

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 179**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2017 PCT/HU2017/050051**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018 WO18096376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2017 E 17829007 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2022 EP 3544420**

54 Título: **Utilización de composiciones para la conservación de órganos/tejidos**

30 Prioridad:

24.11.2016 HU 1600639

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

24.10.2022

73 Titular/es:

**SIGMADRUGS KUTATÓ KORLÁTOLT
FELELŐSSÉGŰ TÁRSASÁG (100.0%)**

**Attila út 117. V. em. 4.
1012 Budapest, HU**

72 Inventor/es:

**FEKETE, ANDREA;
VANNAY, ÁDÁM y
HOSSZÚ, ÁDÁM**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 926 179 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de composiciones para la conservación de órganos/tejidos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la utilización *ex vivo* de un compuesto agonista de receptor sigma-1 de fórmula I para la conservación de un órgano o tejido completo o parcial trasplantable.

10 Antecedentes de la invención

El trasplante de órganos es el tratamiento único o primario para varias enfermedades crónicas que resultan en una insuficiencia orgánica de estadio terminal, tal como la enfermedad renal de estadio terminal (ERET). El trasplante de órgano en estos casos se asocia a una supervivencia y calidad de vida mejoradas.

15 El aislamiento de un órgano respecto de la circulación sistémica, almacenamiento y trasplante causa profundos cambios en la homeostasis y metabolismo del órgano. La homeostasis y metabolismo alterados resultan en daños que pueden causar el deterioro del órgano, su posterior incompatibilidad con el receptor o, en el caso del riñón, un retardo en la función del injerto.

20 Los órganos típicamente se almacenan antes del trasplante (Tx) y debe conservarse su viabilidad durante el almacenamiento y transporte. Tan pronto como el órgano se separa del sistema circulatorio, resulta inevitable el daño isquémico. Tienen lugar inmediatamente procesos inflamatorios y conducen a daños estructurales y metabólicos, y finalmente, a la muerte celular. El agotamiento de las reservas energéticas celulares, que ocurre hasta tan solo unas
25 cuantas horas después del aislamiento, conduce a una deficiencia de funcionamiento de la bomba iónica, edema e hinchazón celular.

Los daños debidos a la falta de equilibrio entre el medio intracelular y el extracelular resultan más o menos abordados mediante la utilización de soluciones de conservación. Sin embargo, las soluciones de conservación varían en
30 composición; sin embargo, todas tienen el objetivo de evitar el edema celular, retrasar la destrucción celular y maximizar la función del órgano después de reestablecerse la perfusión. Puede encontrarse una comparación entre las composiciones de las soluciones de conservación en Guibert et al., Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade, Transfus. Med. Hemother. 2011;38:125-142.

35 Las soluciones de la Universidad de Wisconsin (UW) y de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK, o Custodiol) son los líquidos de conservación más ampliamente utilizados para la conservación de páncreas, corazón, riñón y pulmón con efectos comparables. Ambas han mostrado ser comparables en la conservación de hígado y riñón y también eficaces en la cirugía cardíaca. La conservación con HTK se ha asociado a un riesgo incrementado de pérdida del injerto con un tiempo de isquemia fría superior a 8 h (Stewart ZA, Cameron AM, Singer AL, Montgomery RA, Segev DL: Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK)) se asocia a una supervivencia reducida del injerto en hígados de donantes fallecidos, especialmente los donados después de la muerte cardíaca. Am. J. Transplant 2009;9:286-293.)
40

Con el fin de prolongar la viabilidad del órgano, las demandas de oxígeno y energía deben mantenerse al mínimo. El almacenamiento hipotérmico es actualmente el medio principal para conservar la viabilidad. Sin embargo, el enfriamiento mismo presenta efectos perjudiciales sobre el tejido debido a, p. ej., el estrés oxidativo y la inflamación.
45 La isquemia fría (o almacenamiento en frío) es un factor de riesgo independiente de retardo del funcionamiento del injerto y de disfunción del órgano primario (Erkasap S, Ates E. L-Arginine-enriched preservation solution decreases ischaemia/reperfusion injury in canine kidneys after long term cold storage. Nephrology Dialysis Transplant 2000; 15: 1224-7). Castaneda et al. han demostrado que los trasplantes renales de cadáveres humanos presentan significativamente más células apoptóticas que los trasplantes de donantes vivos. El grado de apoptosis se correlaciona significativamente con la duración de la isquemia fría (Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia reperfusion injury. Transplantation 2003; 76: 50-54). Jani et al. han demostrado en un modelo porcino de donación después de la muerte circulatoria (DMC), la isquemia caliente preferentemente activa la caspasa-1, mientras que la isquemia fría activa la caspasa-3 (Jani A, Zimmerman M, Martin J, Lu L, Turkmen K, Ravichandran K, Pacic A, Ljubanovic D, Edelstein CL. Perfusion storage reduces apoptosis in a porcine kidney model of donation after cardiac death. Transplantation. 91:169-175, 2011). Varios autores han demostrado que órganos de donantes con criterios ampliados y donantes en asistolia controlada resultan particularmente susceptibles a lesiones durante la conservación hipotérmica y podrían beneficiarse de métodos alternativos de conservación (Stubenitsky et al., Kidney preservation in the next millenium
55 Transpl. Int. (1999) 12:83-91). Algunos autores defienden el cambio a la conservación normotérmica, no sólo para evitar daños adicionales por almacenamiento en frío, sino también para mantener los mecanismos de reparación celular. Se ha sugerido que las proteínas de choque término desempeñan un papel clave en la prevención de los resultados isquémicos (Moers et al., Non-heart beating organ donation: overview and future perspectives Transplant International doi:10.1111/j.1432-2277.2007.00455.x)
60

65 La opción principal de tratamiento por reemplazamiento renal para la ERET es el trasplante renal (TxR), que se asocia

a una supervivencia y calidad de vida mejoradas. En una revisión reciente de 110 estudios que incluye prácticamente 2 millones de participantes con insuficiencia cardiaca, se asocia el TxR con un riesgo reducido de mortalidad y de sucesos cardiovasculares, así como una mejor calidad de vida que el tratamiento con diálisis crónica.

5 Aunque el número de trasplantes de riñón no ha cambiado en la última década, el número total de pacientes que viven con un trasplante renal funcional continúa creciendo (US Renal Data System Annual Report 2015). La supervivencia del injerto a un año es de 97 % para el donante vivo y de 92 % para los receptores de trasplante de donantes fallecidos.

10 Los trasplantes de donantes vivos presentan resultados superiores, ya que estos donantes habitualmente son más jóvenes y saludables. El tiempo de isquemia fría puede reducirse marcadamente también, ya que estos trasplantes pueden planificarse por adelantado. La supervivencia del injerto puede mejorarse adicionalmente realizando un trasplante preventivo, realizando el trasplante en el momento en que el receptor se encuentra en un estado médico y social óptimo. Aparte de las ventajas evidentes del trasplante de donante vivo, siempre debe considerarse también el posible daño a una persona saludable.

15 Aproximadamente un tercio de los trasplantes de riñón son de donantes vivos en los EE. UU., mientras que este número es de tan solo aproximadamente 12 % en Hungría. Hungría se unió a la Eurotransplant Foundation en 2012. Es una red de 8 países con el objetivo de mediar y mejorar la asignación y distribución de órganos de donantes para el trasplante.

20 Aunque los resultados a corto plazo de los TxR han mejorado sustancialmente gracias a los avances en las técnicas quirúrgicas y la inmunosupresión, los resultados a largo plazo en gran medida se han mantenido sin cambios a lo largo de las últimas décadas. Los factores que afectan al resultado a largo plazo pueden ser dependientes del aloantígeno (p. ej., la compatibilidad de HLA, la inmunización de HLA, etc.) o independientes del aloantígeno (p. ej., el tipo de donante y la edad de tanto donante como receptor), la recurrencia de la enfermedad, las comorbilidades o el tiempo en diálisis). Entre los factores independientes de aloantígenos, la isquemia/daño por reperfusión (IDR) es una complicación grave que presenta una influencia especial sobre la supervivencia a largo plazo tras el TxR. La IDR es inevitable y la duración del almacenamiento y el tiempo de isquemia fría se correlacionan con un retraso en el funcionamiento del injerto.

25 *Tratamiento:* Aunque el régimen efectivo de inmunosupresión es la clave para un trasplante con éxito, los inmunosupresores también presentan varios efectos no deseables sobre el riñón. Pueden provocar o reactivar infecciones (p. ej., el virus BK del poliooma grave, el citomegalovirus y los virus herpes que resultan en nefritis intersticial o infecciones del tracto urinario, etc.). Los inhibidores de la calcineurina (tacrolimus y ciclosporina-A) son nefrotóxicos, al causar una vasoconstricción persistente, fibrosis intersticial y atrofia tubular que puede conducir eventualmente a una disfunción crónica del injerto. Principalmente debido a los esteroides, tacrolimus y los inhibidores de mTOR, aproximadamente un cuarto de los pacientes de TxR desarrollan diabetes mellitus (DM) postrasplante "de novo", que puede conducir a DNP y disfunción del injerto. Por todos estos motivos, el control estrecho y continuo del protocolo de inmunosupresión resulta de especial interés durante la atención nefrológica postrasplante.

30 El tiempo de conservación segura de la viabilidad de un órgano trasplantable depende del órgano, del método de conservación y de la solución utilizada, y de la condición del órgano. La prolongación del tiempo de conservación (en caliente o en frío) es de importancia primordial.

35 Klouz et al. ha encontrado que la BHDP (N-bencil-N'-(2-hidroxi-3,4-dimetoxibencil)-piperazina), un ligando de sigma-1, protege las funciones mitocondriales al administrarla en ratas o al utilizarse en el líquido de conservación del hígado aislado (Kloutz et al. Protection of cellular and mitochondrial functions against liver ischemia by N-benzyl-N'-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl)-piperazine (BHDP), a sigma1 ligand. Eur. J. Pharmacol. 578 (2008) 292-299.). No se ha investigado si BHDP actúa como un agonista o un antagonista. Los autores sugieren que BHDP protege a las células hepáticas y, en particular, las mitocondrias, y plantean la hipótesis de que ello podría estar relacionado con la acción de la BHDP sobre los receptores de sigma-1 mitocondriales; sin embargo, admiten que se requieren más estudios para validar o rechazar esta hipótesis. Los autores no sugieren que BHDP deba utilizarse en soluciones de conservación de órganos, sino un programa completo de investigación que valide o rechace su hipótesis. Además, Klouz et al. no han llevado a cabo ningún trasplante.

40 Los documentos nº WO2010/077200, nº WO2010/077201, nº US6245781, nº WO2015/118365 y nº WO1995/32991 dan a conocer la utilización *in vivo* de determinados compuestos, incluyendo agonistas de S1R, sin sugerir la utilización *ex vivo* de los mismos. Los documentos nº WO2011/142705 y nº WO2013/051977 dan a conocer una solución de conservación para órganos recolectados, que comprende cocaína. El documento nº WO2011/003129 describe la administración de lamotrigina en un donante o receptor de órgano para el tratamiento de un órgano que debe trasplantarse. El documento nº WO2008/144021 da a conocer la utilización *ex vivo* de dextrometorfano (agonista de S1R) como una sustancia de control en un método para validar los resultados de ensayo de sustancias utilizando un órgano extraído.

65 Inesperadamente se ha encontrado que los compuestos agonistas de S1R, utilizados *ex vivo* en la solución de conservación de un órgano trasplantable, prolongan el tiempo de supervivencia del órgano y protegen frente a daños

funcionales y celulares en dicho órgano, según indica una función e integridad celular mejorados después del autotrasplante de dicho órgano.

Breve descripción de la invención

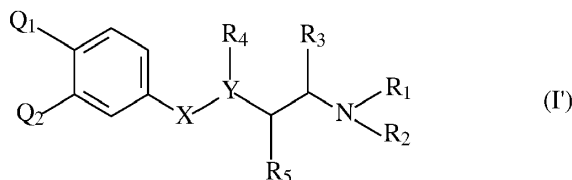
5

La invención se define mediante las reivindicaciones.

La invención se refiere a la utilización *ex vivo* de un compuesto (S1R) agonista de receptor sigma-1 de fórmula I para la conservación de un órgano o tejido, completo o parcial, trasplantable,

10

en el que el compuesto agonista de S1R presenta la fórmula I' a continuación:

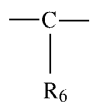


en la que:

15

Q₁ es H, halógeno, pseudohalógeno, alquilo C(1-4) sustituido opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos, alcoxi C(1-3)alcoxi, arilo C(6-10), sustituidos opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos,
 Q₂ es H, halógeno, pseudohalógeno o alcoxi C(1-3),
 X es O, CH₂, etileno o carbonilo (CO), amida,
 o X presenta la fórmula:

20

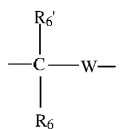


en la que:

25

R₆ se selecciona del grupo que consiste en un hidroxilo, alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(-13) y alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-2), alquilo C(1-6) o alcóxialquilo C(1-6), preferentemente alcóxialquilo C(1-4), arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),
 o X presenta la fórmula:

30

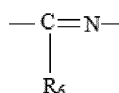


en la que:

35

W es -CH- o carbonilo (-CO-) o W no se encuentra presente, y
 R₆ y R₆ son alquilos C(-16) sustituidos independientemente o no sustituidos, preferentemente alquilo C(1-3), alquilo C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcóxialquilo C(1-6), preferentemente alcóxialquilo C(1-4), alquilo C(1-6), preferentemente alquilo C(1-6), preferentemente alquilo C(1-6), preferentemente alquilo C(1-6) o por lo menos uno de entre R₆ y R₆, preferentemente R₆' es un arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),
 o R₆ y R₆' juntos forman un cicloalquilo C(4-7), preferentemente un cicloalquilo C(4-7), preferentemente un cicloalquilo C(4-7), preferentemente un cicloalquilo C(4-7),
 o X presenta la fórmula:

40



en la que:

45

R₆ se selecciona de un alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(1-3), alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-6) alquilo C(1-6) o alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6) o alcóxialquilo C(1-6) o arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),
 Y es CH, N, O o -O-CH₂CH₂O-,

50

en la que:

en el caso de que Y sea O, entonces R₄ no se encuentra presente,

en el caso de que Y sea N, entonces R₄ es H, o un alquilo C(1-3) o alqueno C(1-3), preferentemente etilo o propenilo, o R₄ y R₁ junto con Y, N y los átomos de carbono entre ellos forman un anillo heterocíclico C(5-7),

en el caso de que Y sea CH, entonces R₄ se selecciona de entre H, alquilo C(1-4) sustituido o no sustituido, alcoxi C(1-4) y arilo C(5-10), o R₄ y R₁ junto con Y, N y los átomos de carbono entre ellos forman un anillo heterocíclico C(5-7),

R₃ se selecciona de entre H, un alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(1-4), alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-4), alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6) o alcoxilalquilo C(1-6), arilo C(5-10), o R₃ y R₆ junto con la fracción -Y-alquilo C2 a la que se encuentran unidos, pueden formar un arilo policíclico C(7-14) sustituido o no sustituido o heteroarilo policíclico C(7-14) o cicloalquilarilo C(7-14), o R₃ y R₆ junto con la fracción -X-Y-alquilo C2 a la que se encuentran unidos, pueden formar un cicloalquilo de 6 a 8 elementos saturado o parcialmente insaturado, o un heterocicloalquilo de 6 a 8 elementos que comprende 0 a 3 heteroátomos, o un alquilarilo, que comprende preferentemente un fenilo sustituido o no sustituido,

R₅ es H o alquilo C(1-3) o alquiloxi C(1-3), o

R₅ y R₆ junto con los átomos de carbono a los que se encuentran unidos forman un anillo de 3, 4, 5 o 6 elementos, saturado o insaturado, preferentemente saturado, en el que dicho anillo comprende opcionalmente un heteroátomo, preferentemente O, en el que dicho anillo es preferentemente furanilo, dihidrofuranilo o tetrahidrofuranilo, en el que preferentemente Y no se encuentra presente,

R₁ y R₂ son, independientemente, H o un alquilo C(1-6), preferentemente metilo o etilo, o

R₁ y R₂ forman un anillo de 5 o 6 elementos, saturado o insaturado, preferentemente saturado, en el que dicho anillo comprende opcionalmente un heteroátomo, preferentemente O, preferentemente una oxazina o morfolina, o alternativamente N, preferentemente un anillo diazina o piperazina, o

dicho anillo es un anillo piperidina opcionalmente sustituido o no sustituido, preferentemente un anillo piperidina sustituido con uno o dos de entre OH y metoxi, y fenilo, preferentemente un fenilo sustituido con un halógeno en la posición para, en el que dichos sustituyentes preferentemente se encuentran en la posición para del anillo piperidina,

o R₁ es un alqueno C(2-4), preferentemente alqueno C(2-3) o alqueno C(3-4), y junto con Y y N y los átomos de carbono entre Y y N forman un anillo heterocíclico, preferentemente una piperazina, y R₂ es un alquilo C(1-6), preferentemente alquilo C(1-4), arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6) o aralquilo C(7-10),

o R₂ es un alqueno C(2-4), preferentemente alqueno C(2-3) o alqueno C(3-4) y junto con el N forman un anillo heterocíclico, preferentemente un tetrahidrotetrazol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Los agonistas del receptor sigma-1 (S1R) mejoran la función renal inducida por el autotrasplante renal (ATx).

(A) Los niveles séricos de creatinina en ratas operadas simuladamente (SHAM) o tras 24 horas de reperfusión en ratas autotrasplantadas y tratadas con vehículo (ATx VEH), ratas autotrasplantadas y tratadas con agonista de S1R-fluvoxamina (Atx FLU) y ratas autotrasplantadas y tratadas con agonista de S1R SA-4503 (Atx SA). (B) Niveles sanguíneos de nitrógeno en urea (NUS) tras 24 horas de reperfusión. (C) Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) tras 24 horas de reperfusión. +++*p*<0.05 versus SHAM; **p*<0.05 versus ATx VEH; ***p*<0.01 versus ATx VEH; n=6 a 8 en cada grupo.

Figura 2. El agonismo de S1R reduce el daño tubular inducido por el ATx.

Expresión de ARNm de la molécula-1 de daño renal (*Kim1*) normalizada respecto a la expresión de la β-actina (*Actb*) en ratas operadas simuladamente (SHAM) o tras 24 horas de reperfusión en ratas autotrasplantadas y tratadas con vehículo (ATx VEH), autotrasplantadas y tratadas con fluvoxamina (ATx FLU) y autotrasplantadas y tratadas con SA-4503 (ATx SA). (B) Expresión de ARNm de lipocalina (*Lcn2*) asociada a gelatinasa de neutrófilos renales normalizada respecto a la expresión de β-actina. (C) Dilatación tubular en el riñón. (D) Imágenes representativas de la dilatación de la luz tubular en secciones renales teñidas con PAS. Las líneas rojas muestran los diámetros tubulares, ampliación de 200x, barra de escala=50 μm. +++*p*<0.001 versus SHAM; ***p*<0.01 versus ATx VEH; ***p*<0.001 versus ATx VEH; n=6 a 8 en cada grupo.

Figura 3. El agonismo de S1R reduce la apoptosis inducida por ATx en el riñón.

Proporción entre células apoptóticas positivas para Tunel en ratas operadas simuladamente (SHAM) o tras 24 horas de reperfusión en ratas autotrasplantadas y tratadas con vehículo (ATx VEH) y ratas autotrasplantadas y tratadas con fluvoxamina (ATx FLU). (B) Expresión de ARNm renal de *Bax* proapoptótico normalizado respecto a la expresión de ARN ribosómico 18s (*Rn18s*). (C) Expresión de ARNm renal de *Bcl2* antiapoptótico normalizado respecto a la expresión de ARN 18s. (D) Imágenes representativas de secciones de riñón tenidas con Tunel. La tinción marrón positiva para Tunel de núcleos muestra las células apoptóticas, ampliación: 200x, barra de escala=100 μm. +++*p*<0.001 versus SHAM; **p*<0.05 versus ATx VEH; n=6 a 8 en cada grupo.

Figura 4. Efecto del agonismo de S1R sobre la respuesta inflamatoria inducida por el ATx en el riñón.

Número de linfocitos CD45⁺ infiltrados en las regiones corticomedulares del riñón en ratas operadas simuladamente (SHAM) o tras 24 horas de reperfusión en ratas autotrasplantadas y tratadas con vehículo (ATx VEH) y ratas autotrasplantadas y tratadas con fluvoxamina (ATx FLU). (B) Imágenes inmunohistoquímicas representativas de linfocitos CD45⁺ infiltrados en las regiones corticomedulares. La tinción marrón muestra los linfocitos CD45⁺, ampliación de 200x, barra de escala=100 µm. ****p*<0.001 versus SHAM; **p*<0.01 versus ATx VEH; n=6 a 8 en cada grupo.

Figura 5. Efecto del agonismo de S1R sobre la respuesta inflamatoria inducida por el ATx en el riñón.

Expresión de ARNm de proteína-1 quimioatrayente de monocitos renales (Mcp1) normalizada respecto a la expresión de ARNr 18s en ratas operadas simuladamente (SHAM) o tras 24 horas de reperfusión en ratas autotrasplantadas y tratadas con vehículo (ATx VEH), y ratas autotrasplantadas y tratadas con fluvoxamina (ATx FLU). (B) Expresión de ARNm de interleuquina-6 renal (*IL6*) normalizada respecto a la expresión de ARNr 18s. (C) Expresión de ARNm de interleuquina-1a renal (*IL1a*) normalizada respecto a la expresión de ARNr 18s. (D) Expresión de ARNm del factor-α de necrosis tumoral (*Tnf*) renal normalizada respecto a la expresión de ARNr 18s. (E) Expresión de ARNm de interleuquina-10 renal (*IL10*) normalizada respecto a la expresión de ARNr 18s. (F) Expresión proteica renal de IL-1α. (G) Expresión proteica renal de TNF-α. (H) Expresión proteica renal de IL-10. **p*<0.05 versus SHAM; ***p*<0.01 versus SHAM; ****p*<0.001 versus SHAM; **p*<0.05 versus ATx VEH; ***p*<0.01 versus ATx VEH; n=6 a 8 en cada grupo.

Figura 6. La solución de conservación que contiene agonistas de S1R mitiga el daño tubular inducida por isquemia fría.

(A) Expresión renal de ARNm de *Kim1* normalizada respecto a la expresión de ARNr 18s en los grupos siguientes: riñones sometidos a 2 horas de perfusión fría (2 h, PF); 2 horas de perfusión fría con solución de conservación que contiene fluvoxamina (2 h PF+FLU); 2 horas de perfusión fría con solución de conservación que contiene SA-4503 (2 h PF+SA); 2 horas de perfusión fría con solución de conservación que contiene el agonista de S1R PRE-084 (2 h PF+PRE); 2 horas de perfusión fría con solución de conservación que contiene FLU y el antagonista de S1R NE100 (2 h PF+FLU+NE100); 2 horas de perfusión fría con solución de conservación que contiene NE100 (2h CP+NE100) y 3 horas de perfusión fría con solución de conservación que contiene FLU (3h CP+FLU). **p*<0.05 versus 2 h PF; **p*<0.001 versus 2 h PF (B) Dilatación tubular en el riñón. **p*<0.05 versus 2 h PF Custodiol; **0.01 versus 2 h PF Custodiol; ***0.001 versus 2 h PF Custodiol; #*p*<0.05 versus 3 h PF Custodiol; ###*p*<0.001 versus 3 h PF Custodiol; \$\$\$*p*<0.001 versus 8 h PF Custodiol; \$\$\$*p*<0.01 versus 24 h PF Custodiol; n=6 en cada grupo.

Figura 7. Las soluciones de conservación que contienen agonistas de S1R mitigan la apoptosis inducida por isquemia fría en el riñón.

(A) Niveles de proteína de caspasa-3 escindida en riñones sometidos a 2 horas de perfusión fría con solución de Custodiol (2 h PF Cust); 2 horas de perfusión fría con solución de Custodiol que contiene fluvoxamina (2 h PF Cust+FLU); 2 horas de perfusión fría con solución salina (2 h PF solución salina); 2 horas de perfusión fría con solución salina que contiene FLU (2 h PF solución salina+FLU); 2 horas de perfusión fría con solución Hypothermosol (2 h PF HT); 2 horas de perfusión fría con solución de HT que contiene FLU (2 h PF HT+FLU). (B) Expresión de ARNm de *Bcl2* antiapoptótico normalizada respecto a la expresión de ARNr de 18s. **p*<0.05 versus 2 h PF; **p*<0.05 versus 2 h PF solución salina, n=6 en cada grupo.

Figura 8. Diseño experimental del autotrasplante renal.

Figura 9. Secciones de hígado teñidas con HE tras 8 h de isquemia fría. Las flechas negras señalan las vacuolas citoplasmáticas. Ampliación: 400x, barra de escala=50 µm. (A) Custodiol, (B) Custodiol que contiene SA4503 0,003 mg/ml, (C) Custodiol que contiene FLU 0,003 mg/ml y (D) Custodiol que contiene PRE-084 0.003 mg/ml.

Descripción detallada de la invención

La conservación del órgano resulta necesaria en la mayoría de casos de trasplante para mantener la viabilidad del órgano del donante durante la recuperación y hasta el momento del trasplante. El almacenamiento se caracteriza por estrés oxidativo, niveles reducidos de NO y la resultante vasoconstricción, una tendencia incrementada a la agregación plaquetaria, adhesión de los monocitos, activación de los leucocitos, edema, degradación membranal y en última instancia, la muerte celular en forma de necrosis y apoptosis. Se ha encontrado que la apoptosis es un factor limitante significativo del almacenamiento, especialmente el tiempo de almacenamiento en frío. La apoptosis incluye cambios morfológicos claros, tales como la formación de ampollas en las células ("blebbing"), contracción celular, fragmentación del núcleo, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN cromosómico y degradación global del ARNm. Se altera la regulación del pH y se incrementa la generación de oxígeno derivado de radicales libres, que

a su vez perjudica los mecanismos de defensa celular y sistémica. Se reconoce que el enfriamiento incrementa todavía más la susceptibilidad de células ya dañadas por la isquemia caliente, produciendo radicales libres, y atenúa los mecanismos naturales de defensa mediante los que las células normalmente se enfrentan a un nivel bajo de producción de radicales libres en el metabolismo.

5 El choque térmico del aislamiento respecto de la circulación y el posterior almacenamiento en frío inducen proteínas de estrés. Se ha mostrado que el almacenamiento en frío incrementa la proteína caspasa-3, la actividad de la caspasa-3 y la apoptosis de las células tubulares en el riñón (Jani et al., Caspase Inhibition Prevents the Increase in Caspase-3, -2, -8 and -9 Activity and Apoptosis in the Cold Ischemic Mouse Kidney *Am J Transplant* 4 (8) 1246-1254, 2004),
10 mientras que la isquemia caliente antes de la conservación en frío incrementa la actividad de la caspasa-1 (Jani et al. *Perfusion storage reduces apoptosis in a porcine kidney model of donation after cardiac death. Transplantation*. 27 de enero, 2011;91(2):169-75.).

15 La conservación potencia las respuestas inflamatorias ya presentes durante la isquemia caliente.

Los órganos procedentes de donantes de criterios ampliados son todavía más susceptibles a la conservación y a la isquemia. Aproximadamente el 80 % de los trasplantes proceden de donantes fallecidos, en los que el tiempo de isquemia fría es un factor de riesgo más significativo de retraso de la función del injerto. Por lo tanto, la duración del almacenamiento en frío debe mantenerse al mínimo.

20 En el trasplante humano, los órganos habitualmente se perfunden con una solución de conservación fría (p. ej., 4°C) y se almacenan y transportan sobre hielo, es decir, se enjuagan y almacenan (sumergidos) en una solución de conservación a una temperatura de entre 0°C y 10°C, de entre 4°C y 10°C o de entre 2°C y 10°C, o a 4°C. Los órganos aislados se sumergen en la solución fría y se introducen en una bolsa o envase estéril que se mantiene refrigerado mediante almacenamiento sobre hielo.

25 Era un objetivo de la presente invención proporcionar medios para prolongar el tiempo de conservación, reducir los daños al órgano, la apoptosis, el estrés celular y el daño inflamatorio causados por la conservación y el almacenamiento, en particular, para prolongar el tiempo de almacenamiento en frío y para retrasar o reducir los daños inducidos por el almacenamiento en frío.

30 El "tiempo máximo de conservación" (o "tiempo máximo de almacenamiento") se refiere al periodo durante el que un órgano se mantiene viable y adecuado para el trasplante. Debe determinarse dicho periodo considerando el tipo de órgano, el método de conservación y la condición del órgano. El experto en la materia que trabaje en el campo del trasplante de órganos conocerá las directrices y métodos para determinar la viabilidad y aceptabilidad de riesgos del trasplante de un órgano. Aunque el tiempo de conservación puede determinarse caso por caso, puede predecirse y calcularse basándose en datos disponibles sobre el tipo de órgano, el método de conservación, la condición del donante, etc. ("tiempo predicho de conservación"). La evaluación del injerto realizada antes del trasplante proporciona datos fiables sobre la condición del órgano almacenado. (En el caso del riñón, puede evaluarse la función de las células renales y tubulares [p. ej., el aclaramiento de la creatinina, el equilibrio ácido-base, la fracción de filtración, la excreción de proteínas totales], parámetros de la perfusión [p. ej., hemólisis y flujo de sangre renal] y el cambio en el peso del riñón, el análisis del perfundido mediante la medición de enzimas intracelulares o biomarcadores de daño [AST, ALT, LDH y marcadores apoptóticos].

35 En el contexto de la presente exposición, "órgano trasplantable" o "tejido trasplantable" se refiere a órganos o tejidos, respectivamente, que pueden mantenerse en estado viable después del aislamiento a partir de un donante y que pueden trasplantarse a un receptor, en el que dicho órgano o tejido se mantiene funcional. El órgano o tejido trasplantable puede referirse a órganos o tejidos artificiales, que al trasplantarse en un receptor se vuelven y mantienen funcionales. Son ejemplos de órganos trasplantables: riñones, corazón, páncreas, hígado, intestino, vasos sanguíneos, piel, ojos, etc. Resulta posible, además, mejorar la condición de un órgano mediante trasplante de una parte del órgano ("órgano parcial") o un tejido en lugar del órgano completo. Por ejemplo, puede trasplantarse un lóbulo del hígado o de un pulmón, córnea, partes de la piel. Los medios de conservación proporcionados en la presente memoria pueden utilizarse para el almacenamiento de tejidos y también de células, debido a que se aplican los mismos principios de conservación. En realizaciones preferentes de la invención, el órgano es un órgano sólido seleccionado de entre corazón, pulmón, órganos abdominales, incluyendo el hígado, páncreas, intestino y riñón. Un "órgano sólido" es un órgano trasplantable que presenta una consistencia o estructura del tejido bien definida y no es un líquido (tal como la sangre, la médula ósea, una suspensión de células, etc.). Entre dichos órganos se incluyen, p. ej., el corazón, los riñones, el hígado, los pulmones y el páncreas.

45 "Almacenamiento o conservación" se refiere al mantenimiento de un órgano en una solución de conservación mediante enjuague, inmersión o, de otro modo, tratamiento de dicho órgano con dicho líquido de conservación. El almacenamiento comprende tanto almacenamiento estático como la perfusión continua (mecanizada). El almacenamiento o conservación se refiere al almacenamiento o conservación *ex vivo*, es decir, el tratamiento con un compuesto S1R de fórmula I' o un compuesto S1R de fórmula I' que contiene solución de conservación se lleva a cabo *ex vivo*. Se proporciona la utilización *ex vivo* de un compuesto agonista de S1R de fórmula I', es decir, dicho compuesto se pone en contacto con el órgano que debe almacenarse fuera de un cuerpo vivo o un cuerpo donante cadáver.

"Almacenamiento en frío o conservación en frío" se refiere a temperaturas de almacenamiento o conservación inferiores o por lo menos 5°C inferiores o por lo menos 10°C inferiores a la temperatura normal del tronco que es característica de la especie a la que pertenece el órgano o tejido, y en particular, a temperaturas inferiores a 10°C.

5 "Isquemia fría" se refiere a condiciones isquémicas, en las que se separa el órgano respecto de la circulación. Por lo tanto, la isquemia fría se refiere a condiciones normotérmicas o subnormotérmicas.

10 Una "solución de conservación" debe entenderse como una solución acuosa adecuada para mantener la viabilidad de un órgano o tejido aislado o artificial hasta que dicho órgano o tejido sea trasplantado en un receptor. La expresión también se refiere a líquidos de perfusión que se utilizan para perfundir el órgano o tejido en preparación para el aislamiento o la conservación.

15 "Mitigado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la prevención o retraso del daño estructural o funcional causado por el almacenamiento. También puede referirse a la restauración parcial o total de una estructura o de una función afectada por el daño inducido por el almacenamiento. La mejora puede medirse mediante el ensayo del marcador o marcadores del daño en una muestra en la que se ha administrado un agente para mitigar el daño ("muestra mitigada") y comparando los resultados con uno o más marcadores predichos o medidos de daño en una muestra causado por las mismas condiciones en ausencia de un agente que ha sido administrado para mitigar el daño ("muestra no mitigada"). La mitigación puede significar una diferencia estadísticamente significativa entre los parámetros medidos de la muestra mitigada y los parámetros predichos o medidos de la muestra no mitigada.

20 Un "nivel alterado" de un (bio)marcador es un nivel de dicho biomarcador que es -debido al daño causado por el almacenamiento- diferente de los niveles normales saludables de dicho marcador cuando no se somete a almacenamiento. Los niveles saludables (normales, estándares) de un marcador pueden determinarse según directrices bien conocidas y práctica de laboratorio habitual.

Compuestos agonistas de S1R

30 Los agonistas del receptor S1R que pueden utilizarse se definen en las reivindicaciones. Resultan preferentes los agonistas de S1R que son altamente selectivos respecto a S2R. También resultan preferentes los agonistas de S1R que presentan una afinidad fuerte para el receptor S1R y que presentan menos efectos secundarios.

35 Un compuesto es selectivo para S1R sobre S2R en el caso de que presente una afinidad más alta para S1R que para S2R, preferentemente 5 veces superior o 20 veces superior, o 50 veces superior, o por lo menos 10⁵ superior, por lo menos 10³ superior o por lo menos 10⁴ superior.

40 En la parte experimental, se muestran experimentos ilustrativos con tres compuestos agonistas de S1R: fluvoxamina, SA-4503 (cumetasina) y PRE-84. Se encontró que la fluvoxamina era el más exitoso de los tres compuestos para reducir, retrasar o prevenir los daños funcionales y/o estructurales en un órgano o tejido que debe trasplantarse y que está almacenado en una solución de conservación. En efecto, se ha encontrado que la fluvoxamina es inesperadamente más eficaz que SA 4503. Resultan particularmente preferentes la fluvoxamina y PRE-084. La fluvoxamina resulta altamente preferente.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo", solo o en combinaciones, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene preferentemente 1 a 6, preferentemente 1 a 4 o 1 a 3 átomos de carbono, o 1 a 2 átomos de carbono (es decir, grupos alquilo "C(1-6)", "C(1-4)", "C(1-3)" o "C(1-2)", respectivamente), tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo y t-butilo.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alcoxi" se refiere a un grupo alquil-O- en el que el grupo alquilo ha sido descrito anteriormente. Entre los ejemplos no limitativos de grupos alcoxi adecuados se incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y n-butoxi, preferentemente metoxi. El enlace con la fracción parental es mediante el oxígeno (en el caso de que sea a un átomo de carbono, oxígeno de éter).

55 La expresión "alcoxi alquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con un grupo alcoxi, es decir, un grupo alquil-O- tal como se ha descrito anteriormente. El enlace con la fracción alquilo es mediante el oxígeno, es decir, es un oxígeno de éter.

60 Un "alqueno" tal como se utiliza en la presente memoria, solo o en combinaciones, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene por lo menos un doble enlace carbono-carbono, en el que dicho grupo hidrocarburo contiene preferentemente 2 a 6, preferentemente 2 a 4 o 2 a 3 o 2 átomos de carbono (es decir, grupos alquilo "C(2-6)", "C(2-4)", "C(2-3)" o "C(2-2)").

65 El término "cicloalquilo" tal como se utiliza en la presente memoria es un anillo alquilo a base de carbonos no aromático compuesto de por lo menos tres átomos de carbono.

Un anillo "heterocíclico" tal como se utiliza en la presente memoria es una fracción cíclica que presenta, aparte de uno o más átomos de carbono, átomos de por lo menos un elemento no carbono como miembro o miembros de su anillo o anillos. Preferentemente, el anillo o anillos de la fracción heterocíclica presenta uno o más anillos de 5 a 6 elementos.

El término "heterocicloalquilo" se refiere a un anillo "heterocíclico" que es derivable a partir de un grupo cicloalquilo tal como se ha definido anteriormente, en el que por lo menos uno de los átomos de carbono del anillo se sustituye por un heteroátomo, tal como, aunque sin limitación, nitrógeno, oxígeno o azufre.

El término "arilo" tal como se ha indicado anteriormente es un grupo que contiene cualquier anillo aromático a base de carbonos que es preferentemente un grupo monocíclico o bicíclico. El término incluye, además, opcionalmente, "heteroarilo", que se define como un grupo que contiene un grupo aromático que presenta por lo menos un heteroátomo incorporado dentro del anillo del grupo aromático. Entre los ejemplos de heteroátomos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, nitrógeno y oxígeno. Opcionalmente, el término "arilo" está limitado a no heteroarilo, que también se encuentra incluido en el término arilo y define un grupo que contiene un grupo aromático que no contiene un heteroátomo. Preferentemente, el término "arilo" se refiere a un anillo aromático o heteroaromático monocíclico de 5 o 6 miembros o bicíclico de 8 a 12 miembros. Más preferentemente, el término "arilo" se refiere a fenilo o naftilo.

El término "aralquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo alquilo que se une a la molécula parental mediante el grupo alquilo, que puede estar adicionalmente sustituido opcionalmente con uno o más, preferentemente uno a tres, o uno a dos, sustituyentes.

El término "cicloalquilarilo" se refiere a un grupo que comprende fusionados un anillo cicloalquilo y un anillo cicloarilo. Preferentemente, la fracción "cicloalquilarilo" está unida al compuesto mediante la parte cicloalquilo del grupo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anillo fusionado" se refiere a que el anillo está fusionado con por lo menos otro anillo formando un grupo de un compuesto que comprende dos o más anillos, en el que un enlace sencillo entre dos átomos miembros de los anillos es, junto con dichos dos miembros, común a los dos anillos, es decir, es compartido. Un ejemplo de anillos fusionados es un arilo policíclico. Un anillo policíclico se entiende en la presente memoria como un grupo que contiene múltiples anillos de un grupo a base de carbonos entre los que por lo menos un anillo es un arilo y que opcionalmente puede comprender, además, un cicloalquilo y/o un heterocicloalquilo.

Una fracción "sustituida" comprende un sustituyente seleccionado de los grupos y fracciones definidas en la presente memoria; sin embargo, un sustituyente es más pequeño, es decir, más corto, es decir, consiste en no más, preferentemente menos átomos que la fracción que se sustituye de esta manera.

En el caso de que una fracción se indique en una fórmula como "no presente" significa que existe un enlace sencillo (covalente) en la estructura ilustrada por la fórmula que une los átomos indicados en la vecindad de la fracción que no está presente.

Aunque la utilización ejemplar de un compuesto agonista de S1R se demuestra en un método de almacenamiento en frío, también se encuentran contemplados los métodos normotérmicos.

El almacenamiento de injertos renales en una solución de perfusión que contiene un compuesto agonista de receptor S1R ejerce una notable renoprotección, marcada por parámetros funcionales e histológicos mejorados en (i) riñones almacenados y (ii) almacenados y posteriormente autotrasplantados en comparación con injertos renales almacenados en soluciones de perfusión convencionales sin el compuesto agonista de S1R. La estructura saludable de los riñones también resultó mejor conservada en los grupos tratados con compuesto agonista de S1R. Debido a que los riñones perfundidos y almacenados en una solución de perfusión que contenía compuesto agonista de S1R mostraron parámetros funcionales e histológicos significativamente mejores que los injertos tratados con vehículo (es decir, la misma solución de perfusión sin el compuesto agonista de S1R), se supone justificadamente que los riñones pretratados con el compuesto agonista de S1R ya están en una mejor condición global cuando se implantan en el receptor y, por lo tanto, son más resistentes a daños por isquemia/reperfusión posteriores durante el trasplante renal.

Aunque la mayor parte de los datos presentados en la presente memoria se refiere al Custodiol (Franz Kohler Chemie GMBH, Bensheim, Alemania), las mediciones con solución salina fisiológica y solución de HT (solución de conservación HypoThermosol® FRS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) indican que el efecto protector de los compuestos agonistas de S1R no está limitado por la naturaleza de la solución de conservación utilizada. De hecho, resulta evidente en la literatura una tendencia a un líquido de conservación "único" o multipropósito: un análisis del Registro científico de receptores de trasplante (SRTR, por sus siglas en inglés) de 2007 indica que se utilizó solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y solución de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK) como solución de enjuague final en 63 % y 28 % de los riñones, respectivamente (Informe anual 2007 de la Red de adquisición y trasplante de órganos de EE. UU. y Registro científico de receptores de trasplante: datos de trasplantes 1997-2006. Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems Bureau, Division of Transplantation, Rockville, MD.) Se encuentran disponibles numerosos estudios de comparación de UW y HTK; la mayoría de ellos informa de una eficacia similar en la conservación del páncreas (Becker T, Ringe B, Nyibata M, et al. Pancreas transplantation with histidine-

tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution and University of Wisconsin (UW) solution: is there a difference? Jop. 2007;8(3):304-311.; Potdar S, Malek S, Egtesad B, et al. Initial experience using histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in clinical pancreas transplantation. Clin. Transplant. Dec 2004;18(6):661-665) y el trasplanta hepático (Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. Liver Transpl. Feb 2006;12(2):226-230. Feng L, Zhao N, Yao X, et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review. Liver Transpl. agosto de 2007;13(8):1125-1136.) Aunque todos los líquidos de conservación declaran ventajas sobre los demás, todos y cada uno de ellos ha sido diseñado para minimizar la hinchazón celular, evitar la acidosis intracelular, impedir la expansión del espacio intersticial y evitar los daños inducidos por los radicales libres del oxígeno, con el fin de conservar el medio intracelular en ausencia de bombas iónicas eficaces y para evitar la necrosis. Las soluciones de conservación convencionales no están diseñadas para evitar específicamente la apoptosis o la inflamación.

Una solución de conservación puede comprender agentes activos osmóticos (p. ej., citrato o lactobionato) para evitar la hinchazón celular; electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^+) para un efecto osmótico; tampones de protones (p. ej., fosfato e histidina) para regular la concentración de H^+ ; un coloide (p. ej., albúmina o HES) para el enjuague y perfusión vascular inicial; inhibidores metabólicos (p. ej., alopurinol) para suprimir la degradación de los constituyentes celulares; metabolitos (p. ej., glutatión) para facilitar la restauración del metabolismo, y secuestradores de radicales libres (p. ej., vitamina E).

La composición del Custodiol y de HT se proporciona en la sección de Métodos a modo de líquidos ejemplares de conservación.

Dada la composición y objetivo similares de los líquidos de conservación, los resultados presentados en la presente memoria son indicativos de la idoneidad de los compuestos agonistas de S1R de fórmula I' en cualesquiera soluciones de conservación utilizadas en la conservación de órganos y tejidos aislados o artificiales trasplantables.

Los daños celulares de un órgano durante el almacenamiento se indican por, p. ej., un número incrementado de células apoptóticas, una expresión incrementada del marcador apoptótico BAX y/o caspasa escindida y/o una expresión reducida del marcador antiapoptótico Bcl-2. Los compuestos agonistas de S1R sometidos a ensayo ejercieron un marcado efecto antiapoptótico, indicado por un número reducido de células apoptóticas según se determinó mediante tinción TUNEL, una expresión reducida del marcador apoptótico BAX, un nivel reducido del marcador apoptótico de caspasa escindida (forma de 319 kDa) y una expresión incrementada del marcador antiapoptótico Bcl-2. De esta manera, en una realización, el daño celular está asociado a uno o más cualesquiera de entre un número incrementado de células apoptóticas, una expresión incrementada del marcador apoptótico BAX y caspasa escindida, y una expresión reducida del marcador antiapoptótico Bcl-2. La reducción, retraso o prevención del daño celular durante el almacenamiento comprende uno o más cualesquiera de entre un número reducido de células apoptóticas, niveles de expresión reducidos del marcador apoptótico BAX y niveles reducidos de caspasa escindida y niveles de expresión incrementados del marcado antiapoptótico Bcl-2 en comparación con el número correspondiente de células o niveles de expresión, respectivamente, en un órgano almacenado bajo condiciones idénticas y en una solución de conservación que presenta la misma composición pero que no comprende el compuesto agonista de S1R de fórmula I'. El experto en la materia conocerá que dichos marcadores y otros marcadores apoptóticos o no apoptóticos conocidos, pueden medirse en cualquier órgano trasplantable mediante métodos bien conocidos de la técnica. La presencia de S1R se muestra en varios tejidos, p. ej., el sistema nervioso central, los pulmones, el páncreas, el corazón, el bazo, los riñones, y los tejidos endocrinos, inmunitarios y reproductores. El experto en la materia conocerá, además, que los compuestos agonistas de S1R de fórmula I' pueden utilizarse en la conservación de órganos que muestran receptores de S1.

Los compuestos agonistas de S1R sometidos a ensayo ejercieron un efecto antiinflamatorio, demostrado en la presente memoria por varias citoquinas proinflamatorias. Los marcadores de inflamación son bien conocidos de la técnica, así como los métodos para detectarlos. El deterioro celular y/o funcional durante el almacenamiento está asociado a niveles incrementados de expresión (según medición de, p.ej., los niveles de ARNm) de uno o más cualesquiera de entre IL-6, IL-1 α , TNF α y un número incrementado de linfocitos CD45 $^+$. Por lo tanto, la reducción, retraso o prevención del daño celular y/o funcional comprende uno o más cualesquiera de entre un nivel de expresión reducido de IL-6, un nivel de expresión reducido de IL-1 α , un nivel de expresión reducido de TNF α y un número reducido de linfocitos CD45 $^+$ en comparación con el número de células o niveles de expresión correspondientes en un órgano almacenado bajo condiciones idénticas y en una solución de conservación que presenta la misma composición pero que no comprende el compuesto agonista de S1R de fórmula I'.

En una realización, el nivel de uno o más marcadores seleccionados de entre el número de células apoptóticas, el nivel de expresión de IL-6, el nivel de expresión de IL-1 α en comparación con el marcador correspondiente en un órgano almacenado bajo condiciones idénticas y en una solución de conservación que presenta la misma composición pero que no comprende el compuesto agonista de S1R de fórmula I'.

La utilización de los compuestos agonistas de S1R mostró en los ensayos un tiempo de conservación claramente prolongado en los experimentos descritos en la presente memoria. Los órganos almacenados en una solución de

conservación que contenía fluvoxamina mostraron 25 % menos daños en los tejidos según mostró el ensayo histológico, tras un tiempo de conservación 1,5 veces más prolongado o incluso 10 veces más prolongado, que los órganos almacenados en la misma solución de conservación pero que no contenía fluvoxamina.

5 Los efectos de los compuestos agonistas de S1R de fórmula I' se ejemplifican mediante el trasplante de riñón y el almacenamiento de riñón e hígado aislados. Los marcadores funcionales, moleculares e histológicos del daño renal aparte de los indicados en la presente memoria son bien conocidos de la técnica, así como los métodos para medir los cambios en dichos marcadores.

10 En una realización, el órgano es el riñón o el tejido es tejido renal y el daño funcional ha sido reducido, retrasado o evitado, indicado por cualquiera de entre un nivel reducido de creatinina en suero, un nivel reducido de nitrógeno de urea en sangre, un nivel reducido de KIM1 en sangre, un nivel reducido de MCP-1 en sangre, un nivel reducido de NGAL en sangre y un incremento de la tasa de filtración glomerular en comparación con el marcador correspondiente en un órgano almacenado bajo condiciones idénticas y en una solución de conservación que presenta la misma composición pero que no comprende el compuesto agonista de S1R de fórmula I'. En otra realización, se reducen, retrasan o evitan daños celulares adicionales, tal como indica una reducción de la dilatación de la superficie de luz tubular.

Los daños celulares pueden someterse a ensayo mediante medición del nivel de uno o más chaperones (p. ej., HSP27, HSP72 y HSP90), agentes vasoactivos (p. ej., preproendotelina, prostaciclina y angiotensina), marcadores de rutas apoptóticas (p. ej., anexina-V, Bcl-2 y caspasa-3,7), marcadores de rutas necróticas (p. ej., fragmentación del ADN), marcadores de inflamación (p. ej., TLR, NF- κ B, IL-1, IL-6 y TNF- α), marcadores de activación del sistema inmunitario (p. ej., IL-1 e IL-6), marcadores de estrés del retículo endoplásmico (p. ej., Xbp1, xantina-oxidasa y SOD), marcadores de estrés oxidativo (p. ej., Xbp1, xantina-oxidasa y SOD), marcadores de angiogénesis (p. ej., VEGF y SDF), marcadores de remodelado (p. ej., MMP, TIMP-1 y TIMP-2), y marcadores de regeneración (p. ej., MMP, TIMP-1 y TIMP-2). Los niveles alterados de dichos biomarcadores son indicativos de daño celular. En otros órganos, pueden detectarse otros marcadores de daño. Por ejemplo, en el caso del hígado, parámetros de laboratorio convencionales, tales como los niveles elevados en suero de ALT (alanina aminotransferasa), AST (aspartato aminotransferasa), gamma-GT y LDH (lactato deshidrogenasa) son indicativos de daño. En una realización, el órgano es el hígado o el tejido es tejido hepático, y el daño funcional ha sido reducido, retrasado o evitado, según indica cualquiera de entre un nivel reducido de alanina aminotransferasa en suero, un nivel reducido de aspartato aminotransferasa en suero, un nivel reducido de gamma-GT en suero y un nivel reducido de lactato deshidrogenasa en suero, en comparación con el marcador correspondiente en un órgano almacenado bajo condiciones idénticas y en una solución de conservación que presenta la misma composición pero que no comprende el compuesto agonista de S1R. La detección de citoquinas inflamatorias de, p.ej., IL-6, TNF- α e IFN- γ , o de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en injertos de hígado es un ejercicio rutinario, así como la detección de la expresión de las proteínas Caspasa-3, Bcl-2 y Bax (marcadores de apoptosis) en los hepatocitos. Pueden medirse marcadores histológicos, tales como la hinchazón de los hepatocitos, una vacuolización citoplasmática incrementada, picnosis nuclear, dilatación sinusoidal y necrosis focal características del daño en el injerto hepático. Parámetros funcionales, tales como la producción de bilis, los niveles de transaminasas, los niveles de bilirrubina y el tiempo de protrombina, también son indicativos del funcionamiento de un órgano trasplantado.

En el caso de los injertos de páncreas, pueden medirse los requisitos de insulina y los niveles de péptido-C, así como la producción de amilasa. Puede evaluarse histológicamente tanto el páncreas exocrino como el endocrino: edema, infiltrado neutrofílico, infiltrado linfocítico, necrosis acinar, hemorrágica y grasa, apoptosis y trombosis vascular son característicos del daño en los tejidos.

Los parámetros funcionales medibles del pulmón (tejido) trasplantado: gases en sangre (tensión de oxígeno), hemodinámica pulmonar (resistencia vascular pulmonar), elasticidad pulmonar, parámetros estructurales: proporción de peso seco a peso, microscopía óptica y contenido de mieloperoxidasa.

La producción de especies de oxígeno reactivo, el daño oxidativo, la troponina I en suero y la puntuación de latido pueden ser marcadores medibles de las funciones del corazón trasplantado.

55 Los compuestos agonistas de S1R fluvoxamina (Flu), SA 4503 y PRE-084 se sometieron a ensayo junto con NE100, un antagonista de S1R específico, confirmando adicionalmente el papel de S1R en el efecto protector de dichos compuestos. Se ha mostrado en varios experimentos que el papel de la ruta de S1R está basado en el antagonismo de NE100.

60 El tiempo de isquemia fría en el contexto experimental de los presentes inventores se fijó en 2 o 3 horas según los datos en la literatura e incluso en 24 horas, y fue validado por parámetros funcionales renales marcadamente deteriorados. La temperatura de la solución de conservación era de 4°C para la perfusión y de aproximadamente 0°C durante el almacenamiento, como es habitual en la técnica y en el trasplante humano (el órgano aislado se mantiene sobre hielo).

65 El estudio fue diseñado para modelizar el escenario más probable en la vida real de un donante fallecido y, de esta

manera, no implicaba el pretratamiento del donante con el compuesto agonista de S1R. Dicha organización del tratamiento también excluyó los efectos antiinflamatorios sistémicos y locales del compuesto agonista de S1R que es conocido que tienen lugar en el donante y para proteger el riñón frente al daño por isquemia/reperfusión (DIR) antes del aislamiento del mismo.

5 También se evitó el tratamiento del receptor con el compuesto agonista de S1R y, por lo tanto, los efectos protectores sistémicos del compuesto también podrían no contribuir a los parámetros funcionales e histológicos mejorados que se midieron.

10 La adición del compuesto agonista de S1R de fórmula I' a la solución de conservación resulta en una situación muy diferente de las conocidas de la técnica, en las que se ha tratado tanto a donante como a receptor con el agente de ensayo. En la presente configuración, sólo resulta afectado el riñón trasplantado. Además, los efectos de un agente activo utilizado en la solución de conservación únicamente (es decir, *ex vivo*) son ciertamente diferentes de los efectos del mismo agente administrado por vía sistémica en el cuerpo vivo.

15 Para someter a ensayo la funcionalidad de los riñones aislados y almacenados, los presentes inventores no solo analizaron los riñones después del almacenamiento, sino que también utilizaron el modelo de autotrasplante de riñón en la rata. Dicho modelo permite la eliminación de los efectos de confusión de la respuesta inmunitaria y las toxicidades relacionadas con la inmunosupresión para evitar el rechazo del aloinjerto.

20 *La adición de un compuesto agonista de S1R de fórmula I' a la solución de conservación mejora la estructura del riñón después de (i) el almacenamiento en frío y (ii) el almacenamiento en frío y el trasplante posterior.*

25 La estructura del riñón después de: (i) el almacenamiento y (ii) el trasplante posterior al almacenamiento, fue evaluada tal como se indica en la sección de Métodos. Se cuantificó el grado de daño tubular mediante la medición de las superficies de luz tubular. La dilatación de la luz tubular está causada por la degradación de las células epiteliales tubulares y es un buen indicador de daño tubular.

30 (i) Almacenamiento. Las luces tubulares estaban menos dilatadas en los riñones almacenados en una solución de conservación a la que se había añadido fluvoxamina. La adición de SA 4503 o PRE-084 también mostró un efecto similar, aunque en menor grado. Puede observarse el daño tubular creciente en la fig. 6B, que muestra la magnitud de las superficies de luz tubular medidas tras 2 y 3 horas de almacenamiento en frío. La adición de fluvoxamina inhibió dicho incremento del daño. También resulta evidente que el daño estructural en presencia de Flu es menos pronunciado tras 3, 8 o incluso 24 horas de isquemia en frío que después de una isquemia más corta, de 2 horas, sin Flu. Dicho resultado indica claramente que los compuestos agonistas de S1R y, en particular, la fluvoxamina, presentan el potencial de prolongar el tiempo de almacenamiento (isquemia fría).

35 (ii) Trasplante después del almacenamiento. Las superficies de luz tubular medidas eran significativamente menores al añadir fluvoxamina o SA 4503 al líquido de conservación en comparación con la solución de conservación estándar, mostrando que una solución que contiene compuesto agonista de S1R de fórmula I' conserva mejor la estructura del riñón aislado. (FIG 2C)

45 El análisis de las imágenes de secciones de riñón teñidas con PAS muestra que el daño tubular y glomerular era grave en riñones tratados con líquido de conservación convencional. Los glomérulos se habían colapsado y su estructura se encontraba dañada y degradada. Se observaron signos excesivos de necrosis y núcleos picnóticos en las células epiteliales tubulares. Los riñones almacenados en solución de conservación que contenía fluvoxamina mostraron un daño histológico más leve. Los glomérulos estaban intactos, y los núcleos y plasma tubulares mostraban una tinción normal. Los bordes en cepillo de los túbulos estaban conservados. (FIG 2)

50 *La adición de un compuesto agonista de S1R de fórmula I' a la solución de conservación inhibe la apoptosis. Marcadores de apoptosis*

55 (i) Almacenamiento: la fluvoxamina, SA 4503 y PRE-084 redujeron los niveles de ARNm de BAX, una proteína activadora de apoptosis, en los riñones almacenados, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa. El tratamiento de fluvoxamina incrementó marcadamente los niveles de ARNm de Bcl-2, una proteína antiapoptótica. PRE-084 presentó un efecto similar, aunque no pudo observarse este efecto para SA 4503 (FIG. 7C).

60 Los niveles de caspasa escindida (forma de 319 kDa) fueron reducidos por la fluvoxamina tanto en el Custodiol como en solución salina, y era evidente una tendencia a la reducción con HT.

(ii) Trasplante después del almacenamiento. El efecto de la fluvoxamina está claramente indicado por una reducción significativa de la expresión de BAX (FIG. 3B) y un incremento significativo de los niveles de ARNm de Bcl-2 (FIG. 3C).

65 Tinción con TUNEL.

(ii) Trasplante después del almacenamiento. Se detectaron células apoptóticas en un ensayo con TUNEL. Los riñones tratados con vehículo mostraban superficies apoptóticas extendidas, mientras que los glomérulos de los riñones tratados con fluvoxamina mostraron un número significativamente inferior de células apoptóticas (FIG. 3A, D1-D3).

La adición de compuesto agonista de S1R DE Fórmula I' al medio de conservación proporciona protección frente al estrés celular mediante la inducción de proteínas de choque térmico.

La expresión de hemo-oxigenasa-1 (HO-1), una proteína de choque térmico, resulta inducida por el estrés oxidativo, p. ej., isquemia no solo en el riñón, sino en otros órganos, tales como el corazón, el hígado, etc.

(ii) Trasplante después del almacenamiento. El tratamiento con vehículo incrementó drásticamente la expresión de HO-1, que fue bloqueada por la fluvoxamina.

La adición de un compuesto agonista de S1R de fórmula I' a la solución de conservación mejora la estructura del riñón después de (i) el almacenamiento en frío y (ii) el almacenamiento en frío y el trasplante posterior.

Marcadores tempranos de lesión renal.

El marcador de daño en los túbulos proximales Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) es una proteína transmembranal de tipo 1, con una inmunoglobulina y dominio de mucina, cuya expresión está marcadamente regulada positivamente en los túbulos proximales en el riñón de la rata postisquémica. Las PTEC (por sus siglas en inglés, células epiteliales de los túbulos proximales) que expresan KIM-1 como fagocitos residentes, contribuyen a la eliminación de las células apoptóticas y facilitan la regeneración de los túbulos dañados. Los túbulos proximales son especialmente sensibles a la isquemia, lo que implica que KIM-1 es un buen marcador temprano.

La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) es otro biomarcador que es conocido que está regulado positivamente en el daño renal. Es una de las quimioquinas clave que regulan la migración e infiltración de los monocitos o los macrófagos.

La lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos renales (NGAL) es un indicador específico de daño renal que se correlaciona con la gravedad del deterioro renal. En el caso del daño renal agudo, se secreta NGAL a niveles elevados en la sangre y en la orina en las pocas horas siguientes al daño, aunque también es detectable en la enfermedad renal crónica. Es indicativo de la presencia y también gravedad de la lesión renal. NGAL puede medirse en suero u orina.

(i) Almacenamiento. Los niveles de KIM-1 están drásticamente reducidos en los riñones aislados que se almacenan en Custodiol y fluvoxamina en comparación con el tratamiento de vehículo (FIG. 6A). La adición de NE100 al líquido de conservación reduce el efecto protector de la fluvoxamina. Tanto SA 4503 como PRE-084 inhiben el incremento de KIM-1, aunque el efecto de la fluvoxamina es más pronunciado. El efecto de la fluvoxamina en solución salina era más leve, aunque se advirtió una tendencia a la reducción.

Los niveles de MCP-1 eran menos elevados según medición tras el almacenamiento en solución de conservación que contiene fluvoxamina en comparación con el Custodiol convencional. Se observan resultados similares con PRE-084.

La expresión de ARNm de NGAL se redujo con la totalidad de los tres agonistas de S1R sometidos a ensayo en Custodiol en comparación con el tratamiento de vehículo. También se demostró la eficacia de la fluvoxamina en solución salina.

(ii) Trasplante después del almacenamiento. Los niveles de expresión de KIM-1 se incrementaron marcadamente en las ratas tratadas con vehículo en comparación con los animales operados simuladamente, indicando daño isquémico. El tratamiento de fluvoxamina y SA 4503 resultó en una expresión significativamente inferior según mediciones posteriores al trasplante.

Los niveles de MCP-1 también eran significativamente menos elevados en los riñones autotrasplantados y tratados con fluvoxamina.

El tratamiento de fluvoxamina y SA 4503 redujo significativamente los niveles de NGAL en comparación con el Custodiol (FIG. 2B).

Parámetros funcionales.

(ii) Trasplante después del almacenamiento. La función renal mejoró sustancialmente en ratas tanto tratadas con fluvoxamina como con SA 4503, tal como muestran los niveles inferiores en suero de creatinina y AST en comparación con la solución de conservación sin un compuesto agonista de S1R. Además, SA 4503 también redujo significativamente los niveles de NUS (nitrógeno de urea en sangre).

Efecto antiinflamatorio.

El agonismo de S1R presentó efectos antiinflamatorios en los riñones almacenados y posteriormente trasplantados, tal como muestran tanto los niveles reducidos de ARNm como los niveles de proteínas de citoquinas inflamatorias (IL10, IL-1 α y TNF α) en los riñones tratados con fluvoxamina.

La adición de un compuesto agonista de s1R de fórmula I' a la solución de conservación protege a los hepatocitos de la isquemia fría durante el almacenamiento.

Se preservó la integridad histológica de los hígados aislados mediante la adición del compuesto agonista de SR1 sometido a ensayo a la solución de conservación incluso tras 8 horas de almacenamiento en frío, tal como muestra el número de vacuolas citoplasmáticas. (FIG 9)

Pueden prepararse agonistas de S1R para la utilización en la presente invención según métodos conocidos por el experto en la materia o disponibles comercialmente, como fluvoxamina, SA4503, PRE-084, 4-IBP, ANAVEX2-73, etc.

Por ejemplo, puede prepararse maleato de fluvoxamina tal como se indica en los documentos n° US 4.085.225 y n° US 6433225 B1. Puede prepararse un compuesto con una estructura similar a la fluvoxamina tal como se indica en, p. ej., el documento n° US 3692835, n° US4081551A, n° US4085225A, n° US4086361A o n° US4077999. El experto en la materia conocerá los métodos apropiados para sintetizar los compuestos según la fórmula I', II, III, IV o V basándose en la guía de las patentes anteriormente indicadas y sus conocimientos generales en el campo.

El documento n° EP2353598A1 da a conocer la síntesis de ligandos de receptor sigma, incluyendo la cumetasina y compuestos relacionados.

PRE-084 es un agonista de S1R de alta afinidad, selectivo para el subtipo S1R ($K_{is}=2,2$ y 13.091 nM para los receptores σ_1 y σ_2 , respectivamente). Es un ligando potente de S1R ($IC_{50}=44$ nm) sin afinidad apreciable para los receptores de PCP ($IC_{50}>100.000$ nM) y se describe su disponibilidad en, p. ej., Griesmaier E. et al., *Experimental Neurology* 237(2), 388-395 (2012)]. Rossi, Daniela et al. describen la síntesis de ligandos de receptor sigma basados en el andamiaje arilalquenilamínico, entre otros RC-33, ver la Tabla A [Rossi D. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19(21), 6210-6224 (2011)]. Pueden prepararse PRE-084 y análogos estructurales tal como se indica en el documento n° WO 1992002481 A1. El experto en la materia conocerá modificaciones de la síntesis de un compuesto deseado.

Es conocido para un gran número de compuestos que son agonistas de S1R. El ensayo de la afinidad de unión y la medición de la constante de disociación pueden llevarse a cabo mediante métodos habituales en la química de las proteínas y bioorgánica.

Por ejemplo, Xu, Rong et al. dan a conocer el efecto de modificaciones de éter de SA 4503 sobre la afinidad de unión y selectividad para SR y transportadores de monoamina y los métodos para medir estos parámetros [Rong Xu et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(1), 222-230 (2015)].

Además, Rossi, Daniela et al. (ver anteriormente) seleccionaron e identificaron un agonista de S1R potente y selectivo de entre varios compuestos y métodos relacionados que se han descrito. Además, los autores han desarrollado un modelo tridimensional de farmacóforo de S1R mediante la utilización de compuestos activos exclusivamente para derivar este modelo. El modelo incluía dos hidrófobos y un nitrógeno positivo como características relevantes y era capaz de discriminar entre moléculas con y sin afinidad para el subtipo S1R. De esta manera, se encuentra perfectamente comprendido en los conocimientos del experto en la materia la preparación y selección de compuestos.

Se encuentran perfectamente dentro de los conocimientos del experto en la materia someter a ensayo si un potencial agonista de S1R es realmente un agonista.

Un método habitual para someter a ensayo si un agonista de S1R actúa sobre S1R es utilizar un antagonista específico, a modo de control. Dicho antagonista específico bien aceptado es NE-100, que es un antagonista de S1R potente y selectivo ($K_i=0,86$ nM) que muestra una selectividad >55 veces sobre S2R y una selectividad >6.000 veces sobre los receptores D1, D2, 5-HT1A, 5-HT2 y PCP (hidrocloruro de 4-metoxi-3-(2-feniletotoxi)-N,N-dipropilbecoetanamina). NE-100 muestra una unión reversible ($K_d=1,2$ nM) [Okuyama S et al., *CNS Drug Rev.* 2(2), 226-237 (1999), Berardi F et al., *Bioorg. Med. Chem.* 9(5), 1325-35 (2001)].

Concentración del compuesto agonista de S1R de fórmula I' en la solución de conservación. Se seleccionó la concentración de fluvoxamina en los experimentos indicados en la presente memoria para que fuera claramente inferior a la dosis diaria habitual administrada en el tratamiento de la depresión. Puede encontrarse una guía para el cálculo de las dosis y concentraciones "humanas" en directrices internacionales y nacionales, p. ej., en directrices proporcionadas por la Food and Drug Administration, p. ej., en "Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers".

Ejemplos

Métodos

Compuestos

5 Fluvoxamina (*maleato de fluvoxamina*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), PRE-084 (*2-morfolín-4-dietil 1-fenilciclohexano-1-carboxilato* Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), SA4503 (*1-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-4-(3-fenilpropil)piperazina*; Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido); NE100 (*monohidrocloreuro de N-dipropil-2-[4-metoxi-3-(2-feniletoksi)-fenil]-etilamina*, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)

10 Modelo de rata de autotrasplante de isoinjerto renal.

Animales

15 El comité institucional sobre bienestar animal aprobó todos los experimentos. Se llevaron a cabo experimentos con ratas Wistar macho que pesaban 205 ± 15 g (Toxi-Coop Toxicological Research Center, Dunakeszi, Hungría). Los animales se alojaron en una sala de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) con ciclos alternantes de luz y oscuridad y disponían de acceso libre a alimento estándar para rata y agua.

20 Las ratas Wistar macho ($n=8/\text{grupo}$) fueron anestesiadas con isoflurano (al 3 % v/v) mezclada con aire sintético (1 l/min) antes de la cirugía y se depositaron sobre una mesa de temperatura controlada para mantener la temperatura corporal central. Se perfundieron los riñones izquierdos con solución fría de perfusión Custodiol (Na^+ : 15 mmol/l; K^+ : 9 mmol/l; Mg^{2+} : 4 mmol/l; Ca^{2+} : 0,015 mmol/l; histidina: 198 mmol/l; triptófano: 2 mmol/l; cetoglutarato: 1 mmol/l; manitol: 30 mmol/l) (Franz Kohler Chemie GMBH, Bensheim, Alemania), y seguidamente se extirparon del animal: los riñones se introdujeron en un recipiente durante 2 horas lleno de (i) solución fría de perfusión Custodiol (ATx) o (ii) solución de perfusión fría Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de FLU (ATx FLU) o (iii) solución fría de perfusión Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de SA4503 (ATx SA). Tras 2 horas, se reimplantaron los riñones en las ratas y se llevaron a cabo anastomosis terminales de la arteria renal, vena renal y uréter. Se extirparon los riñones contralaterales y los riñones autotrasplantados se observaron para garantizar la reperfusión. El tiempo total de isquemia caliente fue de 35 min en todos los animales. Los animales operados simuladamente sirvieron de controles.

30 Tras 24 horas de reperfusión, se recogieron muestras de sangre de la aorta abdominal; se recogieron los riñones restantes, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C o se fijaron en formalina al 8 % tamponada, para el procesamiento posterior. El diseño experimental del autotrasplante se muestra en la fig. 9.

35 Modelo de rata de isquemia fría de riñón e hígado.

40 Se anestesiaron ratas Wistar macho con isoflurano (al 3 % v/v) mezclado con aire sintético (1 l/min) antes de la cirugía y se depositaron sobre una mesa de temperatura controlada para mantener la temperatura corporal central. Se lavaron los riñones ($n=6/\text{grupo}$) a través de las arterias renales con 5 ml de solución fría; a continuación, se extirparon del animal y se introdujeron en un recipiente lleno con la misma solución durante 2 o 3 horas. Se utilizaron las soluciones de perfusión siguientes: (i) Custodiol, 2 horas de perfusión fría (Cust. 2 h PF); (ii) Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de FLU, 2 horas de perfusión fría (Cust. 2 h PF + FLU); (iii) Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de SA4503, 2 horas de perfusión fría (Cust. 2 h PF + SA); (iv) Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de PRE-084, 2 horas de perfusión fría (Cust. 2 h PF + PRE); (v) Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de FLU y 0,001 mg/ml de NE100, 2 horas de perfusión fría (Cust. 2 h PF + FLU + NE100); (vi) Custodiol que contenía 0,001 mg/ml de NE100, 2 horas de perfusión fría (Cust. 2 h PF + NE100); (vii) Custodiol, 3 horas de perfusión fría (Cust. 3 h PF); (viii) Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de FLU, 3 horas de perfusión fría (Cust. 3 h PF + FLU); (ix) Solución salina, 2 horas de perfusión fría (solución salina 2 h PF); (x) Solución salina que contenía 0,003 mg/ml de FLU, 2 horas de perfusión fría (solución salina + FLU 2 h PF); (xi) Solución de conservación HypoThermosol® FRS (Trolox, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , H_2PO_4^- , HEPES, lactobionato, sucrosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina, glutatión; solicitud de patente PCT número: PCT/GB2009/051659) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 2 horas de perfusión fría (HT 2 h PF); (xii) HypoThermosol® FRS que contenía 0,003 mg/ml de FLU, 2 horas de perfusión fría (HT 2 h PF + FLU). Tras la isquemia fría, los riñones se congelaron inmediatamente de manera instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C o se fijaron en formalina al 8 % tamponada para el procesamiento posterior.

55 Para los experimentos de almacenamiento de hígados, se extirparon los hígados del animal y se introdujeron en un recipiente lleno con la misma solución durante 8 horas (es decir, Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de FLU, Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de SA4503 y Custodiol que contenía 0,003 mg/ml de PRE-084).

60 Medición de parámetros metabólicos y renales.

65 Se determinaron los parámetros funcionales metabólicos (glucosa, fructosamina, colesterol total y colesterol-HDL, triglicéridos) y renales de sueros de rata (sodio, potasio, creatinina, nitrógeno de urea en sangre (NUS), aspartato transaminasa (AST)) utilizando kits disponibles comercialmente en un analizador químico fotométrico Hitachi 912.

Análisis histológicos.

Los riñones se fijaron en formalina al 8 %, se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 5 µm con ácido peryódico de Schiff (PAS) para evaluar el daño en los túbulos. Se obtuvieron imágenes con Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungría). Se midieron las superficies de luz tubular en tres campos de magnificación x200 en cada rata. El análisis se llevó a cabo en doble ciego con morfometría asistida por ordenador utilizando los programas Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Corporation, San Jose, CA, EE. UU.) e Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) en un microscopio óptico Zeiss Axiolmager A1 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania).

Se sumergieron muestras de hígado en formalina tamponada al 10 %. Tras 24 horas, las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Detección de apoptosis mediante ensayo TUNEL.

Se incluyeron en parafina muestras de riñón fijadas en formalina. Se montaron secciones de 5 µm de grosor sobre portaobjetos Superfrost (Thermo Shandon, Runcorn, Reino Unido) y se desparafinaron manualmente. El ensayo se llevó a cabo utilizando el kit de detección de apoptosis in situ de peroxidasa Apoptag® (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Brevemente, las muestras se pretrataron con proteinasa K durante 15 min. Tras etapas repetidas de lavado, se bloqueó la actividad endógena de peroxidasa con H₂O₂ al 3 % en metanol durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron los portaobjetos en tampón de reacción que contenía enzima TdT al 30 % durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de la adición de tampón de parada. Se incubaron los portaobjetos con conjugado antidioxigenina durante 30 min a temperatura ambiente. Se revelaron los portaobjetos utilizando sustrato de peroxidasa DAB. Las superficies de los núcleos apoptóticos positivos para TUNEL se midieron en tres campos de magnificación x200 en cada rata. El análisis se llevó a cabo utilizando los programas Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Corporation, San Jose, CA, EE. UU.) e Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) en un microscopio óptico Zeiss Axiolmager A1 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania).

Inmunohistoquímica.

Se incluyeron en parafina muestras de riñón fijadas en formalina. Se montaron secciones de una a dos micrómetros de grosor sobre portaobjetos Superfrost (Thermo Shandon, Runcorn, Reino Unido) y se desparafinaron manualmente. Se bloqueó la actividad endógena de peroxidasa con H₂O₂ al 3 % en metanol durante 20 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se sumergieron en tampón citrato 0,05 mM (pH=6) y se expusieron a 93°C durante 10 min (microondas automático MFX-800-3, Meditest, Budapest, Hungría). Los portaobjetos se trataron principalmente con anticuerpo anti-CD45 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), se diluyeron 1:100 y se incubaron durante la noche a 4°C. Tras el lavado, se utilizó anticuerpo secundario Link biotinilado (Dako, Glostrup, Dinamarca) y se incubó durante 15 min. temperatura ambiente. Para la visualización, se utilizó una técnica estándar de avidina-biotina-peroxidasa (sistema ABC, Dako, Glostrup, Dinamarca) con aminoetilcarbazol como cromógeno.

PCR en tiempo real cuantitativa.

Se aisló el ARN total a partir de riñones con el minikit de ARN total GeneAid (GeneAid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan). Se transcribieron inversamente 500 ng de ARN UTILIZANDO el kit de síntesis de ADNc de primera cadena Maxima para la RT-qPCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para generar ADNc de primera cadena. Se determinaron las expresiones de ARNm de *Ngal* (*Lcn2*), *Kim1*, *Mcp1*, IL-1α (*Il1a*), IL-6 (*Il6*), IL-10 (*Il10*), TNF-α (*Tnf*), HO-1 (*Hmox1*), *Bax*, *Bcl-2* (*Bcl2*), ARN ribosómico 18S (*RN18s*) y β-actina (*Actb*) mediante RT-PCR en tiempo real utilizando la mezcla maestra de enzimas Light Cyler 480 SYBR Green 1 en un sistema Light Cyler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La mezcla de reacción contenía 10 pmoles/µl de cada cebador de PCR (Tabla 1; Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, Ia, EE. UU.), 10 µl de mezcla maestra de enzimas Light Cyler 480 SYBR Green 1 y 1 µl de muestra de ADNc. Las condiciones de las PCR eran las siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos, seguido de 70 ciclos bajo las condiciones de PCR apropiadas. Se llevó a cabo la cuantificación con el método de segunda derivada mediante monitorización del número de ciclos en los que podía distinguirse la señal fluorescente sobre el fondo. Se analizaron los resultados con el software del Light Cyler 480 versión 1.5.0.39 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se determinó la expresión de ARNm de cada gen mediante comparación con el ARN ribosómico 18S como gen de mantenimiento en la misma muestra.

ES 2 926 179 T3

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos de parejas de cebadores específicas aplicadas para la detección en tiempo real de genes examinadas y condiciones de las reacciones de PCR.

Gen	Secuencias de cebador	Condiciones de la PCR
<i>Lcn2</i> de rata	F: 5'-GGG CTG TCC GAT GAA CTG AA-3' R: 5'-CAT TGG TCG GTG GGA ACA GA-3'	95°C-5 s
		56°C-5 s
		72°C-5 s
<i>Kim1</i> de rata	F: 5'-CGC AGA GAA ACC CGA CTA AG-3' R: 5'-CAA AGC TCA GAG ACC CCA TC-3'	95°C-5 s
		60°C-7 s
		72°C-7 s
<i>Mcp1</i> de rata	F: 5'-ATG CAG TTA ATG CCC CAC TC - 3' R: 5'-TTC CTT ATT GGG GTC ACC AC - 3'	95°C-5 s
		60°C-5 s
		72°C-10 s
<i>Il1a</i> de rata	F: 5'-TCT GCC ATT GAC CAT CTG TCT CTG -3' R: 5'-ACC ACC CGG CTC TCC TTG AA -3'	95°C-5 s
		55°C-5 s
		72°C-5 s
<i>Il6</i> de rata	F: 5'-GCC ACT GCC TTC CCT ACT TC - 3' R: 5'-GCC ATT GCA CAA CTC TTT TCT C -3'	95°C-5 s
		55°C-5 s
		72°C-5 s
<i>Il10</i> de rata	F: 5'- AGA ACC ATG GCC CAG AAA TCA AG-3' R: 5'-ACA GGG GAG AAA TCG ATG ACA GC -3'	95°C-5 s
		55°C-5 s
		72°C-5 s
<i>TNFa</i> de rata	F: 5'-GGG GCC ACC ACG CTC TTC TGT -3' R: 5'-CTC CGC TTG GTG GTT TGC TAC GAC -3'	95°C-5 s
		60°C-5 s
		72°C-7 s

(continuación)

Gen	Secuencias de cebador	Condiciones de la PCR
<i>Hmox1</i> de rata	F:5'- AGA CCG CCT TCC TGC TCA ACA TT -3' R: 5'- GAT TTT CCT CGG GGC GTC TCT G -3'	95°C-5 s
		58°C-5 s
		72°C-10 s
<i>Bax</i> de rata	F:5'- AGC CGC CCC AGG ACG CAT CCA -3' R: 5'- CAG CCG CTC CCG GAG GAA GTC CAG-3'	95°C-5 s
		63°C-5 s
		72°C-10 s
<i>Bcl</i> de rata	F:5'- ATG GCG CAA GCC GGG AGA ACA G -3' R: 5'- TGG CGA CAA GGG GCC GTA GAG G -3'	95°C-5 s
		63°C-5 s
		72°C-10 s
<i>Rn18S</i> de rata	F:5'-GCG GTC GCC GTC CCC CAA CTT CTT-3' R: 5'- GCG CGT GCA GCC CCG GAC ATC TA -3'	95°C-5 s
		60°C-5 s
		72°C-10 s
<i>Actb</i> de rata	F: 5'- ACCGAGCATGGCTACAGCGTCACC-3' R: 5'- GTGGCCATCTCTTGCTCGGAGTCT-3'	95°C-5 s
		54°C-5 s
		72°C-5 s

Aislamiento de proteínas y transferencia Western.

5 Todos los reactivos para la transferencia Western se adquirieron de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU., a menos que se indique lo contrario. Se lisaron muestras de tejidos en tampón que contenía leupeptina, aprotinina, Triton X-100, Tris-HCl, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético, NaF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo y ortovanadato de Na (cada sustancia se adquirió de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.). Se determinaron las

10 concentraciones de las proteínas utilizando ensayos de Bradford. Se separaron cincuenta microgramos de proteína en geles de SDS-PAGE al 12,5 % a 200 V (-60 mA, 90 min). La mezcla de proteínas preteñidas se utilizó como marcador de masa molecular. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon los sitios de unión no específica en solución de transferencia que contenía leche seca no grasa al 5 %. Se incubaron las membranas con anticuerpo monoclonal específico para caspasa-3 escindida de rata (Asp175) (Cell Signaling

15 Technology, Danvers, MA, EE. UU.) diluida a 1:1000. Las membranas se lavaron y se incubaron (1 hora, temperatura ambiente) con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.) diluido a 1:4000. Se confirmó la carga igual de proteína en el gel mediante tinción con Ponceau S y se utilizó, además, un control interno. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando un protocolo de detección de transferencia Western de quimioluminiscencia potenciada (sustrato HRP Luminata™ Forte Western, Millipore, Billerica, MA, EE.

20 UU.). Las bandas se analizaron con el software Quantity One versión 4.6.9. La abundancia de proteínas se representó como densidad óptica integrada (DOI) / Ponceau S en comparación con los controles.

Matriz de perlas citométricas.

Todos los reactivos y equipos para la matriz de perlas citométricas (MPC) se adquirieron de BD Biosciences (Budapest, Hungría). Se midieron homogenados de riñón perfundido para los niveles peptídicos de TNF α , IL-1 α e IL-10 mediante la utilización de juegos apropiados Flex de MPC de rata siguiendo el protocolo del fabricante. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un citómetro de flujo FACSVerse y los datos se analizaron utilizando el programa FCAP Array.

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Tras someter a ensayo la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov; se analizaron tablas de datos numéricos de todos los experimentos utilizando la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones de 2 grupos y la prueba de Kruskal-Wallis en el caso de que hubiera 3 o más grupos. Se consideró que los valores de P inferiores 0,05 indicaban diferencias estadísticamente significativas. Los valores de todas las mediciones se expresaron como medias \pm SEM.

Resultados de la evaluación histológica tras el autotrasplante.

Se llevó a cabo la evaluación histológica tras KTx en secciones de riñón teñidas con PAS. Se observaron daños tubulares y glomerulares graves en las ratas tratadas con vehículo (PF + T24 Tx). Los glomérulos se habían colapsado y su estructura se encontraba dañada y degradada. Se observaron signos excesivos de necrosis y núcleos picnóticos en las células epiteliales tubulares. Los riñones tratados con FLU (PC + T24 Tx F) mostraron daños histológicos más leves. Los glomérulos estaban intactos, y los núcleos y plasma tubulares mostraban una tinción normal. Los bordes en cepillo de los túbulos estaban conservados. De manera similar, la estructura se encontraba mejor conservada en riñones que habían sido perfundidos con FLU (PF F) pero recolectados tras 2 horas de isquemia fría (PF). Se cuantificó el grado de daño tubular mediante la medición de las superficies de luz tubular. La dilatación de la luz tubular está causada por la degradación de las células epiteliales tubulares y es un buen indicador de daño tubular. Las luces tubulares se encontraban menos dilatadas en los riñones tratados con FLU con perfusión (PF + T24 Tx F) o sin perfusión (PF F).

REFERENCIAS

Guibert et al Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade *Transfus Med Hemother* 2011;38:125-142.

Stewart ZA, Cameron AM, Singer AL, Montgomery RA, Segev DL: Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) is associated with reduced graft survival in deceased donor livers, especially those donated after cardiac death. *Am J Transplant* 2009;9:286-293.

Erkasap S, Ates E. L-Arginine-enriched preservation solution decreases ischaemia/reperfusion injury in canine kidneys after long term cold storage. *Nephrology Dialysis Transplant* 2000; 15: 1224-7

Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia reperfusion injury. *Transplantation* 2003; 76: 50-54

Jani A, Zimmerman M, Martin J, Lu L, Turkmen K, Ravichandran K, Pacic A, Ljubanovic D, Edelstein CL. Perfusion storage reduces apoptosis in a porcine kidney model of donation after cardiac death. *Transplantation*. 2011;91:169-175

Stubenitsky et al. Kidney preservation in the next millenium *Transpl Int* (1999) 12:83-91

Moers et al. Non-heart beating organ donation: overview and future perspectives *Transplant International* doi:10.1111/j.1432-2277.2007.00455.x

US Renal Data System Annual Report 2015

Hosszu et al. Sigma-1 receptor agonism is protective against renal ischemia/reperfusion injury *JASN ASN*.2015070772; published ahead of print April 7, 2016

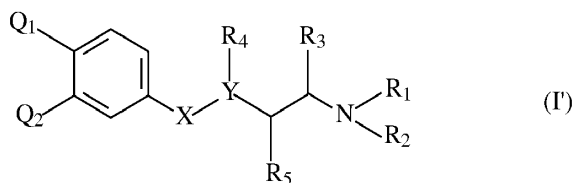
Vettel et al. Dopamine and Lipophilic Derivates Protect Cardiomyocytes against Cold Preservation Injury. *J Pharmacol Exp Ther* 348:77-85, January 2014

Wu et al. Antiapoptotic compound to enhance hypothermic liver preservation. *Transplantation*. 1997 Mar 27;63(6):803-9.

- Campbell et al. Development of pancreas storage solutions: Initial screening of cytoprotective supplements for β -cell survival and metabolic status after hypothermic storage. *Biopreserv Biobank*. 2013 Feb;11(1):12-8. doi: 10.1089/bio.2012.0023.
- 5 Jani et al. Perfusion storage reduces apoptosis in a porcine kidney model of donation after cardiac death. *Transplantation*. 2011 Jan 27;91(2):169-75.
- 2007 Annual Report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data 1997-2006. Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems Bureau, Division of Transplantation, Rockville, MD.
- 10 Becker T, Ringe B, Nyibata M, et al. Pancreas transplantation with histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution and University of Wisconsin (UW) solution: is there a difference? *Jop*. 2007;8(3):304-311.
- 15 Potdar S, Malek S, Eghtesad B, et al. Initial experience using histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in clinical pancreas transplantation. *Clin Transplant*. Dec 2004;18(6):661-665.
- Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transpl*. Feb 2006;12(2):226-230.
- 20 Feng L, Zhao N, Yao X, et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl*. Aug 2007;13(8): 1125-1136.
- 25 Kloutz et al. Protection of cellular and mitochondrial functions against liver ischemia by N-benzyl-N'-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl)-piperazine (BHDP), a sigma1 ligand. *Eur J Pharmacol* 578 (2008) 292-299.

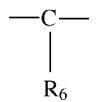
REIVINDICACIONES

1. Utilización *ex vivo* de un compuesto agonista de receptor sigma-1 (S1R) en una solución de conservación para la conservación de un órgano o tejido, completo o parcial, trasplantable, en la que el compuesto agonista de S1R presenta la fórmula I' a continuación:



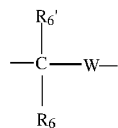
en la que:

Q₁ es H, halógeno, pseudohalógeno, alquilo C(1-4) sustituido opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos, alcoxi C(1-3), arilo C(6-10), sustituido opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos,
 Q₂ es H, halógeno, pseudohalógeno o alcoxi C(1-3),
 X es O, CH₂, etileno o carbonilo (CO), amida,
 o X presenta la fórmula:



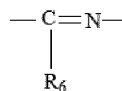
en la que:

R₆ se selecciona del grupo que consiste en un hidroxilo, alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(-13) y alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-2), alquilo C(1-6) o alcoxialquilo C(1-6), preferentemente alcoxialquilo C(1-4), arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),
 o X presenta la fórmula:



en la que:

W es -CH- o carbonilo (-CO-) o W no se encuentra presente, y
 R₆ y R₆ son alquilos C(-16) sustituidos independientemente o no sustituidos, preferentemente alquilo C(1-3), alquilo C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcoxialquilo C(1-6), preferentemente alcoxialquilo C(1-4), alquilo C(1-6), preferentemente alquilo C(1-4) o por lo menos uno de entre R₆ y R₆, preferentemente R₆ es un arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),
 o R₆ y R₆ juntos forman un cicloalquilo C(4-7), preferentemente un ciclopentilo o un ciclohexilo, o X presenta la fórmula:



en la que:

R₆ se selecciona de un alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(1-3), alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-6) alquilo C(1-6) o alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6) o alcoxialquilo C(1-6) o arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),
 Y es CH, N, O o -O-CH₂CH₂O-,
 en la que:
 en el caso de que Y sea O, entonces R₄ no se encuentra presente,

en el caso de que Y sea N, entonces R₄ es H, o un alquilo C(1-3) o alqueno C(1-3), preferentemente etilo o propenilo, o R₄ y R₁ junto con Y, N y los átomos de carbono entre ellos forman un anillo heterocíclico C(5-7),

en el caso de que Y sea CH, entonces R₄ se selecciona de entre H, alquilo C(1-4) sustituido o no sustituido, alcoxi C(1-4) y arilo C(5-10), o R₄ y R₁ junto con Y, N y los átomos de carbono entre ellos forman un anillo heterocíclico C(5-7),

R₃ se selecciona de entre H, un alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(1-4), alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-4), alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6) o alcoxialquilo C(1-6), arilo C(5-10), o R₃ y R₆ junto con la fracción -Y-alquilo C2 a la que se encuentran unidos, pueden formar un arilo policíclico C(7-14) sustituido o no sustituido o heteroarilo policíclico C(7-14) o cicloalquilarilo C(7-14), o R₃ y R₆ junto con la fracción -X-Y-alquilo C2 a la que se encuentran unidos, pueden formar un cicloalquilo de 6 a 8 elementos saturado o parcialmente insaturado, o un heterocicloalquilo de 6 a 8 elementos que comprende 0 a 3 heteroátomos, o un alquilarilo, que comprende preferentemente un fenilo sustituido o no sustituido,

R₅ es H o alquilo C(1-3) o alquiloxi C(1-3), o

R₅ y R₆ junto con los átomos de carbono a los que se encuentran unidos forman un anillo de 3, 4, 5 o 6 elementos, saturado o insaturado, preferentemente saturado, en el que dicho anillo comprende opcionalmente un heteroátomo, preferentemente O, en el que dicho anillo es preferentemente furanilo, dihidrofuranilo o tetrahidrofuranilo, en el que preferentemente Y no se encuentra presente,

R₁ y R₂ son, independientemente, H o un alquilo C(1-6), preferentemente metilo o etilo, o

R₁ y R₂ forman un anillo de 5 o 6 elementos, saturado o insaturado, preferentemente saturado, en el que dicho anillo comprende opcionalmente un heteroátomo, preferentemente O, preferentemente una oxazina o morfolina, o alternativamente N, preferentemente un anillo diazina o piperazina, o

dicho anillo es un anillo piperidina opcionalmente sustituido o no sustituido, preferentemente un anillo piperidina sustituido con uno o dos de entre OH y metoxi, y fenilo, preferentemente un fenilo sustituido con un halógeno en la posición para, en el que dichos sustituyentes preferentemente se encuentran en la posición para del anillo piperidina,

o R₁ es un alqueno C(2-4), preferentemente alqueno C(2-3) o alqueno C(3-4), y junto con Y y N y los átomos de carbono entre Y y N forman un anillo heterocíclico, preferentemente una piperazina, y R₂ es un alquilo C(1-6), preferentemente alquilo C(1-4), arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6) o aralquilo C(7-10),

o R₂ es un alqueno C(2-4), preferentemente alqueno C(2-3) o alqueno C(3-4) y junto con el N forman un anillo heterocíclico, preferentemente un tetrahidrotetrazol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

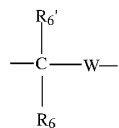
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que, en la fórmula I':

Q₁ es H, halógeno, pseudohalógeno, alquilo C(1-2) sustituido opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos, alcoxi C(1-3), arilo C(6-10), sustituidos opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos,

Q₂ es H, halógeno, pseudohalógeno o alcoxi C(1-3),

X es O, CH₂, etileno o carbonil (CO) amida,

o X presenta la fórmula:

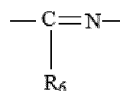


en la que:

W es -CH- o carbonilo (-CO-), y

R₆ y R₆' son alquilo C(1-3) sustituido independientemente o no sustituido, preferentemente alquilo C(1-3), alquiloxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-6) alquilo C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6), alquiloicarbonilo C(1-6), preferentemente alquiloicarbonilo C(1-4) o por lo menos uno de entre R₆ y R₆', preferentemente R₆' es arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),

o R₆ y R₆' juntos forman un cicloalquilo C(4-7), preferentemente un ciclopentilo o un ciclohexilo, o X presenta la fórmula:



en la que:

R₆ se selecciona de un alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(1-3), alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-6) alquilo C(1-6) o alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6) o alcoxilquilo C(1-6), alquilo carbonilo C(1-6), preferentemente alquilo carbonilo C(1-4) o arilo C(5-10), preferentemente arilo C(5-6),

Y es CH, N, O o -O-CH₂CH₂O-,

en la que:

en el caso de que Y sea O, entonces R₄ no se encuentra presente,

en el caso de que Y sea N, entonces R₄ es H o alquilo C(1-3) o alqueno C(1-3), preferentemente etilo o propenilo,

en el caso de que Y sea CH, entonces R₄ se selecciona de entre H, alquilo C(1-4) sustituido o no sustituido, alcoxi C(1-4) y arilo C(5-10),

R₃ se selecciona de entre H, alquilo C(1-6) sustituido o no sustituido, preferentemente alquilo C(1-4), alcoxi C(1-6), preferentemente alcoxi C(1-4), alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6) o alcoxilquilo C(1-6), arilo C(5-10),

R₅ es H o alquilo C(1-3) o alquilo C(1-3),

R₁ y R₂ son, independientemente, H o alquilo C(1-6), preferentemente metilo o etilo, o

R₁ y R₂ forman un anillo de 5 o 6 elementos, saturado o insaturado, preferentemente saturado, en el que dicho anillo comprende opcionalmente un heteroátomo, preferentemente O, preferentemente una oxazina o morfolina, o alternativamente N, preferentemente un anillo diazina o piperazina, o

dicho anillo es un anillo piperidina opcionalmente sustituido o no sustituido, preferentemente un anillo piperidina sustituido con uno o dos de entre OH y metoxi, y fenilo, preferentemente un fenilo sustituido con un halógeno en la posición para, en el que dichos sustituyentes preferentemente se encuentran en la posición para del anillo piperidina.

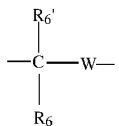
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que, en la fórmula I':

Q₁ es H, halógeno, pseudohalógeno, alquilo C(1-2) sustituido opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos, alcoxi C(1-3), arilo C(5-6), sustituidos opcionalmente con 1, 2, 3 o 4 halógenos,

Q₂ es H, halógeno o pseudohalógeno,

X es O, o

X presenta la fórmula:

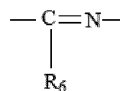


en la que:

W es -CH- o carbonilo (-CO-), y

R₆ y R₆' son alquilo C(1-3) sustituido independientemente o no sustituido, alcoxi C(1-3), preferentemente alcoxi C(1-2), preferentemente alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6), alquilo carbonilo C(1-4) o por lo menos uno de entre R₆ y R₆', preferentemente R₆' es un arilo C(5-6)

o R₆ y R₆' juntos forman un cicloalquilo C(4-6), preferentemente un ciclopropilo o un ciclohexilo, o X presenta la fórmula:



en la que:

R₆ se selecciona de entre alquilo C(1-3),

alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-4) alquilo C(1-6) o alcoxilquilo C(1-6), alquilo carbonilo C(1-4) o arilo C(5-6),

Y es O o -O-CH₂CH₂O-,

en la que:

R₄ no se encuentra presente,

R₃ se selecciona de entre H, alquilo C(1-4), alcoxi C(1-4), alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6), alcoxilquilo C(1-6) o arilo C(5-6)

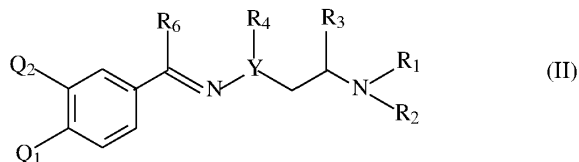
R₅ es H, alquilo C(1-3) o alquilo C(1-3),

R₁ y R₂ son independientemente H, metilo o etilo, o

R₁ y R₂ forman un anillo de 5 o 6 elementos, saturado o insaturado, preferentemente saturado, en el que dicho anillo comprende opcionalmente un heteroátomo, preferentemente O, preferentemente una oxazina o morfolina, o alternativamente N, preferentemente un anillo diazina o piperazina, o

dicho anillo es un anillo piperidina opcionalmente sustituido o no sustituido, preferentemente un anillo piperidina sustituido con uno o dos de entre OH y metoxi, y fenilo, preferentemente un fenilo sustituido con un halógeno en la posición para, en el que dichos sustituyentes preferentemente se encuentran en la posición para del anillo piperidina.

- 5
4. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto agonista de S1R presenta la fórmula II a continuación:



10
en la que:

Q₁ es Cl o F o metilo sustituido con halógeno seleccionado de entre CH₂F, CHF₂ CF₃, CH₂Cl, CHCl₂, CCl₃, o metoxi

Q₂ es H, Cl o F,

R₆ se selecciona de entre un alquilo C(1-3), alcoxi C(1-3), alcoxi C(1-2) alquilo C(1-6), arilo C(5-6) sustituido o no sustituido,

Y es O

R₄ no se encuentra presente,

R₃ es H, metilo o etilo,

R₅ es H, metilo o etilo,

R₁ y R₂ son independientemente H, metilo o etilo,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15
20
25 5. Utilización según la reivindicación 4, en la que:

Q₁ es un metilo sustituido con halógeno seleccionado de entre CHF₂, CF₃, CHCl₂ y CCl₃,

Q₂ es H,

R₆ se selecciona de entre alcoxi C(1-2) alquilo C(2-5) sustituido o no sustituido,

Y es O,

R₄ no se encuentra presente,

R₃ es H o metilo,

R₅ es H, metilo o etilo,

R₁ y R₂ son, independientemente, H, metilo o etilo,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 30
35
40 6. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto agonista de S1R es la fluvoxamina.

7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el órgano o tejido se almacena a una temperatura de entre 0°C y 10°C.

8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el órgano se selecciona de entre corazón, pulmón, órganos abdominales, incluyendo hígado, páncreas, intestino y riñón; o el tejido se selecciona de entre tejido cutáneo, tejido de vasos sanguíneos, islotes de Langerhans, tejido renal, tejido cardiaco y córnea.

9. Utilización según la reivindicación 8, en la que el órgano es el riñón o el tejido es tejido renal y/o el órgano es el hígado o el tejido es tejido hepático.

10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto agonista de S1R se utiliza para reducir, retrasar o evitar daños celulares durante el almacenamiento del órgano o tejido almacenado en la solución de conservación.

11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tiempo de conservación máximo de dicho órgano o tejido se incrementa en por lo menos 15 %, preferentemente en por lo menos 50 %, altamente preferentemente en por lo menos 100 % respecto al tiempo de conservación máximo predicho del órgano completo o parcial o el tejido, almacenado bajo condiciones idénticas y en una solución de conservación que presenta la misma composición pero no comprende el compuesto agonista de S1R.

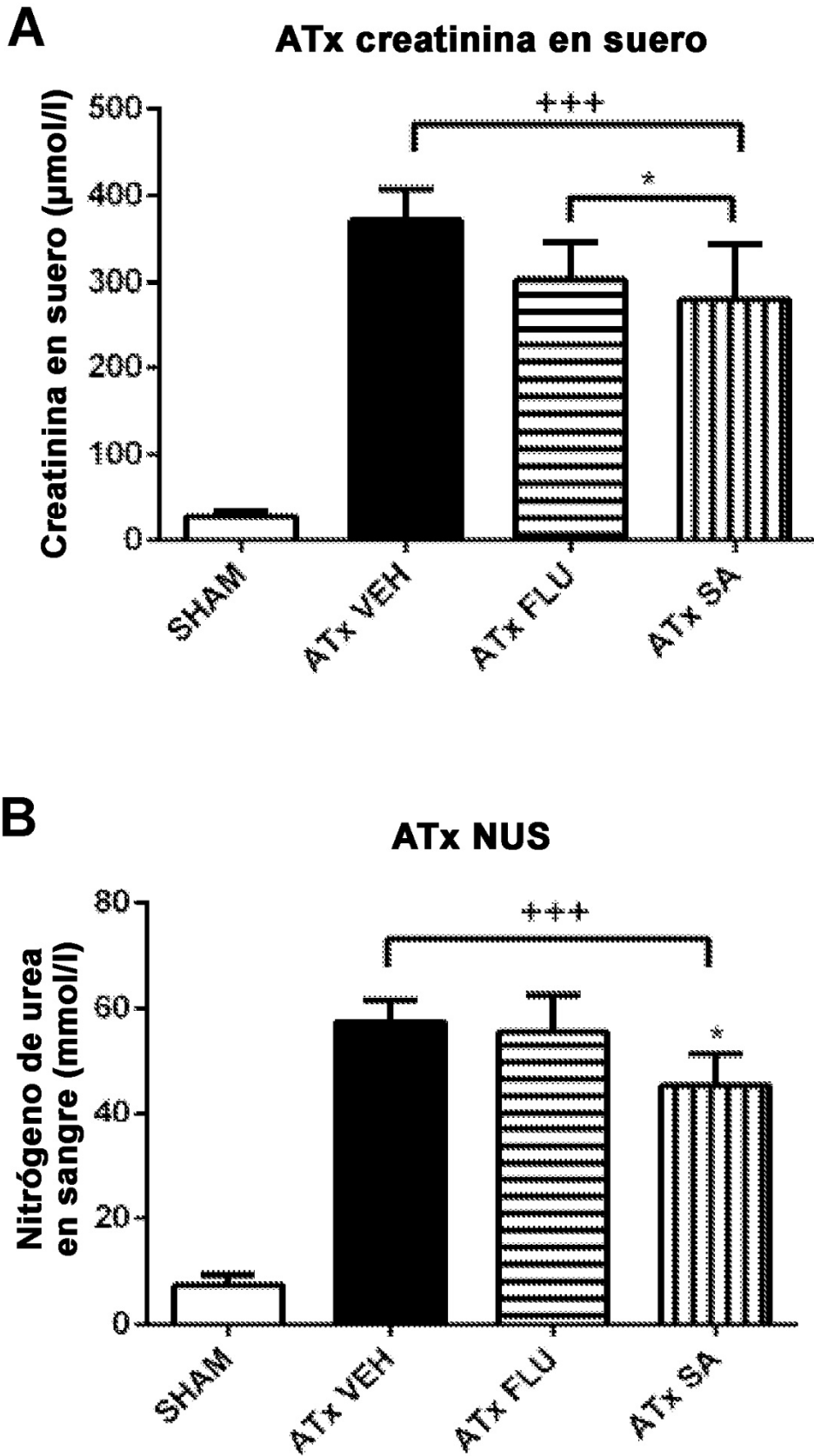


FIG. 1

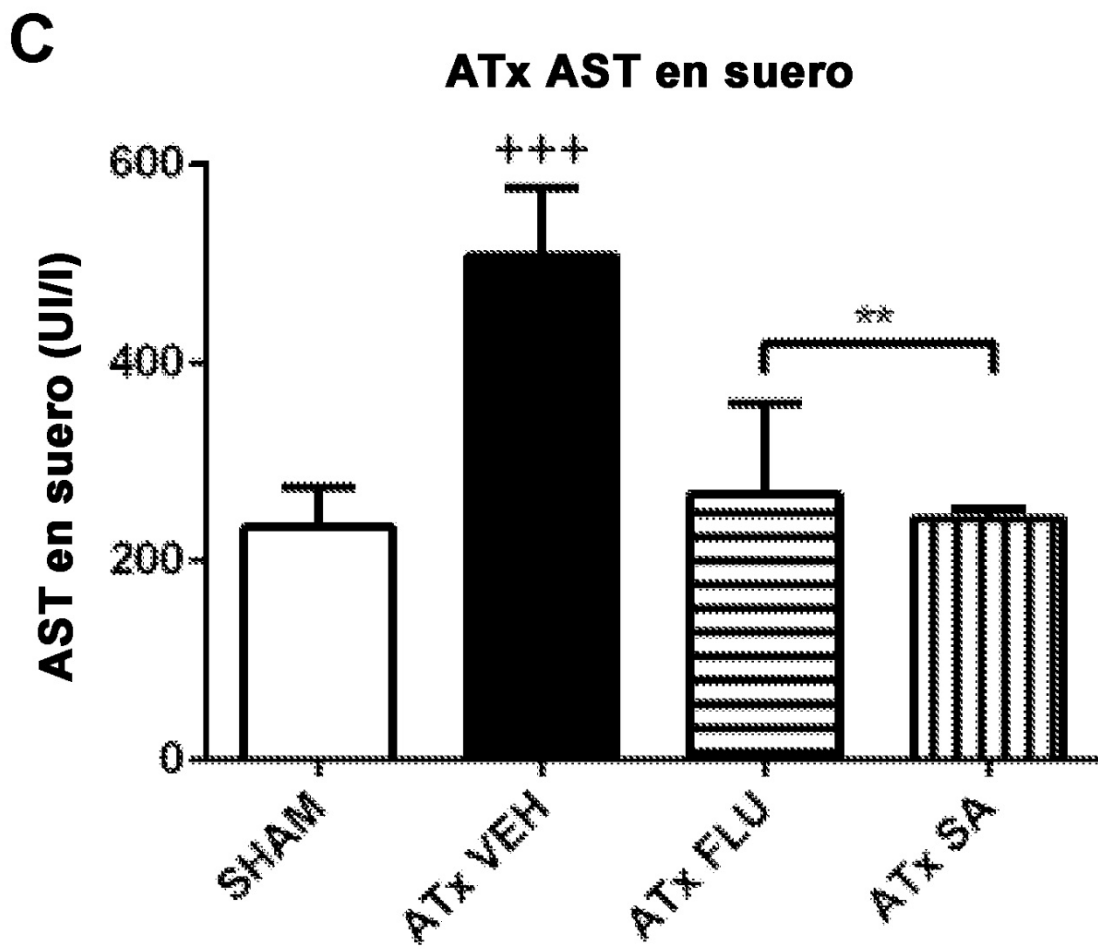


FIG. 1

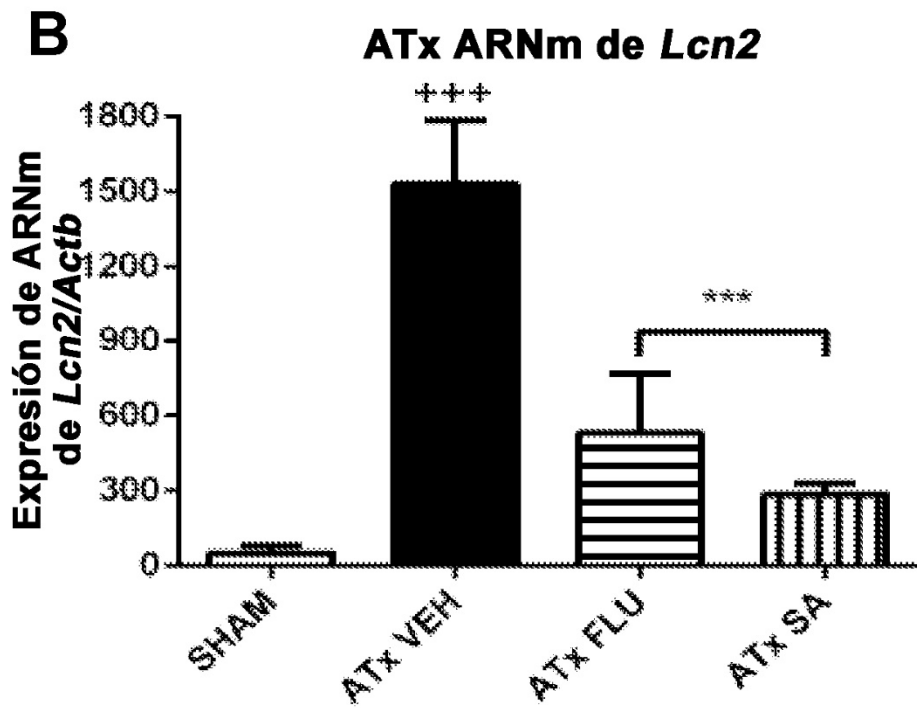
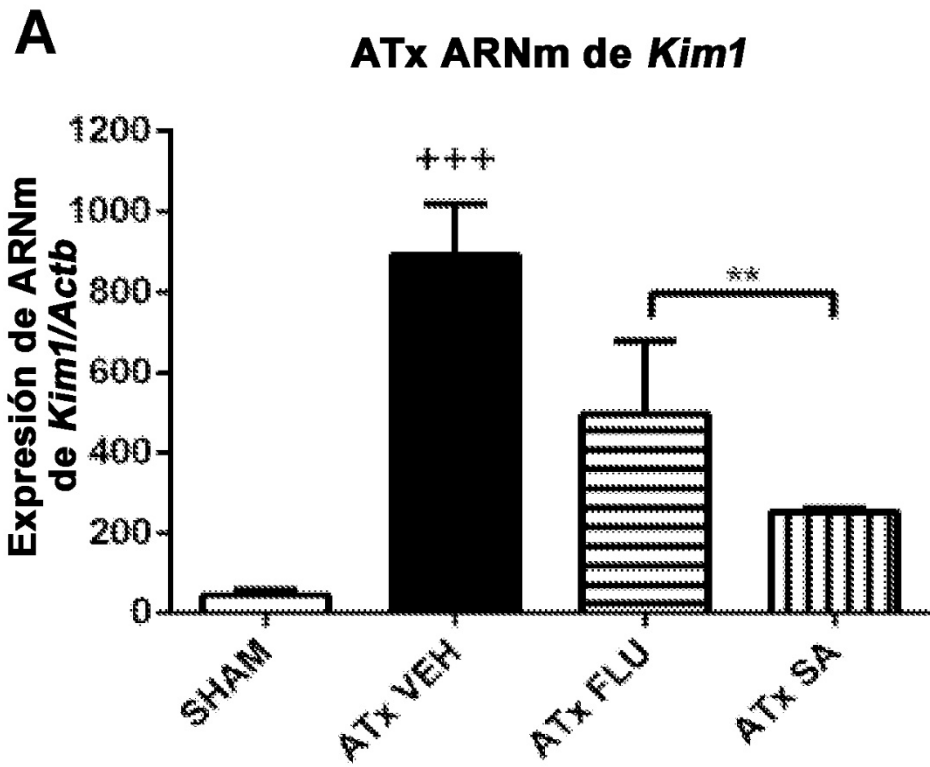


FIG. 2

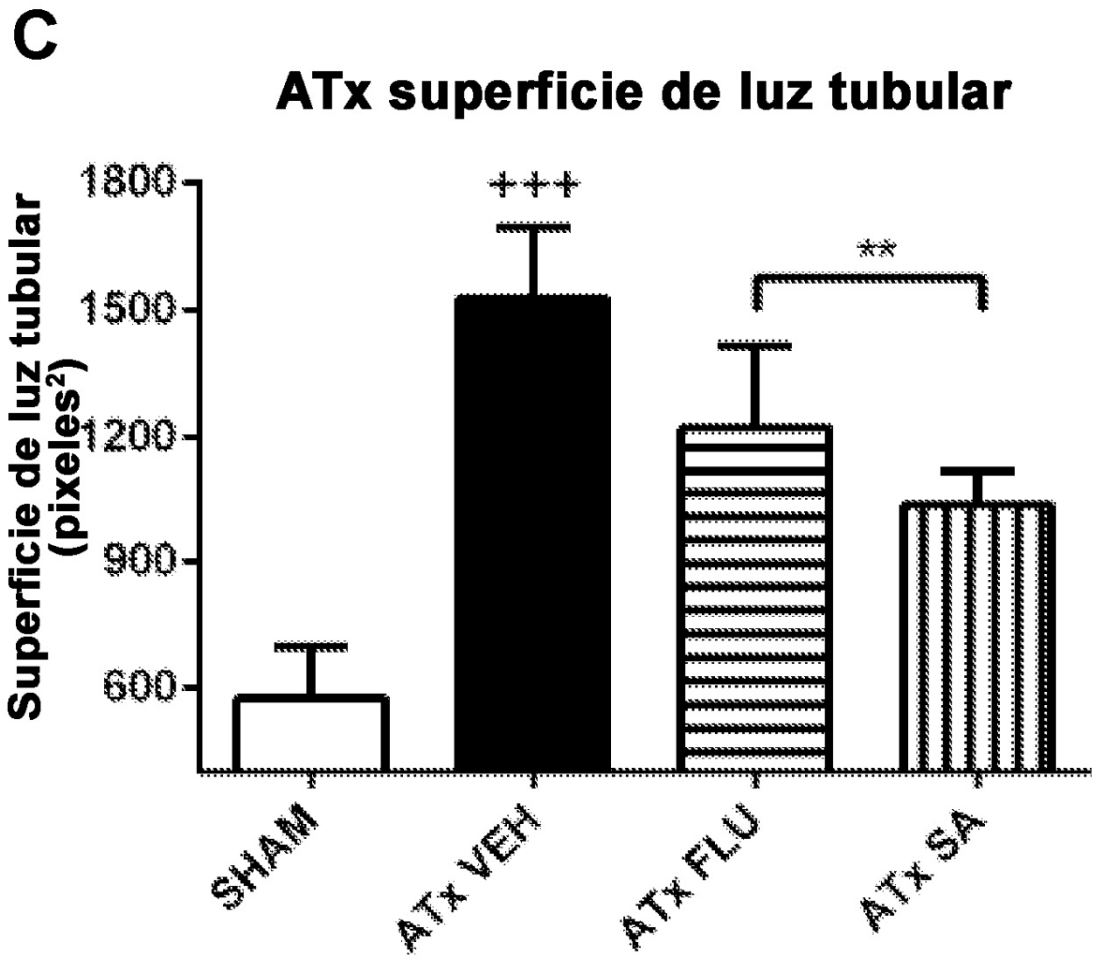
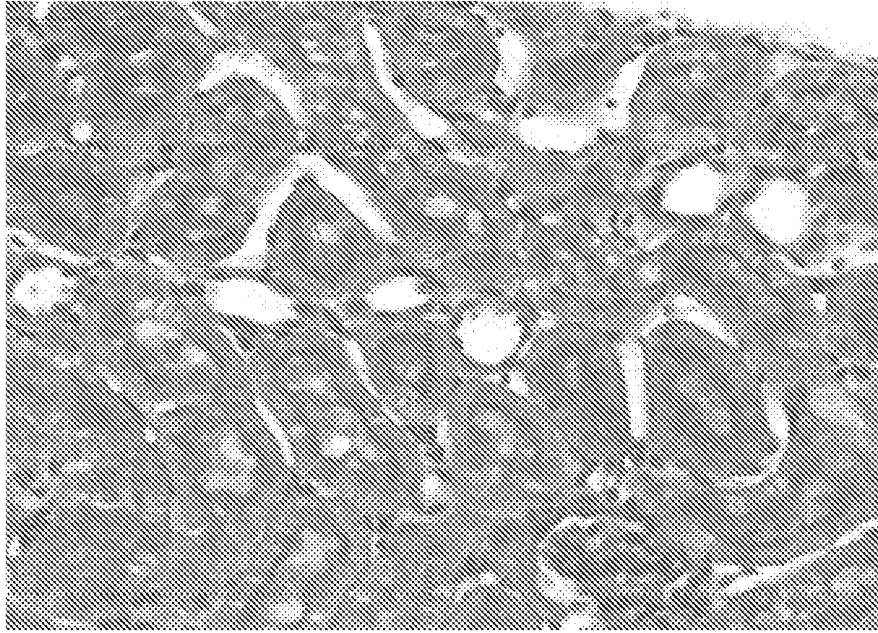


FIG. 2

D/1

SHA



ATx VEH

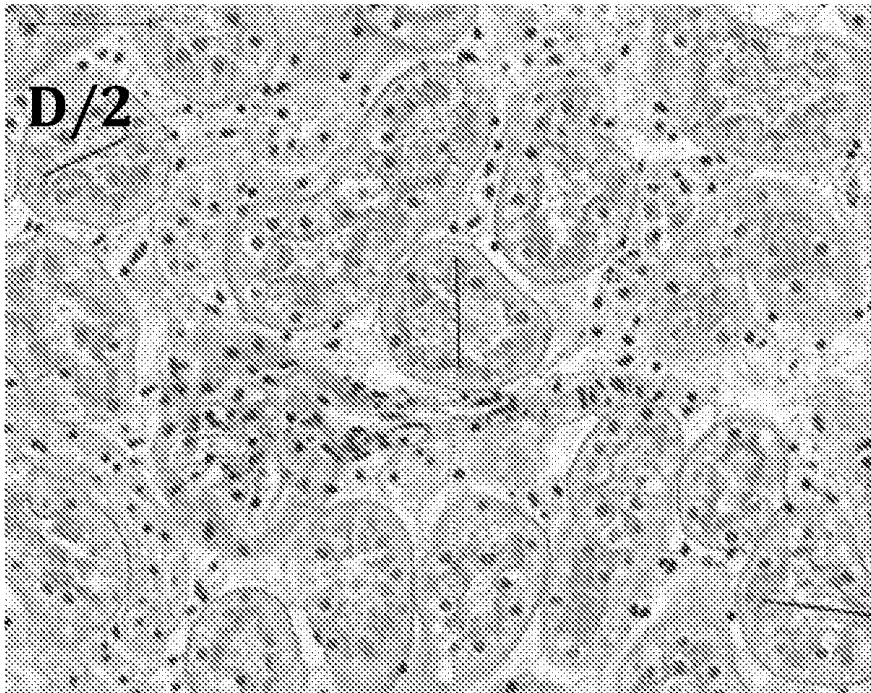
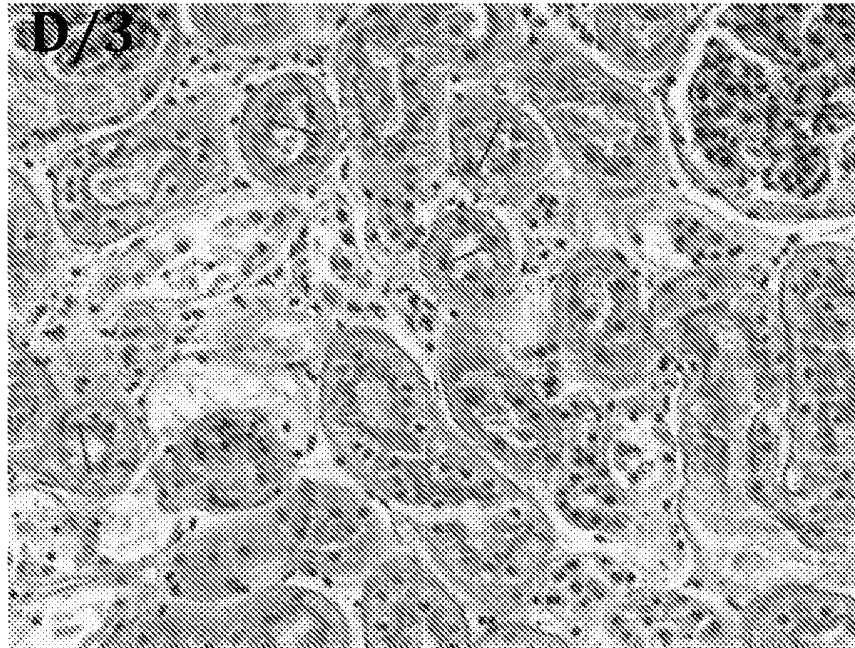


FIG. 2

ATx



ATx

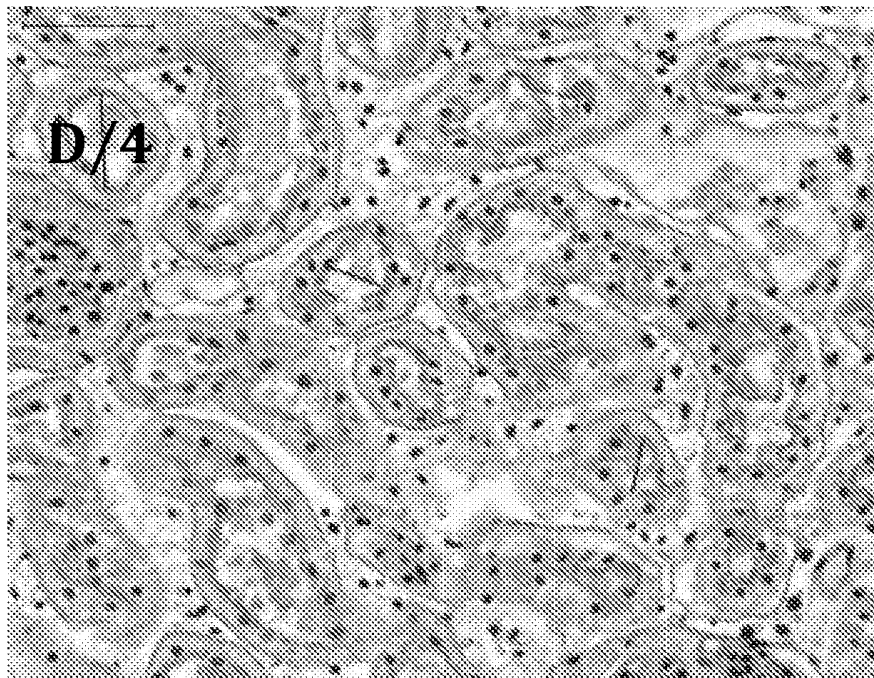


FIG. 2

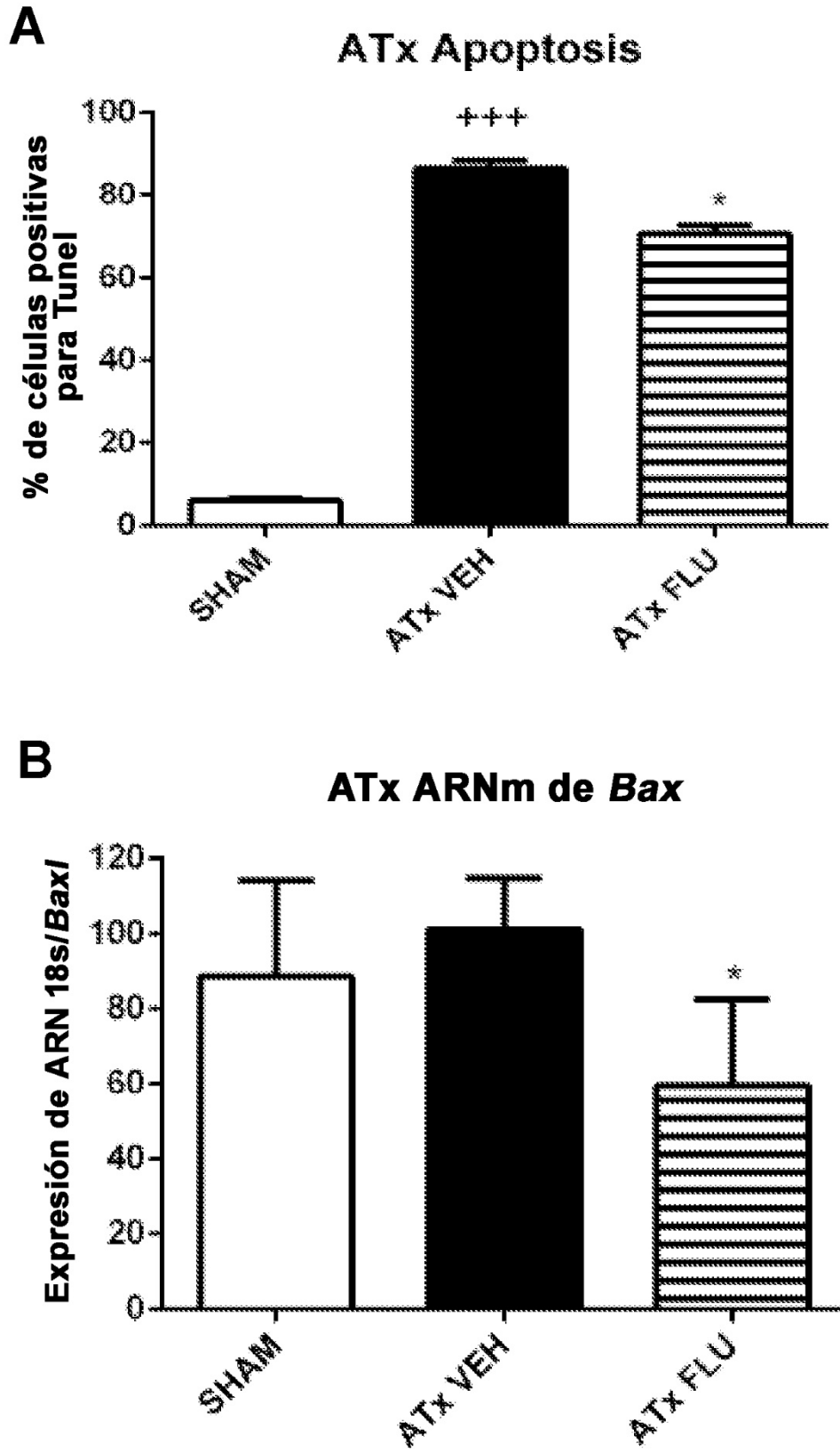


FIG. 3

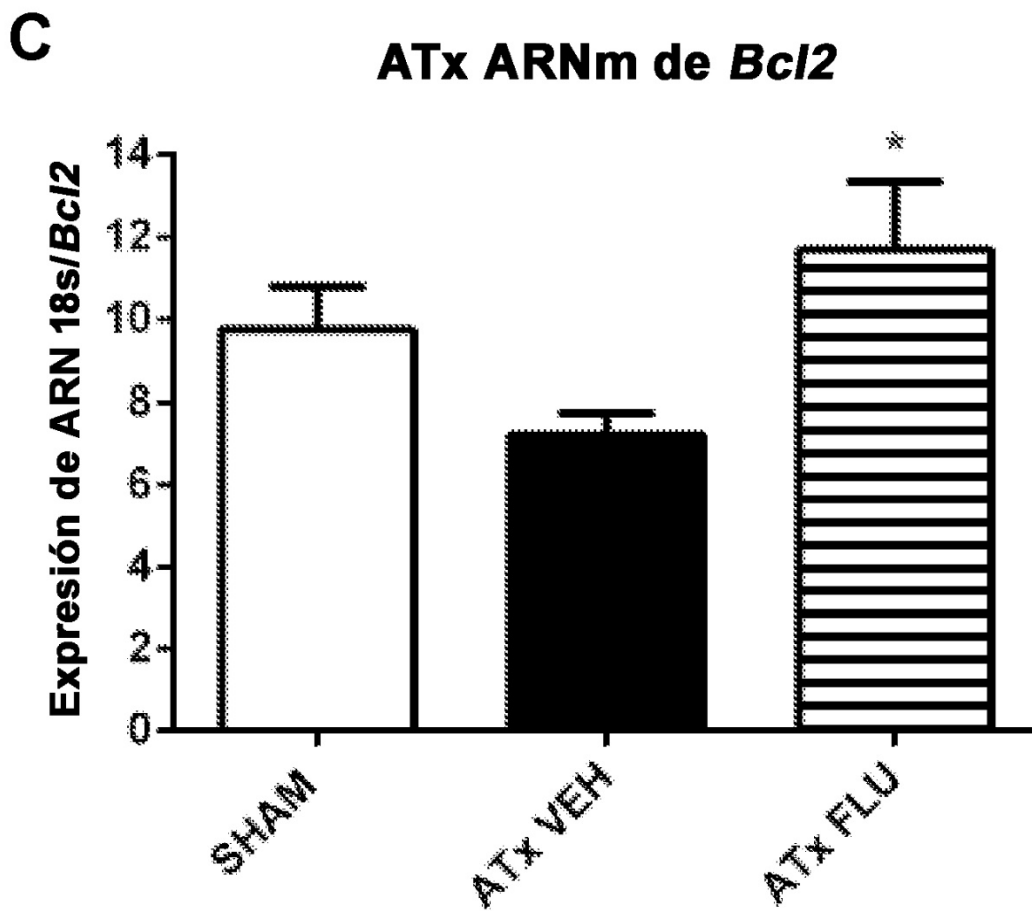
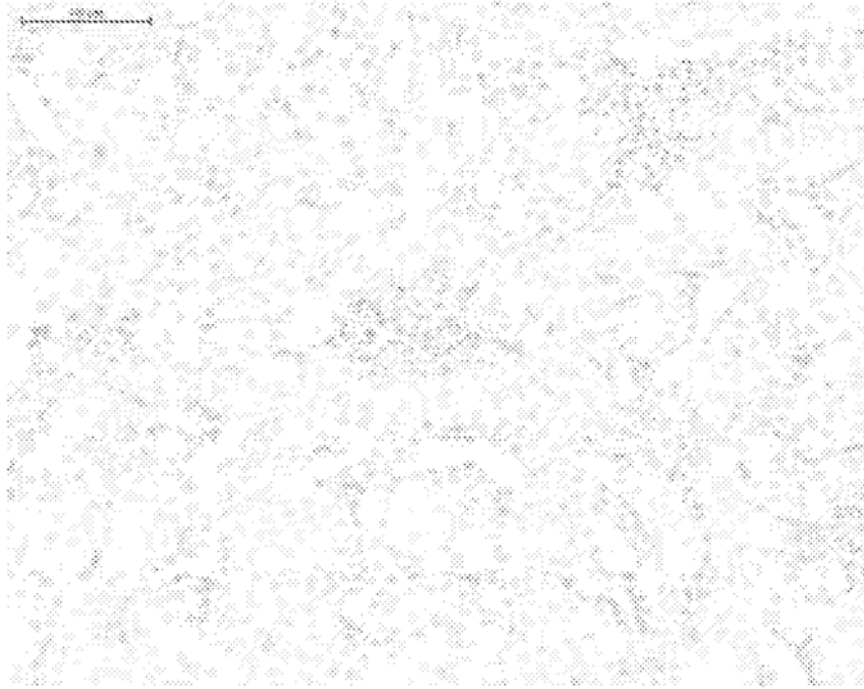


FIG. 3

D/1

SHAM



D/2

ATx VEH

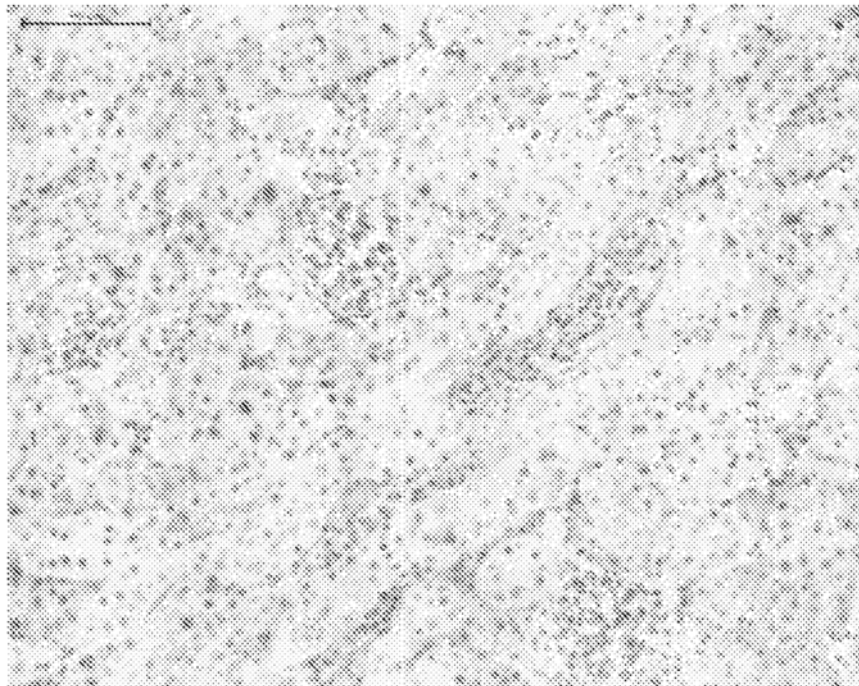


FIG. 3

D/3

ATx FLU

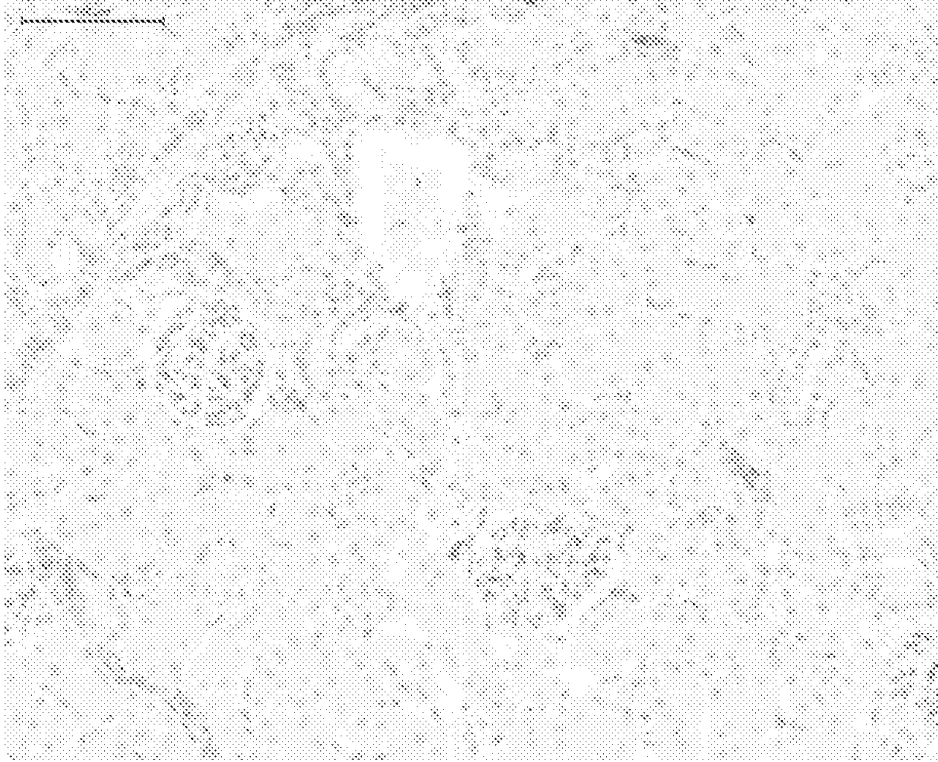


FIG. 3

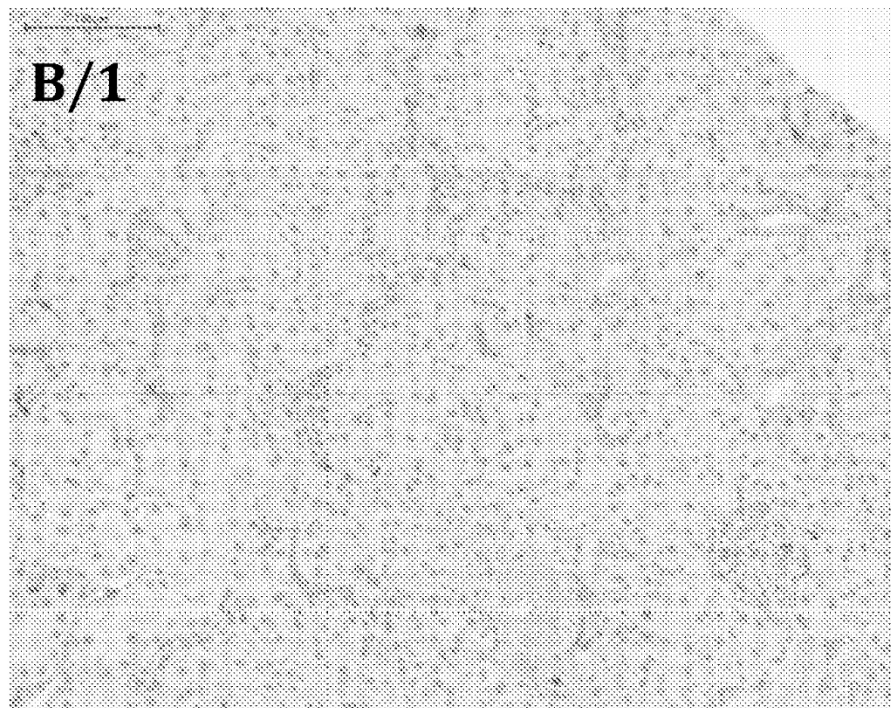
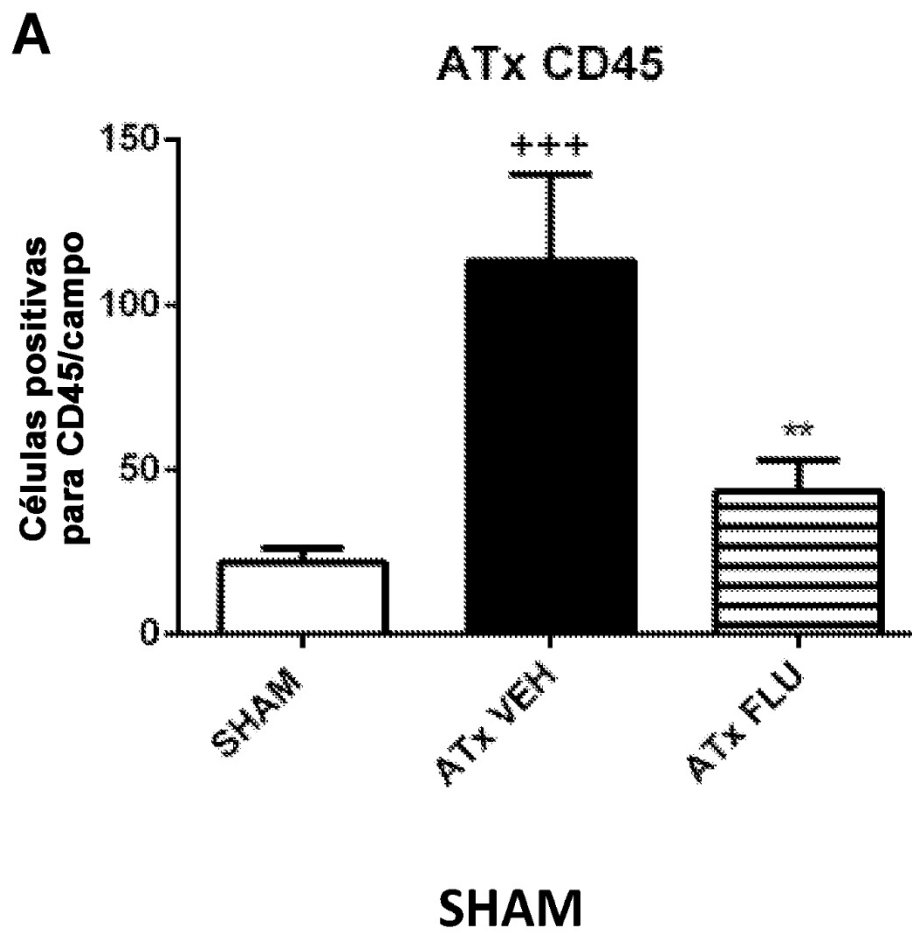
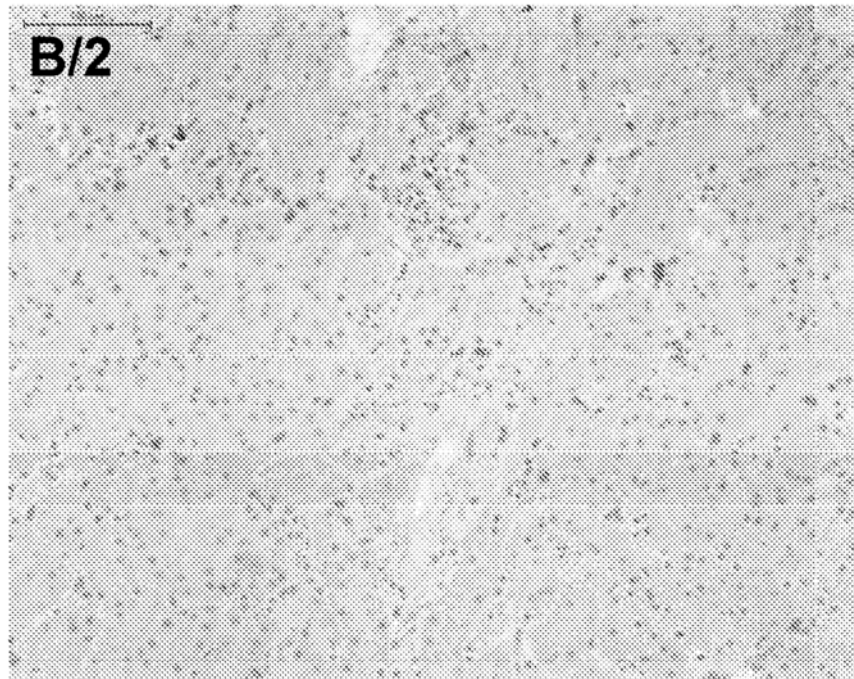


FIG. 4

ATx VEH



ATx FLU

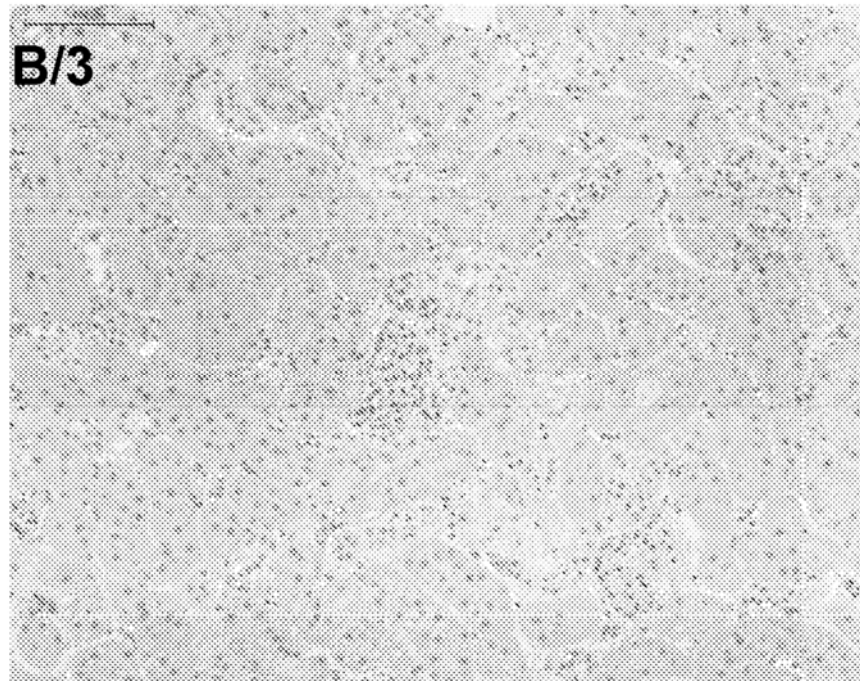


FIG. 4

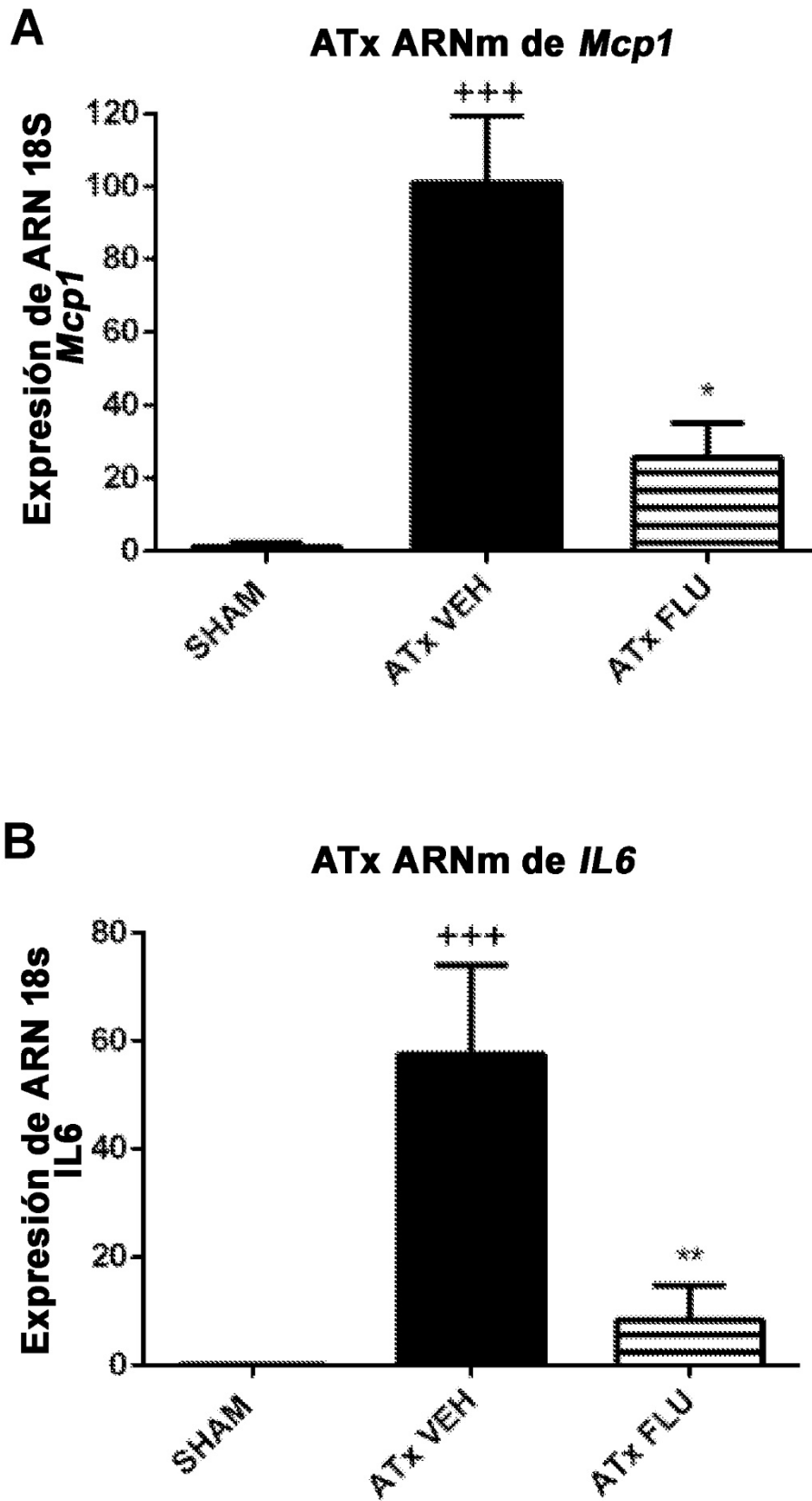


FIG. 5

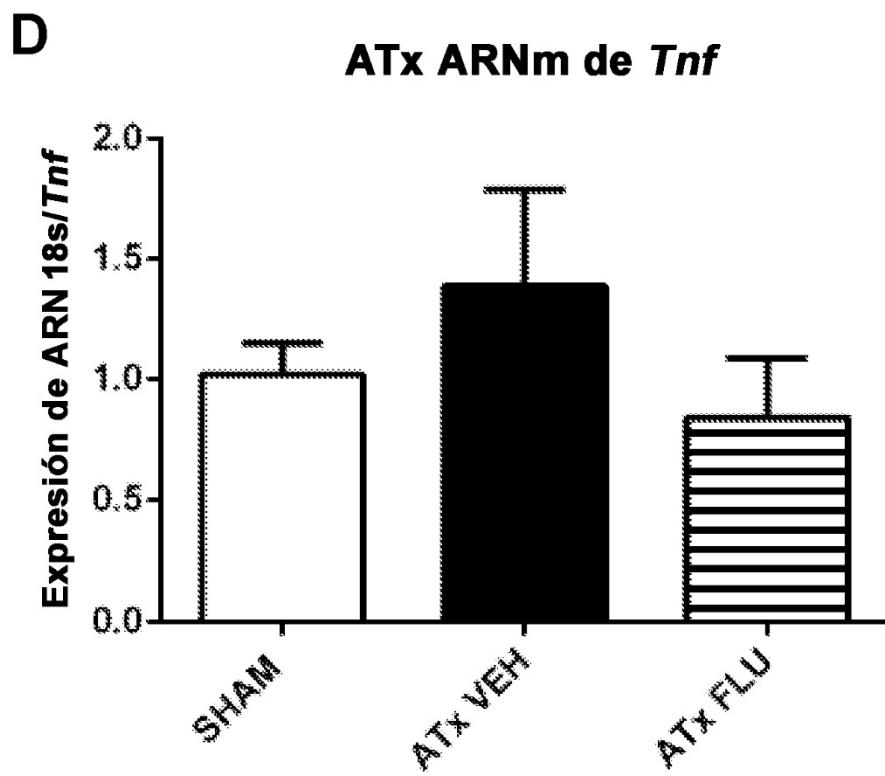
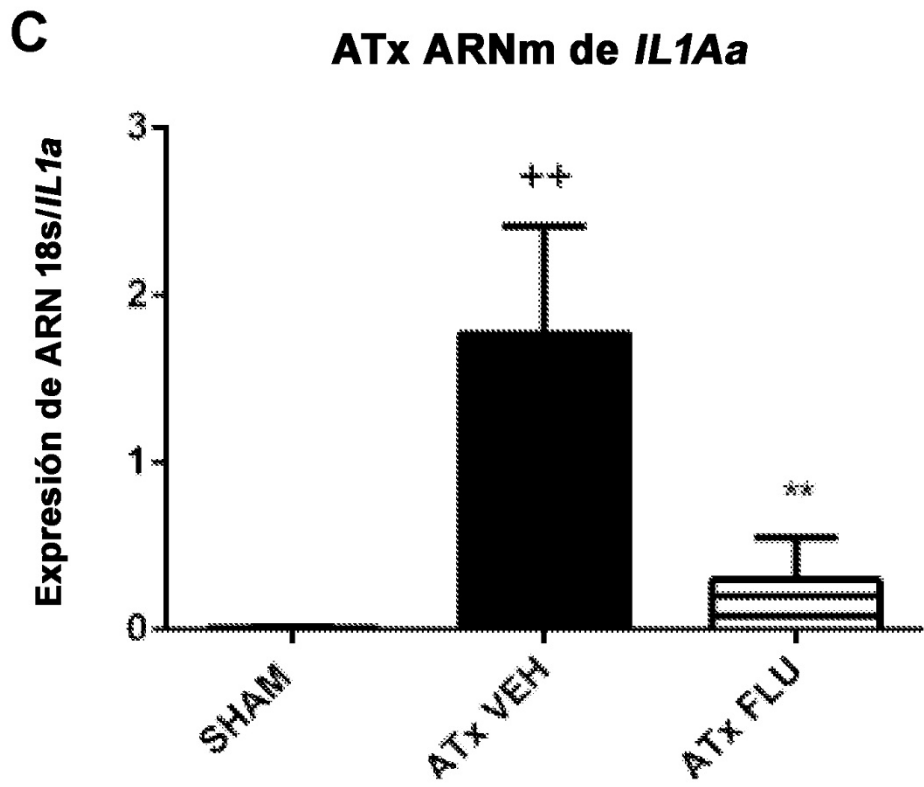
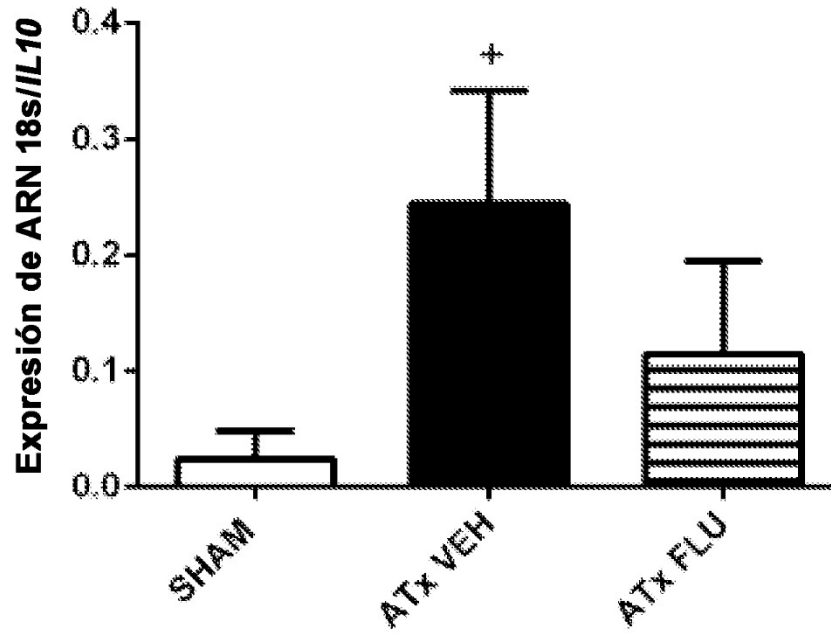


FIG. 5

E

ATx ARNm de *IL10*



F

ATx proteína IL-1 α

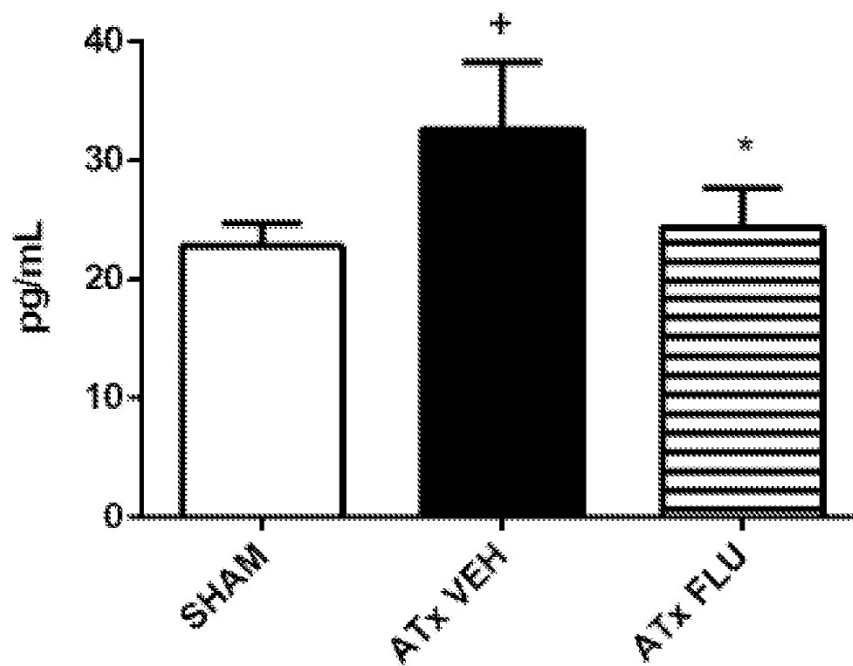


FIG. 5

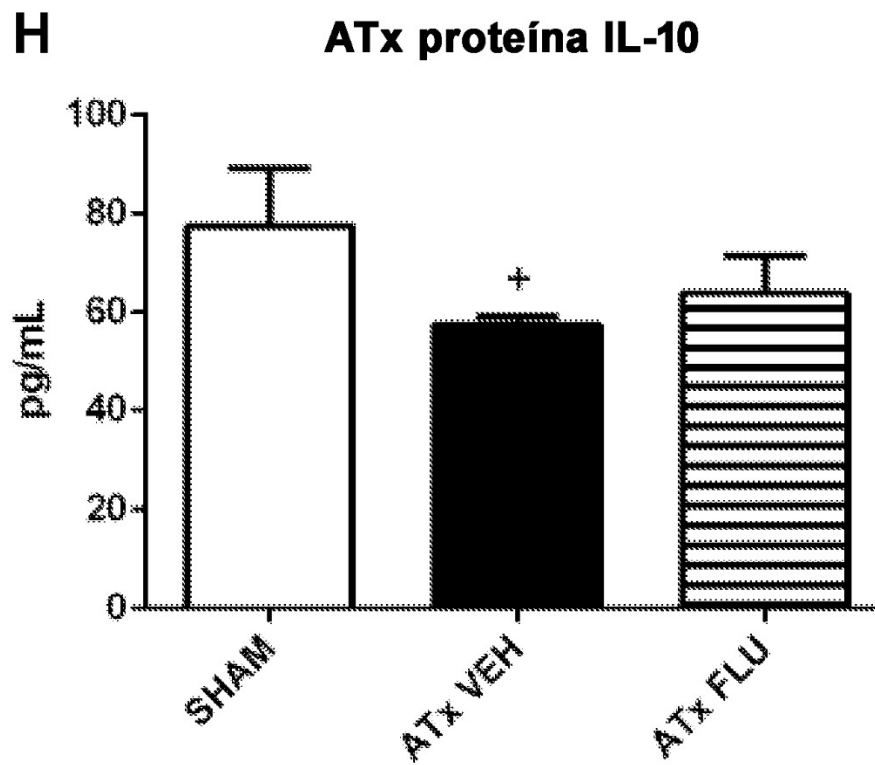
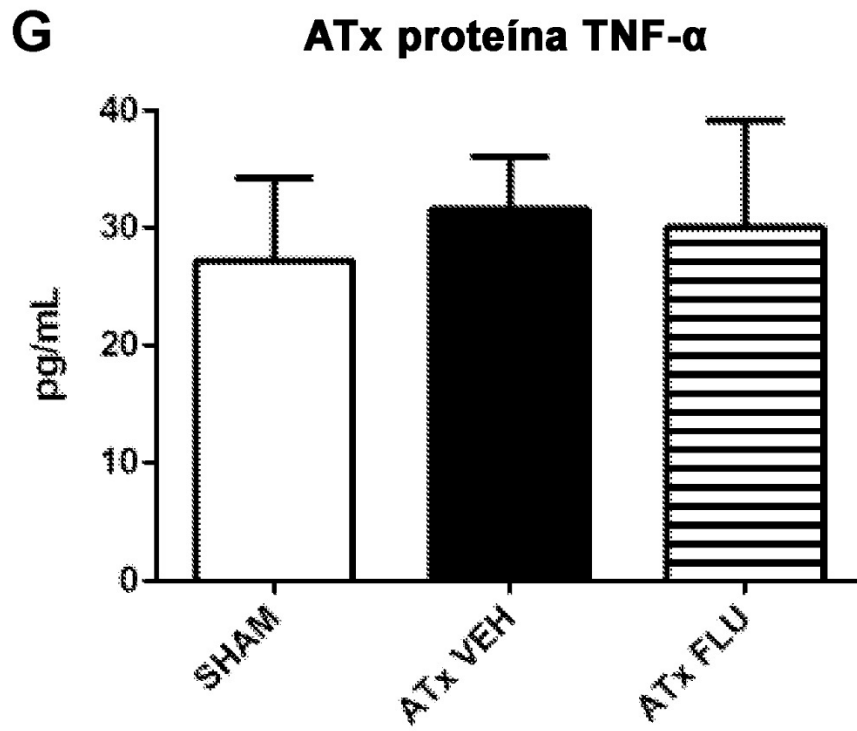


FIG. 5

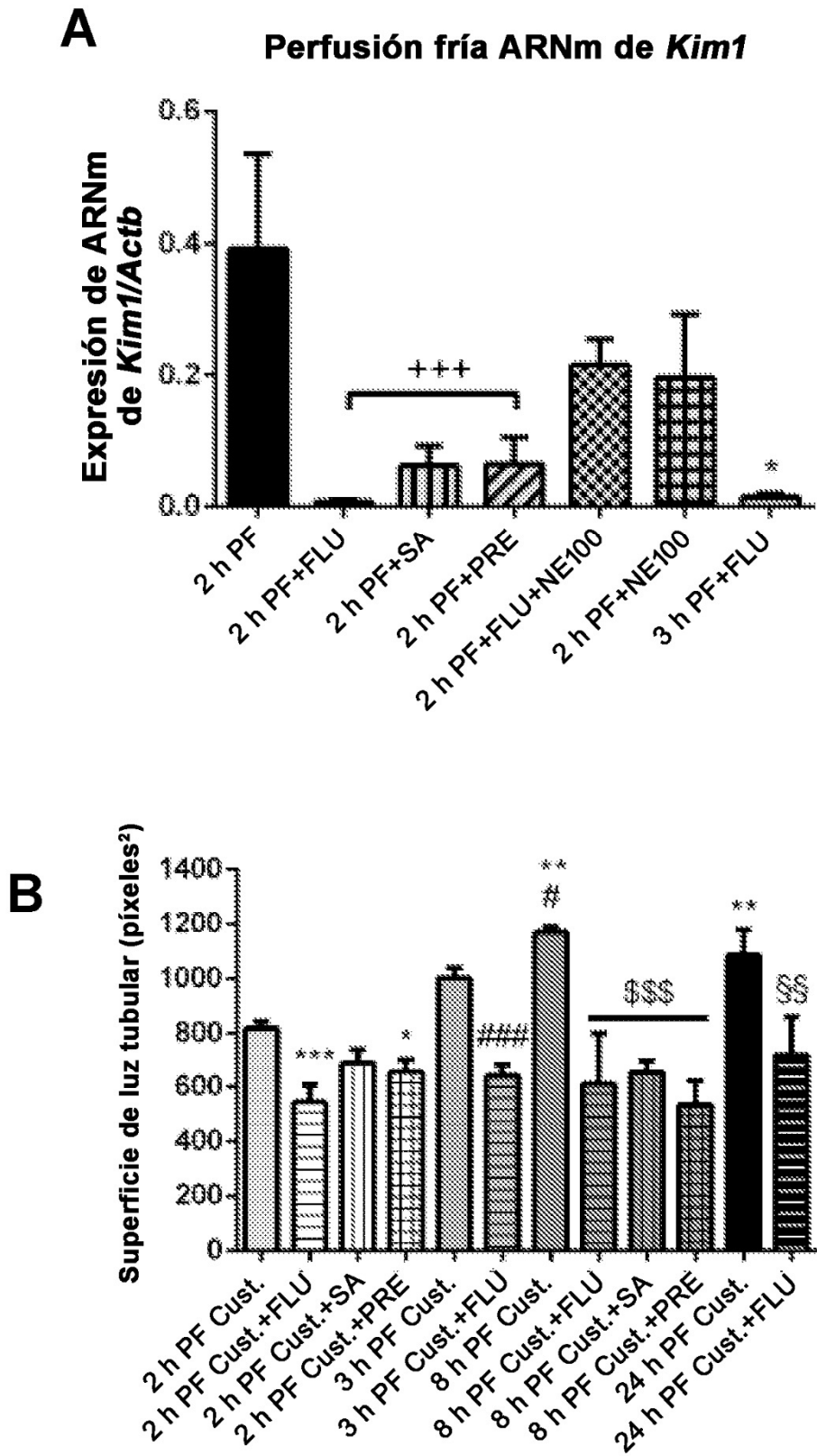


FIG. 6

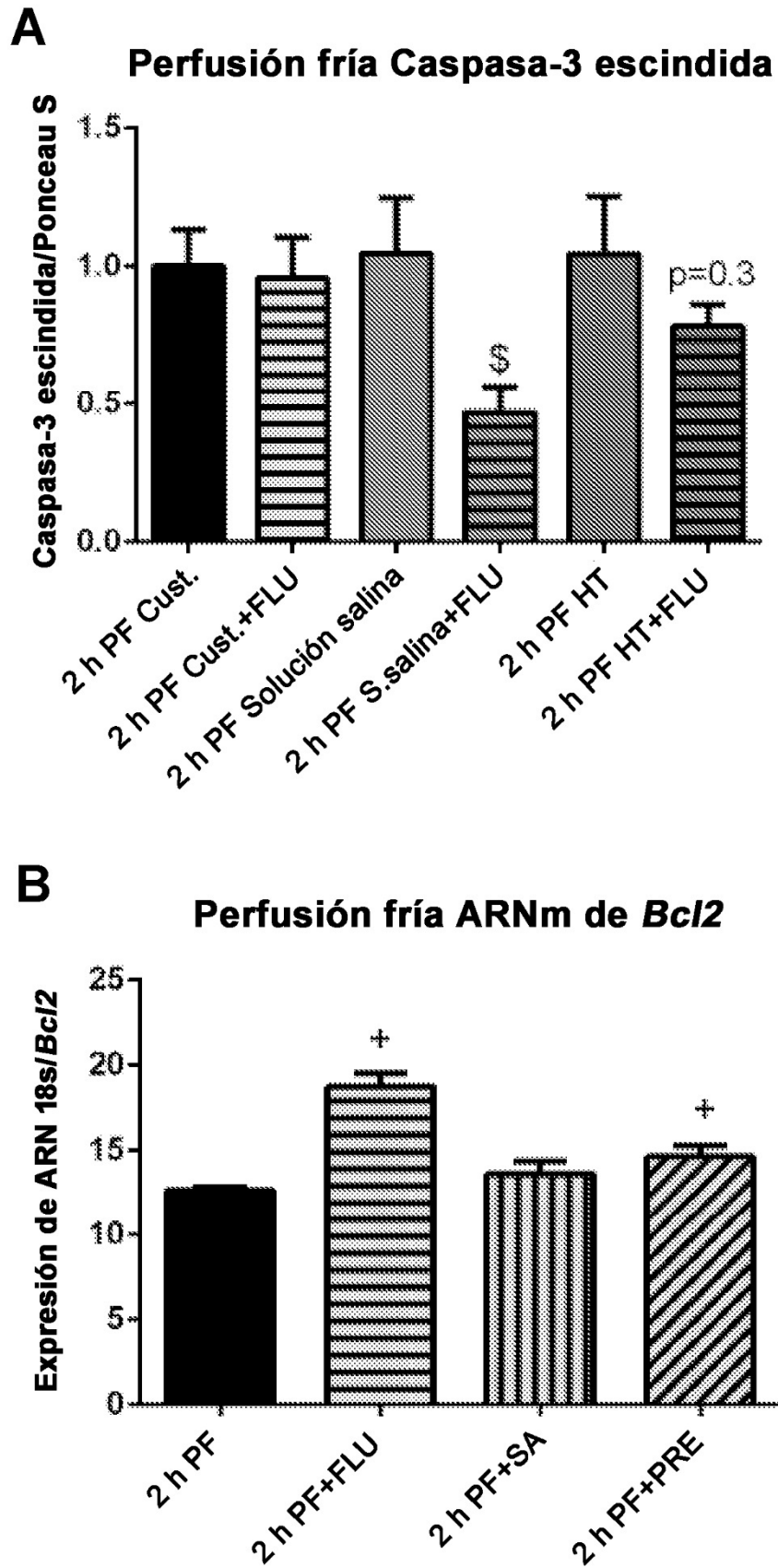


FIG. 7

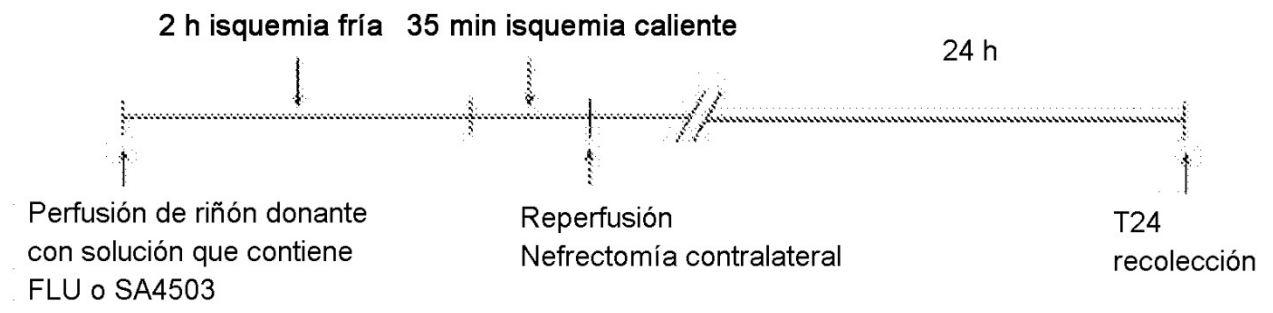


FIG. 8

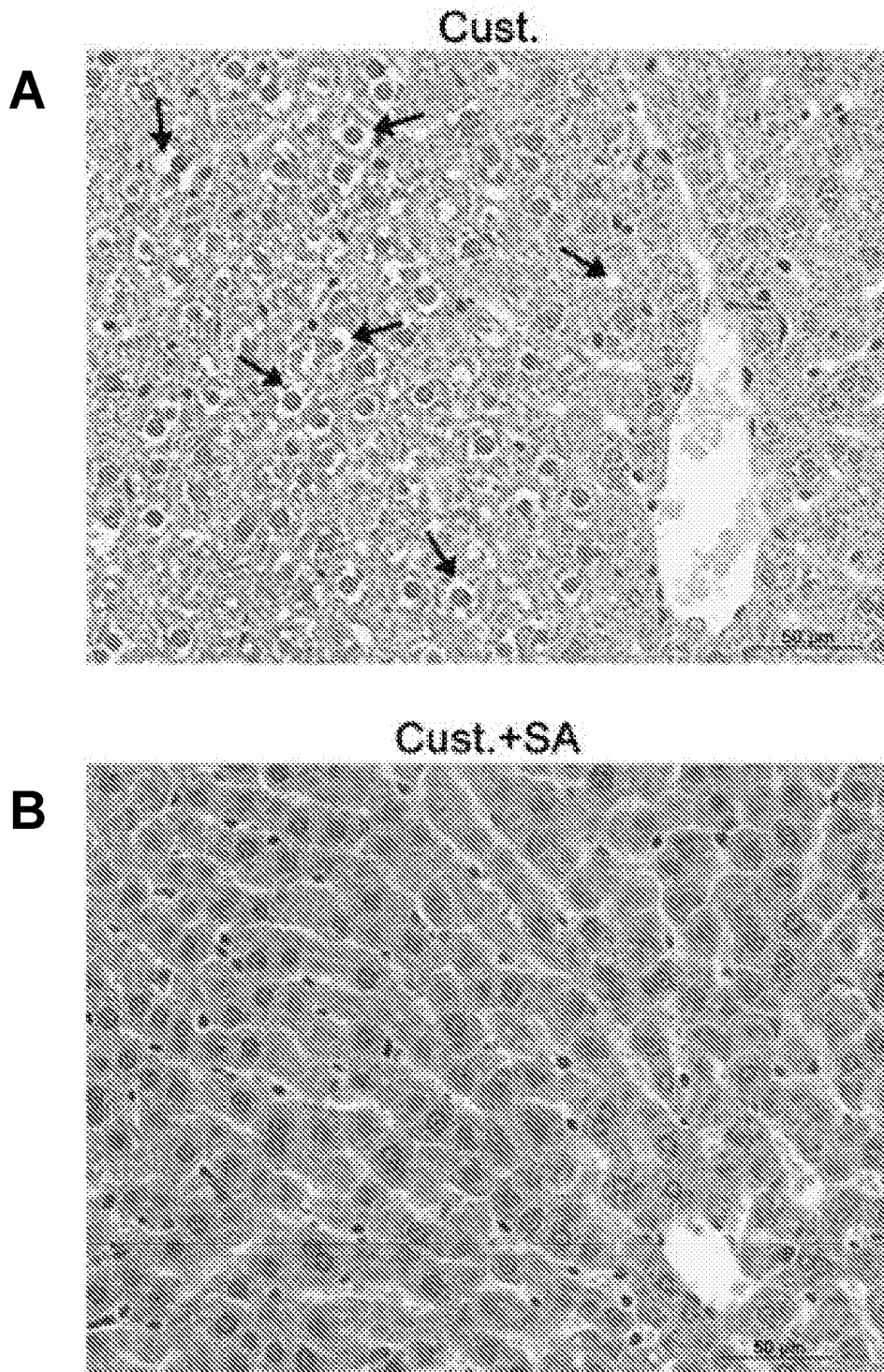


FIG. 9

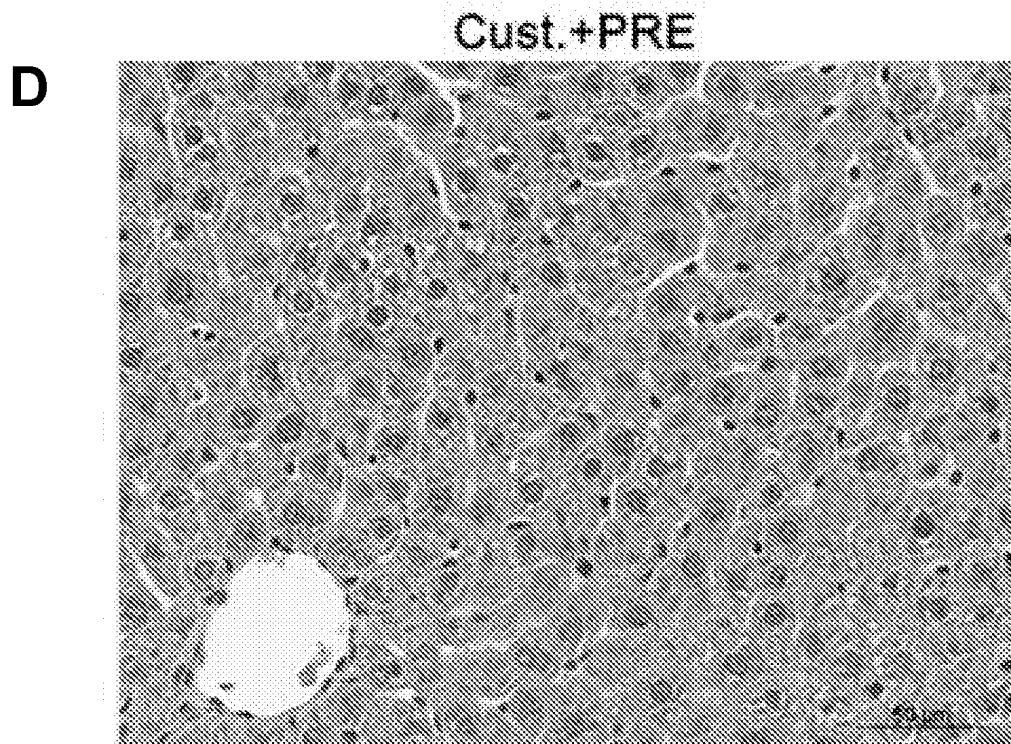
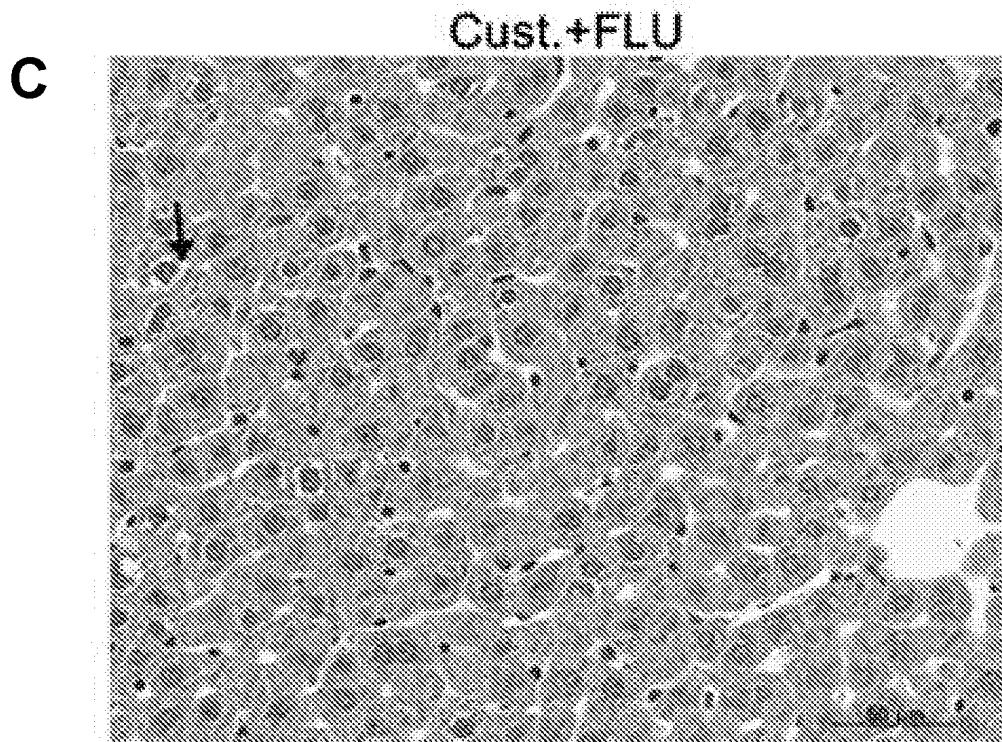


FIG. 9