

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2009/141470 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
26 de noviembre de 2009 (26.11.2009)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A01N 1/02 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2009/000267
- (22) Fecha de presentación internacional:  
18 de mayo de 2009 (18.05.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P200801560 19 de mayo de 2008 (19.05.2008) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE BARCELONA [ES/ES]; Centro de Patentes de la UB, Baldiri Reixac, 4, E-08028 Barcelona (ES). INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER [ES/ES]; C/ Villarroel, nº 170, E-08036 Barcelona (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): PERALTA UROZ, Carmen [ES/ES]; C/ Lepanto 347 1º 1ª, E-08025 Barcelona (ES). ROSELLÓ-CATAFAU, Joan [ES/ES]; Pza Gala Placidia 22, E-08006 Barcelona (ES). BEN MOSBAH, Ismail [TN/ES]; Av República Argentina 64, 11, 5, E-08940 Cornellá de Llobregat (Barcelona) (ES). BARTRONS BACH, Ramón [ES/ES]; C/ Feixa Llarga s/n, E-089007 Hospitalet (Barcelona) (ES).
- (74) Mandatario: SEGURA CÁMARA, Pascual; Centro de Patentes de la UB, C/ Baldiri Reixac, 4, E-08028 Barcelona (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: AQUEOUS SOLUTION FOR THE PRESERVATION OF TISSUES AND ORGANS

(54) Título: SOLUCIÓN ACUOSA PARA LA PRESERVACIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS

(57) Abstract: The invention relates to an improved aqueous solution for the preservation of tissues and organs, containing carvedilol, tacrolimus and trimetazidine. A synergistic effect is observed for this preservation solution which is particularly effective in marginal organs, such as steatotic livers.

(57) Resumen: Se proporciona una solución acuosa mejorada para la preservación de tejidos y órganos que comprende carvedilol, tacrolimus y trimetazidina. Se observa un efecto sinérgico para esta solución de preservación que es especialmente efectiva en órganos marginales como los hígados esteatósicos.



WO 2009/141470 A1

### Solución acuosa para la preservación de tejidos y órganos.

Esta invención está relacionada con una solución acuosa para preservar tejidos y órganos, el uso de la misma, particularmente, para preservar  
5 órganos marginales, así como con un método para preservar tejidos y órganos.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 El trasplante de órganos es el tratamiento a escoger para pacientes que padecen enfermedades crónicas en fase terminal. A pesar de los avances en la mejoría de las técnicas del trasplante, la lesión que sufre el injerto durante el período de isquemia y la subsiguiente reperusión continúa siendo un problema sin resolver en la práctica clínica.

15 Desde el momento en que se realiza la extracción del donante hasta que se procede a la implantación del injerto en el receptor, el/los órgano(s) y los tejidos se someten a un inherente período de isquemia. Así pues, las soluciones líquidas utilizadas para preservar los órganos y los tejidos tienen  
20 que cumplir una serie de requisitos: eliminación de la sangre del donante, conseguir un enfriamiento rápido del órgano y asegurar una prevención y protección efectiva frente a las lesiones causadas por la isquemia.

La preservación hipotérmica estática es un método efectivo para la  
25 preservación de órganos durante cortos períodos de isquemia. Sin embargo, períodos de isquemia prolongados están asociados con el fallo primario del injerto en el trasplante hepático, y con disfunción del injerto en el trasplante renal. Además de la necesidad de ampliar el período de isquemia, la escasez de donantes y en consecuencia el aumento en las listas de espera en el  
30 trasplante de órganos ha derivado en la aceptación de órganos marginales, los cuales presentan poca tolerancia frente a la lesión ocasionada por una isquemia prolongada. En el caso del trasplante hepático, la utilización de órganos marginales, como es el caso de injertos esteatósicos está asociada con un mayor riesgo de padecer fallo primario o disfunción del injerto tras  
35 realizar el trasplante, comparado con los no esteatósicos. Además, algunos hígados esteatósicos no se consideran aptos para ser trasplantados, acentuando aún más la falta de órganos para el trasplante. Es bien conocido

que la mayoría de la lesión que presenta un órgano marginal durante el trasplante está relacionada con el período de preservación hipotérmica. Estas observaciones indican la necesidad de optimizar la preservación de órganos. Por tanto, el principal objetivo en la preservación de órganos, es procurar  
5 prolongar la tolerancia del órgano a la isquemia.

Existen pruebas que indican que la composición de las soluciones de preservación es un factor crítico para la calidad de órganos conservados durante períodos de isquemia prolongados. La solución de preservación,  
10 Universidad de Wisconsin (UW), está considerada como la solución estándar para la preservación hepática, ya que ha resultado efectiva para reducir el daño ocasionado por la isquemia fría y ha extendido los límites de los tiempos de almacenamiento. Esta solución de preservación contiene diferentes componentes encaminados a mejorar la preservación del órgano,  
15 incluyendo el coloide hidroxietil almidón, para prevenir el edema celular, la adenosina como fuente de ATP durante la reperfusión, el alopurinol y el glutation con efectos antioxidantes, y agentes impermeables a la membrana celular tales como el ácido lactobiónico y la rafinosa. Sin embargo, esta solución de preservación, UW, presenta limitaciones en cuanto a la eficacia,  
20 ya que se han observado lesiones irreversibles en los órganos sometidos a trasplante cuando se prolonga el período de isquemia fría (16 h-24 h).

El tacrolimus (TCR) es un compuesto macrólido con efectiva actividad inmunosupresora, anti-microbiana y otras actividades farmacológicas, siendo  
25 de un valor para la prevención del rechazo en el trasplante de órganos y tejidos, así como para desórdenes de origen autoimmune e infeccioso. Es conocido que su adición a las soluciones de preservación puede proteger frente a la lesión ocasionada por la reperfusión. En la literatura se ha descrito una solución de preservación UW que contiene tacrolimus (K. G. Rajesh et  
30 al., "Mitochondrial Permeability transition-pore inhibition enhances functional recovery after long-time hypothermic heart preservation", Transplantation, 2003, vol. 76 (9), pp. 1314-20). Su acción en la preservación se ensayó en corazones. Sin embargo, se concluyó que el tacrolimus no tenía ningún efecto en la preservación.

35 El carvedilol (CVD) es un agente bloqueador  $\beta$ -adrenérgico no selectivo y lipofílico, con efectos vasodilatadores ejercidos principalmente a través del

bloqueo selectivo del receptor  $\alpha_1$ , y con una potente actividad antioxidante. La capacidad del carvedilol de inhibir la lipoperoxidación es mucho mayor que aquella obtenida con otros bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, lo cual explicaría su superioridad en cuanto a los efectos protectores en modelos de isquemia-reperfusión. A pesar de que la adición de antioxidantes como el carvedilol en las soluciones de preservación se ha sugerido en la literatura (cf. B. Yard et al., "Prevention of cold-preservation injury of cultured endothelial cells by catecholamines and related compounds", American Journal of transplantation, 2004, vol. 4, pp. 22-30), no se ha descrito ninguna solución de preservación específica que comprenda carvedilol.

Un estudio reciente indica que la adición de trimetazidina (TMZ) a la solución de preservación UW mejoró la capacidad de esta solución de preservación estándar para proteger ambos, hígados no-esteatósicos y, especialmente, hígados esteatósicos sujetos a períodos de isquemia prolongados (cf. I. Ben Mosbah et al. "Trimetazidine: Is it a promising drug for use in steatotic grafts?", World J Gastroenterol, 2006, vol. 12(6), pp. 908-914).

Sin embargo, algunas de las propiedades de la solución UW como son la alta concentración de potasio (requerida para lavar el órgano antes de la reperusión del injerto en el receptor) y la presencia de hidroxietil almidón (HES) como soporte oncótico (que podría ser responsable de la agregación de glóbulos rojos) no favorecen la preservación del órgano. Estudios recientes han demostrado que ambos tipos de injertos de hígado (injertos esteatósicos y no-esteatósicos) se preservan mejor en una solución de preservación modificada a partir de la UW (llamada IGL-1) que se caracteriza por la inversión en las concentraciones de  $K^+$  y  $Na^+$  y en la sustitución del HES por el polietilenglicol (PEG) en la solución UW original (cf. I. Ben Mosbah et al., "Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution", Liver Transpl, 2006, vol. 12 (8), pp. 1215-23). Por otro lado, a pesar de las mejoras ofrecidas por la solución IGL-1, el daño ocasionado por la isquemia-reperfusión (I/R) continua siendo aún un problema sin resolver.

Todavía existe la necesidad de encontrar soluciones de preservación que permitan prolongar la tolerancia del órgano a la isquemia y minimizar el riesgo inherente que sufren los órganos marginales sometidos a trasplante.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Aunque se conocen o se han sugerido en el estado de la técnica soluciones de preservación que contienen tacrolimus, carvedilol, o trimetazidina, nunca se ha sugerido una solución acuosa para la preservación de tejidos y órganos que comprenda una combinación de los tres principios activos farmacéuticos. Los inventores, sorprendentemente, han encontrado que una solución de preservación que contenga una combinación de tacrolimus, carvedilol y trimetazidina mejora de forma sinérgica la capacidad de preservación de órganos y tejidos sometidos a un período de isquemia prolongado. En particular, este efecto sinérgico es especialmente evidente en órganos marginales, tales como hígados esteatósicos, que hace la solución especialmente ventajosa ya que mejorarían las condiciones iniciales de los órganos marginales disponibles para trasplantes pero con deficientes resultados post-operatorios, y se podría aumentar también el uso de órganos que actualmente son descartados para el trasplante y, por tanto, aumentar la cantidad de órganos disponibles para ser trasplantados.

Así, un aspecto de la presente invención está relacionado con una solución de preservación acuosa para la preservación de tejidos y órganos que comprende una cantidad efectiva de carvedilol, una cantidad efectiva de tacrolimus, y una cantidad efectiva de trimetazidina.

La solución de preservación acuosa de la presente invención permite mantener tejidos u órganos durante un período de tiempo mayor que el que se consigue con otras soluciones de preservación conocidas. Otra ventaja de la solución de preservación de la invención es que permite alargar el tiempo en el cual un tejido o un órgano funcionan adecuadamente y en que es útil para trasplante comparado con lo que se alcanzaría con otras soluciones de preservación.

Un segundo aspecto de esta invención está relacionado con el uso de la solución acuosa de la presente invención para preservar tejidos u órganos. La solución se puede aplicar a tejidos u órganos de mamíferos, incluido humanos. Ejemplos de estos tejidos son arterias y venas.

También forma parte de esta invención un método para preservar tejidos y

órganos que comprende mantener dichos tejidos u órganos en la solución acuosa de la presente invención a una temperatura comprendida entre 2-10 °C. A través de sumergir un tejido u órgano en la solución de preservación acuosa de la presente invención se previene la lesión por reperfusión asociada a la implantación del tejido u órgano y el rechazo del trasplante.

Tal como se utiliza aquí, la frase "una concentración efectiva" de un ingrediente activo, es la cantidad ingrediente activo que se utiliza para la preservación de tejidos u órganos.

Cualquier valor en un intervalo dado aquí se puede extender o alterar sin perder los efectos buscados, como sería aparente para una persona experta en la materia. Así, los intervalos dados, tales como concentraciones, y similares se deberían considerar aproximados, a menos que se especifique lo contrario.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras (1-10) ilustran el efecto de la adición del tacrolimus (TCR), carvedilol (CVD), y trimetazidina (TMZ) a algunas soluciones de preservación ya conocidas, y los efectos de la solución de preservación del Ejemplo 1 (P1) cuando los hígados esteatósicos (S) y los hígados no esteatósicos (NS) se sometieron a un período de isquemia prolongado. En las Figuras, %P significa porcentaje de protección.

La FIG. 1 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación UW cuando se evaluaron los valores de ALT al final del período de isquemia (0 min).

La FIG. 2 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación UW cuando se evaluaron los valores de ALT al final de la reperfusión (120 min.).

La FIG. 3 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación UW cuando se evaluó la producción de bilis al final de la reperfusión (120 min.).

5 La FIG. 4 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación UW cuando se evaluó el % de aclaramiento hepático de BSP en bilis durante la reperfusión.

10 La FIG. 5 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación UW cuando se evaluaron los niveles de ATP al final de la reperfusión (120 min.).

15 La FIG. 6 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación IGL-1 cuando se evaluaron los valores de ALT al final del período de isquemia (0 min.).

20 La FIG. 7 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación IGL-1 cuando se evaluaron los valores de ALT al final de la reperfusión (120 min.).

La FIG. 8 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación IGL-1 cuando se evaluó la producción de bilis al final de la reperfusión (120 min.).

25 La FIG. 9 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación IGL-1 cuando se evaluó el % de aclaramiento hepático de BSP en bilis durante la reperfusión.

30 La FIG. 10 ilustra el porcentaje de protección frente a la solución de preservación IGL-1 cuando se evaluaron los niveles de ATP al final de la reperfusión (120 min.).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 La solución acuosa de la presente invención puede ser aplicada a tejidos u órganos en el momento en que se procede a la extracción del donante, durante su almacenamiento, transporte, hasta su posterior implantación en el

receptor. Se puede utilizar para cortos períodos de isquemia y principalmente para períodos de isquemia prolongados.

5 En una realización preferida de la solución acuosa de la presente invención, la concentración de carvedilol es de 5 a 10 microM, la concentración de tacrolimus es de 5 a 10 microM, y la concentración de trimetazidina es de 0.01 microM a 10 microM.

10 Para evitar la formación de edema tisular y celular, la solución de acuosa de la presente invención contiene polietilenglicol (PEG) con un peso molecular superior a 15.000, lo cual garantiza la presión oncótica. Preferiblemente, el PEG utilizado es un PEG de un peso molecular de 35.000. Más preferiblemente, el PEG es un PEG purificado no lineal, es decir un PEG sintetizado a partir de moléculas de PEG de bajo peso molecular.

15 Por consiguiente, en otra realización preferida, la solución acuosa de la presente invención tiene un pH de 6.5 a 8 y una osmolaridad de 290 a 320 milimoles/kg, y además comprende PEG con un peso molecular superior a 15.000 y en una concentración de 0.01 a 5 mM, rafinosa en una  
20 concentración de 20 a 40 mM,  $MgSO_4$  en una concentración de 1 a 10 mM,  $H_2PO_4^-$  en una concentración de 10 a 40 mM, iones potasio en una concentración de 30 a 50 mM, iones sodio en una concentración de 110 a 160 mM, y ácido lactobiónico en una concentración de 70 a 140 mM.

25 En otra realización todavía más preferida, la solución acuosa de la presente invención tiene un pH de 7.4, una osmolaridad de 320 milimoles/kg, y una concentración de PEG con un peso molecular superior a 15.000 de 0.03 mM, la concentración de rafinosa es de 30 mM, la concentración de  $MgSO_4$  es 5 mM, la concentración de  $H_2PO_4^-$  es 25 mM, la concentración de iones potasio  
30 es de 40 mM, la concentración de iones sodio es de 120 mM, la concentración de ácido lactobiónico es de 100 mM, la concentración de tacrolimus es de 5 microM, la concentración de carvedilol es de 10 microM, y la concentración de trimetazidina es de 1 microM. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular aproximado de 35000.

35 Es bien conocido que la principal causa de no aceptación de órganos para ser trasplantados es la esteatosis. Las realizaciones preferidas anteriormente

mencionadas de la solución de preservación de la invención permiten aumentar la tolerancia de los hígados esteatósicos a la lesión ocasionada por la isquemia-reperfusión asociada al trasplante hepático. Este hecho permite mejorar la funcionalidad post-trasplante del injerto esteatósico y permite  
5 aumentar la disponibilidad de órganos aptos para el trasplante.

Una solución acuosa particularmente preferida de la presente invención consiste en los siguientes componentes:

- 10 - polientilenglicol con un peso molecular aproximado de 35000 en una concentración de 0.03 mM,
- rafinosa en una concentración de 30 mM,
- $MgSO_4$  en una concentración de 5 mM,
- $H_2PO_4^-$  en una concentración de 25 mM,
- iones potasio en una concentración de 40 mM,
- 15 - iones sodio en una concentración de 120 mM,
- ácido lactobiónico en una concentración de 100 mM.
- tacrolimus en una concentración de 5 microM,
- carvedilol en una concentración de 10 microM, y
- trimetazidina en una concentración de 1 microM,
- 20 y tiene un pH de 7.4 y una osmolaridad de 320 milimoles/kg.

Más preferiblemente esta solución de preservación además comprende dexametaxona a una concentración de 16 g/l, y penicilina a una concentración de 200.000 U/l.

25

Estas dos realizaciones preferidas de la solución de preservación de la invención no contienen algunos fármacos tales como el GSH, HES, insulina, alopurinol, y adenosina, los cuales están presentes en otras soluciones de preservación ya conocidas (tales como las soluciones de preservación UW  
30 y/o IGL-1) y se ha demostrado que tales fármacos no tienen efecto o incluso poseen efectos dañinos sobre el órgano preservado. Una sinergia particularmente relevante se ha observado para estas soluciones de preservación preferidas ya que ellas protegen tanto los hígados esteatósicos como los no esteatósicos en comparación con los resultados obtenidos para  
35 las otras soluciones de preservación.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, un aspecto adicional de la

presente invención está relacionado con la utilización de la solución acuosa tal y como se describe y se reivindica aquí para preservar tejidos u órganos. En una realización preferida, el órgano es un órgano abdominal tal como hígado, riñón y páncreas. Preferiblemente, el órgano abdominal es un órgano marginal, y más preferiblemente, es un hígado esteatósico.

La solución de preservación de la presente invención se aplica a la preservación hipotérmica estática y es utilizada a temperatura entre 2 y 10 °C, preferiblemente entre 3 y 5 °C, y más preferiblemente a 4 °C.

Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de grupos particulares y preferidos indicados anteriormente.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Preparación de una solución de preservación acuosa

Se preparó una solución acuosa, cuya composición está expuesta en la Tabla 1, teniendo en cuenta el proceso que se detalla a continuación.

Tabla 1:

	Concentración (mM)
Ácido lactobiónico	100
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	25
MgSO <sub>4</sub>	5
Rafinosa	30
PEG 35000	0.03
Potasio	40

Sodio	120
Tacrolimus	$5 \cdot 10^{-3}$
Carvedilol	$10 \cdot 10^{-3}$
Trimetazidina	$1 \cdot 10^{-3}$

Paso 1:

- 5 A una solución que contenía 1 g of polientilenglicol (PEG 35.000) dializado, se añadió 4.11 mg de tacrolimus (TCR) y se agitó hasta obtener una primera solución.

Paso 2:

10

En un recipiente de un litro que contenía 800 ml de agua (destilada y desionizada) a temperatura ambiente, se añadió 35.83 g de ácido lactobiónico y se agitó hasta su disolución. Seguidamente, se añadieron 0.60 g de  $MgSO_4$ , 22.5 ml de NaOH 5N, 6 ml de KOH 5N, 3.4 g de  $KH_2PO_4$ , y

15 17.83 g de rafinosa para formar así una segunda solución. A continuación, a esta segunda solución se añadió 1ml de solución que contenía TMZ procedente de una solución stock (la solución stock: 2.66 mg de TMZ disueltos en 10 ml de agua) y 10 ml de CVD procedente de una solución stock (solución stock: 6.5 mg de carvedilol en 8 ml de ácido tartárico y 8 ml de

20 agua).

La solución preparada en el Paso 1 se mezcló con la solución preparada en el Paso 2, y posteriormente se ajustó el pH a  $7.4 \pm 0.1$  con NaOH 5N.

- 25 Finalmente, se enrasó con agua el recipiente hasta llegar a un volumen de 1 litro, y se filtró y esterilizó. Se obtuvo una solución con una osmolaridad de  $320 \pm 10$  mOsm/l. Antes de utilizarla, se añadió dexametaxona (16 g/l) y penicilina (200,000 U/l).

30 EJEMPLO 2

En este ejemplo, se comparó el efecto de la solución acuosa de la presente invención sobre el hígado con respecto al obtenido cuando se utilizaron las

soluciones de preservación UW e IGL-1.

5. Se evaluó la lesión y funcionalidad hepática determinando las transaminasas, la producción de bilis, el aclaramiento hepático (%BSP) y el contenido de ATP.

10 Para llevar a cabo el estudio, se utilizaron ratas Zucker homocigotas (obesas, Ob) y heterocigotas (delgadas, Ln) entre 16 y 18 semanas de edad, procedentes de Iffa-Credo (L'Abresle, France). Se utilizó un modelo de hígado perfundido aislado para evaluar la lesión y funcionalidad hepática, sin la influencia de otros órganos, de componentes plasmáticos y de efectos neuronales/hormonales. En este modelo experimental se preserva la arquitectura hepática, la microcirculación y la producción biliar. Este modelo experimental utilizado se ha considerado apropiado en la literatura para testar la eficacia de diferentes soluciones de preservación para trasplante. Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia inhalatoria de isofluorano. El estudio respetó las regulaciones de la Unión Europea sobre la realización de experimentos en animales (Directiva 86/609/CEE).

#### 20 Obtención del hígado y grupos experimentales

La cirugía se realizó siguiendo los pasos descritos en anteriores estudios (I. Ben Mosbah et al. "Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution", Liver Transpl 2006, vol. 12 (8), pp. 1215-23, and I. Ben Mosbah et al. "Addition of adenosine monophosphate-activated protein kinase activators to University of Wisconsin solution: a way of protecting rat steatotic livers", Liver Transpl., 2007, vol. 13(3), pp. 410-25). Tras la canulación del conducto biliar, se aisló la vena porta y se ligaron las ramas esplénica y pilórica. Todos los animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales, de una manera aleatoria tal y como se describe a continuación.

#### Soluciones de Preservación y grupos experimentales

35 La composición de las soluciones de preservación UW, IGL-1 y P1 se muestra en la Tabla 2, siendo P1 una solución de preservación según la presente invención.

Tabla 2:

Componentes	Propiedades	UW	IGL-1	P1
Na <sup>+</sup> (mmol)	Catión	30	100	120
K <sup>+</sup> (mmol)	Catión	100	30	40
Mg <sup>2+</sup> (mmol)	Catión	5	5	5
Sulfato (mmol)	Tampón	5	5	5
Fosfato (mmol)	Tampón	25	25	25
Ácido Lactobiónico (mmol)	Tampón	100	100	100
Rafinosa (mmol)	Azúcar	30	30	30
HES (g/l)	Coloide	50	-	-
PEG (g/l)	Coloide	-	1	1
Adenosina (mmol)	Fuente energética	5	5	-
Allopurinol (mmol)	Antioxidante	1	1	-
GSH (mmol)	Antioxidante	3	3	-
Trimetazidina (μmol)	Protector Mitochondrial	-	-	1
Carvedilol (μmol)	Antioxidante	-	-	10
Tacrolimus (μmol)	Anti-inflamatorio	-	-	5
Insulina (U/L)	Protector Mitochondrial	40	40	-
Dexametaxona (g/L)	Protector de Membrana	16	16	16
Penicilina (U/L)	Antibiótico	200.000	200.000	200.000

5 HES = hidroxietil-almidón; GSH = Glutación.

#### A) Estudio I: P1 vs. UW

- 10
- 1) UW: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución UW durante 24 h a 4 °C.
  - 2) UW+CVD: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución UW que contenía 10 μM de carvedilol durante

24 h a 4 °C.

- 3) UW+TMZ: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución UW que contenía 1µM de trimetazidina durante 24 h a 4 °C.
- 5 4) UW+TCR: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución UW que contenía 5 µM de tacrolimus durante 24 h a 4 °C.
- 10 5) UW+CVD+TMZ+TCR: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución UW que contenía 10 µM de carvedilol, 1µM de trimetazidina y 5 µM de tacrolimus durante 24 h a 4 °C.

Los resultados obtenidos en los grupos 1-5 se compararon con aquéllos obtenidos cuando los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron con la solución de preservación P1 durante 24 h a 4 °C.

15

B) Estudio II: P1 vs. IGL-1

- 1) IGL: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución IGL-1 durante 24 h a 4 °C.
- 20 2) IGL+CVD: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución IGL-1 que contenía 10 µM de carvedilol durante 24 h a 4 °C.
- 25 3) IGL+TMZ: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución IGL-1 que contenía 1µM de trimetazidina durante 24 h a 4 °C.
- 4) IGL+TCR: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución UW que contenía 5 µM de tacrolimus durante 24 h a 4 °C.
- 30 5) IGL+CVD+TMZ+TCR: Los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron en la solución IGL-1 que contenía 10 µM de carvedilol, 1µM de trimetazidina y 5 µM de tacrolimus durante 24 h a 4°C.

Los resultados obtenidos en los grupos 1-5 se compararon con aquellos obtenidos cuando los hígados procedentes de 16 ratas Zucker (8 Ln y 8 Ob) se preservaron con la solución de preservación P1 durante 24 h a 4°C.

35

### Procedimiento

Tras las 24h de la preservación fría del injerto, se determinaron los niveles de alanina aminotransferasa acumulada (ALT) tras una isquemia prolongada.

5 Además, tras las 24h de la preservación fría del injerto, los hígados se expusieron a 22 °C durante 30 min para mimetizar el período de isquemia caliente que sufre el injerto durante la implantación en el receptor.

Seguidamente, los hígados se conectaron a través de la vena porta al circuito de perfusión y se perfundieron durante 120 min. a 37 °C. Durante los  
10 primeros 15 min de perfusión, se aumentó progresivamente el flujo hasta que se estabilizó la presión portal a 12 mm Hg (Pression Monitor BP-1, Instruments, Inc, Sarasota, FL, USA). El flujo se controló mediante una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, France). El líquido de perfusión consistió en un medio de cultivo celular (William's medium E, Bio Whitaker,  
15 Spain) con la solución Krebs-Heinseleit–albúmina. El líquido de perfusión se oxigenó con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, y la temperatura del líquido de perfusión se mantuvo a 37°C. Al final de la reperfusión normotérmica (120 min) se recogieron alícuotas del líquido de perfusión para evaluar la ALT. Se evaluaron además la producción biliar y el aclaramiento hepático (%BSP) en  
20 muestras biliares así como el contenido de ATP en muestras de hígado.

### Determinaciones Bioquímicas

-Ensayo de transaminasas. Como parámetro de lesión hepática, se evaluaron  
25 las transaminasas atendiendo a las instrucciones proporcionadas por los Kits comerciales procedentes de Boehringer Mannheim (Munich, Germany).

- Producción de Bilis. La producción de bilis se valoró como parámetro de funcionalidad hepática. La bilis se recogió a través del conducto biliar y la  
30 producción de bilis se estimó midiendo el volumen de bilis obtenido después de 120 min de perfusión, y se expresó como µl/g hígado.

- Aclaramiento hepático de BSP. Al igual que la producción de bilis, el aclaramiento hepático de BSP es considerado otro parámetro fiable de  
35 funcionalidad hepática. Treinta minutos después del inicio de la perfusión, se añadieron 10 mg de BSP en el líquido de perfusión. La concentración de BSP en las muestras biliares se determinó midiendo la absorbancia a 580 nm. El

aclaramiento hepático de BSP se expresó como % BSP.

5 - ATP. Las muestras hepáticas se homogeneizaron en una solución conteniendo ácido perclórico y la determinación de ATP se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución.

### Estudio Estadístico

10 Los datos se expresaron como valor de la media  $\pm$  error estándar de la media. Los datos obtenidos se sometieron a estudio estadístico mediante un test de análisis de varianza, y se determinó el nivel de significación estadística mediante el test Student-Newman-Keuls. En todos los casos, los resultados se consideraron significativamente diferentes cuando  $p < 0.05$ .

15 Para predecir el daño hepático después del período de preservación del injerto se valoraron los niveles de ALT. Esta determinación es una herramienta valiosa para predecir el daño del órgano tras preservación fría. Al final de la isquemia fría, se observaron niveles de transaminasas más elevados en los hígados esteatósicos que en los no esteatósicos preservados  
20 tanto en la solución UW como IGL. Esto confirma la poca tolerancia que presentan los hígados esteatósicos a los efectos dañinos ocasionados durante la isquemia fría. Los valores de ALT (U/l) al final de la isquemia fría cuando los injertos se preservaron en la solución UW fueron  $32.87 \pm 2.91$  y  $152.23 \pm 2.21$  para hígados no esteatósicos y esteatósicos, respectivamente.  
25 Los valores de ALT (U/l) al final de la isquemia fría cuando los injertos se preservaron en solución IGL fueron  $21.44 \pm 0.62$  y  $87.47 \pm 3.20$  para hígados no esteatósicos y esteatósicos, respectivamente.

30 Al final de la reperfusión, se observaron niveles de transaminasas más elevados en los hígados esteatósicos que en los no esteatósicos. Los valores de ALT (U/l) al final de la reperfusión cuando los injertos fueron preservados en solución de preservación UW fueron  $45.05 \pm 3.53$  y  $159.11 \pm 3.01$  para hígados no esteatósicos y esteatósicos, respectivamente. Los valores de ALT (U/l) al final de la reperfusión cuando los injertos fueron preservados en  
35 solución de preservación IGL fueron  $35.62 \pm 2.32$  y  $121.41 \pm 1.23$  para hígados no esteatósicos y esteatósicos, respectivamente.

La funcionalidad hepática se valoró midiendo la producción de bilis y el aclaramiento hepático (%BSP). La producción de bilis y el %BSP fue menor en hígados esteatósicos que en los no esteatósicos preservados tanto en la solución UW como IGL. Los valores de la producción biliar ( $\mu\text{l/g}/120$  min) al final de la reperfusión cuando los hígados se preservaron en UW fueron de  $9.55 \pm 0.25$  y  $1.46 \pm 0.18$  para hígados no esteatósicos e hígados esteatósicos, respectivamente. Los valores de la producción biliar ( $\mu\text{l/g}/120$  min.) al final de la reperfusión cuando los hígados se preservaron en IGL fueron de  $14.25 \pm 0.63$  y  $3.44 \pm 0.38$  para hígados no esteatósicos e hígados esteatósicos, respectivamente. Los valores de % BSP en bilis al final de la reperfusión cuando los hígados se preservaron en UW fueron  $6.13 \pm 1.13$  y  $4.70 \pm 0.65$  para hígados no esteatósicos e hígados esteatósicos, respectivamente. Los valores de % BSP en bilis al final de la reperfusión cuando los hígados se preservaron en IGL fueron  $8.04 \pm 0.61$  y  $7.34 \pm 0.58$  para hígados no esteatósicos e hígados esteatósicos, respectivamente.

Al final de la reperfusión, los niveles de ATP fueron menores en hígados esteatósicos que en los no esteatósicos preservados tanto en la solución UW como IGL-1. Los valores de ATP ( $\mu\text{M/g}$ ) al final de la reperfusión cuando los hígados se preservaron en UW fueron  $0.90 \pm 0.02$  y  $0.61 \pm 0.03$  para hígados no esteatósicos e hígados esteatósicos, respectivamente. Los valores de ATP ( $\mu\text{M/g}$ ) al final de la reperfusión cuando los hígados se preservaron en IGL fueron  $1.19 \pm 0.09$  y  $0.77 \pm 0.06$  para hígados no esteatósicos e hígados esteatósicos, respectivamente.

Las Tablas 3-6 que se exponen a continuación muestran el efecto de la adición de tacrolimus (TCR), carvedilol (CVD), y trimetazidina (TMZ) a las soluciones de preservación ya conocidas, y aquél obtenido por la solución de preservación del Ejemplo 1 (P1) cuando los hígados esteatósicos y no esteatósicos se sometieron a un período de isquemia prolongado. Los valores se expresan como porcentaje de protección frente a las soluciones de preservación UW o IGL-1 de los parámetros de lesión y funcionalidad hepática: ALT al final de los 24h de isquemia (0 min), ALT al final de los 120 min. de reperfusión (120 min.), producción biliar, % BSP, y contenido de ATP al final de la reperfusión (120 min.).

**Tabla 3:** Hígados no esteatósicos (procedentes de ratas Zucker Ln) en solución de preservación UW

5

	UW+ CVD	UW+ TMZ	UW+ TCR	[UW+CVD]+ [UW+TMZ]+ [UW+TCR]	UW+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
ALT (0 min.)	7.51	10.10	17.16	<b>34.77</b>	<b>74.90</b>	<b>82.10</b>
ALT (120 min.)	11.66	17.44	20.59	<b>49.69</b>	<b>76.68</b>	<b>85.05</b>
Bilis	8.24	12.0	14.0	<b>34.24</b>	<b>58.87</b>	<b>63.37</b>
%BSP	9.38	10.69	13.76	<b>33.83</b>	<b>50.80</b>	<b>63.76</b>
ATP	8.65	5.28	16.66	<b>30.59</b>	<b>54.8</b>	<b>66.37</b>

10 **Tabla 4:** Hígados esteatósicos (procedentes de ratas Zucker Ob) en solución de preservación UW

	UW+ CVD	UW+ TMZ	UW+ TCR	[UW+CVD]+ [UW+TMZ]+ [UW+TCR]	UW+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
ALT (0 min.)	14.44	18.54	25.77	<b>58.75</b>	<b>81.06</b>	<b>85.20</b>
ALT (120 min.)	11.0	10.12	19.55	<b>40.67</b>	<b>71.33</b>	<b>78.53</b>
Bilis	8.50	11.40	17.60	<b>37.50</b>	<b>81.40</b>	<b>91.50</b>
%BSP	11.45	10.70	13.30	<b>35.45</b>	<b>56.0</b>	<b>67.50</b>
ATP	7.26	6.53	16.22	<b>30.01</b>	<b>55.20</b>	<b>75.0</b>

**Tabla 5:** Hígados no esteatósicos (procedentes de ratas Zucker Ln) en solución de preservación IGL-1

	IGL+ CVD	IGL+ TMZ	IGL+ TCR	[IGL+CVD]+ [IGL+TMZ]+ [IGL+TCR]	IGL+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
ALT (0 min.)	9.42	7.98	19.17	<b>36.57</b>	<b>63.71</b>	<b>72.57</b>
ALT (120 min.)	15.97	17.41	18.59	<b>51.97</b>	<b>70.52</b>	<b>81.11</b>
Bilis	9.26	4.50	14.52	<b>28.28</b>	<b>43.70</b>	<b>49.0</b>
%BSP	8.74	8.37	10.15	<b>27.26</b>	<b>41.40</b>	<b>49.0</b>
ATP	8.17	8.41	16.56	<b>33.14</b>	<b>48.63</b>	<b>59.60</b>

5

**Tabla 6:** Hígados esteatósicos (procedentes de ratas Zucker Ob) en solución de preservación IGL-1

	IGL+ CVD	IGL+ TMZ	IGL+ TCR	[IGL+CVD]+ [IGL+TMZ]+ [IGL+TCR]	IGL+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
ALT (0 min.)	9.89	13.94	19.24	<b>43.07</b>	<b>61.75</b>	<b>74.27</b>
ALT (120 min.)	14.62	10.75	19.47	<b>44.84</b>	<b>63.76</b>	<b>72.69</b>
Bilis	9.30	6.0	15.0	<b>30.30</b>	<b>59.0</b>	<b>72.10</b>
%BSP	9.73	8.22	9.98	<b>27.93</b>	<b>49.28</b>	<b>62.58</b>
ATP	7.99	2.63	18.15	<b>28.77</b>	<b>57.0</b>	<b>65.37</b>

10

Atendiendo a los parámetros de lesión y funcionalidad hepática, nuestros resultados indican que la combinación de tacrolimus, carvedilol y

trimetazidina como aditivo a las soluciones de preservación, UW o IGL-1, (UW+TCR+CVD+TMZ o IGL-1+TCR+CVD+TMZ) resultó en un grado de protección mayor tanto en hígados esteatósicos como en no esteatósicos, comparado con los resultados obtenidos cuando el tacrolimus, carvedilol y trimetazidina fueron añadidos por separado a la solución de preservación UW (por ejemplo, [UW+TCR]+[UW+CVD]+[UW+TMZ]) o IGL-1 (por ejemplo [IGL+TCR]+[ IGL+CVD]+[ IGL+TMZ]). Además, la solución de preservación P1 ofreció una protección mayor en ambos tipos de hígados (esteatósicos como no esteatósicos) comparado con los resultados obtenidos en UW+TCR+CVD+TMZ y IGL-1+TCR+CVD+TMZ.

En resumen, teniendo en cuenta los resultados mostrados en las Tablas 3-6, se observa un efecto sinérgico en las soluciones de la presente invención, el cual es especialmente evidente en el caso de la solución de preservación P1. Este efecto sinérgico es especialmente mejorado en hígados esteatósicos.

## REIVINDICACIONES

1. Solución acuosa para la preservación de tejidos y órganos que comprende una cantidad efectiva de carvedilol, una cantidad efectiva de tacrolimus y una cantidad efectiva de trimetazidina.
2. Solución según la reivindicación 1, que tiene una concentración de carvedilol comprendida entre 5 y 10 microM, una concentración de tacrolimus comprendida entre 5 y 10 microM, y una concentración de trimetazidina comprendida entre 0.01 microM y 10 microM.
3. Solución según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que tiene un pH de 6.5 a 8 y una osmolaridad de 290 a 320 milimoles/kg y que además comprende:
- polientilenglicol teniendo un peso molecular superior a 15.000 en una concentración de 0.01 a 5 mM,
  - rafinosa en una concentración de 20 a 40 mM,
  - $MgSO_4$  en una concentración de 1 a 10 mM,
  - $H_2PO_4^-$  en una concentración de 10 a 40 mM,
  - iones potasio en una concentración de 30 a 50 mM,
  - iones sodio en una concentración de 110 a 160 mM, y
  - ácido lactobiónico en una concentración de 70 a 140 mM.
4. Solución según la reivindicación 3, donde el pH es 7.4, la osmolaridad es 320 milimoles/kg, la concentración de polientilenglicol es 0.03 mM, la concentración de rafinosa es 30 mM, la concentración de  $MgSO_4$  es 5 mM, la concentración de  $H_2PO_4^-$  es 25 mM, la concentración de iones potasio es 40 mM, la concentración de iones sodio es 120 mM, la concentración de ácido lactobiónico es 100 mM, la concentración de tacrolimus es 5 microM, la concentración de carvedilol es 10 microM, y la concentración de trimetazidina es 1 microM.
5. Solución según la reivindicación 4, que consiste en:
- polientilenglicol que tiene un peso molecular aproximado de 35000 en una concentración de 0.03 mM,
  - rafinosa en una concentración de 30 mM,
  - $MgSO_4$  en una concentración de 5 mM,

- $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  en una concentración de 25 mM,
- iones potasio en una concentración de 40 mM,
- iones sodio en una concentración de 120 mM,
- ácido lactobiónico en una concentración de 100 mM,
- 5 - tacrolimus en una concentración de 5 microM,
- carvedilol en una concentración de 10 microM, y
- trimetazidina en una concentración de 1 microM.

10 6. Solución según la reivindicación 5, que además consiste en dexametaxona en una concentración de 16 g/l, y penicilina en una concentración de 200.000 U/l.

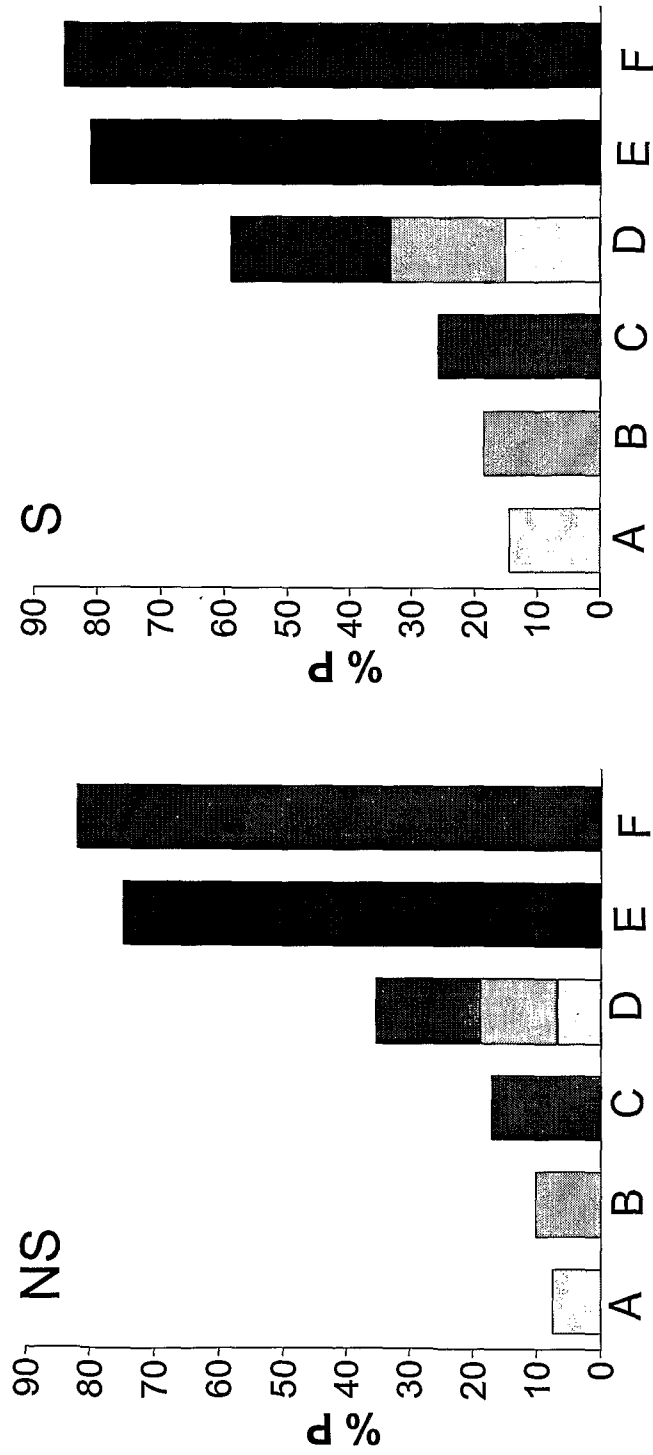
15 7. Uso de la solución como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preservación de un tejido o un órgano.

8. Uso según la reivindicación 7, donde el órgano es un órgano abdominal.

20 9. Uso según la reivindicación 8, donde el órgano abdominal es un órgano marginal.

25 10. Método para la preservación de tejidos y órganos que comprende mantener dichos tejidos u órganos en la solución de preservación acuosa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 a una temperatura comprendida entre 2-10 °C.

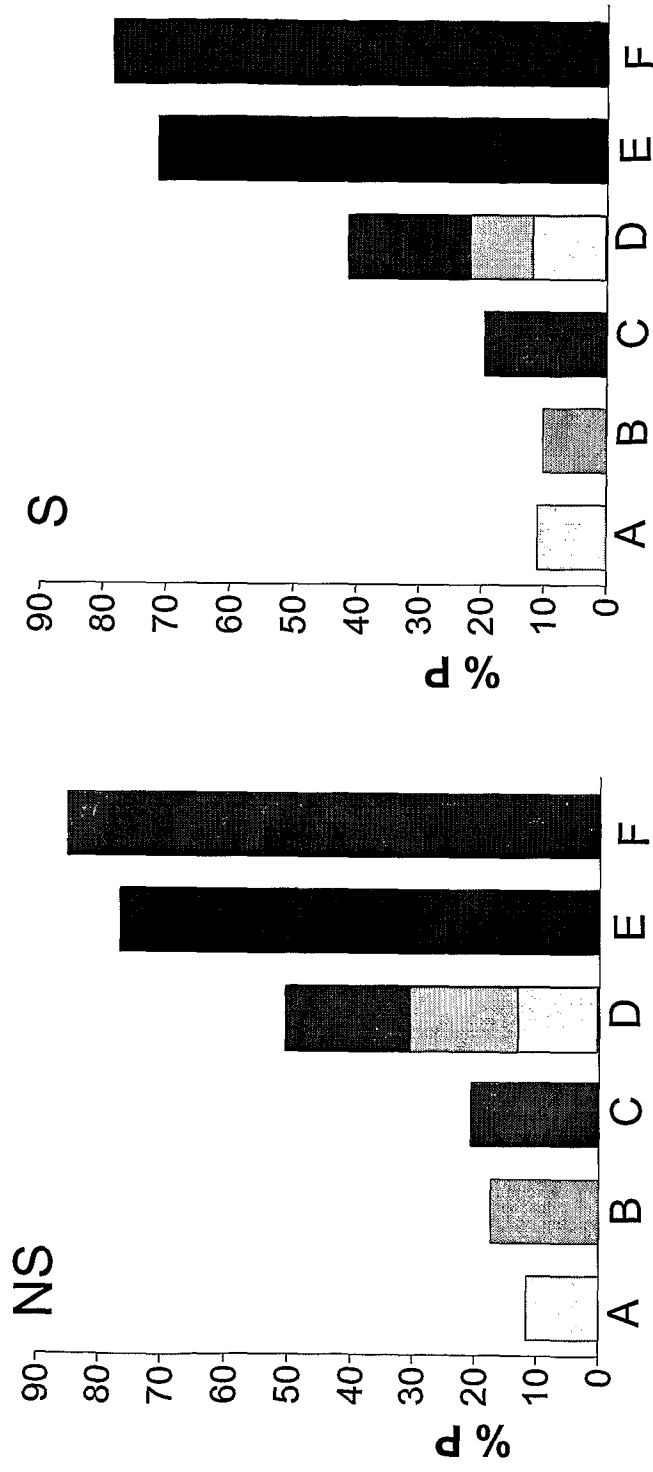
# ALT(0 min)



- A: UW+CVD
- B: UW+TMZ
- C: UW+TCR
- D: [UW+CVD]+[UW+TMZ]+ [UW+TCR]
- E: UW+CVD+TMZ+TCR
- F: P1

Fig.1

# ALT(120 min)



- A: UW+CVD
- B: UW+TMZ
- C: UW+TCR
- D: [UW+CVD]+[UW+TMZ]+ [UW+TCR]
- E: UW+CVD+TMZ+TCR
- F: P1

Fig. 2

# BILIS

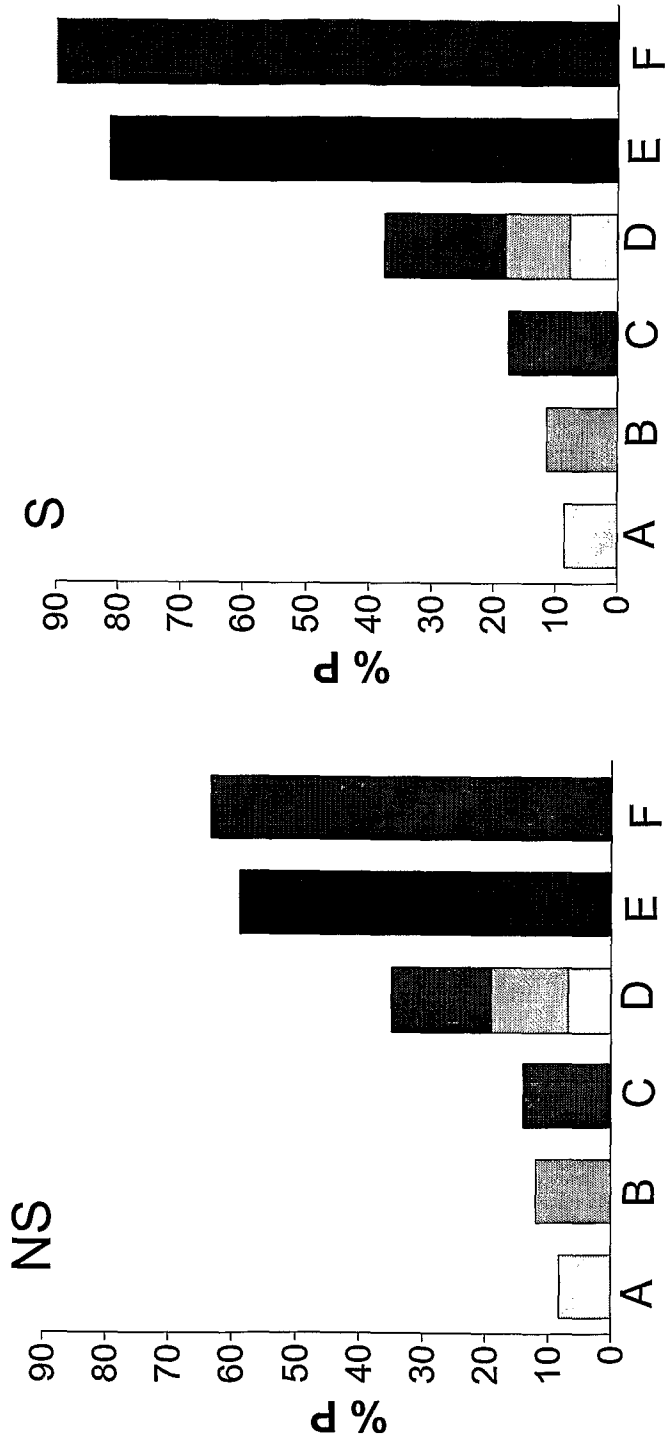


Fig. 3

- A: UW+CVD
- B: UW+TMZ
- C: UW+TCR
- D: [UW+CVD]+[UW+TMZ]+ [UW+TCR]
- E: UW+CVD+TMZ+TCR
- F: P1

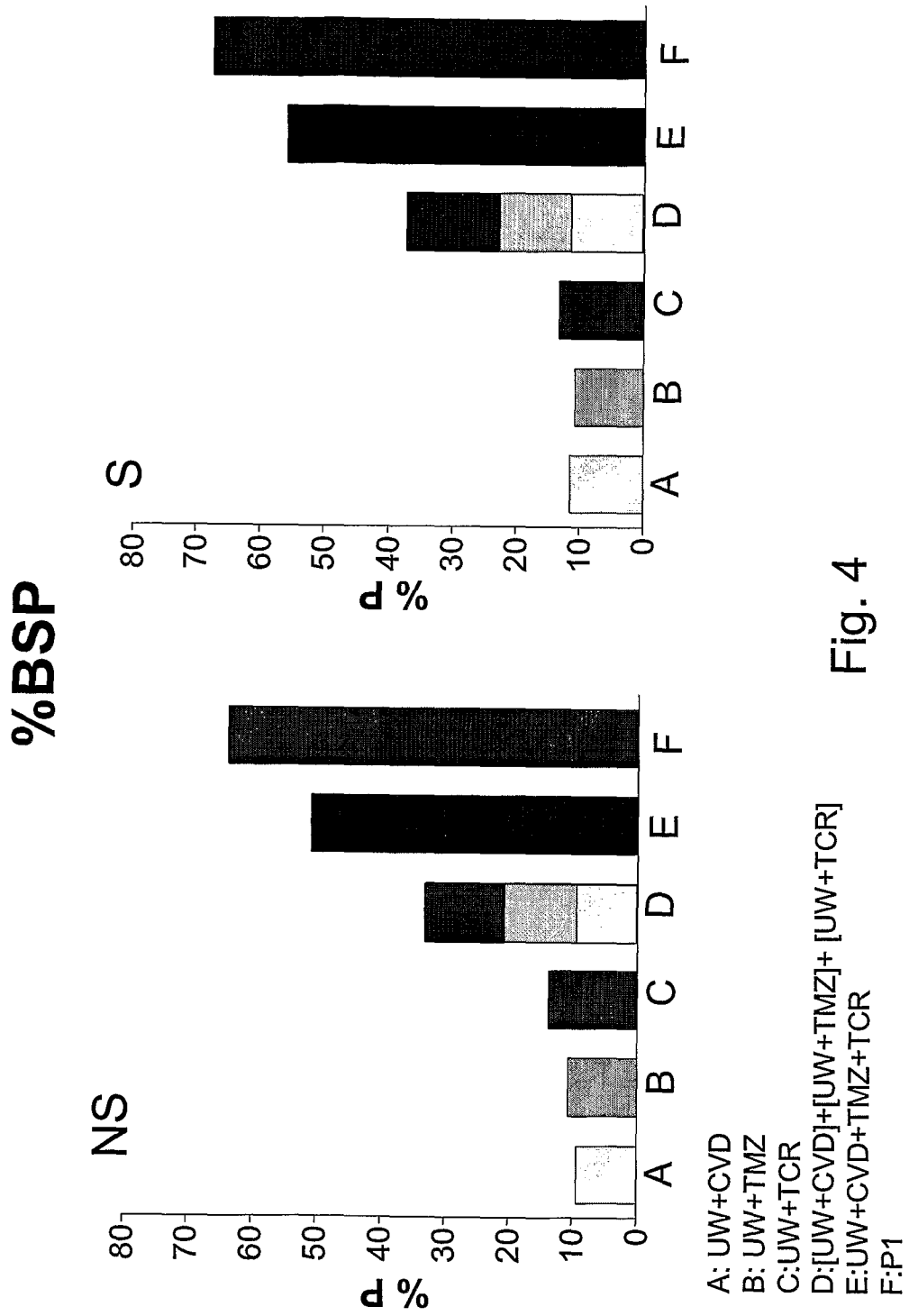


Fig. 4

# ATP

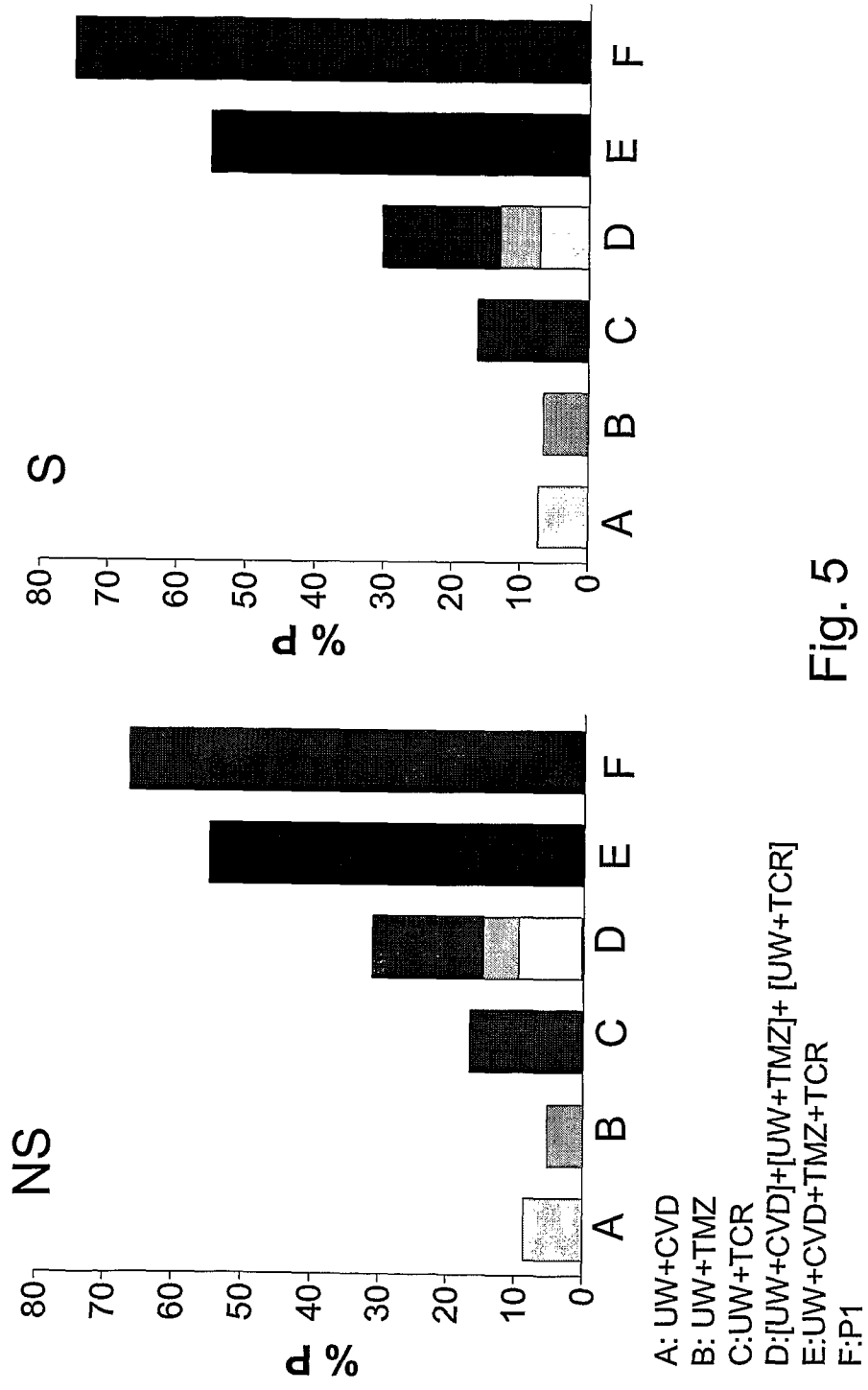


Fig. 5

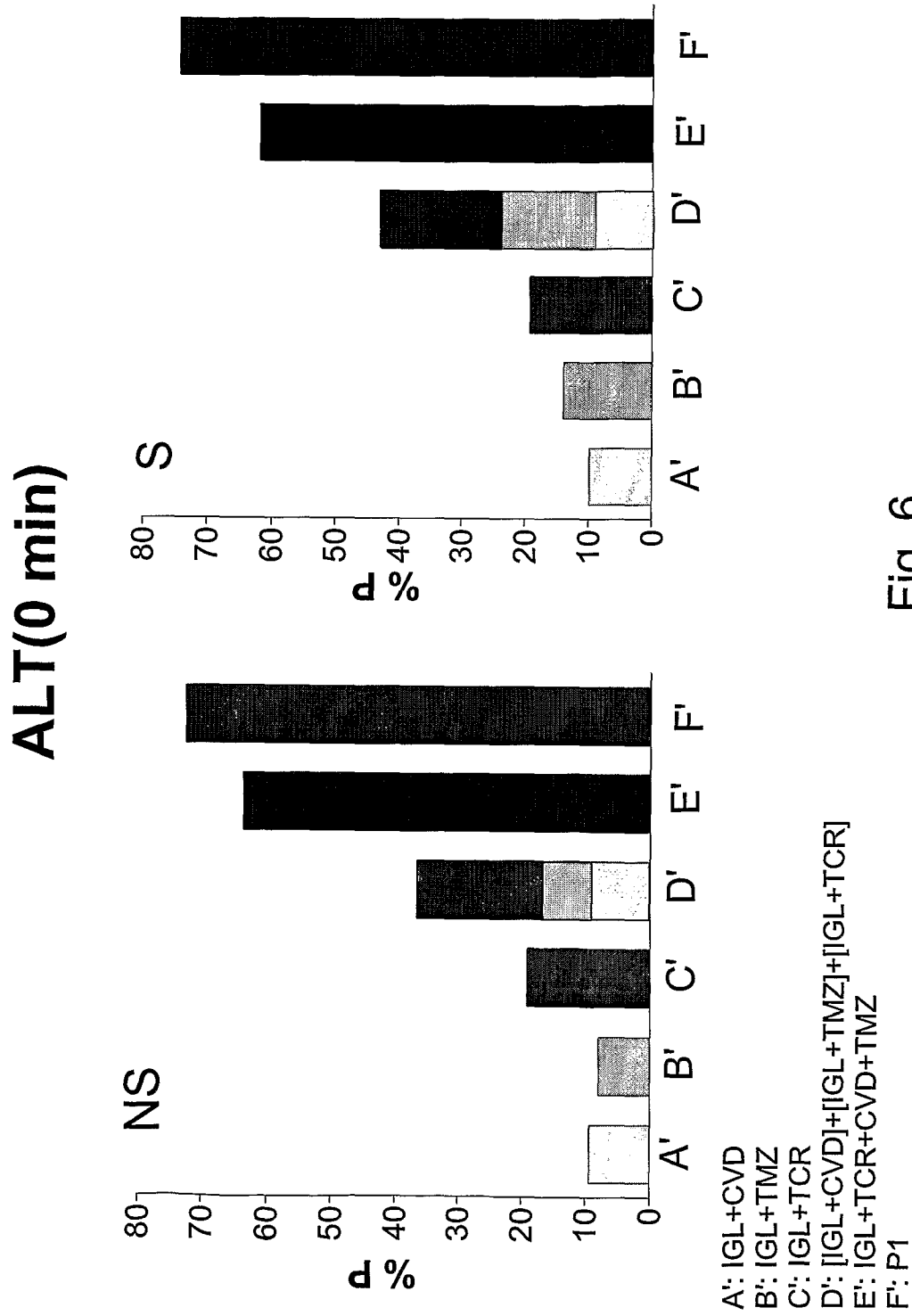
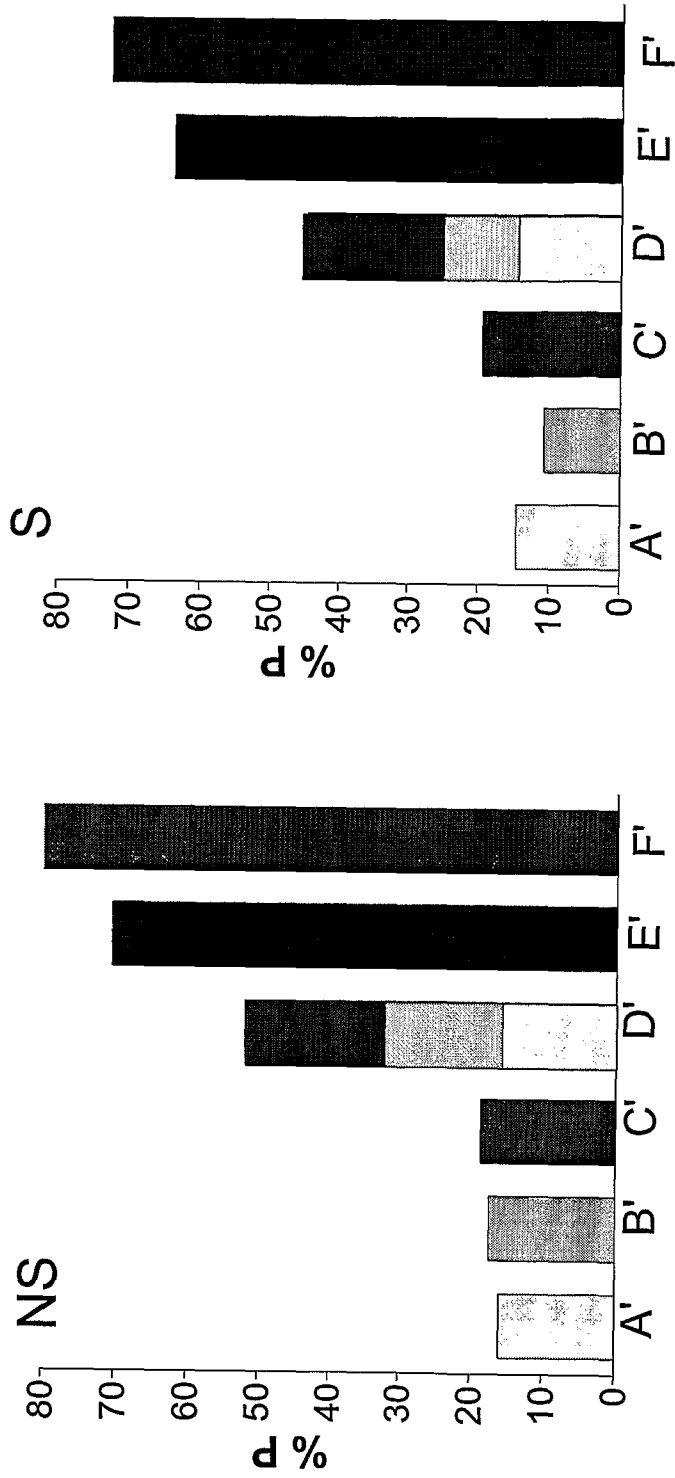


Fig. 6

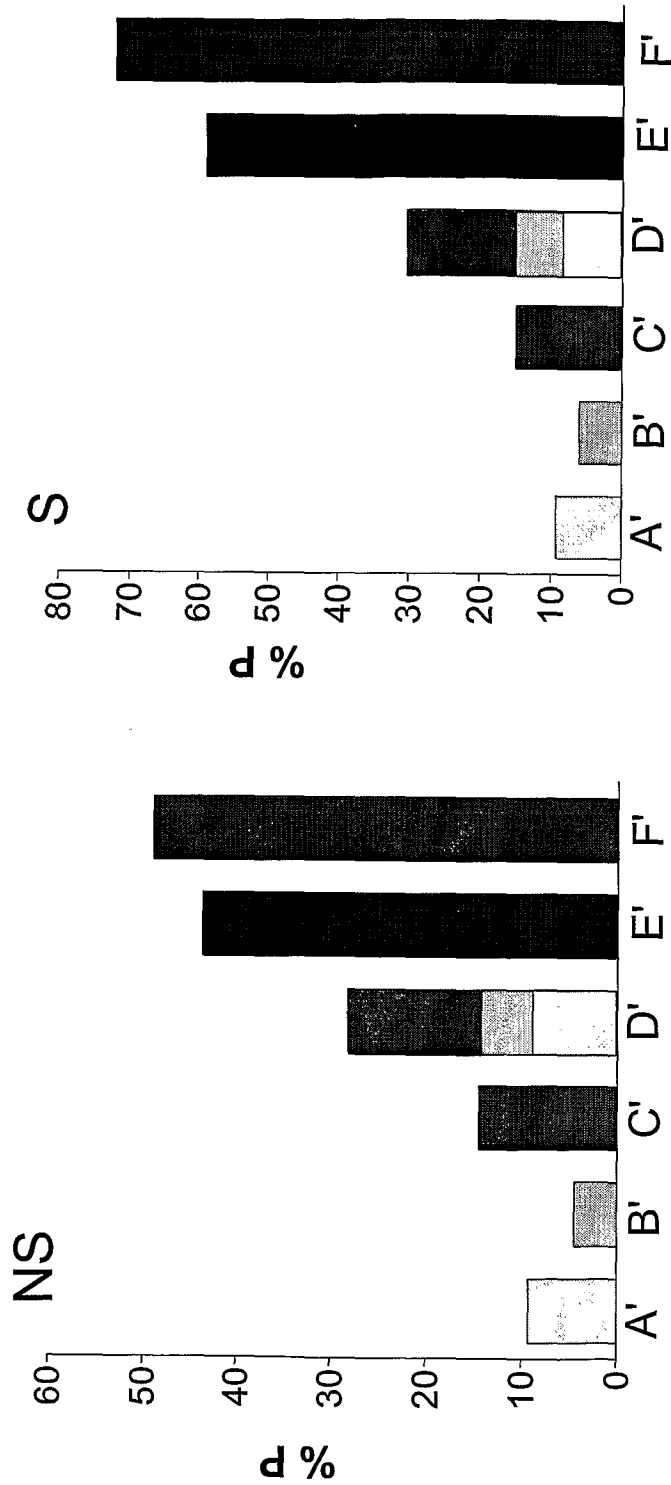
# ALT(120 min)



- A': IGL+CVD
- B': IGL+TMZ
- C': IGL+TCR
- D': [IGL+CVD]+[IGL+TMZ]+[IGL+TCR]
- E': IGL+TCR+CVD+TMZ
- F': P1

Fig. 7

# BILIS



- A': IGL+CVD
- B': IGL+TMZ
- C': IGL+TCR
- D': [IGL+CVD]+[IGL+TMZ]+[IGL+TCR]
- E': IGL+TCR+CVD+TMZ
- F': P1

Fig. 8

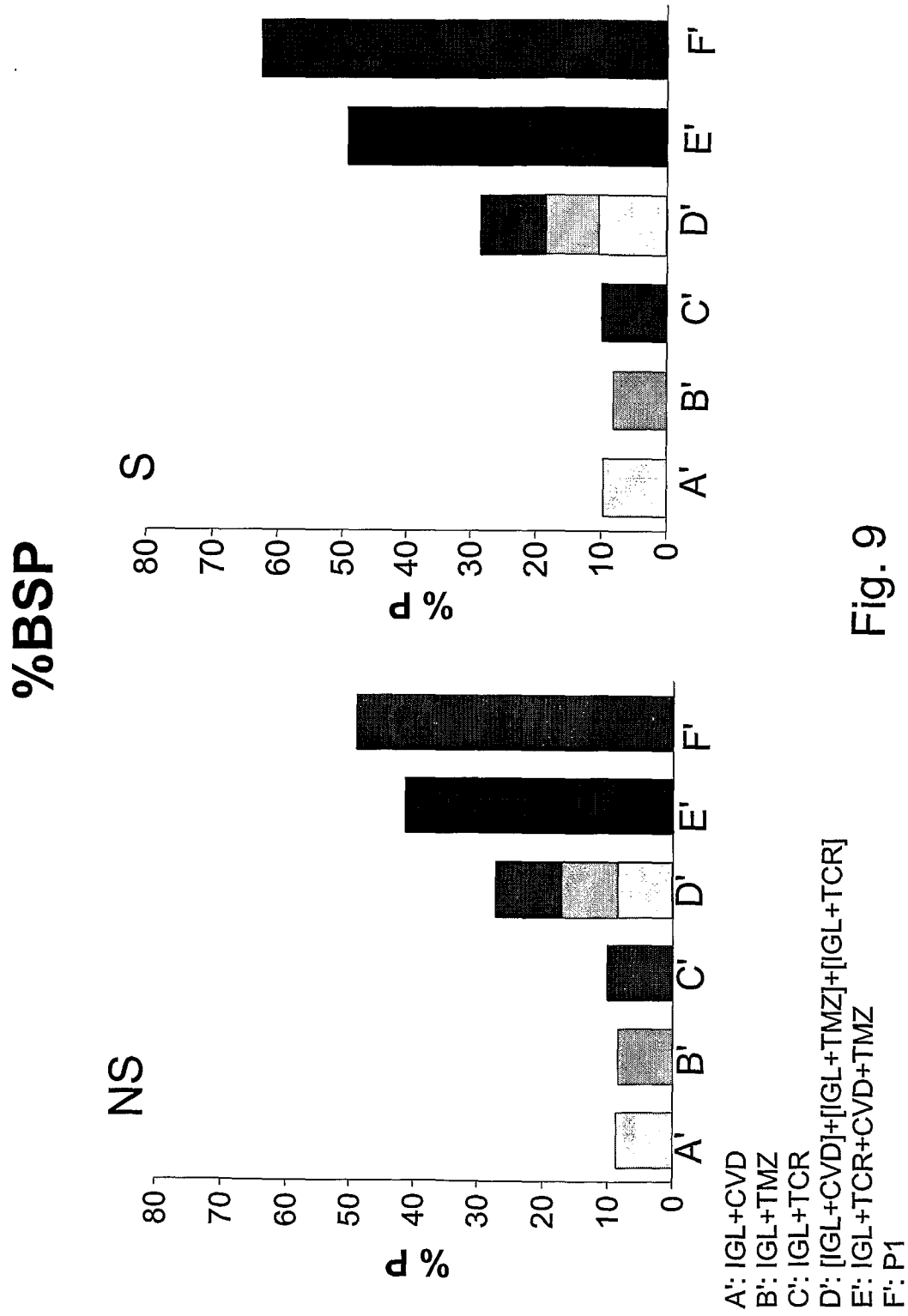
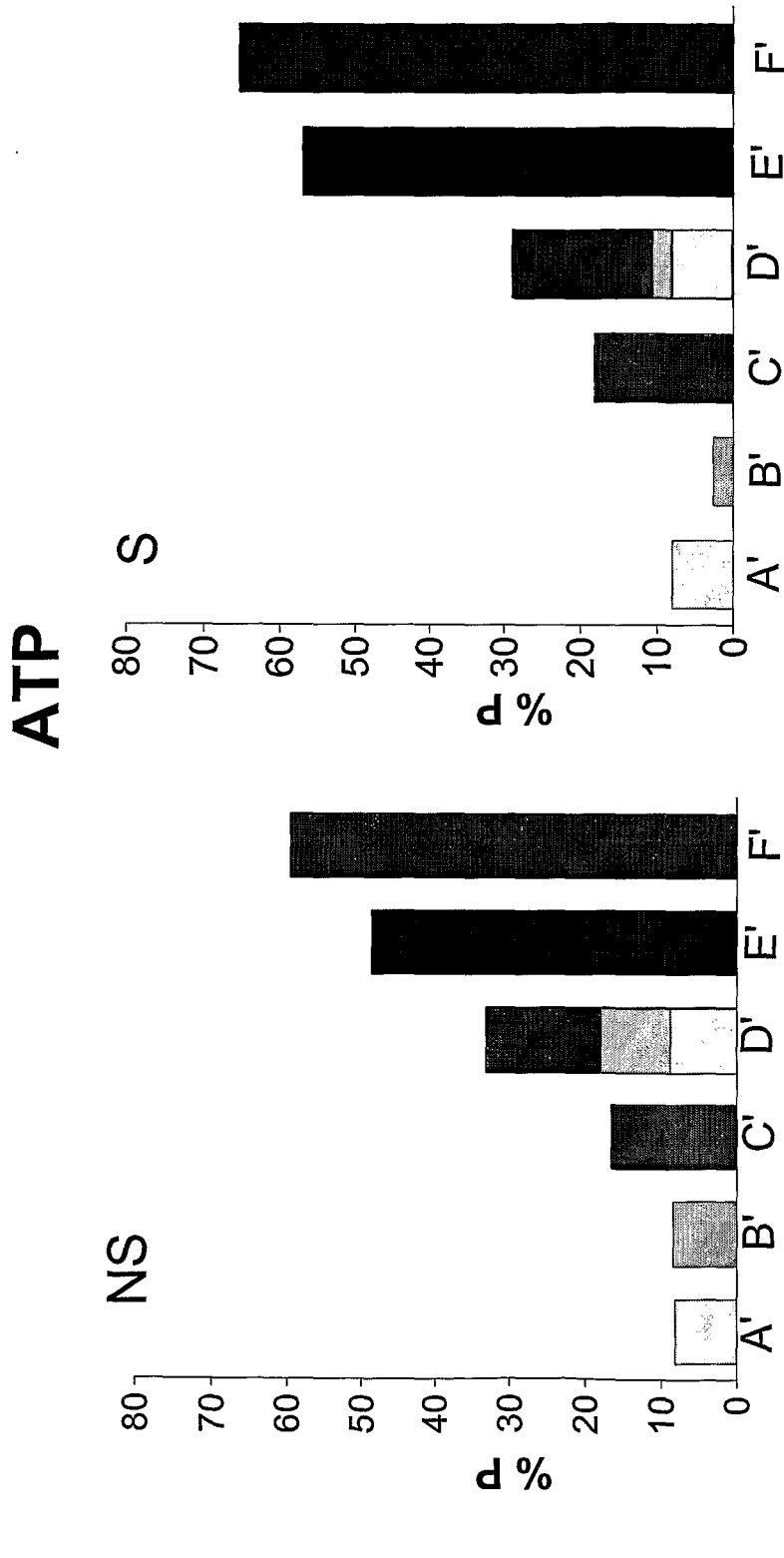


Fig. 9



A': IGL+CVD  
B': IGL+TMZ  
C': IGL+TCR  
D': [IGL+CVD]+[IGL+TMZ]+[IGL+TCR]  
E': IGL+TCR+CVD+TMZ  
F': P1

Fig. 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2009/000267

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>A01N 1/02</b> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>A01N</b>	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>INVENES, EPODOC, WPI, XPAIP, XPESP, XPOAC, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, PUBCHEM, GOOGLE SCHOLAR</b>	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
<b>Category*</b>	<b>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</b>
A	PAPEZIKOVA, I. ET AL. "Carvedilol Addition to University of Wisconsin Solution Reduces Preservation Injury of Steatotic Livers" SFRBM's 14th Annual Meeting: Program and Abstracts. Free Radical Biology and Medicine. 01-01-2007 Volumen 43, Suplemento 1, Pages S44-S49
A	LAURENS, M. ET AL. Warm Ischemia-Reperfusion Injury is Decreased by Tacrolimus in Steatotic Rat Liver. Lisee Transplantation. 2006 Volumen 12, Pages 217-225.
A	BEN MOSBAH, I. ET AL. Trimetazidine: Is It a Promising Drug for Use in Steatotic Grafts? World J. Gastroenterol. 14-02-2006, Volumen 12, No. 6, Pages 908-914. ISSN 1007-9327.
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search <b>30 October 2009 (30.10.2009)</b>	Date of mailing of the international search report <b>(06/11/2009)</b>
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer <b>N. Urquía Fernández</b> Telephone No. +34 91 349 30 45

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000267

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YUE, T. ET AL. Carvedilol Inhibits Activation of Stress-Activated Protein Kinase and Reduces Reperfusion Injury in Perfused Rabbit Heart. European Journal of Pharmacology. 1998. Volumen 345, Pages 61-65.	1-10
A	ZOPPO, A. ET AL. Trimetazidine counteracts Tacrolimus Nephrotoxicity in a Hypertensive Lisee Transplant Patient. Transplantation. 27.10.1999. Volume 68, No. 8, Page 1211.	1-10
A	SINGH D. ET AL. Carvedilol and Trimetazidine attenuates Ferric Nitriloacetate-induced Oxidative Renal Injury in Rats. Toxicology. 2003. Volume 191 Pages 143-151.	1-10

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2009/000267

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01N 1/02** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPAIP, XPESP, XPOAC, BIOSIS, COMPCDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, PUBCHEM, GOOGLE SCHOLAR

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	PAPEZIKOVA, I. ET AL. "Carvedilol Addition to University of Wisconsin Solution Reduces Preservation Injury of Steatotic Livers" SFRBM's 14th Annual Meeting: Program and Abstracts. Free Radical Biology and Medicine. 01-01-2007 Volumen 43, Suplemento 1, Páginas S44-S49	1-10
A	LAURENS, M. ET AL. Warm Ischemia-Reperfusion Injury is Decreased by Tacrolimus in Steatotic Rat Liver. Liver Transplantation. 2006 Volumen 12, Páginas 217-225.	1-10
A	BEN MOSBAH, I. ET AL. Trimetazidine: Is It a Promising Drug for Use in Steatotic Grafts? World J. Gastroenterol. 14-02-2006, Volumen 12, No. 6, Páginas 908-914. ISSN 1007-9327.	1-10

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

30 Octubre 2009 (30.10.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

**06-NOVIEMBRE-2009 (06/11/2009)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

N. Urquía Fernández

N° de teléfono +34 91 349 30 45

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000267

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	YUE, T. ET AL. Carvedilol Inhibits Activation of Stress-Activated Protein Kinase and Reduces Reperfusion Injury in Perfused Rabbit Heart. European Journal of Pharmacology. 1998. Volumen 345, Páginas 61-65.	1-10
A	ZOPPO, A. ET AL. Trimetazidine counteracts Tacrolimus Nephrotoxicity in a Hypertensive Liver Transplant Patient. Transplantation. 27.10.1999. Volumen 68, No. 8, Página 1211.	1-10
A	SINGH D. ET AL. Carvedilol and Trimetazidine attenuates Ferric Nitritoacetate-induced Oxidative Renal Injury in Rats. Toxicology. 2003. Volumen 191 Páginas 143-151.	1-10