



(19)  
 Bundesrepublik Deutschland  
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 22 561 B4** 2009.12.10

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **102 22 561.3**  
 (22) Anmeldetag: **17.05.2002**  
 (43) Offenlegungstag: **04.12.2003**  
 (45) Veröffentlichungstag  
 der Patenterteilung: **10.12.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A01N 1/02** (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(62) Teilung in:  
**102 62 084.9**

(73) Patentinhaber:  
**Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, 64665  
 Alsbach-Hähnlein, DE**

(74) Vertreter:  
**Zinngrebe, H., Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 64283  
 Darmstadt**

(72) Erfinder:  
**Groot, Herbert de, 40591 Düsseldorf, DE; Rauen,  
 Ursula, 45327 Essen, DE; Bruns, Wilfried, 68647  
 Biblis, DE; Köhler, Gernot, 64665  
 Alsbach-Hähnlein, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
 gezogene Druckschriften:

**US 63 21 909 B**  
**US 55 06 266 A**  
**US 54 05 742 A**

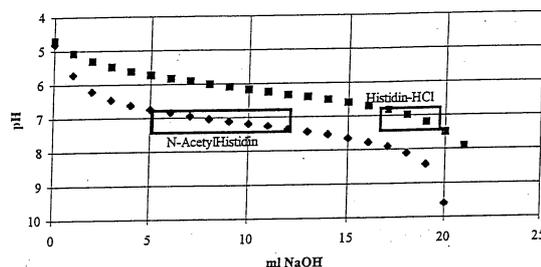
**Rote Liste Service GmbH (Hrsg.): Rote Liste 2002.  
 Aulendorf, Editio Cantor Verlag, 2002, Eintrag  
 52311**

**Nürnberg, E. und Surmann, P. [Hrsg.]: Hagers  
 Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Bd. 2,  
 Methoden. Berlin: Springer-Verlag, 51991, S.  
 821-822**

**Cryobirlogy Vol. 42, 2001, S. 307-313**

(54) Bezeichnung: **Protektive Lösung zur Verhinderung von Ischämieschäden**

(57) Hauptanspruch: Protektive Lösung zur Vermeidung von Ischämieschäden an Organen, oder an isolierten Zellsystemen oder Gewebeteilen nach Perfusion, Operation, Transplantation oder Kryokonservierung und anschließender Reperfusion, welche als Elektrolyte Alkali- und Erdalkalitionen, sowie einen Puffer auf der Basis eines oder mehrerer Histidin-Derivate und einen Polyol und/oder einen Zucker enthält und eine Osmolarität von etwa 290 mosm/l bis etwa 350 mosm/l sowie einen pH-Wert von etwa 6,8 bis etwa 7,4 aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass als Histidin-Derivate ein Puffer auf der Basis von N-Acylhistidin/geeignete organische Base eingesetzt wird und Hydroxamsäure und/oder ein oder mehrere Hydroxamsäure-Derivate zugesetzt sind.



**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine verbesserte Zusammensetzung von Lösungen zur Organprotektion, vorzugsweise von Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas und Gefäßsystemen, um gegebenenfalls langandauernde Operationen am nicht-durchbluteten ischämischen Organ durchführen zu können, oder zur Konservierung derselben Organe zur Transplantation mit reduzierter Schädigung des Gewebes gegenüber anderen Konservierungsverfahren während der Transport- bzw. Lagerzeit. Die vorliegende Erfindung stellt hierfür geeignete Lösungen sowie Verfahren zu deren Herstellung nach den Anforderungen der GMP-Richtlinien bereit.

**[0002]** Mit der Einführung des hyperkalämischen Herzstillstandes durch Melrose im Jahre 1955 waren die Herzchirurgen in der Lage, komplexe Eingriffe am blutleeren, nichtschlagenden Herzen durchzuführen. Wenngleich mit den damaligen kardioplegischen Lösungen nur bis zu 40 Minuten operiert werden konnte, waren erstmalig operative Rekonstruktionen bei angeborenen Herzmissbildungen und der Einsatz von Herzklappen-Prothesen möglich. Einen Meilenstein der Herzchirurgie setzte Banard 1967 mit der erstmals durchgeführten Herztransplantation.

**[0003]** Ziel der weiteren Forschung bestand darin, die bis dahin limitierte Operationsdauer mit geeigneten Lösungen und entsprechenden Anwendungsverfahren zu verlängern. Schon in den 60iger Jahren konnte die Arbeitsgruppe von Bretschneider mit neuen Konzepten zur Verbesserung der Myocard-Protektion die Ischämiezeiten erheblich verlängern. Erstmals wird durch Entzug von Natrium der Herzstillstand induziert und mit Substraten, wie z. B. Procain, Acetylcholin und Novocain die Zellmembran geschützt, um der Entstehung eines intrazellulären Ödems entgegen zu wirken.

**[0004]** Das US-Patent 5,506,266 beschreibt die Wirksamkeit bestimmter Hydroxamsäurederivate zur Vermeidung von Reperfusionsschäden. Der Eintrag 52 311 der Roten Liste 2002 (Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main, Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 2002) gibt an, dass eine spezielle Histidin-HCl/Histidin-Puffer enthaltende Lösung (Custodiol®) im Falle der Kardioplegie bei kardiochirurgischen Eingriffen, zur Organprotektion bei Eingriffen in Blutleere und zur Konservierung von Organtransplantaten, sowie Venen- und Arterientransplantaten angewendet werden kann.

**[0005]** US-Patent 5,405,742 lehrt eine Konservierungslösung für Organe, die u. a. Kalium-, Natrium-, Magnesium- und Calcium-Ionen, sowie Mannitol, Zucker, einen Phosphat-/Carbonat-Puffer und ggf. das Hydroxamsäure-Derivat Deferoxamin als Eisen-Chelator enthält. In US-Patent 6321909B1 ist eine lagerstabile Lösung zur Konservierung von Organen beschrieben, die lineares Polyethylenglykol eines spezifischen durchschnittlichen Molekulargewichts enthält.

**[0006]** E. Nürnberg und P. Surmann beschreiben in Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis (Springer-Verlag/Berlin, 1991, Band 2: Methoden, S. 821–822 Strategien zur Löslichkeitsverbesserung pharmazeutischer Zusammensetzungen, die auch für Lösungen zur Organprotektion relevant sein können.

**[0007]** P. -W. So und B. J. Fuller lehren in ihrem Aufsatz „Hepatic uptake of solutes from the preservation Solution during hypothermic storage – a NMR study in rat liver“ (Cryobiology, 2001, Vol. 42, S. 307–313) die Verwendung von Carnosin in einer Lösung zur Organkonservierung.

**[0008]** In der europäischen Patentschrift EP 0 012 272 B1 ist eine protektive Lösung für Herz, Niere und andere Organe beschrieben, welche durch ein Puffersystem auf der Basis von Histidin + Histidin-HCl gekennzeichnet ist und welche außerdem Natrium-, Kalium- und Magnesium-Ionen sowie ein Polyol oder einen Zucker enthält. Mit dieser protektiven Lösung wird die tolerierbare Ischämiezeit um den Faktor 8 gegenüber den Zeiten von unbehandelten Herzen erzielt. Eine weitere Verbesserung dieser Lösung wird in der Europäischen Patentschrift EP 0 054 635 B1 beschrieben, wonach durch den Zusatz von  $\alpha$ -Ketoglutarat der aerobe Stoffwechsel während der ca. 8 bis 10 Minuten andauernden Perfusion des Organs mit der protektiven Lösung durch die günstige Beeinflussung des Citratzyklus der ATP-Verlust verringert wird. In den darauffolgenden Jahren richtete sich das Augenmerk der Kliniker und Physiologen auf die zeitliche Phase der Beendigung der Ischämie, die mit der Erwärmung des hypothermen und hypoxischen Organs und der Reperfusion mit Blut beendet ist, und in der die Organe ihre vollständige Funktion wiedererlangen. Studien hierzu zeigen, dass gerade in der sog. Reperusionsphase verschiedene pathophysiologische Prozesse ablaufen, die mit dem Begriff Reperfusionsschaden (I-R-Schaden) zusammengefasst werden. Dabei kommt es vor allem zu Endothelzellschäden, die zum Teil als Ursache, zum Teil als Folge entzündlicher Prozesse interpretiert werden und in deren Pathogenese reaktiven Sauerstoffspezies eine erhebliche Bedeutung zuzukommen scheint. In den letzten Jahren

stellte sich zudem die zum Schutz der Organe eingesetzte Kalte als eigenständiger Schädigungsfaktor heraus; keine der derzeit eingesetzten Konservierungslösungen vermag gegen diese Schädigung einen Schutz zu bieten.

**[0009]** Zweck der vorliegenden Erfindung ist es, die folgenden pathophysiologischen Vorgänge während der Ischämie und der Reperfusion zu verhindern bzw. zu vermindern:

- ischämische Schädigung
- Kälteschädigung (kälteinduzierte Apoptose)
- Reperfusionsschäden
- Entzündliche Prozesse.

**[0010]** Dazu ist im Patentanspruch 1 eine organprotektive Lösung angegeben, die der Erfüllung der genannten Aufgabe dient. Aus den dargestellten Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung bei Kardioplegie und Organkonservierung ergeben sich eine Reihe von Forderungen für die Zusammensetzung einer Organprotektionslösung. Für die Realisierung dieser Forderungen haben wir Substanzen gefunden, die die Konzeption der neuartigen, effektiv wirksamen Organprotektionslösung gemäß Patentanspruch 1 erlauben. Die Zusammensetzung der Lösung ist so gewählt, dass sie vor allen zuvor genannten Schädigungskomponenten einen wirksamen Schutz bietet. Durch die mechanismenorientierten und nicht toxischen Komponenten kann die Konservierungsschädigung deutlich vermindert werden. Die von den bisher verwendeten Konservierungslösungen bekannte Toxizität bei (akzidenteller bzw. während der Anastomosierungszeit erfolgender) Erwärmung des Organs wird vermieden. Auf diese Weise werden die Funktionalität und Viabilität des entsprechenden Organgewebes verbessert und die Ischämie- und Kaltlagerungstoleranz erhöht; damit werden längere Organkonservierungszeiten möglich. Dies kann auch einen Beitrag zur Logistik leisten, um die Verfügbarkeit von Organen für die Transplantation zu verbessern.

**[0011]** Eisenchelatoren können zur Hemmung der eisenabhängigen Kälteschädigung bzw. der kälteinduzierten Apoptose dienen. Als Verbindungen zur Verminderung dieser Zellschädigungen ist nicht jeder Komplexbildner geeignet. So ist z. B. EDTA wie auch das im Custodiol enthaltene Histidin hier unwirksam, obwohl auch diese Liganden starke Eisenkomplexe bilden. Das Eisen muß vielmehr in spezieller Weise vom Liganden gebunden werden, und der Ligand muß die intrazellulären Kompartimente schnell und in ausreichender Konzentration erreichen.

**[0012]** Es konnte gezeigt werden, daß dem Strukturelement der Hydroxamsäure I bzw. II, welches im Deferoxamin dreimal enthalten ist, als geeignetem Strukturelement bzw. Ligand für Eisen eine besondere Bedeutung zukommt,



wobei  $R^1 = C_1$ - $C_{20}$  Alkyl, Aryl, Alkyl-aryl geradkettig oder verzweigt bedeutet, auch Heteroatome und/oder weitere Substituenten wie -OH, -NH<sub>2</sub> etc. enthalten kann,  $R^2 = H$  und sonst wie  $R^1$  ist und wobei  $R^1$  und  $R^2$  zu einem Ring geschlossen sein und/oder weitere Substituenten enthalten können; wie z. B. 2-Hydroxypyridin-N-oxide und seine Derivate, die lediglich eine andere tautomere Struktur des Falles darstellen, wobei  $R^1$  und  $R^2$  zu einem Ring mit konjugierten Doppelbindungen geschlossen sein können. Mit den im Vergleich zum Deferoxamin kleinen und lipophilen Substanzen ist die Strategie einer schnellen intrazellulären Verfügbarkeit eines starken Eisenchelators verifiziert.

**[0013]** Auch einfache Hydroxamsäuren zeigen schon positive Wirkung; jedoch ist für eine gute Wirksamkeit ein bestimmtes Hydrophilie/Lipophilie-Verhältnis erforderlich. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die am Hydroxamsäurestickstoff alkylierten ( $R^2 = \text{Alkyl}$ ) gegenüber den unsubstituierten Verbindungen ( $R^2 = H$ ) generell wirksamer sind. Ist  $R^2$  eine stark elektronenziehende Gruppe wie z. B. -CO- $R^3$  ( $R^3$  gleiche Bedeutung wie  $R^1$ ) führt dies zur Unwirksamkeit, obwohl auch diese Verbindungen noch leicht Eisenkomplexe bilden, wie z. B.:

N-Hydroxysuccinimid

3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-enzotriazin

[0014] Die Wirksamkeit zweier Beispielsubstanzen demonstrieren die [Abb. 1](#) und [Abb. 2](#).

[0015] Die Hydroxamsäure und/oder Derivate sind daher in den erfindungsgemäßen Lösungen enthalten, zweckmäßig in Konzentrationen bis zu etwa 10 mmol/l.

[0016] [Abb. 1](#). Hemmung der Kälteschädigung von Leberendothelzellen durch Salicyl-N-methylhydroxamsäure.

[0017] Kultivierte Rattenleberendothelzellen wurden 72 h bei 4°C in University of Wisconsin-Lösung (UW) unter aeroben Bedingungen in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM Salicyl-N-methylhydroxamsäure inkubiert und anschließend für 3 h in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Als Parameter der Zellschädigung diente die Freisetzung cytosolischer Lactatdehydrogenase (LDH).

[0018] [Abb. 2](#). Hemmung der Kälteschädigung von Hepatozyten durch 3,4-Dimethoxy-N-methyl-benzhydroxamsäure.

[0019] Kultivierte Rattenhepatozyten wurden 24 h bei 4°C in University of Wisconsin-Lösung (UW) unter aeroben Bedingungen in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM 3,4-Dimethoxy-N-methyl-benzhydroxamsäure inkubiert und anschließend für 3 h in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Als Parameter der Zellschädigung diente die Freisetzung cytosolischer Lactatdehydrogenase (LDH).

[0020] Deferoxamin ist ein starker Eisenchelator, der als sechszähliger Ligand das Eisen in nicht redoxaktiver Form bindet. Es dient damit einem optimalen Schutz bei längerer Kälteexposition. Deferoxamin ist jedoch ein relativ großes, hydrophiles Molekül mit einer dadurch begrenzten Membrangängigkeit. Deferoxamin erreicht deshalb nicht alle intrazellulären Kompartimente in ausreichender Konzentration und Geschwindigkeit, um einen kompletten Schutz zu bieten. Es kann in einer Konzentration von vorzugsweise bis zu etwa 10 mmol/l in der Lösung enthalten sein.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird der anspruchsgemäßen Lösung ein Derivat der 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromen-2-carbonsäure (Trolox), zweckmäßig Trolox-Methylester zugesetzt. Der relativ hydrophile, aber membrangängige Radikalfänger Trolox bzw. seine Derivate davon werden zugesetzt, um die bei der Kälteschädigung und bei der Reoxygenierungsschädigung entstehenden intrazellulären Radikale abzufangen. Das Troloxderivat liegt in der erfindungsgemäßen Lösung zweckmäßig in einer Konzentration von bis zu etwa 10 mmol/l vor.

[0022] Alle organoprotektiven Lösungen verfügen über Puffersubstanzen, die der unvermeidlichen Azidose während der Ischämie entgegenwirken. Phosphate oder Bicarbonate sind hierbei die meistverwendeten anorganischen Puffersysteme. Als absolut überlegen bezüglich der Pufferkapazität und pH-Stabilität hat sich das in Custodiol® eingesetzte organische Puffersystem Histidin/Histidin-HCl erwiesen. Besondere Vorteile ergeben sich, wenn Derivate des Histidins, wie z. B. N-Acetylhistidin, statt Histidin/Histidin HCl als Puffersystem in der vorstehend genannten, aber auch in anderen bekannten protektiven Lösungen benutzt werden. [Abb. 3](#) zeigt eine um den Faktor 2 verbesserte Pufferkapazität des N-Acetylhistidins im Vergleich zu Histidin/Histidin HCl. Dadurch werden einige unerwünschte Nebenwirkungen des Histidins (Toxizität insbesondere in der Wärme aber auch in der Kälte bei einigen Zelltypen wie z. B. bei Hepatozyten) vermieden ohne die gute Pufferkapazität zu beeinträchtigen.

[0023] [Abb. 3](#) Neutralisationskurve von Histidin/Histidin-HCl und N-Acetylhistidin.

[0024] Nutzbare Pufferkapazität im Bereich des physiologischen pH-Wertes; bei N-Acetylhistidin 60% und bei Histidin 30% bezogen auf das Verhältnis verbrauchter Base zu Substrat.

[0025] Darüber hinaus wird der pK-Wert insbesondere des Puffer-Systems N-Acetylhistidin/N-Acetylhistidin(-) in einen sehr günstigen physiologischen Bereich verschoben und dadurch die nutzbare Pufferkapazität erheblich verstärkt. Das genannte Puffersystem kann in der erfindungsgemäßen Lösung in einer Konzentration bevorzugt von etwa 30 mmol/l bis etwa 265 mmol/l enthalten sein.

[0026] [Abb. 4](#). Beispiel für die Toxizität von Histidin unter warmen Bedingungen und Herabsetzung dieser Toxizität durch Histidinderivate.

[0027] Kultivierte Rattenhepatozyten wurden 5 h bei 37°C unter aeroben Bedingungen in Gegenwart und Ab-

wesenheit von 198 mM L-Histidin bzw. von 198 mM Na-Acetylhistidin inkubiert. Als Grundlösung diente Krebs-Henseleit-Puffer (KH), eine in Zellkulturen häufig verwendete physiologische Salzlösung; die Histidin(derivat)-haltigen Lösungen wurden durch Verminderung der NaCl-Konzentration der Lösung isoosmolar gehalten.

**[0028]** Diese Weiterentwicklung erlaubt eine noch bessere Erhaltung der zellulären Funktionen nach Konservierung.

**[0029]** Als Elektrolyte werden zweckmäßig Natriumionen eingesetzt. Geringe Natriumkonzentrationen sind zum einen vorteilhaft für die elektromechanische Entkopplung an der Zellmembran (Herzstillstand), zum anderen vermindern sie die hypoxische Schädigung aufgrund der Vermeidung/Verminderung des hypoxieinduzierten Natriumeinstroms. Zudem bleibt eine osmotische Reserve für andere Substanzen (z. B. Puffersubstanzen, s. u.) erhalten. Auch bei niedriger Natriumkonzentration der Lösung ist eine schnelle Einstellung der Homöostase in der Reperfusionphase möglich, da der interstitielle Anstieg von Natrium (140 mM) schnell erfolgt. Daher empfiehlt sich eine Natriumkonzentration von etwa 10 mmol/l bis etwa 80 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung.

**[0030]** Eine relativ geringe, jedoch über dem physiologischen extrazellulären Wert liegende Kaliumkonzentration unterstützt die elektromechanische Entkopplung an der Zellmembran (Herzstillstand), vermeidet jedoch die Nachteile stark hyperkalämischer Lösungen (stark hyperkalämische Lösungen induzieren einen schnellen Herzstillstand, sind aber auch in der Reoxygenierungsphase verantwortlich für Rhythmusstörungen und ggf. verstärkte Reperfusionsschäden; in der Reperfusionphase ist die Einstellung der interstitiellen Kaliumkonzentration zeitlich verzögert, wodurch die Quote verspäteter Initialfunktionen der Organe bei diesen Lösungen erhöht ist). Nur leicht hyperkalämische Lösungen besitzen zudem den Vorteil, dass ein Auswaschen der Lösung aus dem zu transplantierenden Organ vor Reperfusion nicht erforderlich ist (die Lösungen können also ihre protektiven Eigenschaften bis zum Ende der Ischämiezeit entfalten), und verfügen über eine hohe systemische Tolerabilität. Daher empfiehlt sich eine Kaliumkonzentration von etwa 5 mmol/l bis etwa 25 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung.

**[0031]** Eine deutlich erhöhte Magnesiumkonzentrationen (über den Serum-Normwert hinaus) wird angestrebt, da Magnesium als Coenzym zahlreicher glykolytischer Enzymsysteme den anaeroben Stoffwechsel stützt und somit zur Bildung von ATP auch während der kalten Ischämie beiträgt. Zudem trägt Magnesium zur Aufrechterhaltung der Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembran bei und wirkt so den Veränderungen der Ionenhomöostase entgegen. Als physiologischer Ca<sup>2+</sup>-Antagonist kann Magnesium außerdem den schädlichen Effekten einer intrazellulären Calciumakkumulation entgegenwirken. In der Reperfusionphase ist ein hoher Pool an Magnesium erforderlich, um den aeroben Energiestoffwechsel zu stimulieren. Die gefäßdilatativen Eigenschaften von Magnesium wirken außerdem den konstriktiven Effekten beim Reperfusionsschaden entgegen. Daher empfiehlt sich eine Magnesiumkonzentration von etwa 3 mmol/l bis etwa 27 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung.

**[0032]** Unter ischämischen Bedingungen (und der damit verbundenen intrazellulären Azidose und Störung der Natriumhomöostase) besteht das Risiko eines cytosolischen Calciumanstiegs. Dies führt zum Anstieg unerwünschter Aktivitäten, z. B. Stimulation von Proteasen und Phospholipasen, und geht beim Herzen mit einer Hyperkontraktur mit hohem ATP-Verbrauch einher. Die physiologischen Funktionen von Calcium sind somit während der Ischämie weitestgehend zu unterdrücken, weswegen sich die Calciumkonzentration in der Lösung im Bereich der cytoplasmatischen Konzentrationen bewegen sollte. Daher empfiehlt sich ein Calciumgehalt von etwa 0,005 mmol/l bis etwa 0,095 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung.

**[0033]** Die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin bzw. ihre Derivate als Dipeptide mit Glycin (Lys-Gly, Gly-Lys bzw. Arg-Gly, Gly-Arg) können zur Deckung fehlender Basenäquivalente herangezogen werden, da die Konzentration und das Verhältnis der Kationen Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium auf Grund bereits beschriebener Tatsachen festgelegt ist. Die Konzentration an Lysin und/oder Lysinderivaten bzw. Arginin und/oder Argininderivaten in der erfindungsgemäßen Lösung kann jeweils bis zu etwa 140 mmol/l betragen.

**[0034]** Das physiologische extrazelluläre Anion Chlorid wird in einer im Vergleich zu physiologischen Werten deutlich erniedrigten Konzentration eingesetzt, um Störungen der Ionenhomöostase während der kalten Ischämie zu vermindern. Dies gilt insbesondere für einen hypoxieinduzierten Einstrom von Kationen wie dem Natrium. Aus Gründen der Elektroneutralität ist dieser Einstrom vom parallelen Einstrom von Anionen, bevorzugt von Chlorid, abhängig. Hinweise verschiedener Autoren lassen darauf schließen, dass hohe Chlorid-Konzentrationen das Ausmaß eines intrazellulären Ödems begünstigen. Daher empfiehlt sich eine Chlorid-Konzent-

ration in der erfindungsgemäßen Lösung von etwa 10 mmol/l bis etwa 90 mmol/l. Neben dem Chlorid kann auch Lactobionat als impermeables Anion in einer Konzentration bis zu etwa 140 mmol/l zugesetzt werden.

**[0035]** Die in den organprotektiven Lösungen eingesetzten Konzentrationen an Anionen ergeben sich im allgemeinen aus der Wahl der Kationen und des verwendeten (an)organischen Puffers. Die Verwendung von impermeablen Anionen, wie z. B. Lactobionat, soll der Entstehung eines intrazellulären Ödems entgegenwirken, allerdings mit dem Nachteil erhöhter Viskosität und mangelnder Perfusion kapillarer (z. B. Sinusoide) Gefäßsysteme. Aspartat stellt eine hervorragende Alternative dar, zumal mit der Verwendung von Aspartat mehrere Ziele verfolgt werden können:

- a) Aspartat als Säureäquivalent ersetzt das unvorteilhafte Chlorid
- b) die Asparaginsäure unterstützt aktiv den Stoffaustausch an Membranen und beschleunigt die Wiederherstellung der Homöostase.
- c) Aspartat begünstigt in Verbindung mit  $\alpha$ -Ketoglutarat den aeroben Energiestoffwechsel in der kritischen Phase der Reperfusion bzw. Reoxygenierung des Organs und beschleunigt dessen Initialfunktionen.

**[0036]** Besonders in der Reoxygenierungsphase, wenn mit zunehmender Erwärmung des Organs der Energiebedarf erheblich ansteigt, ist es notwendig, die Energiebereitstellung zu forcieren, denn ein ATP-Mangel gerade in dieser Erwärmungsphase würde erheblich die Funktionalität des Organs beeinträchtigen und das Ausmaß eines Reperfusionsschadens erhöhen. Es empfiehlt sich eine Aspartat-Konzentration von bis zu etwa 140 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung. Zweckmäßig ist in der erfindungsgemäßen Lösung Aspartat im Verhältnis zu Chlorid im Überschuss vorhanden.

**[0037]** Die Aminosäure Glycin wird in höherer millimolarer Konzentration eingesetzt, da Glycin in diesen Konzentrationen den hypoxieinduzierten Natriumeinstrom durch eine Stabilisierung der Plasmamembran (Vermeidung eines diffusionsorientierten Stoffaustauschs) verhindert und zudem die Aktivierung von Makrophagen hemmt. Empfehlenswert ist eine Glycin Konzentration von bis zu etwa 30 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung.

**[0038]** Auch während der kalten Ischämie ist der Energiebedarf des betreffenden Organs nicht unerheblich, weswegen zur Unterstützung energieliefernde Substrate oder energiestoffwechselfördernde Substanzen der Lösung zuzugeben sind. Verschiedene Konzepte werden dabei verfolgt (s. auch Aspartat, s. o., und  $\alpha$ -Ketoglutarat, s. u.), eines davon ist der Zusatz von Glucose.

**[0039]** Eine physiologische Glucosekonzentration der Lösung erlaubt auch den Zellen, die aufgrund vergleichsweise geringer Glycogenvorräte auf exogenes Glucoseangebot angewiesen sind, wie z. B. Endothelzellen, die Energiegewinnung über anaerobe Glycolyse während der Ischämie. Die Glucosekonzentration ist jedoch so gewählt, dass eine exzessive Glucoseaufnahme durch andere Zellen, insbesondere durch Hepatozyten (ein Problem bei früheren Konservierungslösungen mit extrem hohen Glucosekonzentrationen), vermieden wird. Daher empfiehlt sich eine Glucosekonzentration von bis zu etwa 10 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung.

**[0040]**  $\alpha$ -Ketoglutarat dient zusammen mit Aspartat zur Unterstützung des Metabolismus unter/nach hypoxischen Bedingungen. Man wählt zweckmäßig eine Konzentration von etwa 1 mmol/l bis etwa 9 mmol/l.

**[0041]** Der Zusatz von osmotisch wirksamen Substanzen ist in dem Maße erforderlich, wie es zum Erreichen des erforderlichen physiologischen osmotischen Drucks von ca. 300 mosm/l notwendig ist. Im allgemeinen werden Polyole/Zucker (z. B. Mannitol) oder auch hochmolekulare Substanzen (z. B. HES, Dextran) hierzu verwendet. Letztere haben sich nicht bewährt, da die Nachteile der mit HES und Dextran erzeugten hohen Viskosität die Qualität der Protektion beeinträchtigen.

Viskosität bei 4°C:

Custodiol® 1,8 cP

UW-Lösung 4,8 cP

**[0042]** Als Osmolyte sollen je nach Organ Mannitol, Xylitol, Sorbitol, Saccharose oder Raffinose zum Einsatz kommen. Die Osmolyt-Konzentration beträgt zweckmäßig bis zu 100 mmol/l in der erfindungsgemäßen Lösung.

**[0043]** Zur Vermeidung eines interstitiellen Ödems ist in einigen Organen/Geweben der Zusatz einer kolloidosmotisch wirksamen Substanz wünschenswert. Dextran-40/Dextran-70. Dies gilt im besonderen Maße für Lunge- und Pankreasprotektion.

## Beispiele

**[0044]** Im Folgenden sind Beispiele von Lösungen dargestellt, die den Anforderungen des hier beanspruchten Schutzzumfanges entsprechen:

## Beispiel I:

	mmol/l
Na <sup>+</sup>	25
K <sup>+</sup>	15
Mg <sup>++</sup>	10
Ca <sup>++</sup>	0,1
Cl <sup>-</sup>	25
Aspartat <sup>-</sup>	33
Ac-N-His <sup>-</sup>	60
Ac-N-His <sup>-</sup>	60
Lysin-H <sup>+</sup>	60
Glycin	10
Tryptophan	2
Veratryl-N-methylhydroxamsäure	2
Trolox-OCH <sub>3</sub>	2
Ketoglutarat <sup>-</sup>	2
N-Methylsalicylhydroxamsäure	2
pH	7,2
Osmolalität	310

## Beispiel II:

	mmol/l
Na <sup>+</sup>	15
K <sup>+</sup>	10
Mg <sup>++</sup>	8
Ca <sup>++</sup>	0,015
Cl <sup>-</sup>	0,03
Aspartat <sup>-</sup>	38
Ac-N-His	60
Ac-N-His <sup>-</sup>	60
Lysin-H <sup>+</sup>	60
Glycin	10
Tryptophan	2
2,3-Dimethoxy-N-methylbenzhydroxamsäure	2
Trolox-OCH <sub>3</sub>	2
Ketoglutarat <sup>-</sup>	2
N-Methylsalicylhydroxamsäure	2
Mannitol	30
pH	7,2
Osmolalität	310

## Beispiel III:

	mmol/l
Na <sup>+</sup>	15
K <sup>+</sup>	10
Mg <sup>++</sup>	16
Ca <sup>++</sup>	0,04
Cl <sup>-</sup>	0,03
Aspartat <sup>-</sup>	54
Ac-N-His	60
Ac-N-His <sup>-</sup>	60
Lysin-H <sup>+</sup>	60
Glycin	6
Tryptophan	2
2,3-Dimethoxy-benzhydroxamsäure	1
Trolox-OCH <sub>3</sub>	2
Ketoglutarat <sup>-</sup>	3
2-Hydroxy-3-methyl-isocarbostyryl	1
Mannitol	20
pH	7,2
Osmolalität	310

## Beispiel IV

	mmol/l
Na <sup>+</sup>	15
K <sup>+</sup>	10
Mg <sup>++</sup>	8
Ca <sup>++</sup>	0,015
Cl <sup>-</sup>	0,03
Aspartat <sup>-</sup>	31
Ac-N-His	70
Ac-N-His <sup>-</sup>	70
Lysin-H <sup>+</sup>	70
Glycin	8
Tryptophan	2
2-Hydroxy-3-methyl-isocarbostyryl	2
Ketoglutarat <sup>-</sup>	2
N-Methylsalicylhydroxamsäure	2
Mannitol	20
pH	7,2
Osmolalität	310

**[0045]** Entsprechend den funktionalen Bestandteilen einer organprotektiven Lösung, nämlich Puffersystem, Elektrolyte, protektiv wirkende Substanzen und Osmolyte wird die erfindungsgemäße Lösung hergestellt. Dazu werden in ca. 90% der benötigten Wassermenge zunächst die Puffersubstanzen gelöst. Nun werden die als Elektrolyten notwendigen Neutralsalze der Kationen, also beispielsweise Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium in den angegebenen, physiologisch sinnvollen Konzentrationen zugegeben und unter Rühren gelöst. Es folgen als weitere Bestandteile die protektiv wirksamen Substanzen, die der Lösung zugegeben werden. Danach wird der pH-Wert der Lösung überprüft und gegebenenfalls auf den im Patentanspruch 1 angegebenen Wert eingestellt. Schließlich wird die angegebene Menge Osmolyte zugegeben und die Lösung auf das Sollvolumen verdünnt. Nach dem Abfüllen in geeignete Behältnisse wird die Lösung sterilisiert.

**[0046]** Die Herstellung cyclischer Hydroxamsäuren, beispielsweise die sich vom 2-Hydroxypyridin-N-Oxid ableitenden Verbindungen ist beschrieben beispielsweise in Organic Synthesis, Kollektiv Volume V Seite 623 und folgende. Ein Herstellungsverfahren für Hydroxamsäuren aus Carbonsäurederivaten findet sich in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Seite 686 und folgende, wobei als Lösungsmittel niedere Alkohole DMF, THF benutzt werden. Die Umsetzung mit dem entsprechenden Carbonsäureester kann basenkatalysiert (NaOMe, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaO) erfolgen. Schließlich wird zur Herstellung cyclischer Hydroxamsäuren Bezug genommen auf A. Kleemann, J. Engel, Pharmazeutische Wirkstoffe, zweite Auflage 1982, Seite 206 und folgende.

### Patentansprüche

1. Protektive Lösung zur Vermeidung von Ischämieschäden an Organen, oder an isolierten Zellsystemen oder Gewebeteilen nach Perfusion, Operation, Transplantation oder Kryokonservierung und anschließender Reperfusion, welche als Elektrolyte Alkali- und Erdalkaliionen, sowie einen Puffer auf der Basis eines oder mehrerer Histidin-Derivate und einen Polyol und/oder einen Zucker enthält und eine Osmolarität von etwa 290 mosm/l bis etwa 350 mosm/l sowie einen pH-Wert von etwa 6,8 bis etwa 7,4 aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Histidin-Derivate ein Puffer auf der Basis von N-Acylhistidin/geeignete organische Base eingesetzt wird und Hydroxamsäure und/oder ein oder mehrere Hydroxamsäure-Derivate zugesetzt sind.

2. Lösung nach Anspruch 1, bei der ein Puffer auf der Basis von N-Glycylhistidin/N-Glycylhistidin-Hydrochlorid oder N-Acetylhistidin/organische Base oder N-Acetylhistidin/Lysin und/oder Arginin eingesetzt wird.

3. Lösung nach einem der vorstehenden Ansprüche mit einem Gehalt an Lysin und/oder Lysin-Derivat, bevorzugt lysinhaltige Dipeptide.
4. Lösung nach einem der vorstehenden Ansprüche mit einem Gehalt an Aspartat.
5. Lösung nach einem der vorstehenden Ansprüche, in welcher das N-Acetylhistidin/N-Acetylhistidin(-) in einer Konzentration von etwa 30 mmol/l bis 265 mmol/l enthalten ist.
6. Lösung nach einem der Ansprüche 4 oder 5 mit einem Gehalt an Aspartat von bis zu etwa 140 mmol/l.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

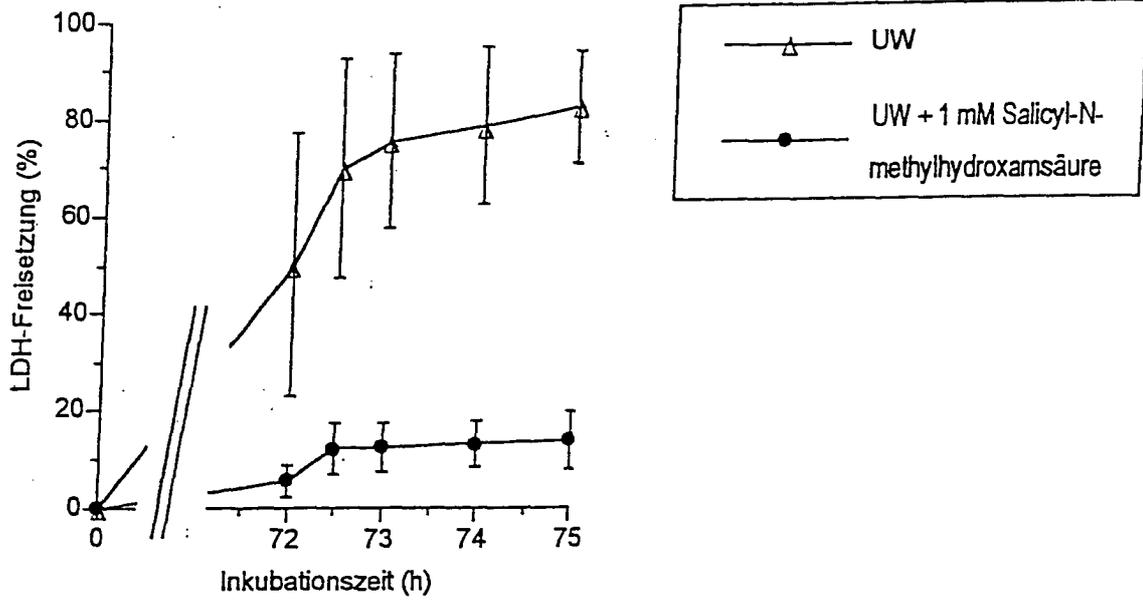


Abb. 1

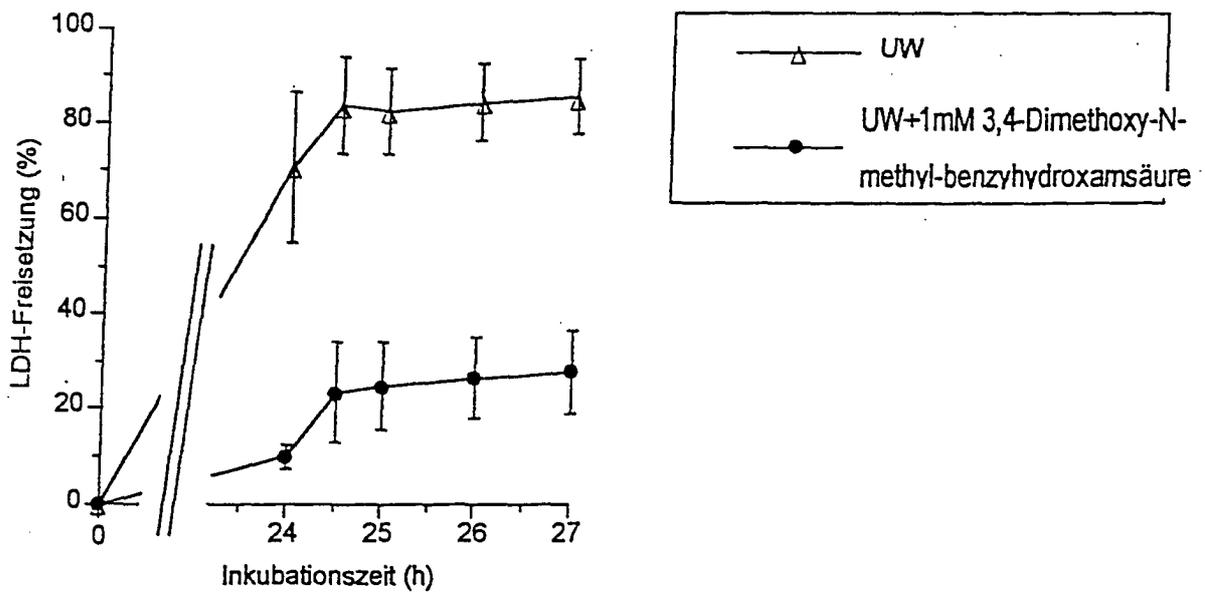


Abb. 2

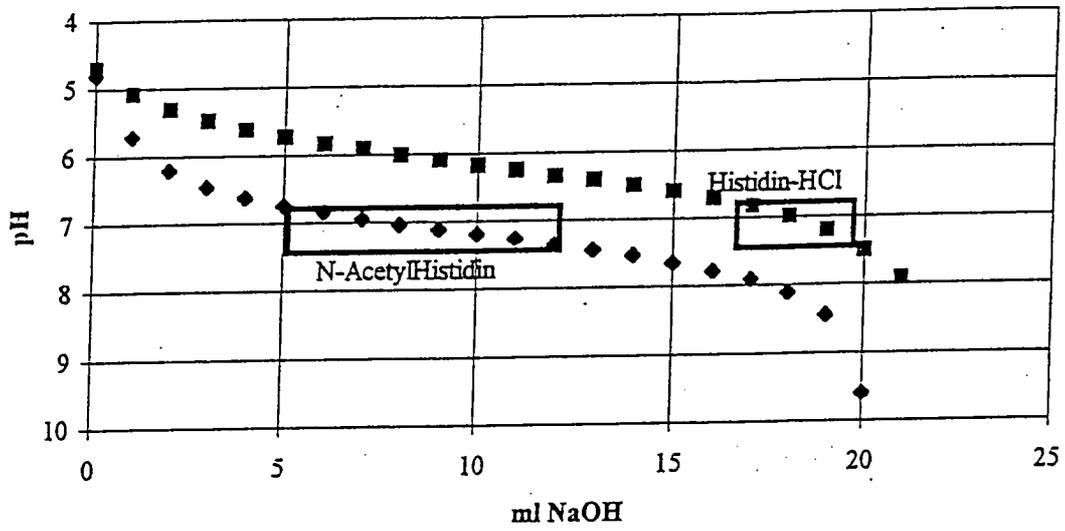


Abb. 3

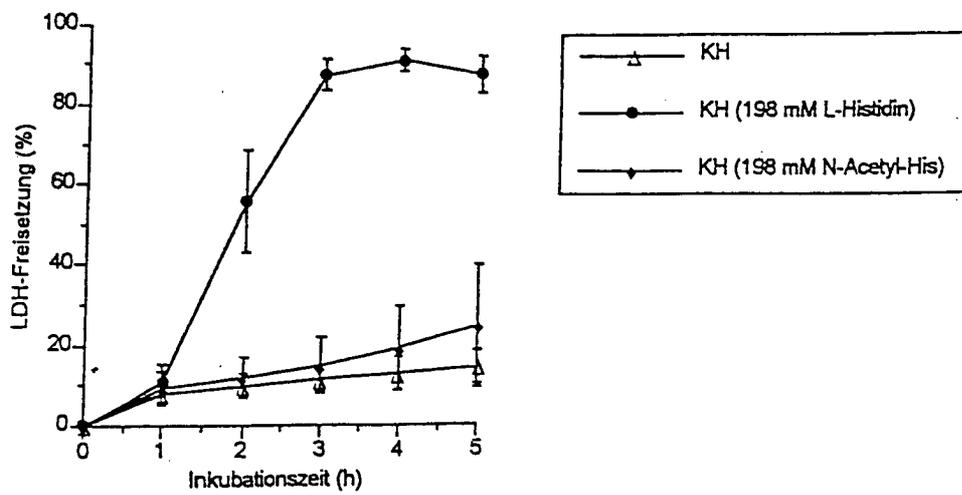


Abb. 4