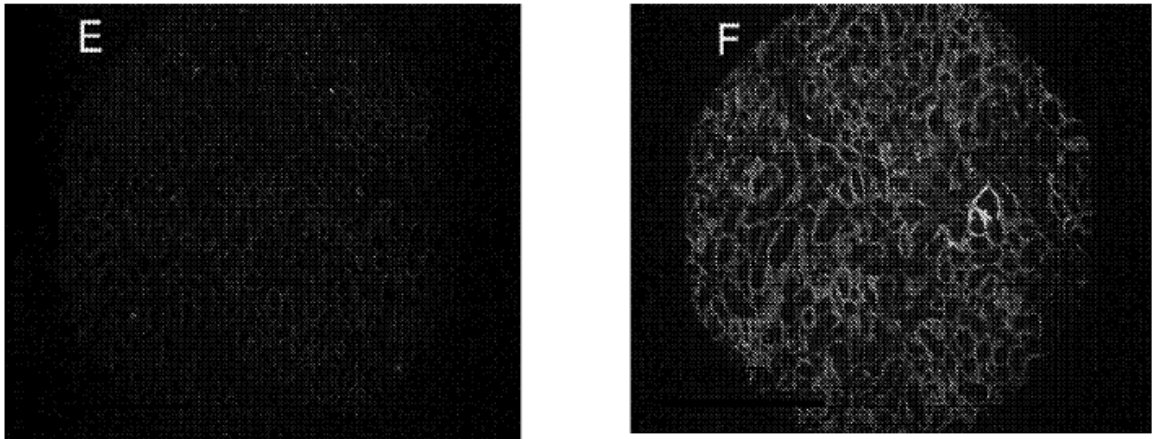


Fig. 4

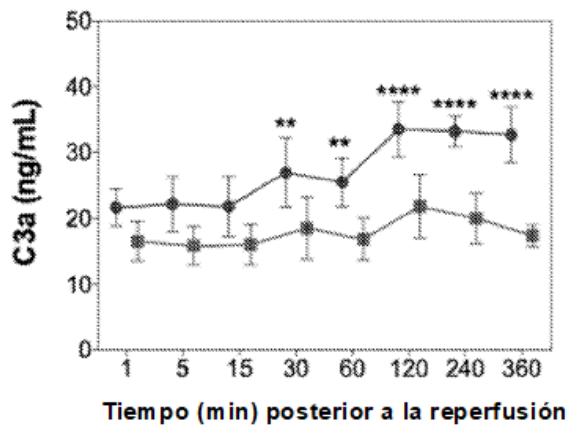


Fig. 5A

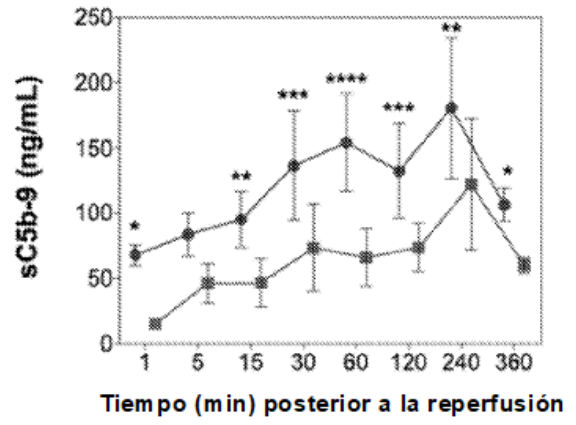


Fig. 5B

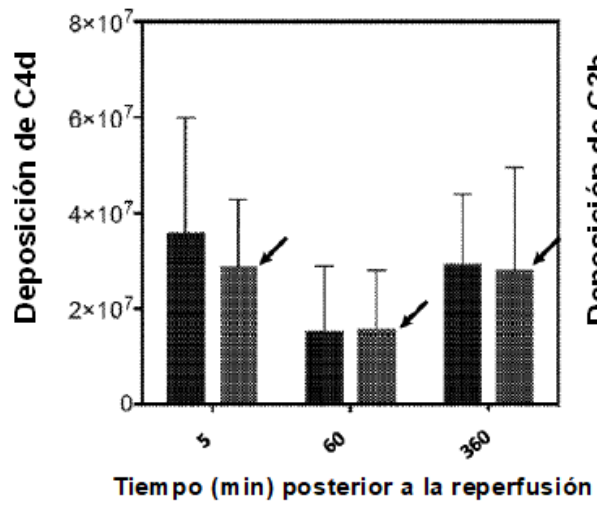


Fig. 5C

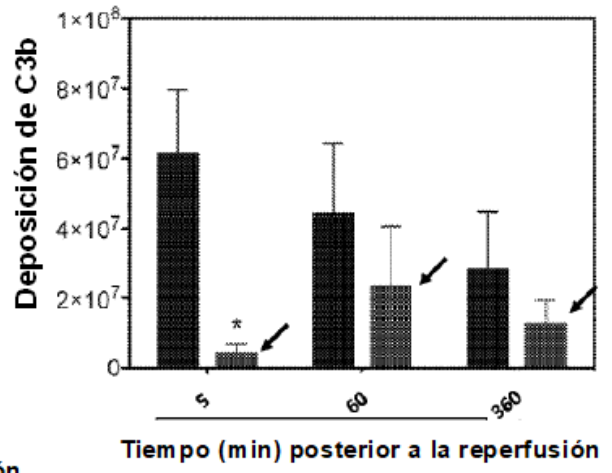


Fig. 5D

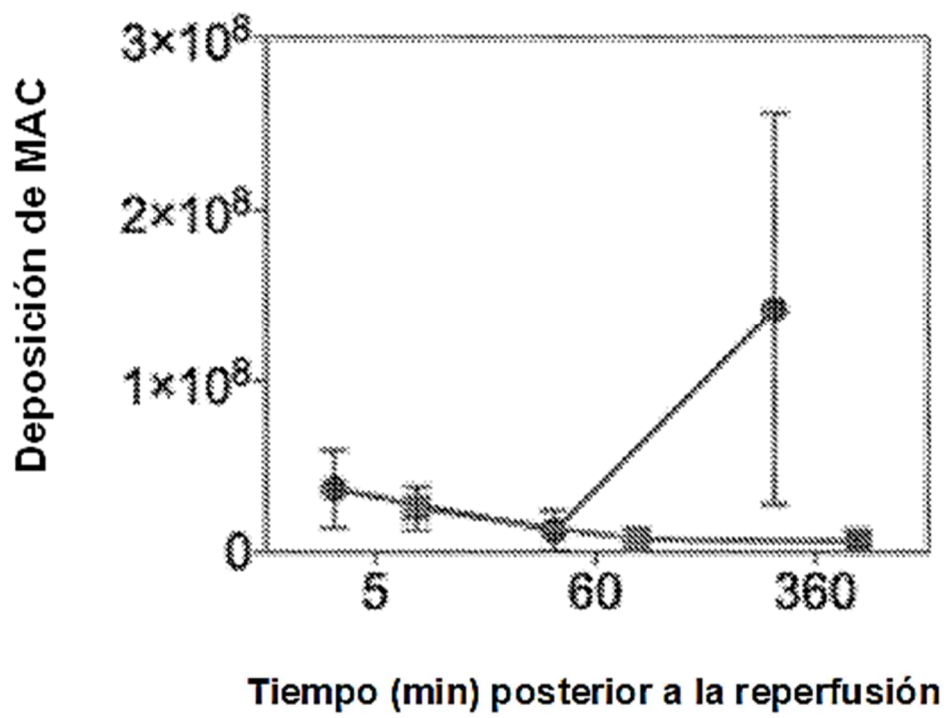


Fig. 5E

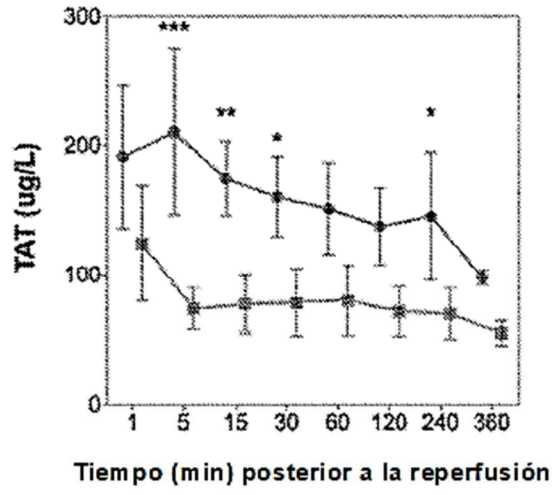


Fig. 6A

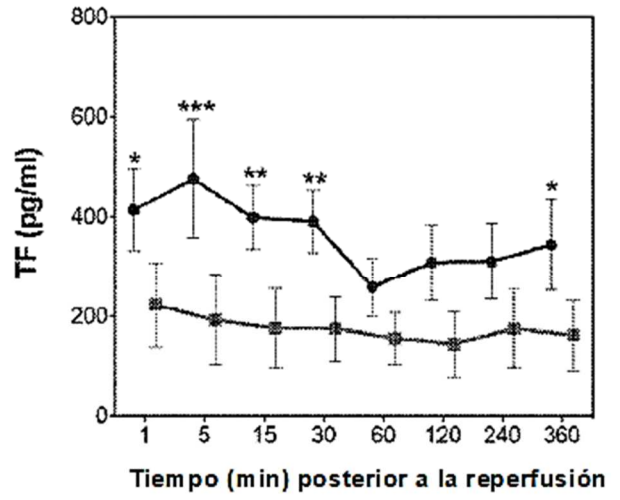


Fig. 6B

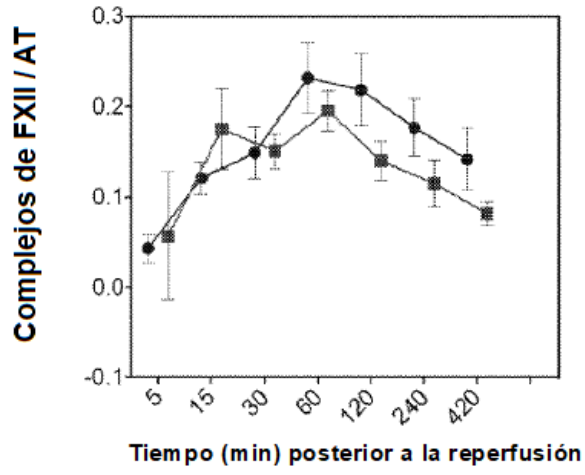


Fig. 6C

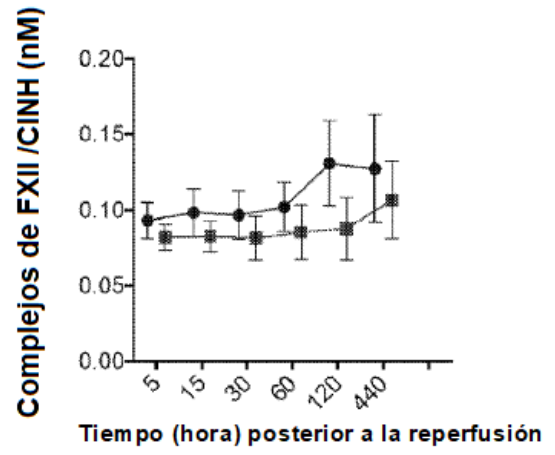


Fig. 6D

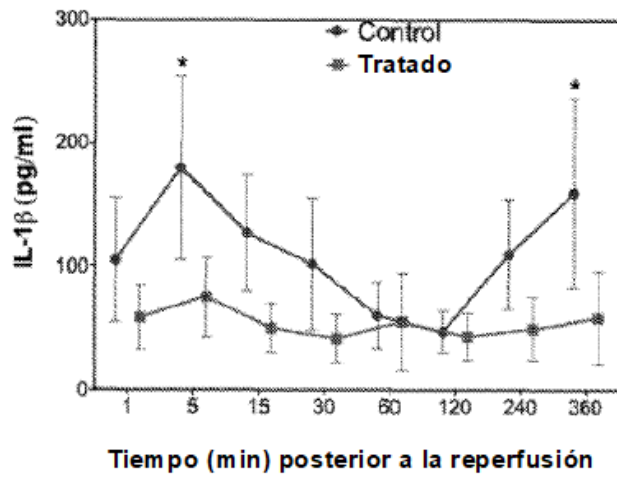
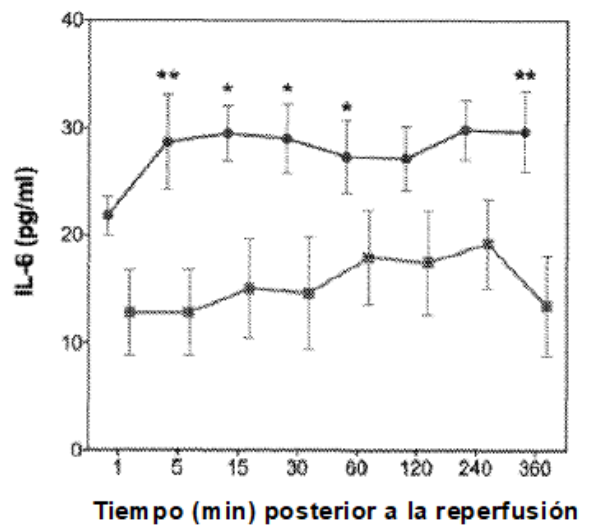


Fig. 7A

Fig. 7B



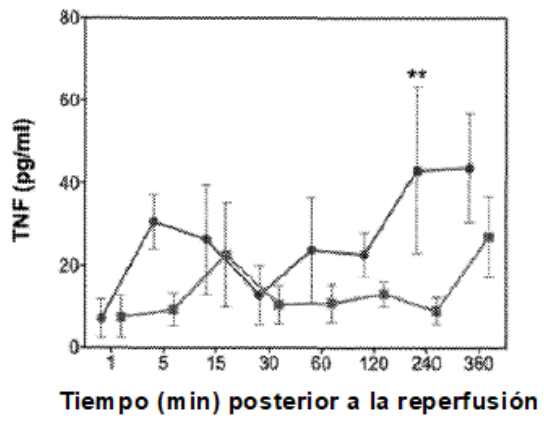


Fig. 7C

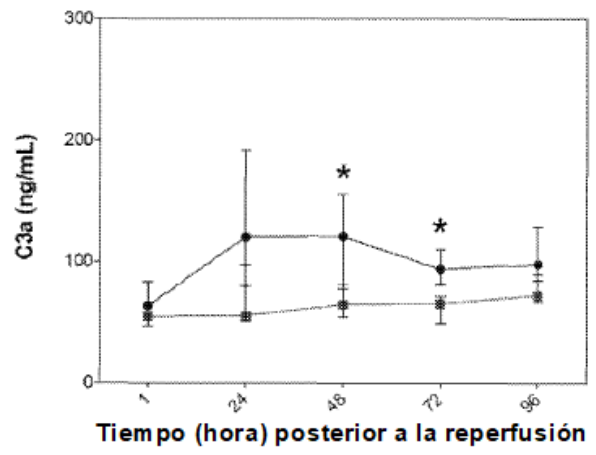


Fig. 8A

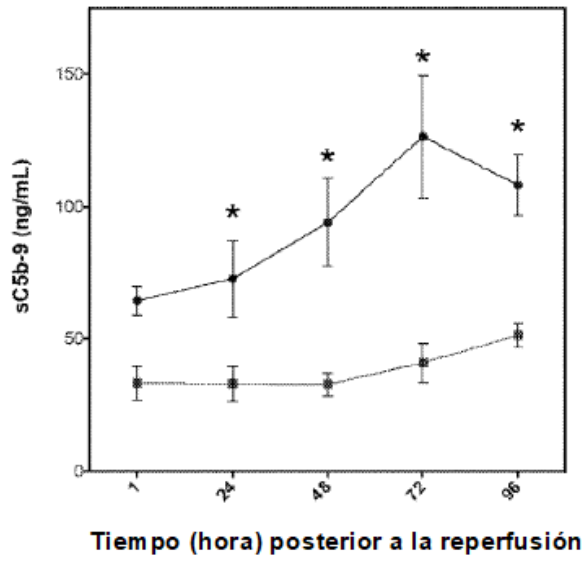


Fig. 8B

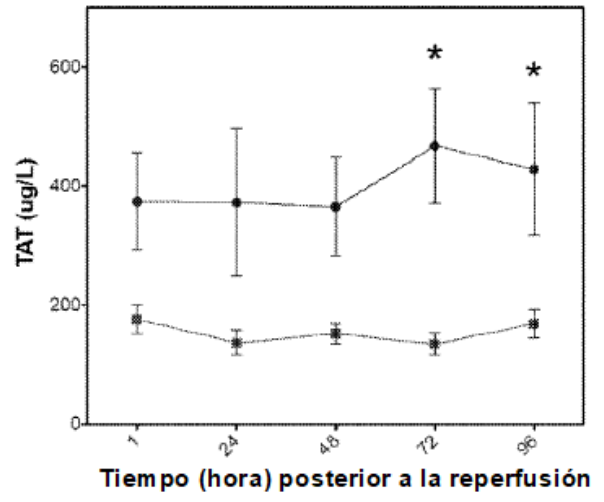


Fig. 8C

Fig. 9A

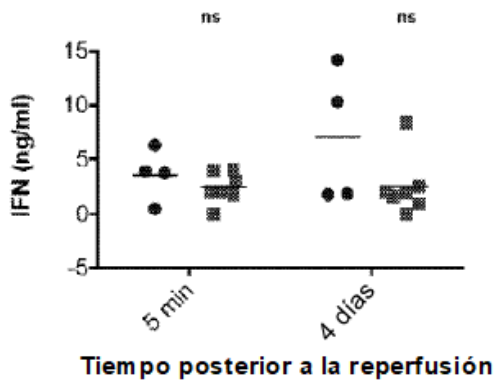


Fig. 9C

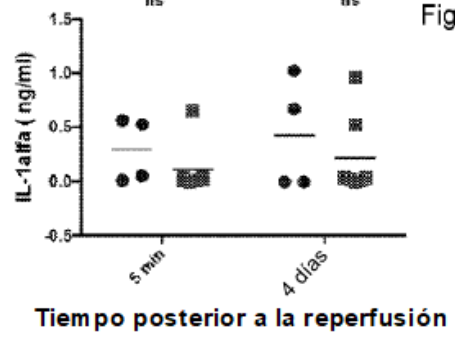


Fig. 9B

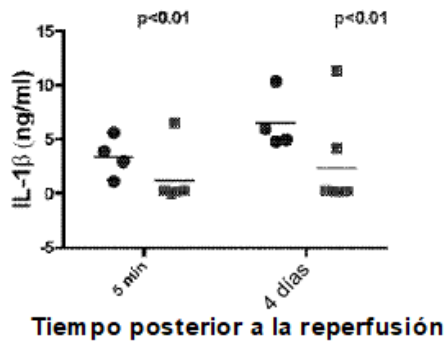
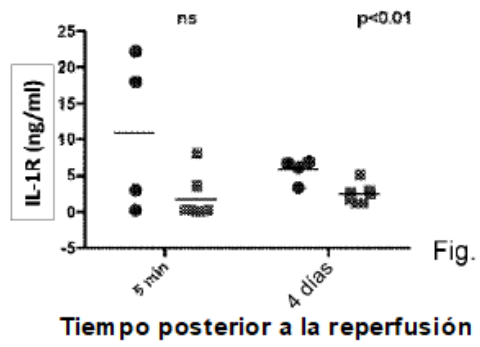


Fig. 9D



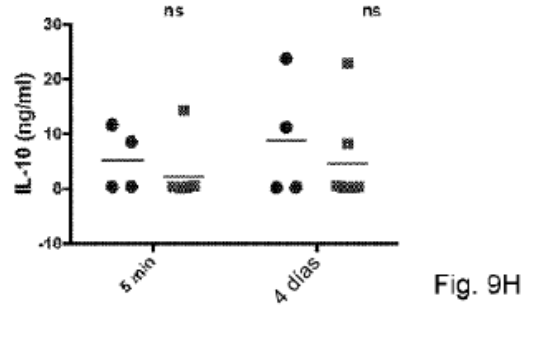
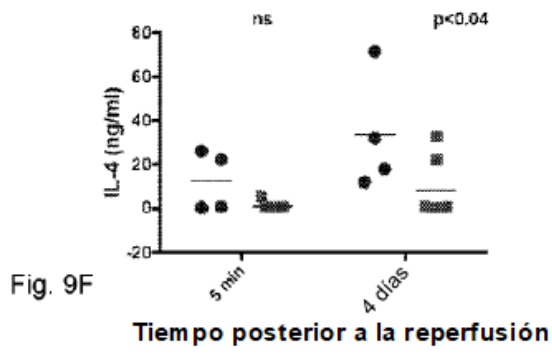
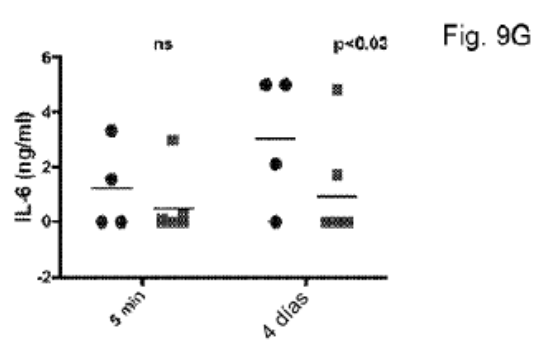
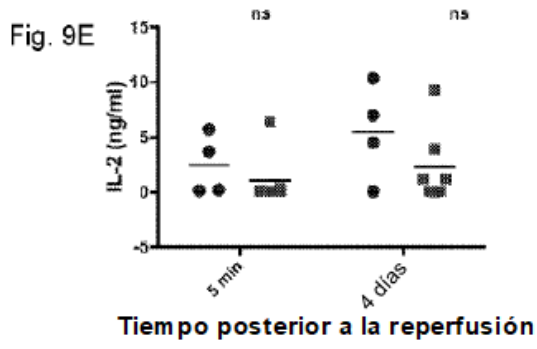


Fig. 9I

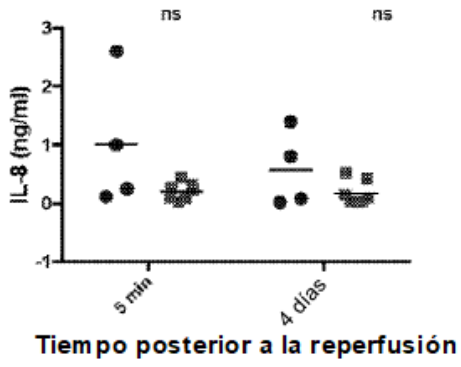


Fig. 9K

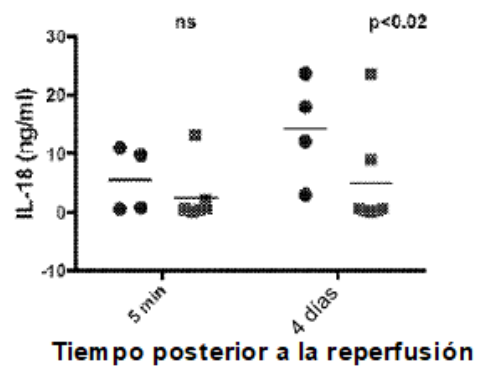


Fig. 9J

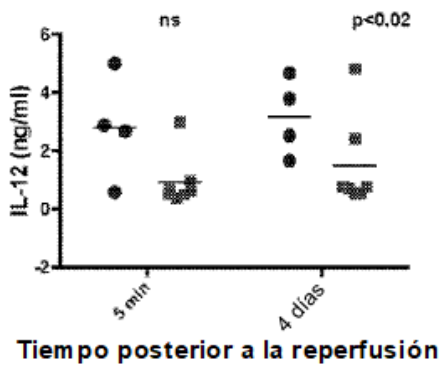
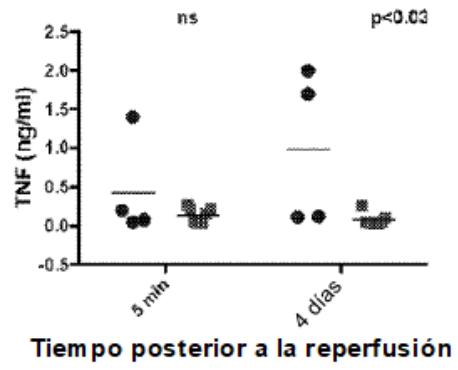


Fig. 9L



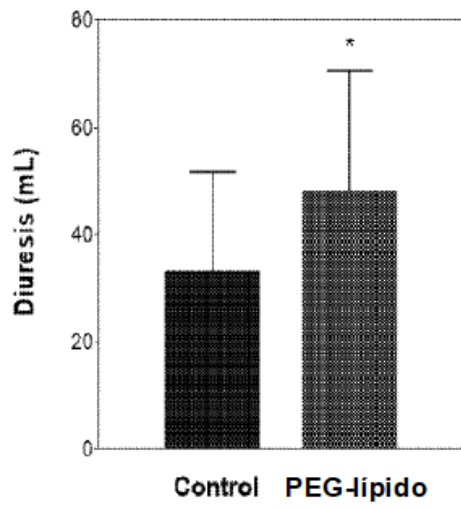


Fig. 10A

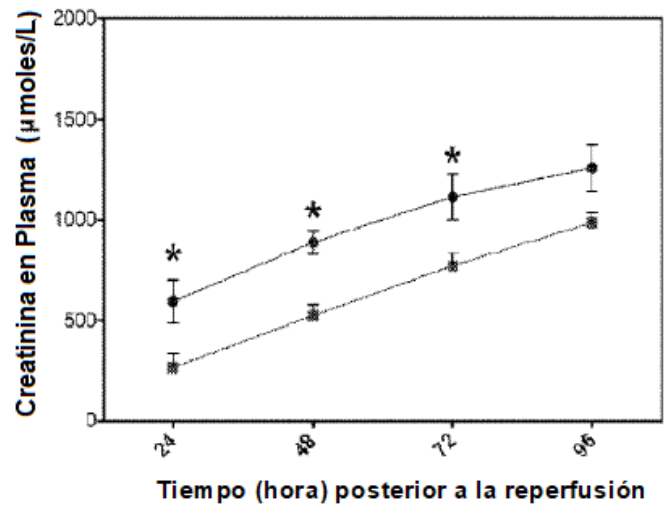


Fig. 10B

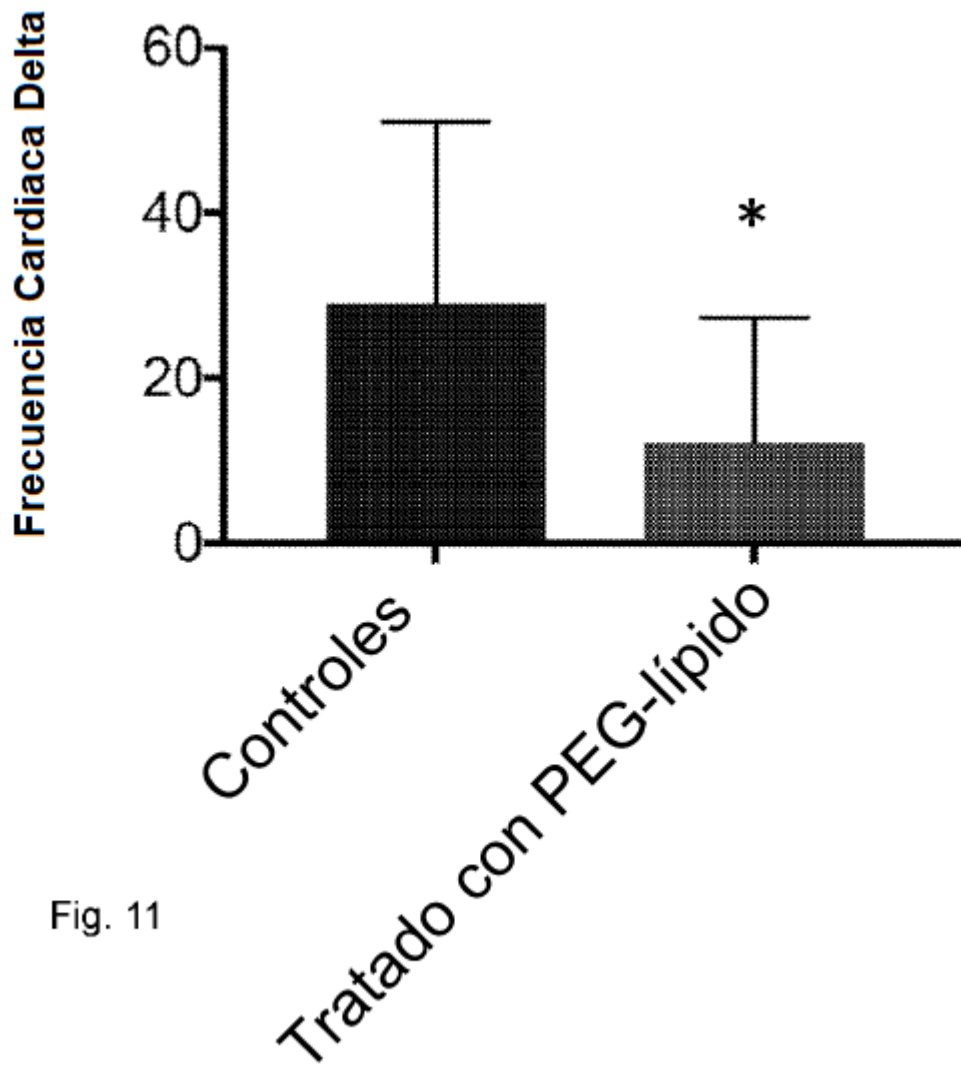


Fig. 11

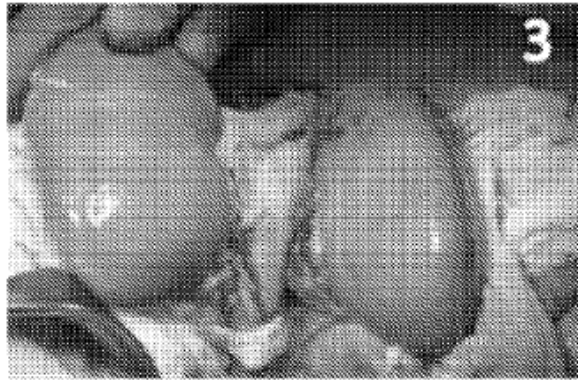
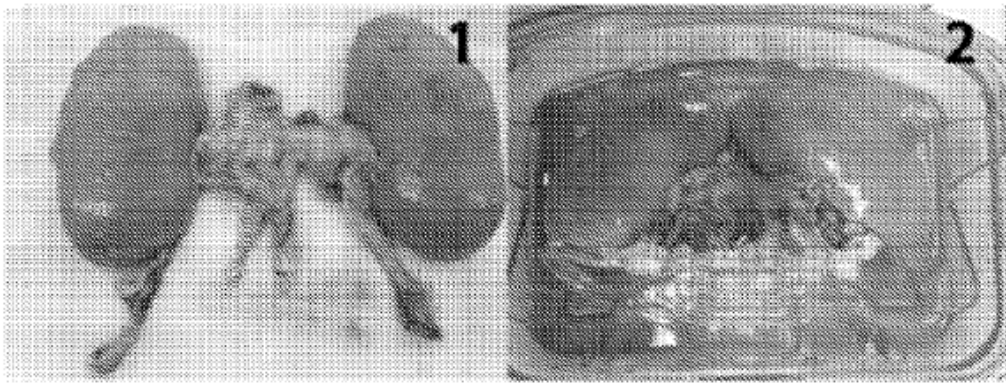


Fig. 12

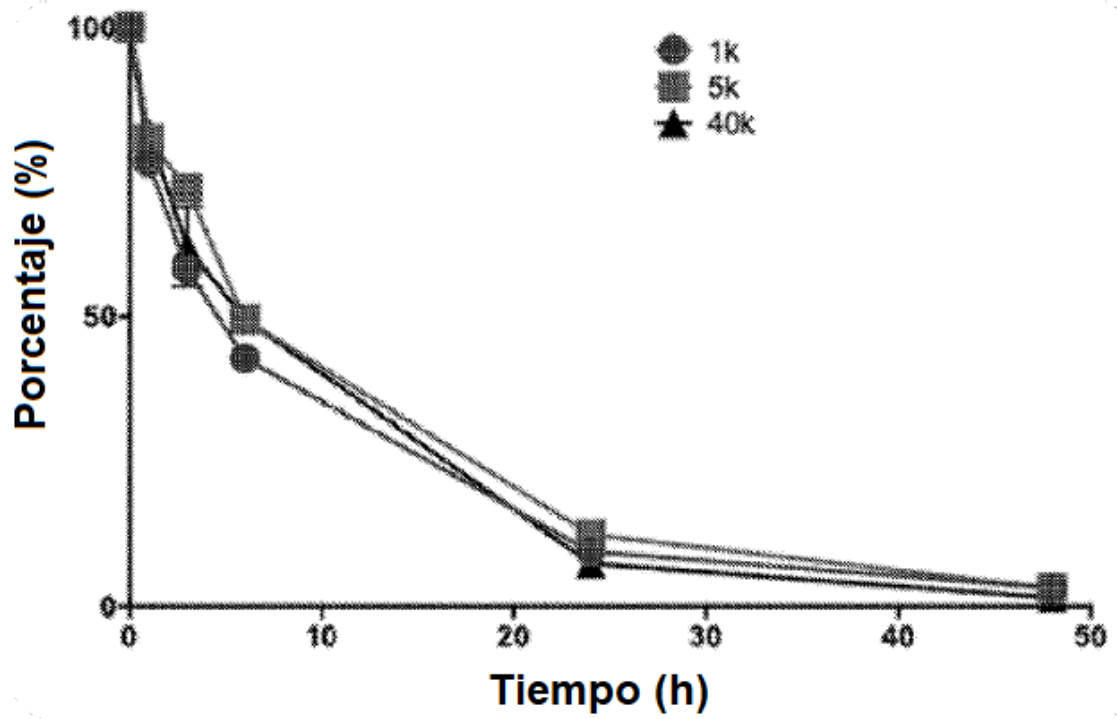


Fig. 13

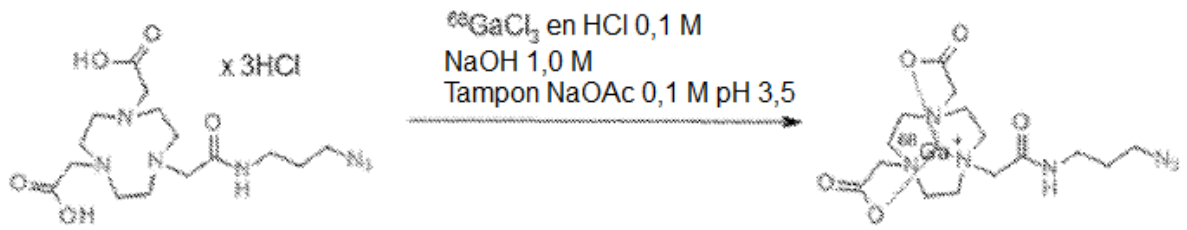


Fig. 14

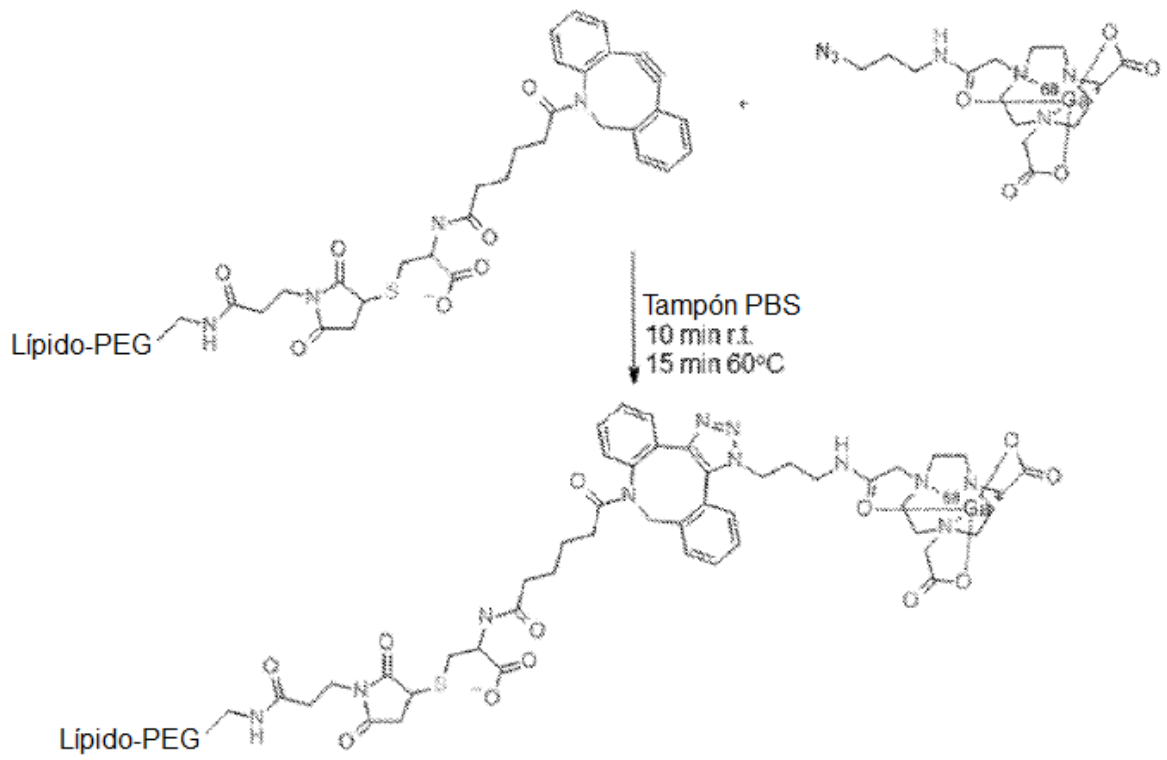


Fig. 15

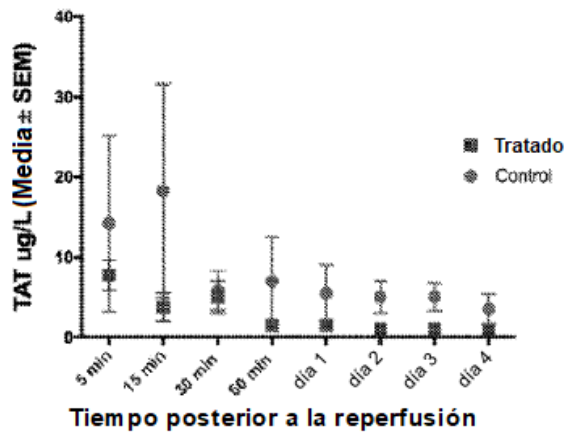


Fig. 16A

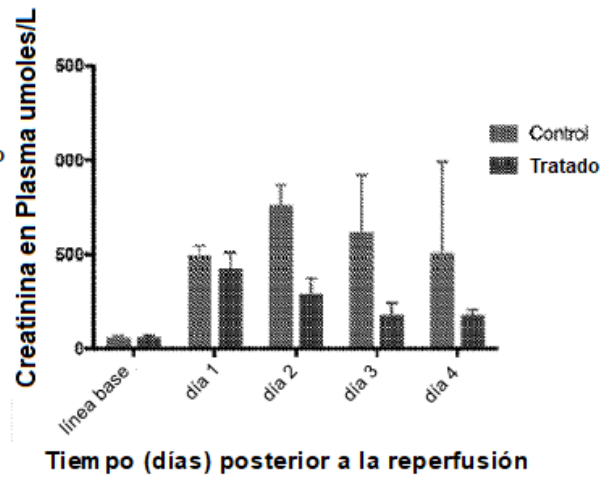


Fig. 16B

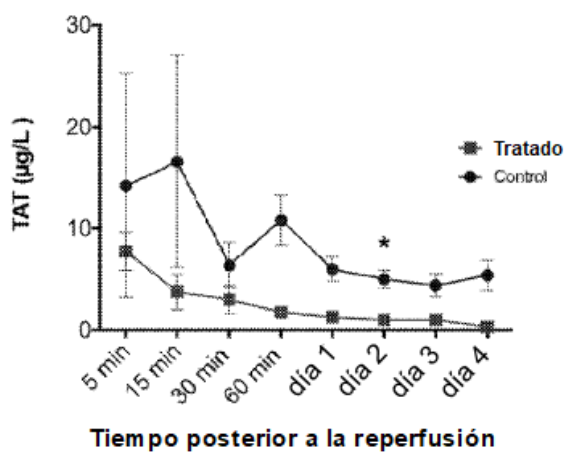


Fig. 17A

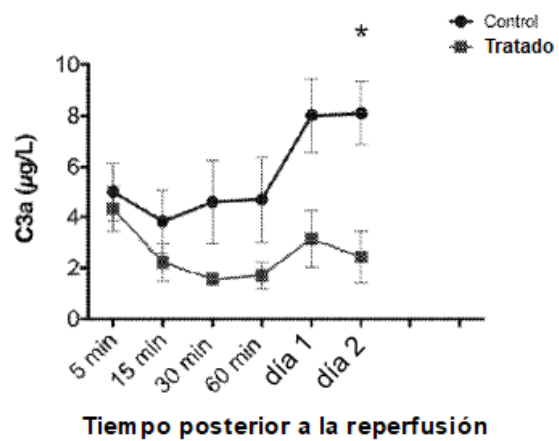


Fig. 17B

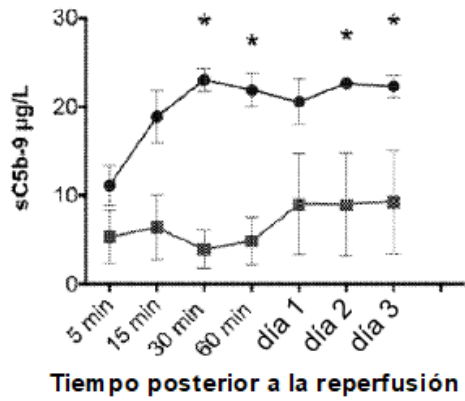


Fig. 17C

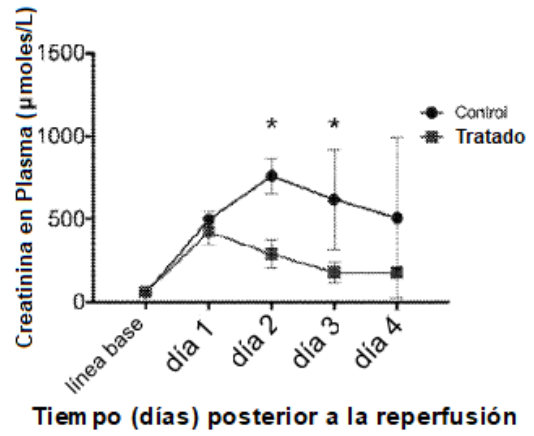


Fig. 17D

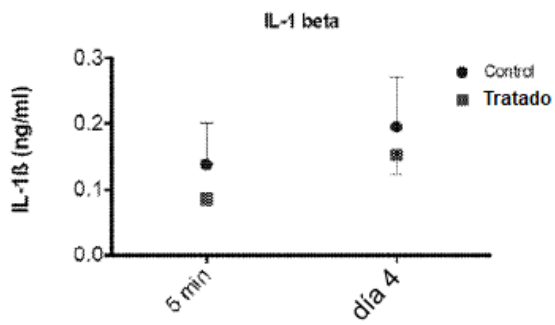


Fig. 18A

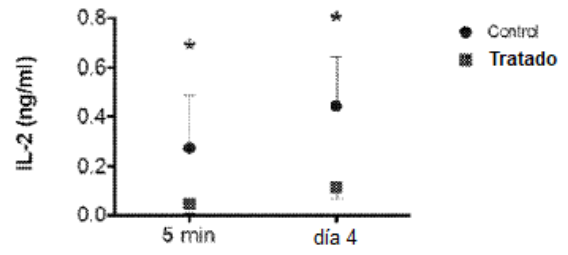


Fig. 18B

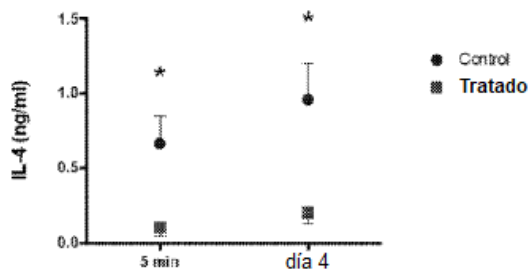


Fig. 18C

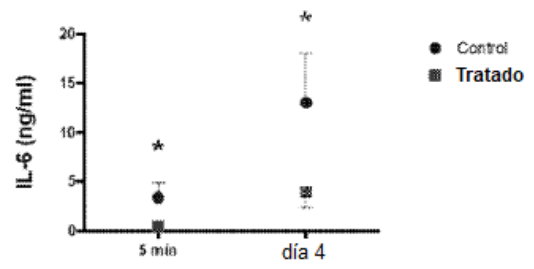


Fig. 18D

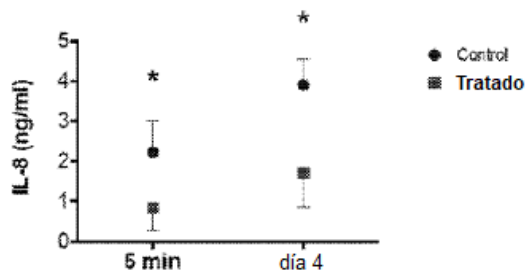


Fig. 18E

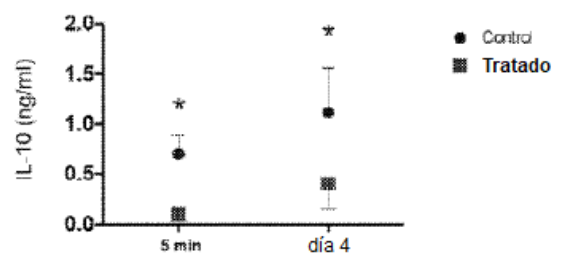


Fig. 18F

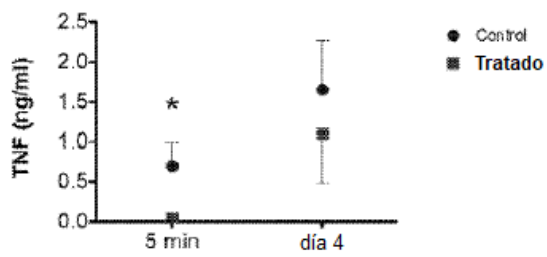


Fig. 18G

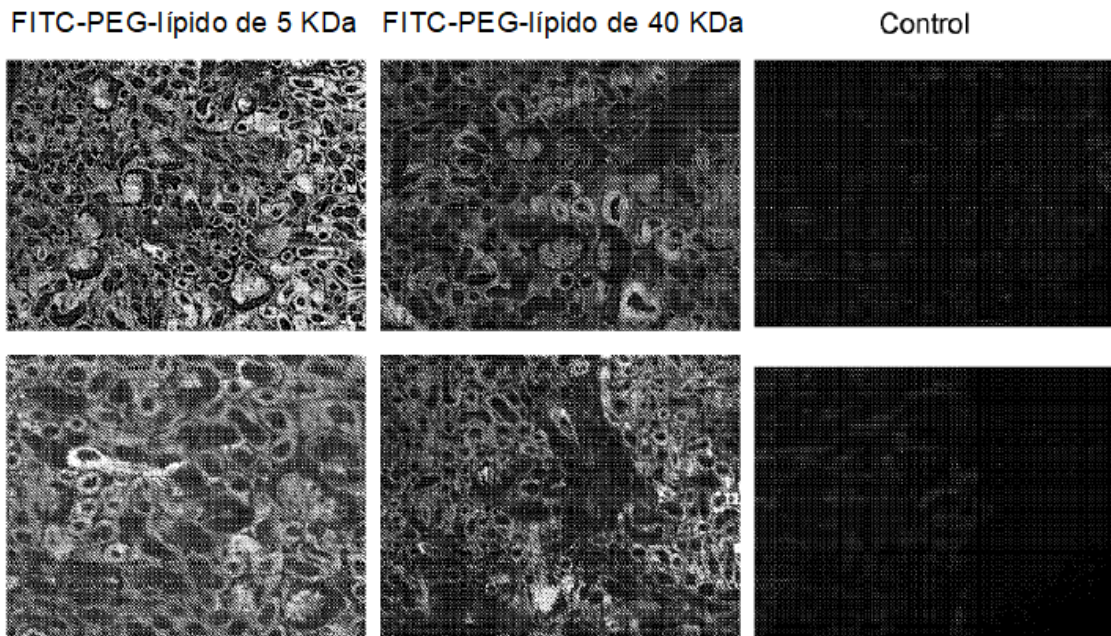


Fig. 19

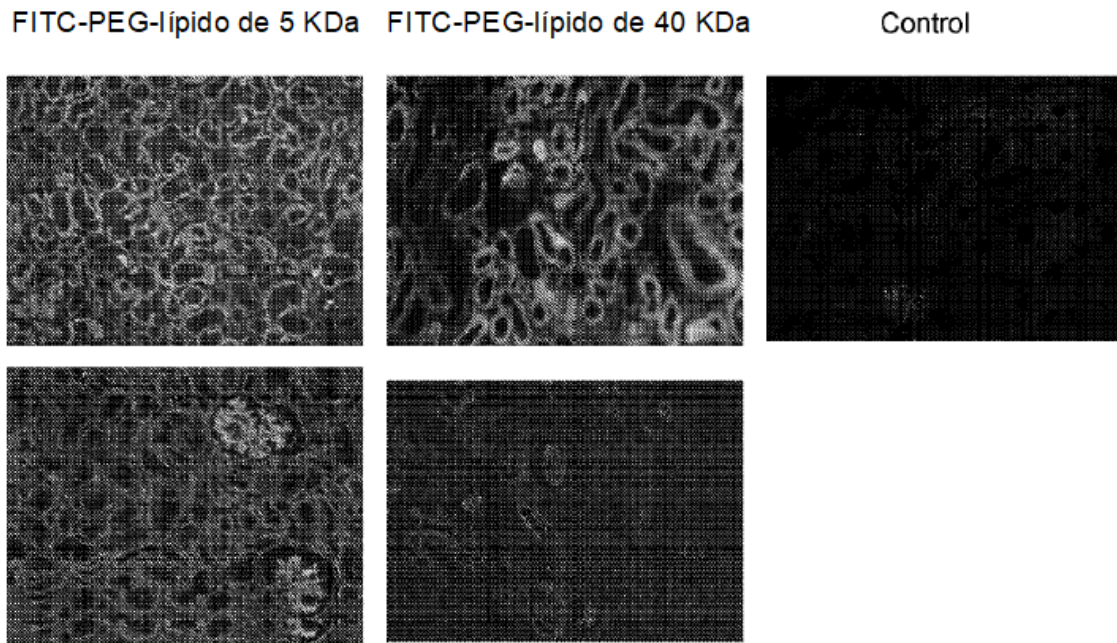


Fig. 19

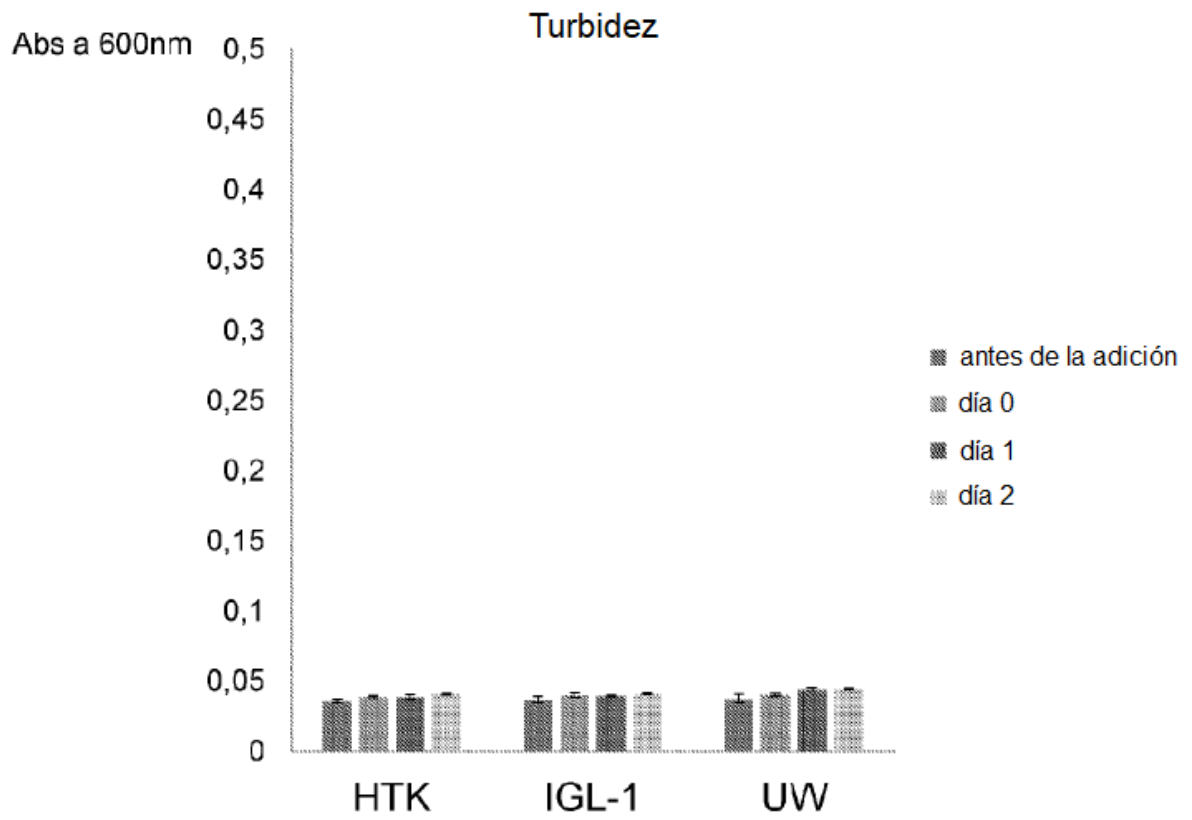


Fig. 20