

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 559**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

A61K 31/453 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2009 E 09749954 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **23.03.2011 EP 2298071**

54 Título: **Solución acuosa para la preservación de tejidos y órganos**

30 Prioridad:

19.05.2008 ES 200801560

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

01.02.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA (33.3%)
Centro de Patentes de la UB Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona , ES;
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (33.3%) y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**PERALTA UROZ, CARMEN;
ROSELLÓ-CATAFAU, JOAN;
BEN MOSBAH, ISMAIL y
BARTRONS BACH, RAMÓN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 559 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 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 órganos marginales, así como con un método para preservar tejidos y órganos.

5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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 reperfusión continúa siendo un problema sin resolver en la práctica clínica.

10 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 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.

15 La preservación hipotérmica estática es un método efectivo para la 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 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 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 mayor parte 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 prolongar la tolerancia del órgano a la isquemia.

20 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 de la 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, incluyendo el coloide hidroxietil almidón, para prevenir el edema celular, la adenosina como fuente de ATP durante la reperfusión, el alopurinol y el glutatión 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, 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).

25 El tacrolimus (TCR) es un compuesto macrólido con efectiva actividad inmunosupresora, anti-microbiana y otras actividades farmacológicas, siendo de un valor para la prevención del rechazo en el trasplante de órganos y tejidos, así como para desórdenes de origen autoinmune 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 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.

30 El carvedilol (CVD) es un agente bloqueador β -adrenérgico no selectivo y lipofílico, con efectos vasodilatadores ejercidos principalmente a través del bloqueo selectivo del receptor α_1 , y con una potente actividad antioxidante. La capacidad del carvedilol de inhibir la lipoperoxidación es mucho mayor que aquella obtenida con otros bloqueadores β -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 reperfusión 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 (IR) 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.

BREVE DESCRIPCIÓN 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

5 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.).

10 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.).

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.

15 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.).

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.).

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.).

20 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.).

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.

25 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

30 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.

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.

35 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.

40 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 concentración de 20 a 40 mM, MgSO₄ en una concentración de 1 a 10 mM, H⁺PO₄ 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.

5 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 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.

10 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-reperusión asociada al trasplante hepático. Este hecho permite mejorar la funcionalidad post-trasplante del injerto esteatósico y permite aumentar la disponibilidad de órganos aptos para el trasplante.

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

- polietilenglicol con un peso molecular aproximado de 35000 en una concentración de 0.03 mM,
 - 15 - 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,
 - iones sodio en una concentración de 120 mM,
 - 20 - 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,
- y tiene un pH de 7.4 y una osmolaridad de 320 milimoles/kg.

25 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.

30 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 incluidos en otras soluciones de preservación ya conocidas (tales como las soluciones de preservación UW 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 las otras soluciones de preservación.

35 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.

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

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Preparación de una solución de preservación acuosa

5 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 ² PO ⁴⁻	25
MgSO ₄	5
Rafinosa	30
PEG 35000	0,03
iones potasio	40
iones sodio	120
Tacrolimus	5.10 ⁻³
Carvedilol	10.10 ⁻³
Trimetazidina	1.10 ⁻³

Paso 1:

10 A una solución que contenía 1 g of polientilenglicol (PEG 35000) dializado, se añadió 4,11 mg de tacrolimus (TCR) y se agitó hasta obtener una primera solución.

Paso 2:

15 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 MgSO₄, 22,5 ml de NaOH 5N, 6 ml de KOH 5N, 3,4 g de KH₂PO₄, y 17,83 g de rafinosa para formar así una segunda solución. A continuación, a esta segunda solución se añadió 1 ml 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 carvedilol procedente de una solución stock (solución stock: 6,5 mg de carvedilol en 8 ml de ácido tartárico y 8 ml de 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 ± 0.1 con NaOH 5N.

20 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 ± 10 mOsm/l. Antes de utilizarla, se añadió dexametaxona (16 g/l) y penicilina (200,000 U/l).

EJEMPLO 2

25 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.

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

30 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 (LAbresle, 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 isoflurano. El estudio respetó las regulaciones de la Unión Europea sobre la realización de experimentos en animales (Directiva 86/609/CEE).

Obtención del hígado v grupos experimentales

- 5 La técnica quirúrgica se realizó como se describió 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.
- 10

Soluciones de Preservación y grupos experimentales

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 ⁺ (mmol)	Catión	30	100	120
K ⁺ (mmol)	Catión	100	30	40
Mg ⁺² (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 de energía	5	5	-
Alopurinol (mmol)	Antioxidante	1	1	-
GSH (mmol)	Antioxidante	3	3	-
Trimetazidina	Protector mitocondrial	-	-	1
Carvedilol (µmol)	Antioxidante	-	-	10
Tacrolimus (µmol)	Anti-inflamatorio	-	-	5
Insulina (U/L)	Protector mitocondrial	40	40	-
Dexametasona (g/l)	Protector de membrana	16	16	16
Penicilina (U/l)	Antibiótico	200000	200000	200000

- 15 HES= Hidroxietil almidón; GSH= Glutación

A) Estudio I: P1 vs. UW

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.

- 20 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.

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.

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, 1 µM 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.

5 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.

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.

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

15 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, 1 µM 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.

Procedimiento

20 Tras las 24h de la preservación fría del injerto, se determinaron los niveles de alanina aminotransferasa acumulada (ALT) tras una isquemia prolongada. 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 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 se perfusión consistió en un medio de cultivo celular (William's médium E, Bio Whittaker, Spain) con la solución Krebs-Heinseleit-albúmina. El líquido de perfusión se oxigenó con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂, 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 muestras biliares así como el contenido de ATP en muestras de hígado.

Determinaciones Bioquímicas

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

35 - 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 producción de bilis se estimó midiendo el volumen de bilis obtenido después de 120 min de perfusión, y se expresó como µl/g hígado.

40 - Aclaramiento hepático de BSP. Al igual que la producción de bilis, el aclaramiento hepático de BSP es considerado otro parámetro fiable de 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.

- 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

5 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 $p < 0.05$.

10 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 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. 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.

15 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 solución de preservación IGL fueron $35,62 \pm 2,32$ y $121,41 \pm 1,23$ para hígados no esteatósicos y esteatósicos, respectivamente.

25 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.

35 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.

40 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

	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	34,77	74,90	82,10
ALT (120 min)	11,66	17,44	20,59	49,69	76,68	85,05

ES 2 394 559 T3

Bilis	8,24	12,0	14,0	34,24	58,87	63,37
%BSP	9,38	10,69	13,76,	33,83	50,80	63,76
ATP	8,65	5,28	16,66	30,59	54,80	66,37

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	58,75	81,06	85,20
ALT (120 min)	11,0	10,12	19,55	40,67	71,33	78,53
Bilis	8,50	11,40	17,60	37,50	81,40	91,50
%BSP	11,45	10,70	13,30	35,45	56,0	67,50
ATP	7,26	6,53	16,22	30,01	55,20	75,0

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	36,57	63,71	72,57
ALT (120 min)	15,97	17,41	18,59	51,97	70,52	81,11
Bilis	9,26	4,50	14,52	28,28	43,70	49,0
%BSP	8,74	8,37	10,15	27,26	41,40	49,0
ATP	8,17	8,41	16,56	33,14	48,63	59,60

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	43,07	61,75	74,27
ALT (120 min)	14,62	10,75	19,47	44,84	63,76	72,69
Bilis	9,30	6,0	15,0	30,30	59,0	72,10
%BSP	9,73	8,22	9,98	27,93	49,28	62,58
ATP	7,99	2,63	18,15	26,77	57,0	65,37

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 ,

5 (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.

10

REIVINDICACIONES

- 5 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.
- 10 3. Solución según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que comprende adicionalmente polietilenglicol con un peso molecular superior a 15.000.
4. Solución según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene un pH de 6.5 a 8 y una osmolaridad de 290 a 320 milimoles/kg y que además comprende:
- 15 - polietilenglicol 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,
 - MgSO₄ en una concentración de 1 a 10 mM,
 - H₂PO₄ en una concentración de 10 a 40 mM,
 20 - 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 5. Solución según la reivindicación 4, en la que el pH es 7.4, la osmolaridad es 320 milimoles/kg, la concentración de polietilenglicol es 0,03 mM, la concentración de rafinosa es 30 mM, la concentración de MgSO₄ es 5 mM, la concentración de H₂PO₄ 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.
- 30 6. Solución según la reivindicación 5, que consiste en:
 - polietilenglicol que tiene un peso molecular aproximado de 35.000 en una concentración de 0,03 mM,
 - rafinosa en una concentración de 30 mM,
 - MgSO₄ en una concentración de 5 mM,
 35 - H₂PO₄ 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,
 - tacrolimus en una concentración de 5 microM,
 40 - carvedilol en una concentración de 10 microM, y
 - trimetazidina en una concentración de 1 microM.
7. Solución según la reivindicación 6, que además comprende dexametasona en una concentración de 16 g/l, y penicilina en una concentración de 200.000 U/l.
- 45 8. Solución según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 caracterizada porque no contiene ninguno de glutatión, hidroxietil almidón, insulina, alopurinol y adenosina.
9. Uso de la solución como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1- 8 para la preservación de un tejido o un órgano.
- 50 10. Uso según la reivindicación 9, en el que el órgano es un órgano abdominal.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que el órgano abdominal es un órgano marginal.
- 55 12. Uso según la reivindicación 11, en el que el órgano marginal es un hígado esteatótico.
- 60 13. 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 1-8 a una temperatura comprendida entre 2-10 °C.

ALT(0 min)

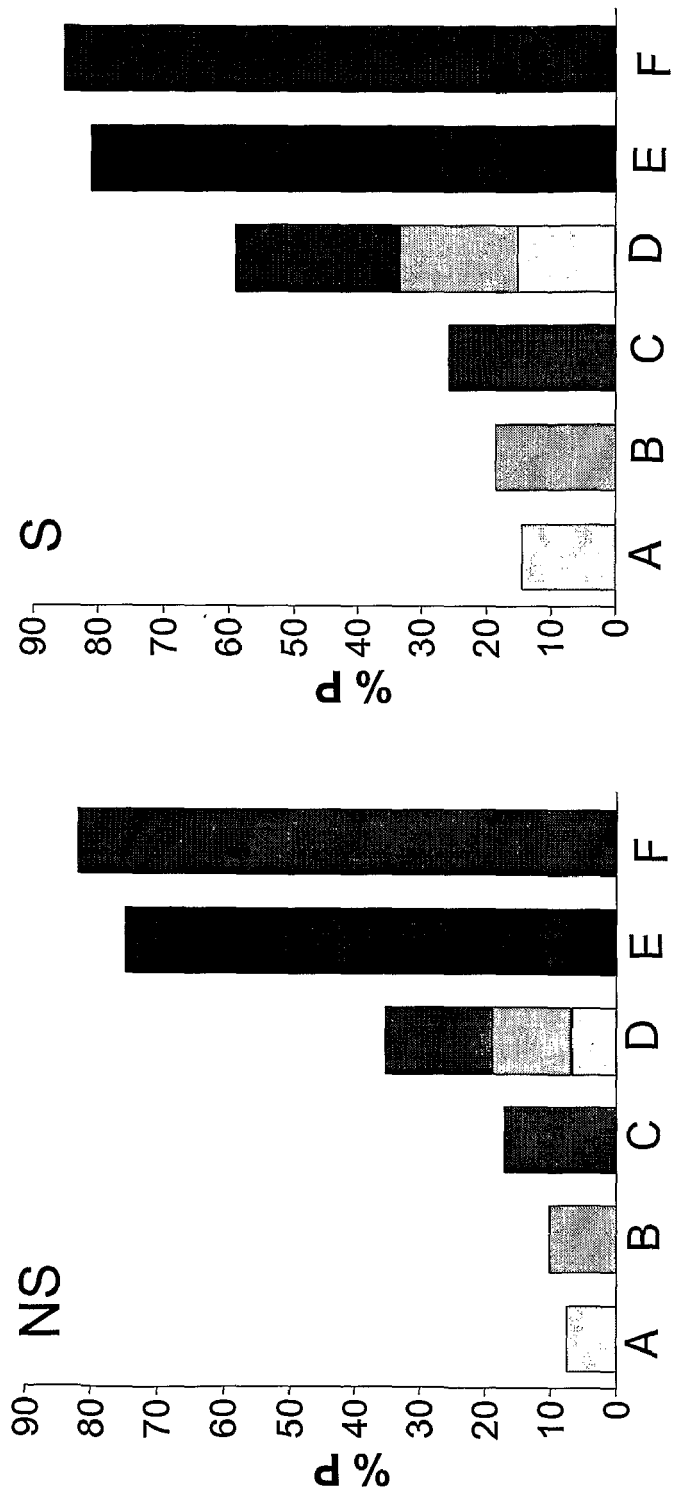
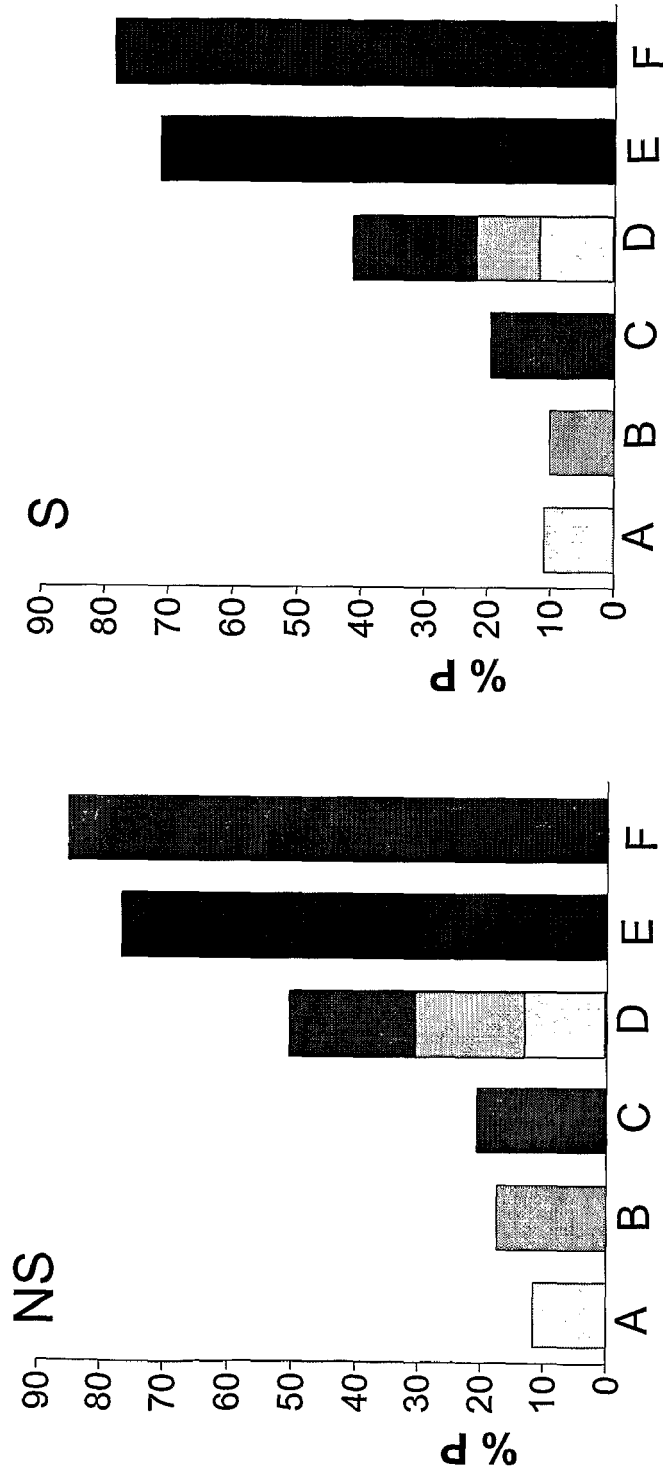


Fig.1

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

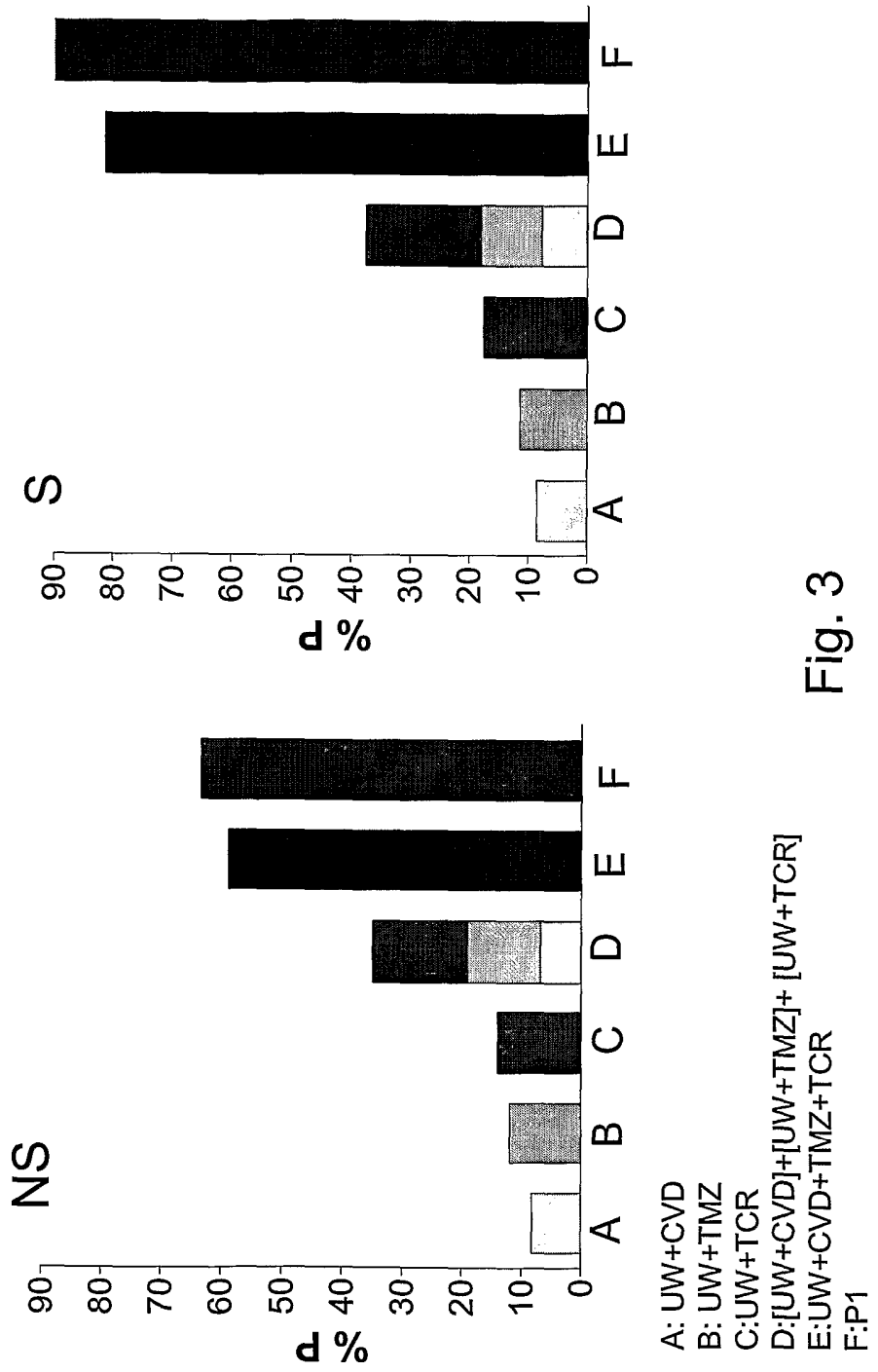


Fig. 3

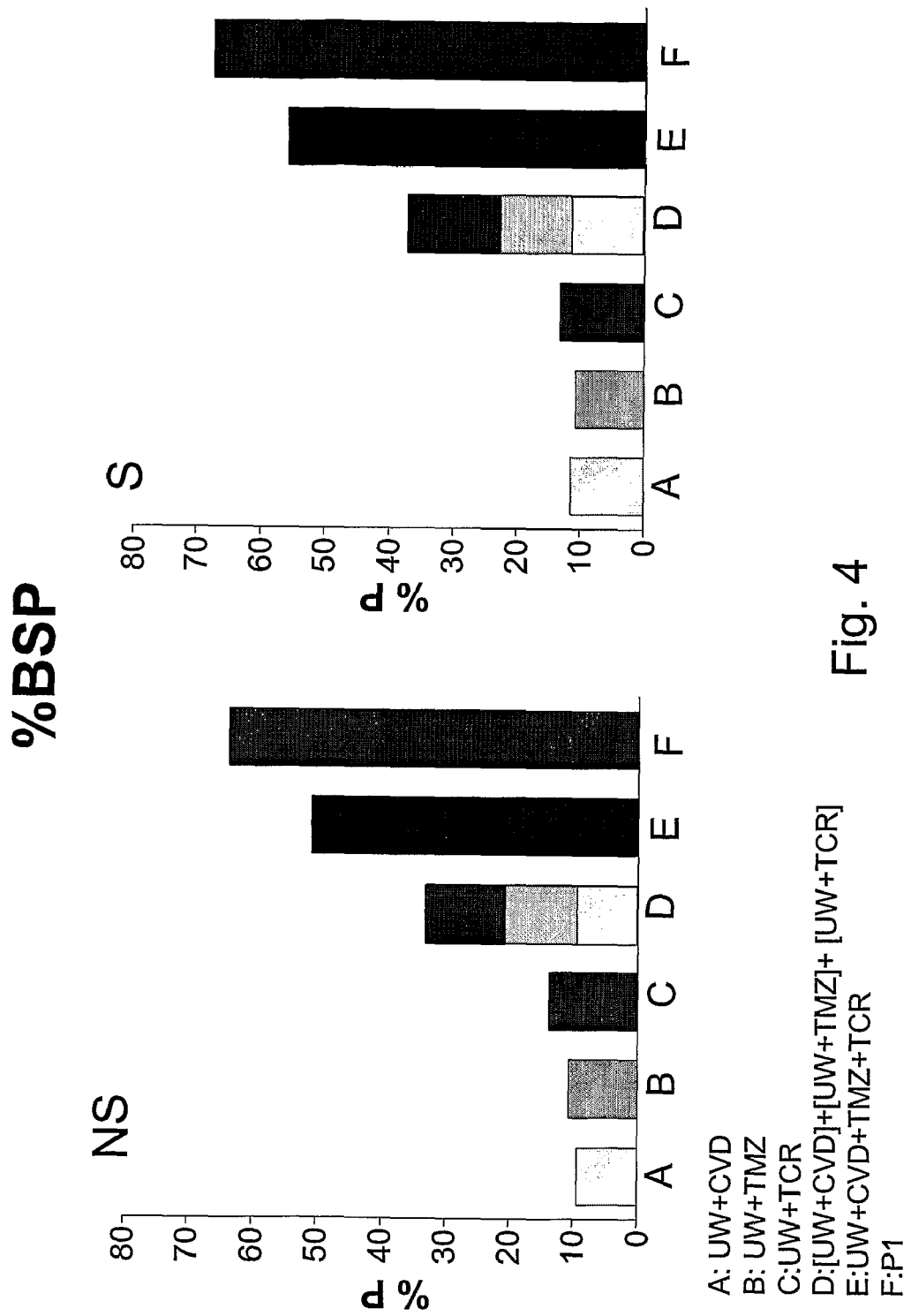
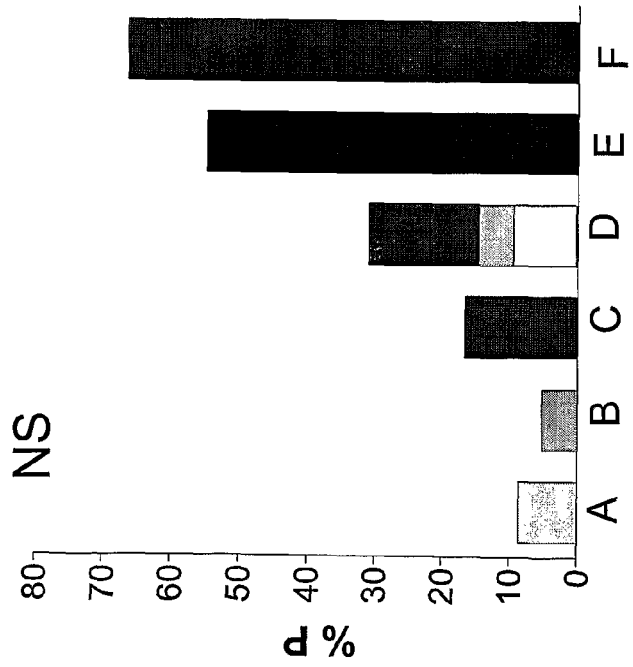
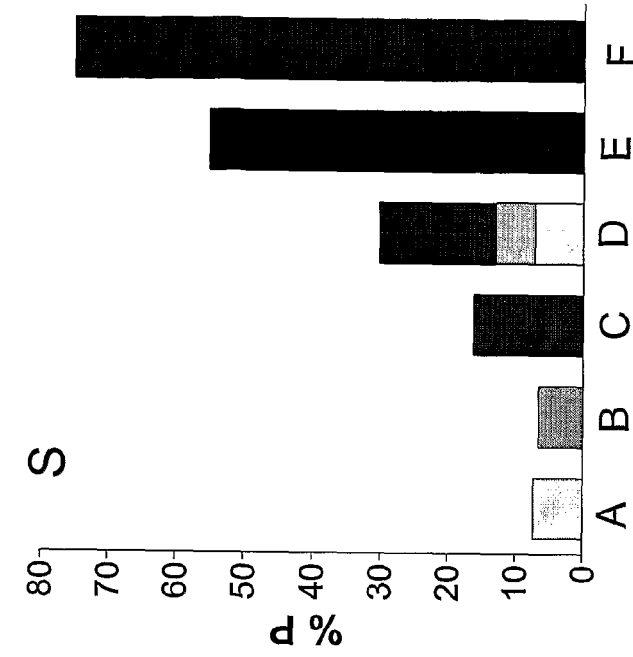


Fig. 4

ATP



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

Fig. 5

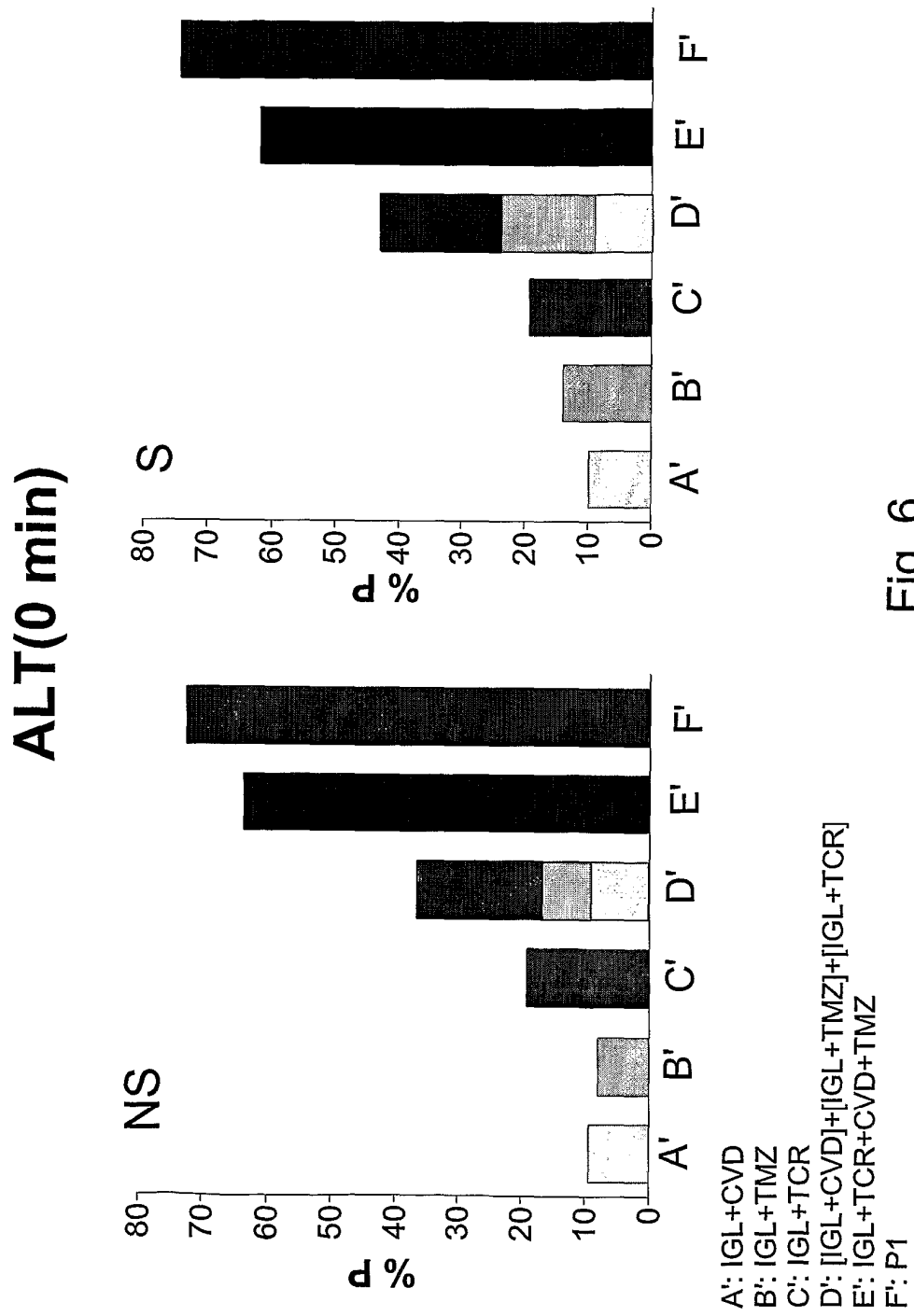
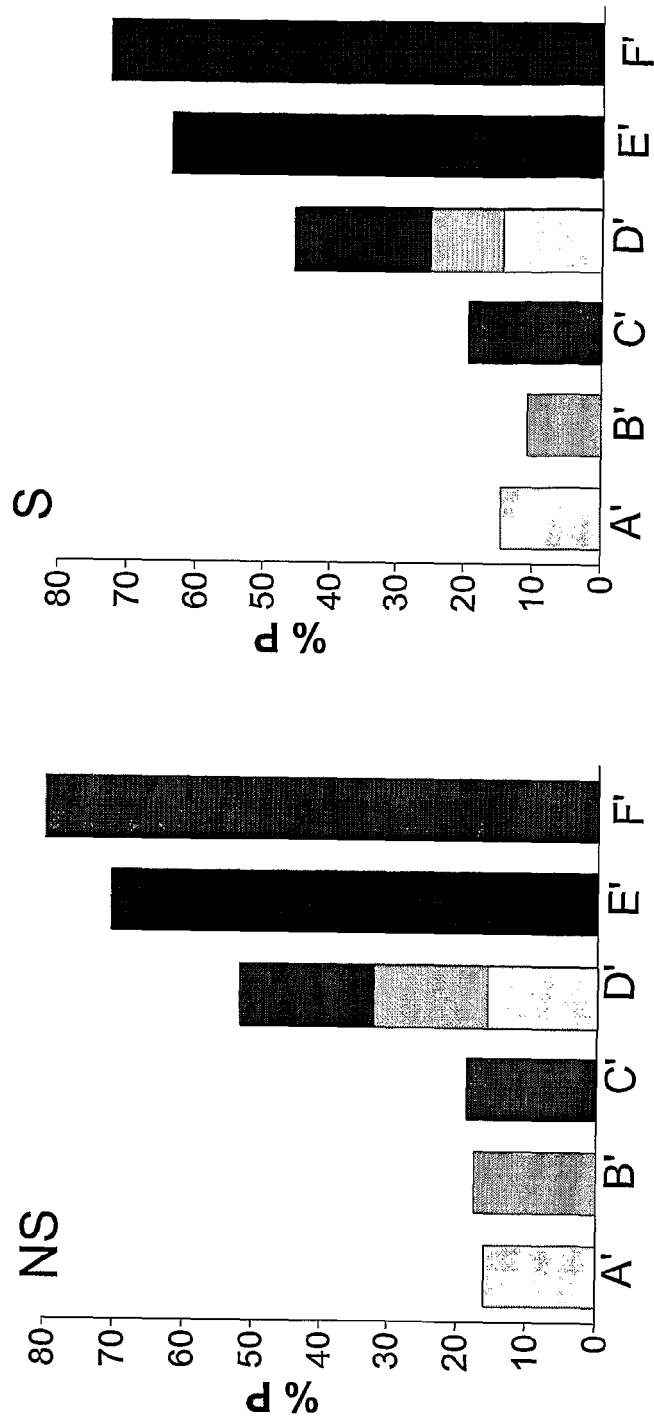


Fig. 6

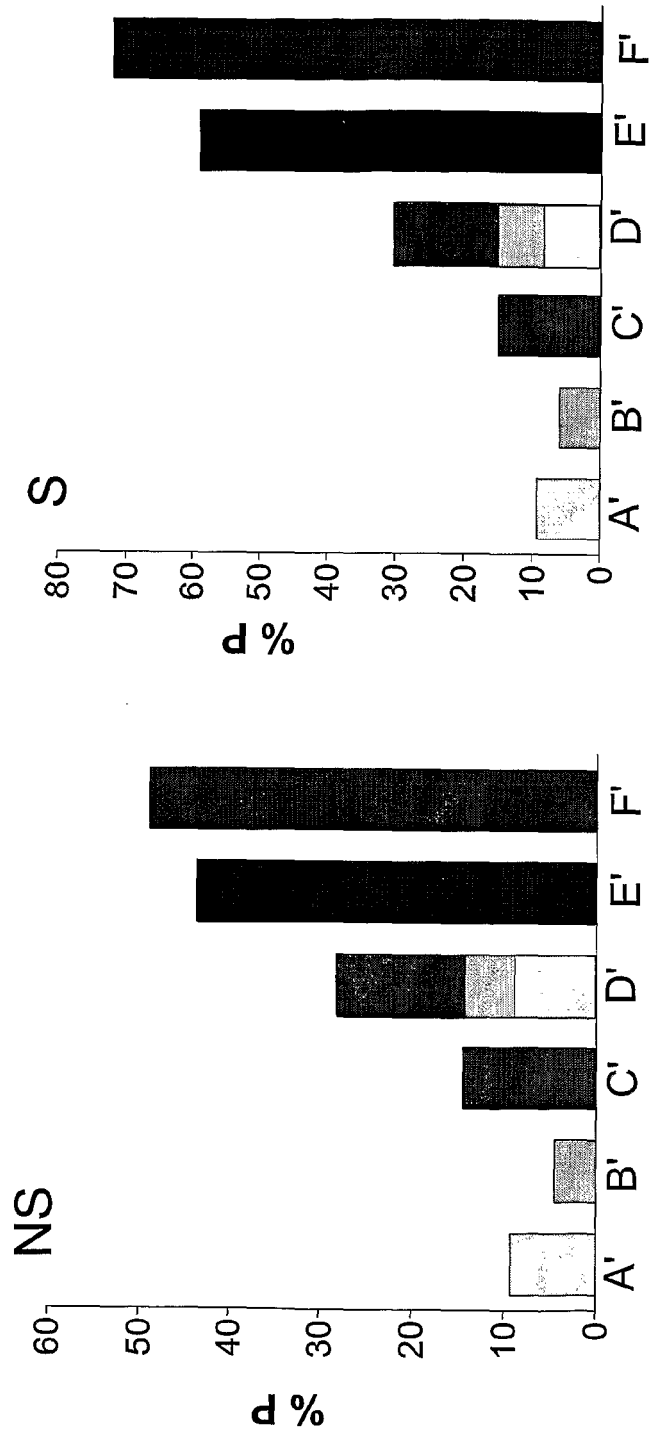
ALT(120 min)



- 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

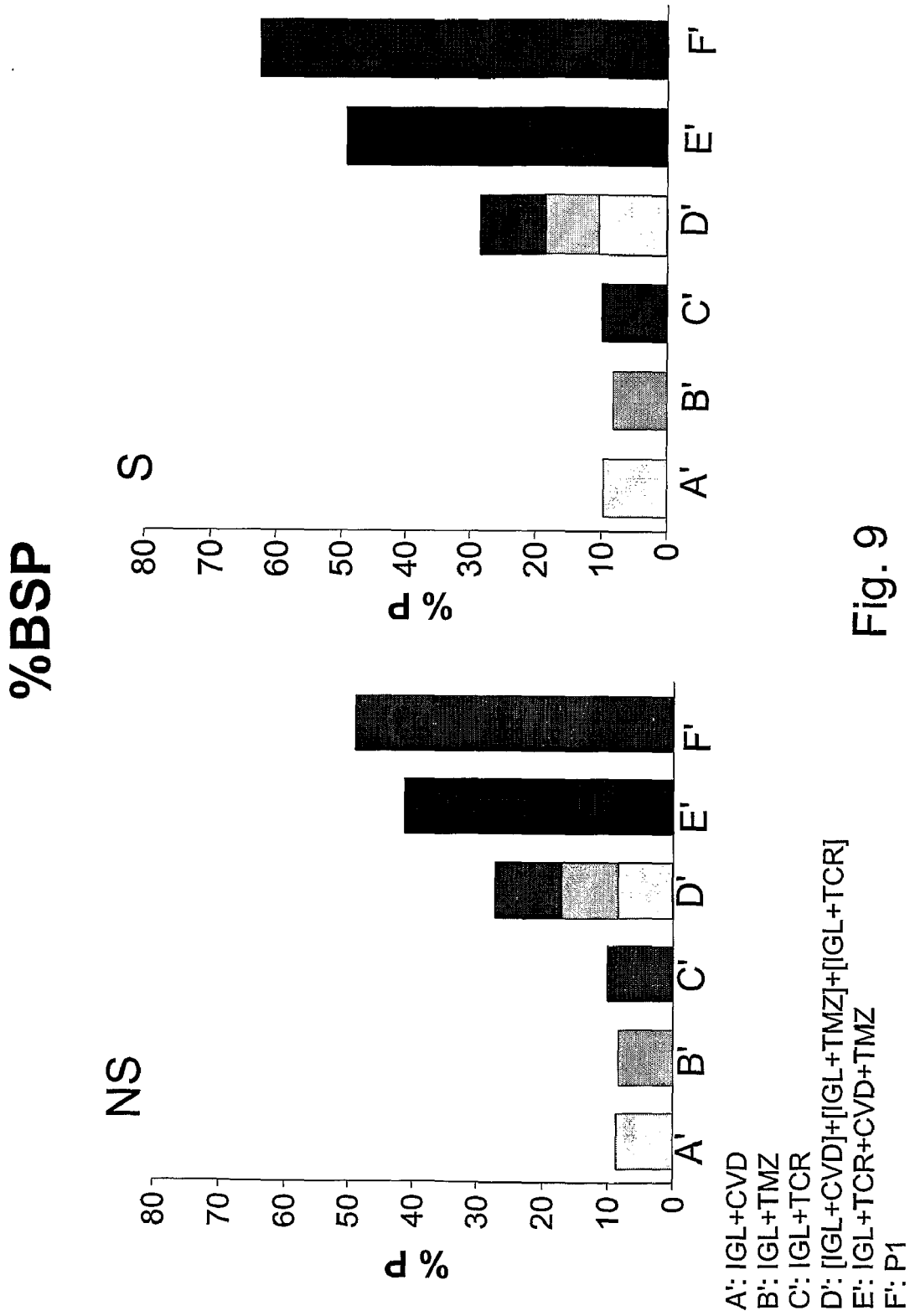


Fig. 9

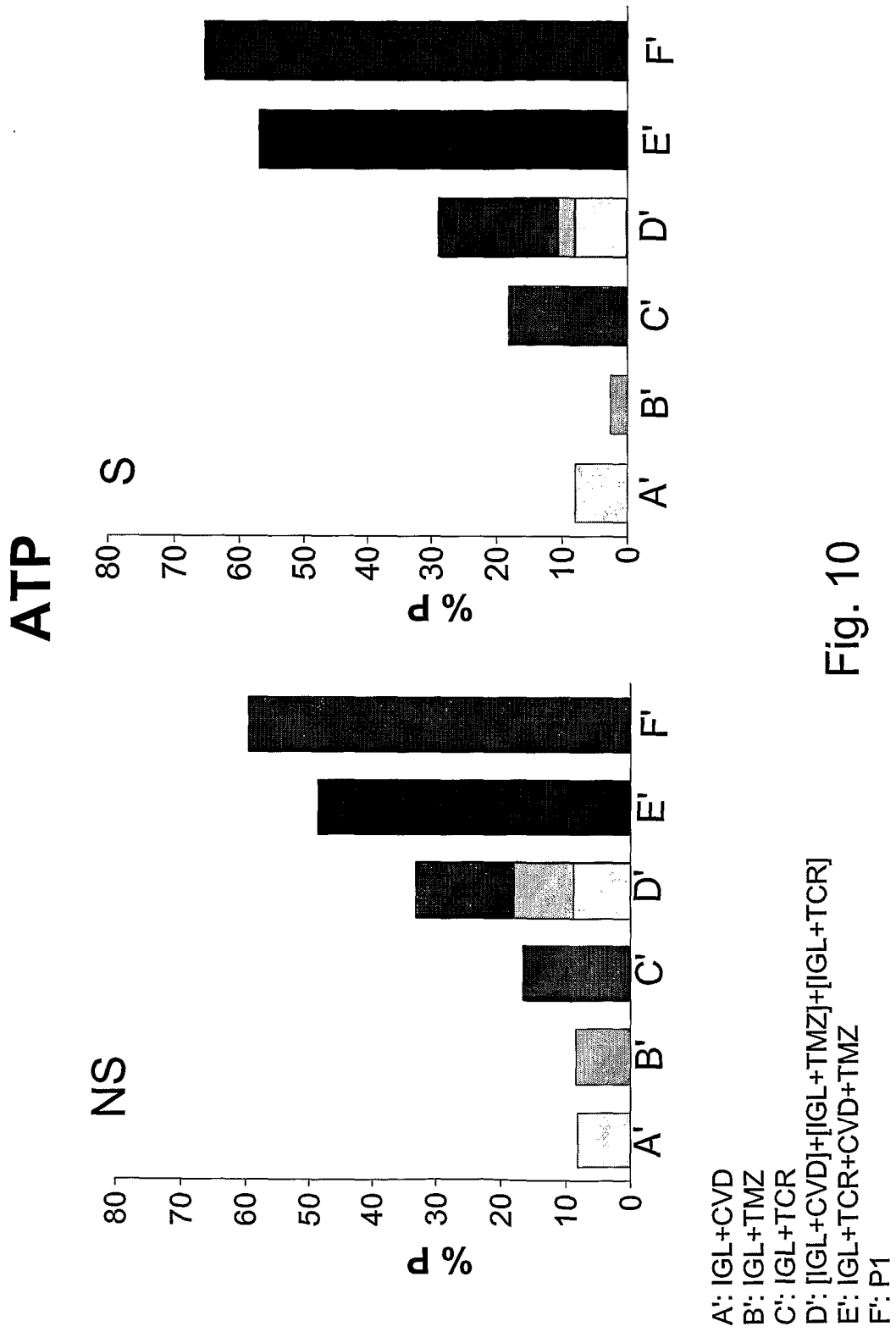


Fig. 10