

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 733**

51 Int. Cl.:

A01N 1/122

(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2020** **PCT/FR2020/051589**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2021** **WO21058892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2020** **E 20781054 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025** **EP 4033898**

54 Título: **Solución para conservar y/o enjuagar órganos que van a ser trasplantados**

30 Prioridad:

27.09.2019 FR 1910747

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

03.06.2025

73 Titular/es:

**INSTITUT GEORGES LOPEZ (100.00%)
1 Allée des Chevreuils Route Nationale 6 Parc
Tertiaire du Bois Dieu
69380 Lissieu, FR**

72 Inventor/es:

**LOPEZ, GEORGES ANTOINE y
LOPEZ, ALEXANDRE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 3 023 733 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

Solución para conservar y/o enjuagar órganos que van a ser trasplantados

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una solución acuosa para conservar y/o enjuagar un órgano a trasplantar y su uso para la conservación estática, conservación dinámica y/o enjuague de un órgano a trasplantar.

Estado de la técnica anterior

El trasplante de órganos es el último recurso en caso de fallo de un órgano vital, que se sustituye por un órgano sano llamado injerto.

10 Los órganos trasplantados proceden generalmente de sujetos en estado de muerte encefálica (o muerte cerebral), cuya circulación y respiración se mantienen artificialmente mediante procedimientos de reanimación. En Francia, la ley establece que se presume que todas las personas son donantes, es decir, donantes de órganos y tejidos, a menos que una persona haya expresado en vida su negativa a ser extirpada. El equipo médico también puede decidir no proceder a la donación de órganos debido a los antecedentes patológicos del donante (tumores, enfermedades infecciosas u otras afecciones) o a obstáculos médicos. Al mismo tiempo, muchos trasplantes se realizan con donantes
15 vivos, como los de riñón.

Tras ser extraídos del donante, los órganos se someten a un inevitable periodo de flujo sanguíneo isquémico (caliente y luego frío) para garantizar su conservación, antes de ser asignados a un receptor compatible y luego trasplantados.

20 En este contexto, todos los órganos están expuestos a los daños causados por el síndrome de isquemia-reperusión. Este síndrome reúne una serie de procesos fisiopatológicos responsables de lesiones en el injerto, en particular una alteración de las poblaciones celulares.

La isquemia-reperusión es uno de los principales factores que provocan daños en los órganos antes del trasplante, retrasan y/o alteran la recuperación de la función orgánica, aumentan el riesgo de rechazo y reducen la supervivencia del injerto a largo plazo. El resultado es que los órganos que ya no pueden trasplantarse se sobrecargan, o surge la necesidad de un nuevo trasplante porque el injerto dejará de funcionar a más o menos largo plazo.

25 A pesar de los constantes avances en el campo de la donación de órganos, la lista de personas que esperan un trasplante de órganos no deja de crecer, sobre todo por el éxito de los trasplantes, sus beneficios para los pacientes y el envejecimiento de la población. Hasta la fecha, más de 20.000 personas esperan un trasplante de órganos. En 5 años, esta cifra ha aumentado un 17% (Agencia de la biomedicina).

La escasez de órganos disponibles para trasplantes es actualmente uno de los principales problemas de salud pública.

30 Este hallazgo ha llevado a buscar otros injertos disponibles, o incluso nuevas posibilidades terapéuticas. Por ejemplo, el xenotrasplante (con órganos extraídos de animales) y la terapia celular son posibles, pero puede que no estén disponibles hasta dentro de varios años.

Otras posibilidades, más accesibles y rápidas de aplicar, consisten en mejorar/adaptar la conservación de los injertos para :

- 35
- reducir el número de pérdidas de injertos; y
 - poder utilizar los llamados injertos "marginales", que suelen ser demasiado sensibles y que se deterioran más rápidamente que los injertos "sanos" durante el procedimiento de trasplante.

Por ejemplo, en el trasplante de hígado, una solución para hacer frente a la escasez de órganos sería utilizar injertos "marginales", como hígados que sufran esteatosis.

40 La esteatosis hepática es una enfermedad del hígado asociada a una sobrecarga de lípidos, principalmente triglicéridos, en el citoplasma de los hepatocitos. La prevalencia de esta patología es del 20% al 30% en los países desarrollados. Se trata, por tanto, de una patología frecuente, cuya prevalencia tiende a aumentar con el incremento de la obesidad y la diabetes.

45 Se observan dos tipos de esteatosis hepática: la esteatosis microvacuolar, cuya etiología es variable, se caracteriza por la presencia de varias pequeñas vacuolas lipídicas en el citoplasma, cuya presencia no induce el desplazamiento del núcleo del hepatocito. El segundo tipo de esteatosis, más grave, es la esteatosis macrovacuolar, una de cuyas causas es el consumo excesivo de alcohol. Este tipo de esteatosis se caracteriza por una única gran vacuola lipídica que desplaza el núcleo del hepatocito.

50 Los hígados con esteatosis son más sensibles a la conservación hipotérmica estática. En este contexto patológico, la disponibilidad de oxígeno se reduce debido a anomalías morfológicas en los hepatocitos.

Los criterios para trasplantar o no injertos "marginales" no están claros, y cada centro de trasplantes tiene sus propios parámetros de evaluación para decidir si se recoge o no un injerto y se asigna a un receptor.

Las soluciones de conservación o las soluciones de enjuague se utilizan habitualmente para lavar el injerto de sangre residual, enfriar el órgano o conservarlo, sobre todo durante el transporte.

- 5 Cuando el órgano se extrae del cuerpo del donante, queda desprovisto de toda vascularización y se ve sometido a un fenómeno de isquemia caliente. Las células se necrosan rápidamente, lo que afecta a la viabilidad del injerto. Para limitar este fenómeno, el órgano se coloca rápidamente en una solución de conservación a +4°C. La conservación hipotérmica estática es el procedimiento de conservación más común. El órgano puede mantenerse en esta solución hasta el momento del trasplante.
- 10 En este contexto, el papel del líquido de conservación es reducir el impacto de las lesiones de isquemia-reperfusión (lesiones celulares y reacción aloinmune), pero también garantizar la irrigación del injerto para una eliminación casi completa de la sangre, distribuir homogéneamente el líquido hipotérmico y limitar los efectos deletéreos causados por la isquemia fría.

- 15 Sin embargo, este procedimiento garantiza la conservación del órgano durante un periodo limitado, por ejemplo, menos de 24 horas para el riñón, de 8 a 12 horas para el hígado o de 4 a 6 horas para el corazón.

Las principales soluciones utilizadas son :

- Soluciones en las que la concentración de potasio (K^+) es mayor que la de sodio (Na^+), conocidas como soluciones intracelulares. Un ejemplo es la solución BELZER UW® (UW®) para la conservación renal, hepática y pancreática, comercializada por BRIDGE TO LIFE;
- 20 - Soluciones en las que la concentración de potasio (K^+) es inferior a la de sodio (Na^+), conocidas como soluciones extracelulares. Un ejemplo es el líquido SAINT THOMAS® para la conservación de injertos cardíacos, comercializado por LOS LABORATORIOS AGUETTANT.

- 25 El documento WO 00/69259 describe una solución de conservación extracelular que utiliza un polietilenglicol de 35.000 Daltons (PEG 35) como agente oncótico a una concentración de 0,029 mM o $1g.L^{-1}$. Esta solución de conservación se utiliza para la conservación hipotérmica estática y ha demostrado protección de las células endoteliales y propiedades antioxidantes para la conservación renal y hepática antes del trasplante.

Una primera posibilidad para la conservación y el transporte del injerto consiste en sumergir el órgano que se va a trasplantar en la solución de conservación mantenida entre +2 y +8°C (conservación hipotérmica estática) antes mencionada. No hay circulación de la solución en el injerto.

- 30 Una alternativa consiste en perfundir el injerto de forma continua hasta su implantación en el receptor (conservación dinámica) en condiciones de hipotermia.

El principio de conservación dinámica requiere el uso de una máquina de perfusión (o MP) y se basa en la circulación continua o pulsátil controlada de un perfusato (o solución).

- 35 Hasta la fecha, existen dos tipos de MP: de flujo continuo y de flujo pulsátil. Este flujo proporciona un suplemento de nutrientes con niveles variables de oxígeno, mientras que los residuos tóxicos y los radicales libres producidos pueden ser eliminados.

Por ejemplo, la máquina Lifeport®, comercializada por ORGAN RECOVERY SYSTEM, se utiliza para la perfusión hipotérmica de injertos renales. Una de las soluciones utilizadas con esta máquina es la solución Belzer-MPS®, derivada de la solución UW®.

- 40 La máquina RM3® es una MP pulsátil comercializada por IGL que puede transportar uno o dos riñones. Dispone de un sistema de bombeo regulado que imita los fenómenos de sístole y diástole del corazón.

La solución conservante utilizada en una máquina de perfusión debe elegirse cuidadosamente, sobre todo en lo que respecta a su viscosidad, para garantizar una perfusión eficaz y continua del injerto.

- 45 En la actualidad, es necesario limpiar el órgano utilizando un líquido de enjuague, por ejemplo del tipo descrito en el documento del Solicitante WO 2012/150392. Este documento describe una solución de enjuague extracelular que comprende una elevada proporción de PEG y una cantidad de K^+ inferior a 10 mmol.L^{-1} . A continuación, el órgano se conserva eligiendo otra solución que corresponde a una solución de conservación adaptada al sistema de conservación seleccionado (estático o dinámico). Además, de lo anterior se desprende que la solución de conservación también debe elegirse en función del órgano a trasplantar.

- 50 En otras palabras, no existe ninguna solución adecuada, en particular en términos de formulación y viscosidad, que pueda utilizarse para enjuagar el injerto pero también para conservar el injerto, ya sea en un sistema estático o dinámico.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de desarrollar una solución universal capaz de garantizar el enjuague de un injerto del mismo modo que su conservación efectiva *mediante* la aplicación de procedimientos de conservación estáticos o dinámicos. Además, esta solución debería permitir aclarar y/o conservar los injertos "marginales".

Descripción de la invención

5 El Solicitante ha desarrollado una solución de nueva generación para la conservación y/o enjuague de órganos a trasplantar, que permite resolver los problemas del estado de la técnica anteriormente mencionados.

En particular, la solución utilizada de acuerdo con la invención asegura un mejor enjuague y/o conservación del injerto, reduciendo así el daño celular y el deterioro de la función del órgano. La solución según 1 también es eficaz para enjuagar y/o conservar injertos "marginales". El resultado es un aumento del número de injertos disponibles para trasplante, una recuperación funcional más rápida y eficaz del injerto y una mejora de la calidad de los órganos a trasplantar.

Inesperadamente, la presencia de PEG 35 a una concentración superior a lg.L^{-1} dentro de una solución con una composición específica de iones sodio (Na^+) y (K^+), no altera su viscosidad inicial y la convierte en una solución que puede utilizarse tanto para almacenamiento estático como en máquinas de perfusión (MP).

15 Según un primer aspecto, la invención se refiere a una solución acuosa para conservar y/o enjuagar un órgano a trasplantar que comprende:

- iones de sodio (Na^+) a una concentración comprendida entre 30 y 150 mmol.L^{-1} ;
- iones de potasio (K^+) a una concentración comprendida entre 10 y 40 mmol.L^{-1} ;
- polietilenglicol con una masa molar de 35000 g.mol^{-1} (PEG 35000) a una concentración en masa comprendida entre 2 y 5 g.L^{-1} .

Según la invención, el polietilenglicol tiene una concentración molar comprendida entre 0,057 y 0,143 mmol.L^{-1} .

En el sentido de la invención, se entiende por "solución" una mezcla homogénea formada por una única fase (disolvente) que contiene al menos una sustancia (solute) disuelta en el disolvente.

25 En el sentido de la invención, por "conservación" se entiende el mantenimiento *ex vivo* de la viabilidad de las células del órgano a trasplantar así como de sus funciones fisiológicas. A efectos de la invención, el término "conservación" puede utilizarse para designar el mismo mecanismo.

En el sentido de la invención, por "enjuague" se entiende la acción de limpiar el órgano a trasplantar después de haberlo extraído para eliminar la sangre residual, eliminar los productos de degradación del metabolismo celular o los catabolitos (por ejemplo, la endotelina) liberados tras un calentamiento isquémico o eliminar la acumulación de grandes cantidades de potasio susceptibles de provocar trastornos del ritmo cardíaco en el receptor.

En el sentido de la invención, los términos "órgano a trasplantar" o "injerto" designan el mismo objeto, a saber, un órgano o tejido a trasplantar de un donante a un receptor mediante intervención quirúrgica para sustituir un órgano defectuoso.

35 En el sentido de la invención, "trasplante" se refiere a la transferencia de un órgano completo de un donante, que implica el restablecimiento de la continuidad vascular aferente y eferente de este órgano con el sistema circulatorio del receptor. En un sentido más amplio, podríamos utilizar el término "injerto".

En una realización particular, la solución es de tipo extracelular en el sentido de que contiene una mayor concentración de Na^+ que de K^+ .

40 Según una realización particular, la solución según 1 invención comprende además glutatión, como agente antioxidante, a una concentración ventajosamente comprendida entre 1 y 11 mmol.L^{-1} , por ejemplo 9 mmol.L^{-1} .

El glutatión es una enzima que interviene en la eliminación de los radicales libres (o ROS), ayudando a reducir el estrés oxidativo que provoca el deterioro del órgano a trasplantar.

45 Según una realización preferente, la solución según 1 invención comprende además iones de zinc (Zn^{2+}) en una concentración ventajosamente entre 0,08 mmol.L^{-1} y 0,210 mmol.L^{-1} , preferentemente entre 0,08 mmol.L^{-1} y 0,170 mmol.L^{-1} , aún más ventajosamente entre 0,08 mmol.L^{-1} y 0,1 mmol.L^{-1} , por ejemplo 0,091 mmol.L^{-1} .

Según otra realización particular, la solución según la invención comprende además iones de zinc (Zn^{2+}) a una concentración ventajosamente comprendida entre 0,170 y 0,210 mmol.L^{-1} , por ejemplo 0,191 mmol.L^{-1} .

El zinc desempeña varias funciones en el metabolismo celular, en particular como cofactor activador de la forma endotelial de la óxido nítrico sintasa (o eNOS o NOS3). Por lo tanto, el zinc desempeña un papel indirecto en el

aumento de la concentración de óxido nítrico en el injerto.

Ventajosamente, los iones Zn^{2+} son aportados por una sal de zinc, por ejemplo gluconato de zinc o cloruro de zinc, preferentemente cloruro de zinc.

- 5 Según una realización particular, la solución según la invención comprende además iones nitrito (NO_2^-) a una concentración ventajosamente entre 5 y 100 $nmol.L^{-1}$, por ejemplo 50 $nmol.L^{-1}$.

El nitrito es la forma soluble del monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO) que induce la vasodilatación del endotelio de los vasos sanguíneos, lo que provoca un aumento del flujo sanguíneo.

Ventajosamente, los iones NO_2^- son proporcionados por una sal de nitrito, por ejemplo nitrito de sodio ($NaNO_2$), nitrito de calcio ($Ca(NO_2)_2$) o nitrito de potasio (KNO_2), preferentemente nitrito de sodio ($NaNO_2$).

- 10 Según una realización particular, el pH de la solución de conservación y/o de enjuague según la invención está ventajosamente comprendido entre 7,2 y 7,6, por ejemplo igual a 7,4.

Según una realización particular, la osmolaridad de la solución está ventajosamente comprendida entre 250 y 380 $mosm.L^{-1}$, por ejemplo igual a 290 $mosm.L^{-1}$.

- 15 Según una realización particular, la solución según la invención comprende también al menos un anión impermeante, al menos un azúcar, al menos un agente estabilizador de la membrana celular, una solución tampón y/o al menos una fuente de energía.

Según una realización particular, la solución según la invención comprende además :

- 20
- rafinosa en una concentración ventajosamente entre 25 y 35 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 30 $mmol.L^{-1}$; y alopurinol en una concentración ventajosamente comprendida entre 0,5 y 1,5 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 1 $mmol.L^{-1}$; o alternativamente
 - manitol a una concentración ventajosamente comprendida entre 40 et 80 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 60 $mmol.L^{-1}$.

Según una realización particular, la solución según la invención comprende además :

- 25
- rafinosa a una concentración ventajosamente comprendida entre 25 y 35 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 30 $mmol.L^{-1}$; y alopurinol a una concentración ventajosamente comprendida entre 0,5 y 1,5 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 1 $mmol.L^{-1}$; o alternativamente
 - manitol a una concentración ventajosamente comprendida entre 40 y 80 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 60 $mmol.L^{-1}$, y la histidina a una concentración ventajosamente comprendida entre 25 y 35 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 30 $mmol.L^{-1}$.

En una realización particular, la solución según la invención comprende además:

- 30
- ácido lactobiónico a una concentración ventajosamente comprendida entre 80 y 120 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 100 $mmol.L^{-1}$;
 - iones sulfato (SO_4^{2-}), preferentemente suministrados por sulfato de magnesio ($MgSO_4$), a una concentración ventajosamente comprendida entre 4 y 6 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 5 $mmol.L^{-1}$;
- 35
- iones fosfato (PO_4^{3-}) preferentemente suministrados por fosfato de potasio (KH_2PO_4) a una concentración ventajosamente comprendida entre 20 et 30 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 25 $mmol.L^{-1}$; y
 - adenosina a una concentración ventajosamente comprendida entre 4 y 6 $mmol.L^{-1}$, por ejemplo 5 $mmol.L^{-1}$.

En una realización preferente, la composición de la solución según la invención comprende:

- 40
- PEG 35000 a una concentración de 5 $g.L^{-1}$;
 - glutatión a una concentración de 9 $mmol.L^{-1}$;
 - iones Zn^{2+} a una concentración de 0,191 $mmol.L^{-1}$;
 - iones NO_2^- a una concentración de 50 $nmol.L^{-1}$;
 - rafinosa a una concentración de 30 $mmol.L^{-1}$;
 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 $mmol.L^{-1}$;

- iones SO_4^{2-} , preferentemente suministrados por MgSO_4 , a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
- iones PO_4^{3-} , preferentemente suministrados por KH_2PO_4 , a una concentración de 25 mmol.L^{-1} ;
- adenosina a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
- alopurinol a una concentración de 1 mmol.L^{-1} .

5 En otra realización preferente, la composición de la solución según la invención comprende :

- PEG 35000 a una concentración de 5 g.L^{-1} ;
- glutatión a una concentración de 9 mmol.L^{-1} ;
- iones Zn^{2+} a una concentración de $0,091 \text{ mmol.L}^{-1}$;
- iones NO_2^- a una concentración de 50 nmol.L^{-1} ;

- 10
- rafinosa a una concentración de 30 mmol.L^{-1} ;
 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L^{-1} ;
 - iones SO_4^{2-} , preferentemente suministrados por MgSO_4 , a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
 - iones PO_4^{3-} , preferentemente suministrados por KH_2PO_4 , a una concentración de 25 mmol.L^{-1} ;
 - adenosina a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
- 15
- alopurinol a una concentración de 1 mmol.L^{-1} .

En otra realización preferente, la composición de la solución según la invención comprende :

- PEG 35000 a una concentración de 5 g.L^{-1} ;
- glutatión a una concentración de 9 mmol.L^{-1} ;
- iones Zn^{2+} a una concentración de $0,191 \text{ mmol.L}^{-1}$;

- 20
- iones NO_2^- a una concentración de 50 nmol.L^{-1} ;
 - manitol a una concentración de 60 mmol.L^{-1} ;
 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L^{-1} ;
 - iones SO_4^{2-} , preferentemente suministrados por MgSO_4 , a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
 - iones PO_4^{3-} , preferentemente suministrados por KH_2PO_4 , a una concentración de 25 mmol.L^{-1} ;
- 25
- adenosina a una concentración de 5 mmol.L^{-1} .

En otra realización preferente, la composición de la solución según la invención comprende :

- PEG 35000 a una concentración de 5 g.L^{-1} ;
- glutatión a una concentración de 9 mmol.L^{-1} ;
- iones Zn^{2+} a una concentración de $0,091 \text{ mmol.L}^{-1}$;

- 30
- iones NO_2^- a una concentración de 50 nmol.L^{-1} ;
 - manitol a una concentración de 60 mmol.L^{-1} ;
 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L^{-1} ;
 - iones SO_4^{2-} , preferentemente suministrados por MgSO_4 , a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
 - iones PO_4^{3-} , preferentemente suministrados por KH_2PO_4 , a una concentración de 25 mmol.L^{-1} ;

- adenosina a una concentración de 5 mmol.L⁻¹.

En otra realización preferente, la composición de la solución según la invención comprende :

- PEG 35000 a una concentración de 5 g.L⁻¹ ;
- glutatión a una concentración de 9 mmol.L⁻¹ ;
- 5 - iones Zn²⁺ a una concentración de 0,191 mmol.L⁻¹ ;
- iones NO²⁻ a una concentración de 50 nmol.L⁻¹ ;
- manitol a una concentración de 60 mmol.L⁻¹ ;
- histidina a una concentración de 30 mmol.L⁻¹ ;
- ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L⁻¹ ;
- 10 - iones SO₄²⁻, preferentemente suministrados por MgSO₄, a una concentración de 5 mmol.L⁻¹ ;
- iones PO₄³⁻, preferentemente suministrados por KH₂PO₄, a una concentración de 25 mmol.L⁻¹ ;
- adenosina a una concentración de 5 mmol.L⁻¹.

En otra realización preferente, la composición de la solución según la invención comprende :

- PEG 35000 a una concentración de 5 g.L⁻¹ ;
- 15 - glutatión a una concentración de 9 mmol.L⁻¹ ;
- iones Zn²⁺ a una concentración de 0,091 mmol.L⁻¹ ;
- iones NO²⁻ a una concentración de 50 nmol.L⁻¹ ;
- manitol a una concentración de 60 mmol.L⁻¹ ;
- histidina a una concentración de 30 mmol.L⁻¹ ;
- 20 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L⁻¹ ;
- iones SO₄²⁻, preferentemente suministrados por MgSO₄, a una concentración de 5 mmol.L⁻¹ ;
- iones PO₄³⁻, preferentemente suministrados por KH₂PO₄, a una concentración de 25 mmol.L⁻¹ ;
- adenosina a una concentración de 5 mmol.L⁻¹.

25 Según otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de la solución según la invención para la conservación estática, ventajosamente hipotérmica, de un órgano a trasplantar.

Según la invención, la solución se utiliza a una temperatura ventajosamente comprendida entre +1 y +12°C, preferentemente entre +2 y +8°C, por ejemplo +5°C, para la conservación estática de un órgano a trasplantar.

Según otro aspecto, concíbelas invención se refiere a la utilización de la solución según la invención para la conservación, ventajosamente hipotérmica, dinámica de un órgano a trasplantar.

30 Según la invención, la solución se utiliza a una temperatura ventajosamente comprendida entre +1 y +12°C, preferentemente entre +2 y +8°C, por ejemplo +5°C, para la conservación dinámica de un órgano a trasplantar.

Según una realización particular, la solución según la invención se utiliza para perfundir un injerto en una máquina de flujo continuo.

35 Según una realización particular, la solución según la invención se utiliza para perfundir un injerto en una máquina de flujo pulsátil.

Según otro aspecto, la invención se refiere al uso de la solución según la invención para el enjuague de un órgano a trasplantar.

Según la invención, la solución se utiliza a una temperatura ventajosamente comprendida entre +1 y +12°C,

preferentemente entre +2 y +8°C, por ejemplo +5°C, para el enjuague de un órgano a trasplantar.

Según una realización particular, la solución según la invención se utiliza para enjuagar el órgano a trasplantar y asegurar su conservación, estática o dinámica, antes del trasplante a un receptor.

Según una realización particular, el órgano a trasplantar es un órgano sano o "marginal".

- 5 Según una realización particular, el órgano a trasplantar es un órgano abdominal, preferiblemente el hígado, el páncreas, el riñón o los intestinos.

Según una realización particular, el hígado a trasplantar es un hígado sano o un hígado esteatósico.

Según otra realización, el órgano a trasplantar es un tejido.

- 10 A modo de ejemplo, un tejido según la invención es piel, hueso, vasos sanguíneos, tendones o válvulas cardíacas.

La invención y sus ventajas quedarán más claras en las siguientes figuras y ejemplos, que se dan para ilustrar la invención y no pretenden ser limitativos.

- 15 [Fig. 1] La figura 1 muestra la cuantificación de la actividad de la aldehído deshidrogenasa-2 (ALDH 2) tras 24 horas de conservación hipotérmica estática de un hígado en una solución UW®, IGL-0, IGL-1 o según la invención (INV).

[Fig. 2] La figura 2 muestra la cuantificación del contenido de transaminasas en el tejido hepático tras 24 horas de conservación hipotérmica estática de un hígado en una solución UW®, IGL-1 o según la invención (INV).

- 20 [Fig. 3] La figura 3 muestra la cuantificación del contenido de glutamato deshidrogenasa (GLDH) en el tejido hepático tras 24 horas de conservación hipotérmica estática de un hígado en una solución UW®, IGL-1 o según la invención (INV).

[Fig. 4] La figura 4 muestra la determinación de la cantidad de células presentes en el efluente de enjuague de un hígado sano o de un hígado esteatósico, enjuagado con la solución IGL-1® o con la solución según la invención (INV).

- 25 [Fig. 5] La figura 5 muestra la cuantificación del número de glóbulos rojos que quedan en el tejido hepático tras el enjuague de un hígado sano o esteatósico con la solución UW®, IGL-1® o la solución según la invención (INV).

[Fig. 6] La figura 6 muestra la evaluación de la actividad de la aldehído deshidrogenasa-2 (ALDH 2) en el hígado tras la conservación hipotérmica dinámica con la solución PERF-GEN® o la solución según la invención (INV).

- 30 [Fig. 7] La figura 7 muestra la evaluación de la degradación del parénquima hepático midiendo el contenido de aspartato aminotransferasa (ASAT) en el hígado después de la conservación hipotérmica dinámica con la solución PERF-GEN® o la solución según la invención (INV).

[Fig. 8] La figura 8 muestra la evaluación de la degradación del parénquima hepático midiendo el contenido de glutamato deshidrogenasa (GLDH) en el hígado después de la conservación hipotérmica dinámica con la solución PERF-GEN® o la solución según la invención (INV).

- 35 **Ejemplo de realización de la invención**

1/ Preparación de la solución de conservación y enjuague según la invención

Una solución según la invención se prepara mezclando los ingredientes según la formulación (para 1 litro) en la tabla 1:

[Tabla 1]

Ingrediente	Concentración
PEG 35000 (peso molecular 35000 g.L ⁻¹)	0,14 mM (es decir, 5 g.L ⁻¹)
Na ⁺ (suministrado por NaOH)	125 mM
K ⁺ (suministrado por KH ₂ PO ₄)	25 mM
Zn ²⁺ (suministrado por ZnCl ₂)	0,191 mM
Glutación	9 mM
NO ²⁻ (proporcionado por NaNO ₂)	50 nM

Rafinosa	30 mM
Ácido lactobiónico	100 mM
SO ₄ ²⁻ (suministrado por MgSO ₄)	5 mM
PO ₄ ³⁻ (proporcionado por KH ₂ PO ₄)	25 mM
Adenosina	5 mM
Alopurinol	1 mM

La solución se prepara disolviendo todos los ingredientes, con agitación magnética, en una solución acuosa. El pH de la solución resultante se ajusta a 7,4.

2/ Comparación de la viscosidad de las soluciones de la técnica anterior con la solución según la invención

- 5 La viscosidad se determinó utilizando el procedimiento de la Farmacopea Europea en el capítulo 2.2.9 "Viscosidad - Procedimiento del tubo capilar".

[Tabla 2]

Solución	IGL-1®	INV	Perf-Gen®
Uso	Conservación estática	Enjuagado + Conservación estática + conservación dinámica	Conservación dinámica
Agente oncótico	PEG 35 (lg.L ⁻¹)	PEG 35 (5 g.L ⁻¹)	HES (50 g.L ⁻¹)
Viscosidad (cP)	1,2	1,4	2,4

- 10 Estos resultados muestran que, como era de esperar, el aumento significativo de la concentración de PEG en la solución INV en comparación con la solución IGL-1® no provoca un aumento de la viscosidad de la solución.

La viscosidad de la solución según la invención es muy adecuada para su uso en conservación estática (como IGL-1®) y conservación dinámica (como Perf-Gen®).

3/ Conservación estática de un hígado hipotérmico

- 15 Para evaluar la eficacia de la solución de conservación según la invención, se realizaron evaluaciones en hígados sanos o afectados por esteatosis.

3.1 / Condiciones experimentales

Se recolectaron hígados de ratas normales (sanas) y ratas obesas (ratas Zucker; hígados esteatósicos designados como "Ob" o "fatty" en las figuras) de entre 10 y 12 semanas de edad y, a continuación, se conservaron mediante técnicas conocidas por el experto en la materia.

- 20 El propósito de estos experimentos es comparar el rendimiento de la solución según la invención (Solución INV) en la conservación hipotérmica del hígado *ex vivo* en comparación con una solución IGL-0 (solución IGL-1® formulada sin PEG) o con soluciones de la técnica anterior, a saber:

- Solución Belzer UW® (en lo sucesivo, UW);
- Solución IGL-1®.

- 25 A continuación, el órgano se almacena estáticamente en la solución de enjuague (100 ml; HTK®, IGL-1® o INV) durante 24 horas a 4°C.

Se midieron varios parámetros para evaluar la eficacia de la solución según la invención en la conservación del hígado en condiciones de hipotermia.

- 30 3.2 / Cuantificación del contenido de aldehído deshidrogenasa 2 en tejido hepático La aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial (ALDH 2) es una enzima principal del metabolismo de los aldehídos que protege contra la acumulación tóxica de aldehídos a nivel celular, por ejemplo, asegurando la conversión del acetaldehído en ácido acético. La activación de la aldehído deshidrogenasa-2 (ALDH2) está asociada a la protección de las células del órgano a trasplantar.

Tras 24 horas de conservación en soluciones UW[®], IGL-0 (solución IGL-1[®] formulada sin PEG), IGL-1[®] o INV, se llevó a cabo un análisis de la activación de ALDH2 mediante un kit enzimático en hígados sanos.

Los resultados se muestran en la figura 1.

- 5 Los datos muestran que la conservación del hígado en una solución INV induce un aumento de la actividad ALDH2 en el tejido en comparación con las soluciones IGL-0, IGL- 1[®] y UW[®]. Esto protege al órgano contra el daño isquémico.

La formulación de las soluciones IGL-0 y UW no contiene PEG. Estos resultados muestran que el PEG 35 utilizado a una concentración conforme a la invención en la solución INV proporciona una mejor protección del órgano (valor $p < 0,05$).

3.3/ Cuantificación del contenido de transaminasas en el tejido hepático.

- 10 Las transaminasas (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, etc.) son enzimas sintetizadas por los hepatocitos y liberadas en caso de lesión o necrosis hepatocelular. La concentración de transaminasas es, por tanto, un marcador de la eficacia de la conservación del hígado mediante una solución de conservación.

Tras 24 horas de conservación en soluciones UW[®], IGL-1[®] o INV, se realizó un análisis cuantitativo de los niveles de transaminasas utilizando un kit enzimático en hígados esteatósicos.

- 15 Los resultados se muestran en la figura 2.

Los datos muestran que la concentración de transaminasas es menor tras 24 horas de conservación con la solución INV según la invención que con la solución UW[®]. En otras palabras, la solución INV proporciona una mejor conservación que la solución UW[®].

3.4/ Cuantificación del contenido de glutamato deshidrogenasa en el tejido hepático

- 20 La glutamato deshidrogenasa (GLDH) es una enzima mitocondrial específica del hígado que desempeña un papel importante en el catabolismo de los aminoácidos. Interviene en la 35 desaminación del ácido glutámico (o glutamato) para formar α -cetoglutarato. Un aumento de la concentración sérica de GLDH indica degradación del parénquima hepático y, más concretamente, degradación de las mitocondrias.

- 25 Tras 24 horas de conservación en soluciones UW[®], IGL-1[®] o INV, se realizó un análisis cuantitativo de los niveles de GLDH utilizando un kit enzimático en hígados esteatósicos.

Los resultados se muestran en la figura 3.

- 30 Los datos muestran que la concentración de GLDH es 2,5 veces menor tras 24 horas de conservación con la solución INV que con la solución IGL-1[®] y 5 veces menor que con la conservación con la solución UW[®]. Estos resultados indican que la solución INV garantiza una mejor conservación del hígado a trasplantar que las soluciones de la técnica anterior.

4/ Enjuague de un hígado para trasplante

4.1 / Condiciones experimentales

- 35 Los hígados de ratas normales (sanas) y ratas obesas (ratas Zucker; hígados esteatósicos designados por el término "Ob" o "fatty" en las figuras) de 10 a 12 semanas de edad se cosecharon y lavaron mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia.

El objetivo de estos experimentos es comparar el rendimiento de enjuague de la solución según la invención (Solución INV) con el de las soluciones de la técnica anterior, a saber :

- Solución Belzer UW[®] (en lo sucesivo, UW);
- Solución de conservación HTK[®] (para histidina-triptófano-cetoglutarato o solución Custodiol[®] HTK) ;
- 40 - Solución IGL-1[®].

El hígado se lava por influjo de la solución de enjuague a través de la aorta y eflujo a través de la vena porta.

Se midieron varios parámetros para evaluar la eficacia de la solución la invención en el enjuague hepático.

4.2 / Determinación del número de células presentes en el efluente de enjuague del tejido hepático

El rendimiento de enjuague de la solución Pinvention (INV) se evalúa en :

- 45 - TO (disección aórtica después de que el volumen total de enjuague haya pasado por la aorta en todos los grupos

experimentales excepto HTK);

- T1 (después de que el volumen total de enjuague haya pasado por la aorta en el grupo HTK);
- T2 (después de que el volumen total de enjuague haya pasado por la vena porta); y
- T24 (24 horas post-isquemia), en hígados sanos y esteatósicos, en comparación con la solución IGL-1®.

5 Los resultados se muestran en la figura 4.

Los datos muestran que, en el hígado sano, el efluente obtenido tras el enjuague hepático con la solución INV está más concentrado en células, concretamente en glóbulos rojos, que la solución IGL-1® en TO, T1 y T2. El efluente INV es por tanto más "sucio", más concentrado en glóbulos rojos, que el efluente dTGL-1 durante todo el procedimiento de muestreo hepático. Por lo tanto, la solución INV según la invención proporciona un mejor enjuague hepático que la solución IGL-1®.

Como todos sabemos, el timbre de un hígado esteatósico es menos eficaz que el de un hígado sano debido al daño celular y tisular. Los resultados muestran que la solución INV induce una disminución de la concentración de células en el efluente a lo largo del tiempo. Estos datos muestran que la solución según la invención proporciona un enjuague eficaz del hígado esteatósico.

15 4.3 / Cuantificación del número de glóbulos rojos presentes en el tejido hepático tras el enjuague

Se realizó un análisis histológico para cuantificar el número de glóbulos rojos que quedaban en :

- tejido hepático sano, tras muestreo y enjuague con soluciones HTK®, IGL-1 e INV; y
- tejido hepático graso, tras la toma de muestras y el enjuague con soluciones UW e INV.

Los resultados se muestran en la figura 5.

20 En el caso de un hígado sano, los datos muestran que el hígado enjuagado con la solución INV contiene 7 veces menos glóbulos rojos que el hígado enjuagado con la solución HTK® y 2 veces menos que el hígado enjuagado con la solución IGL-1®.

Con respecto al hígado esteatósico, los datos muestran que el hígado enjuagado con solución INV contiene más de 1,5 veces menos glóbulos rojos que el hígado enjuagado con solución UW®.

25 Estos resultados confirman que la solución según la invención proporciona un mejor enjuague hepático que las soluciones del estado de la técnica.

5/ Perfusión hepática dinámica

5.1 / Perfusión dinámica en condiciones de un hígado hipotérmico

30 Para conservar un hígado para trasplante se utiliza una máquina de perfusión hipotérmica. Este equipo permite aplicar el protocolo HOPE (Hypothermic Oxygenated Perfusion), que garantiza la oxigenación pasiva de la perfusión hipotérmica, es decir, sin transportador de oxígeno, protegiendo así la integridad mitocondrial y reduciendo las lesiones por isquemia-reperfusión hepática.

35 El hígado que se va a trasplantar se mantiene en una solución de conservación durante 7 horas y, a continuación, se coloca en una máquina de perfusión hipotérmica durante 1 hora para someterlo al protocolo HOPE. A continuación, se reperfunde el hígado con una solución de Krebs en condiciones normotérmicas.

La solución Perf-Gen® es una de las soluciones del estado de la técnica utilizadas en una máquina de infusión hipotérmica. Esta solución comprende hidroxietilalmidón como agente oncótico y glucosa como agente osmótico.

El objetivo de estos experimentos es comparar el rendimiento de la solución según la invención (Solución INV) con el de la solución Perf-Gen®.

40 Se midieron varios parámetros para evaluar la eficacia de la solución según la invención en la conservación del hígado en condiciones de perfusión hipotérmica dinámica:

5.2 / Evaluación de los niveles de ALDH2 en el tejido hepático

45 Se midió la concentración de ALDH2 en tejido hepático sano para evaluar las propiedades de protección celular de la solución INV utilizada en un aparato de perfusión según el protocolo HOPE (véase el apartado 3.4), en comparación con la solución Perf-Gen®.

Los resultados se muestran en la figura 6.

Los datos muestran que la solución INV según la invención produce una actividad ALDH2 significativamente mayor que la solución Perf-Gen® tras perfusión dinámica en hipotermia.

5.3 / Evaluación de la degradación del parénquima hepático

5 5.3.1 / *Aspartato aminotransferasa*

El nivel de aspartato aminotransferasa (ASAT), un tipo particular de transaminasa, se midió mediante un kit enzimático, 1h después de someterse al protocolo HOPE (véase el punto 3.4).

Los resultados se muestran en la figura 7.

10 Los datos muestran un menor contenido de ASAT en el tejido hepático perfundido con la solución según la invención en comparación con el uso de la solución del estado de la técnica.

5.3.2 / *GLDH*

Los niveles de GLDH se midieron utilizando un kit enzimático al inicio del protocolo HOPE y después cada 15 minutos, es decir, a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos.

Los resultados se muestran en la figura 8.

15 Los datos muestran que la infusión con la solución INV produce una reducción de los niveles de GLDH en comparación con la solución Perf-Gen®.

En conclusión, la perfusión de un hígado en una máquina de perfusión hipotérmica con la solución de la 1ª invención da lugar a niveles más bajos de ASAT y GLDH, lo que refleja una menor degradación del tejido hepático en comparación con la solución Perf-Gen®.

20 **6/ Conclusión**

La solución según la invención es adecuada para su uso en la conservación hipotérmica estática de un órgano a trasplantar y/o en el enjuague dinámico del órgano en un aparato de perfusión hipotérmica. Además, en estos 2 contextos de utilización, la solución INV según 1 invención es más eficaz que las soluciones de la técnica anterior. El INV contribuye a proteger el órgano que se va a trasplantar y a reducir los daños causados en el tejido hepático por 25 las reacciones de isquemia y reperfusión.

REIVINDICACIONES

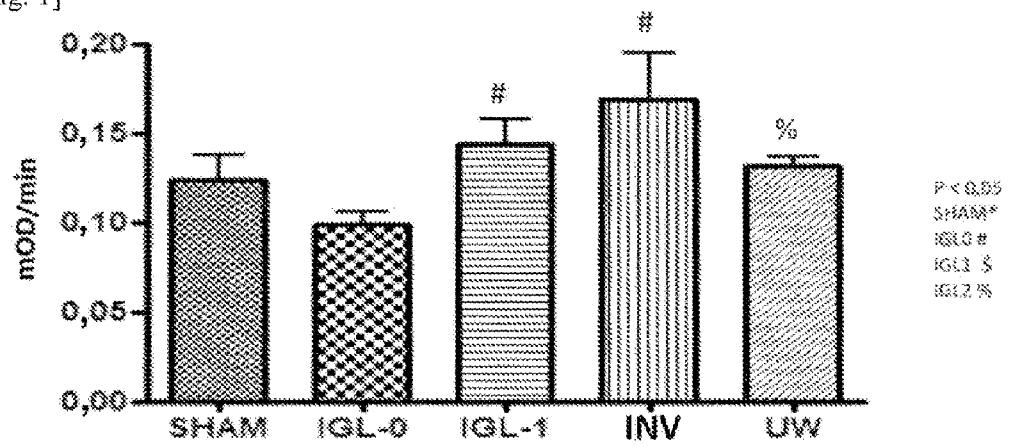
1. Solución acuosa para conservar y/o enjuagar un órgano a trasplantar que comprende:
 - iones de sodio (Na^+) a una concentración comprendida entre 30 y 150 mmol.L^{-1} ;
 - iones potasio (K^+) a una concentración comprendida entre 10 y 40 mmol.L^{-1} ;
 - polietilenglicol con una masa molar de 35000 g.mol^{-1} (PEG 35000) a una concentración comprendida entre 2 y 5 g.L^{-1} .
2. Solución según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende además glutatión, como agente antioxidante, a una concentración comprendida entre 1 y 11 mmol.L^{-1} .
3. Solución según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende adicionalmente iones zinc (Zn^{2+}) a una concentración comprendida entre 0,08 y 0,210 mmol.L^{-1} .
4. Solución según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende además iones nitrito (NO_2^-) a una concentración comprendida entre 5 y 100 nmol.L^{-1} .
5. Solución según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el pH está comprendido entre 7,2 y 7,6, preferentemente igual a 7,4.
6. Solución según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende además un anión impermeante, un azúcar, un agente estabilizador de la membrana celular, una solución tampón y/o una fuente de energía.
7. Solución según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende además :
 - rafinosa a una concentración comprendida entre 25 y 35 mmol.L^{-1} y alopurinol a una concentración comprendida entre 0,5 y 1,5 mmol.L^{-1} ; o bien
 - manitol a una concentración comprendida entre 40 y 80 mmol.L^{-1} , ventajosamente manitol a una concentración comprendida entre 40 y 80 mmol.L^{-1} e histidina a una concentración comprendida entre 25 y 35 mmol.L^{-1} .
8. Solución según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** comprende además:
 - ácido lactobiónico a una concentración comprendida entre 80 y 120 mmol.L^{-1} ;
 - iones sulfato (SO_4^{2-}), preferentemente suministrados por sulfato de magnesio (MgSO_4), a una concentración comprendida entre 4 y 6 mmol.L^{-1} ;
 - iones fosfato (PO_4^{3-}), preferentemente suministrados por fosfato de potasio 10 (KH_2PO_4), a una concentración comprendida entre 20 y 30 mmol.L^{-1} ; y
 - adenosina a una concentración comprendida entre 4 y 6 mmol.L^{-1} .
9. Solución según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende:
 - PEG 35000 a una concentración de 5 g.L^{-1} ;
 - glutatión a una concentración de 9 mmol.L^{-1} ;
 - iones Zn^{2+} a una concentración de 0,191 mmol.L^{-1} ;
 - iones NO_2^- a una concentración de 50 nmol.L^{-1} ;
 - rafinosa a una concentración de 30 mmol.L^{-1} ;
 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L^{-1} ;
 - iones SO_4^{2-} , preferentemente suministrados por MgSO_4 , a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
 - iones PO_4^{3-} , preferentemente suministrados por KH_2PO_4 , a una concentración de 25 mmol.L^{-1} ;
 - adenosina a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
 - alopurinol a una concentración de 1 mmol.L^{-1} .
10. Solución según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** comprende:
 - PEG 35000 a una concentración de 5 g.L^{-1} ;
 - glutatión a una concentración de 9 mmol.L^{-1} ;
 - iones Zn^{2+} a una concentración de 0,191 mmol.L^{-1} ;
 - iones NO_2^- a una concentración de 50 nmol.L^{-1} ;
 - manitol a una concentración de 60 mmol.L^{-1} ;
 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L^{-1} ;
 - iones SO_4^{2-} , preferentemente suministrado por MgSO_4 , a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;

- iones PO_4^{3-} , preferentemente suministrados por KH_2PO_4 , a una concentración de 25 mmol.L^{-1} ;
- adenosina a una concentración de 5 mmol.L^{-1} .

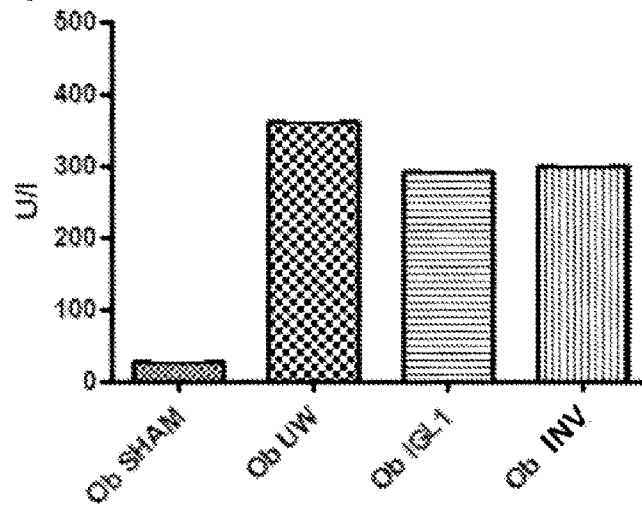
11. Solución según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** comprende:

- PEG 35000 a una concentración de 5 g.L^{-1} ;
 - 5 - glutatión a una concentración de 9 mmol.L^{-1} ;
 - iones Zn^{2+} a una concentración de $0,191 \text{ mmol.L}^{-1}$;
 - iones NO_2^- a una concentración de 50 nmol.L^{-1} ;
 - manitol a una concentración de 60 mmol.L^{-1} ;
 - 10 - histidina a una concentración de 30 mmol.L^{-1} ;
 - ácido lactobiónico a una concentración de 100 mmol.L^{-1} ;
 - iones SO_4^{2-} , preferentemente suministrados por MgSO_4 , a una concentración de 5 mmol.L^{-1} ;
 - iones PO_4^{3-} , preferentemente suministrados por KH_2PO_4 , a una concentración de 25 mmol.L^{-1} ;
 - adenosina a una concentración de 5 mmol.L^{-1} .
12. Uso de una solución según una de las reivindicaciones 1 a 10, para la conservación estática de un órgano a trasplantar.
13. Uso de una solución según una de las reivindicaciones 1 a 10, para la conservación dinámica de un órgano a trasplantar.
14. Uso de una solución según una de las reivindicaciones 1 a 10, para el enjuague de un órgano a trasplantar.
15. Uso según una de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado porque el órgano a trasplantar es un órgano abdominal, preferentemente el hígado, el páncreas, el riñón o los intestinos.

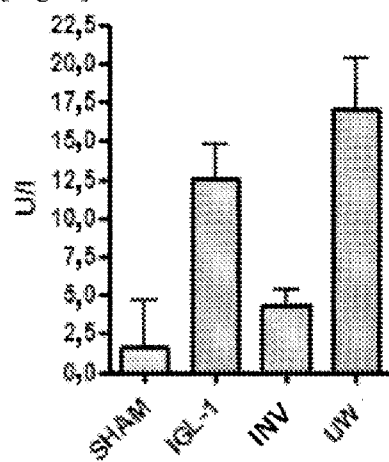
[Fig. 1]



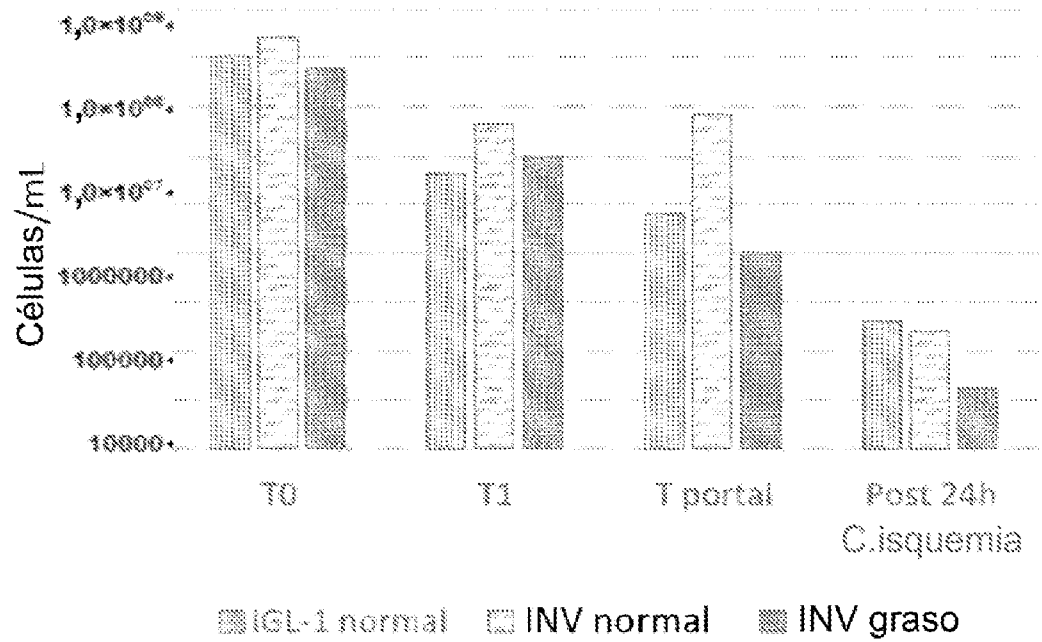
[Fig. 2]



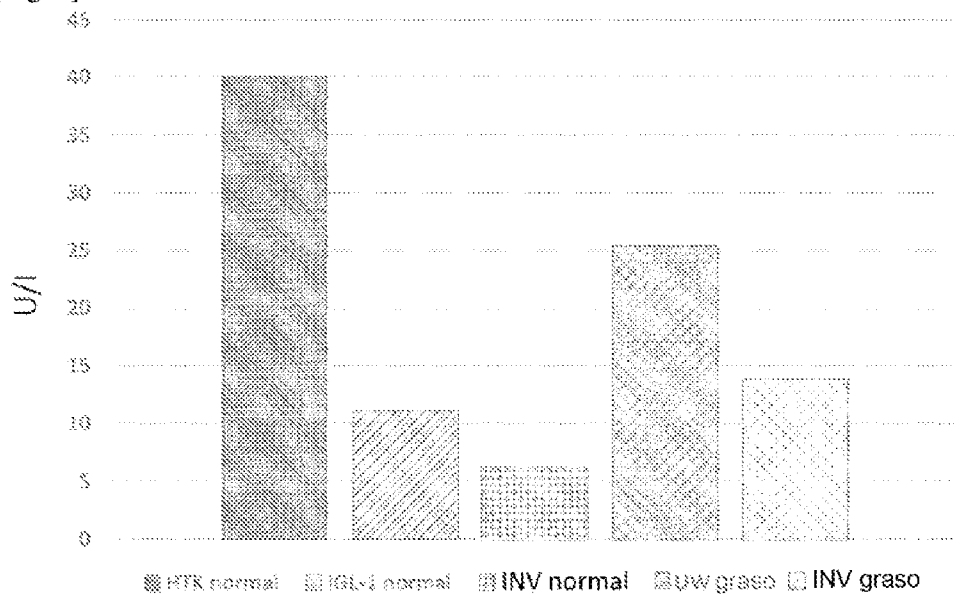
[Fig. 3]



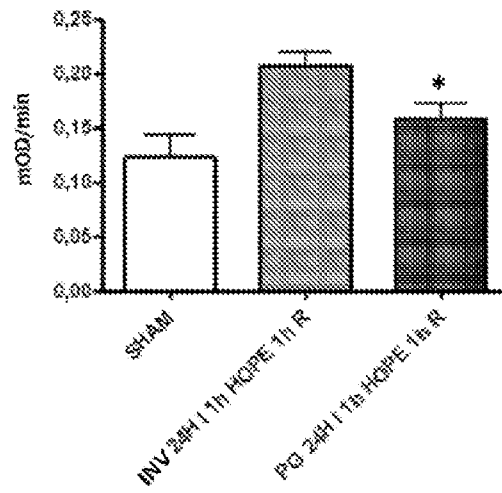
[Fig. 4]



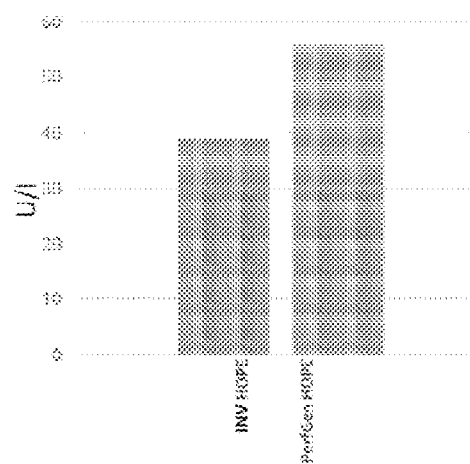
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

