



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 310**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61M 1/00 (2006.01)

A61M 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97925571 .8**

86 Fecha de presentación : **16.05.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **1021084**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2000**

54

Título: **Disolución y procedimiento para la reanimación y reparación de tejido dañado isquémicamente.**

30

Prioridad: **17.05.1996 US 649200**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73

Titular/es: **Breonics, Inc.**
301 Nott Street
Schenectady, New York 12305, US

72

Inventor/es: **Brasile, Lauren**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 296 310 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

Disolución y procedimiento para la reanimación y reparación de tejido dañado isquémicamente.

5 **Campo del invento**

El presente invento se refiere generalmente a la conservación, mantenimiento y reparación de tejidos y órganos. Más específicamente, el presente invento proporciona un proceso mediante el cual la integridad, función, y viabilidad son restablecidas en un órgano o tejido isquémicamente dañado usando una composición proporcionada aquí.

Antecedentes del invento

Continúa habiendo una escasez extrema de órganos para trasplantes. Actualmente, el principal factor limitante en trasplantes clínicos es la continua escasez de órganos. Por ejemplo, los trasplantes de riñón son altamente dependientes de la disponibilidad de órganos retirados de donantes cadáveres con el corazón aun latiente. Adicionalmente, una amplia y aún sin explotar fuente de órganos para trasplantes son cadáveres de corazón no latiente. Cadáveres con corazón no latiente son víctimas de accidentes que sucumben en el sitio de la lesión y los que tienen tiempos de supervivencia postrauma cortos. En tales casos, las razones por las que tales órganos no son usados es porque una vez el corazón deja de latir, la falta de suministro de sangre circulante (isquemia caliente) resulta en una cascada de lesiones.

Un órgano marginalmente, pero funcionalmente, dañado por una isquemia caliente no puede tolerar daños adicionales mediados por la hipotermia. En condiciones de hipotermia utilizadas para conservar órganos que se pretende usar para trasplantes, la bicapa lipídica experimenta un cambio de fase y se vuelve de tipo gel, que reduce ampliamente la fluidez. El lípido esencialmente congelado en las membranas celulares anula la utilización de O₂, aún en presencia de una elevada tensión de O₂. La consecuencia metabólica es glicolisis, que es análogo al estado de anoxia. Se ha descrito que por debajo de 18°C, la hipotermia inhibe la actividad tubular del riñón y que a 4°C, la utilización de oxígeno es aproximadamente 5% de la de normotermia.

El almacenamiento hipodérmico puede también producir vasoespasmos y subsiguientes edemas en un órgano. Los órganos conservados hipotérmicamente pueden experimentar inflamación glomerular de células endoteliales y pérdida de integridad vascular junto con necrosis tubular; fenómeno atribuido a las condiciones hipodérmicas empleadas. La hipotermia puede también inhibir la ATPasa dependiente de Na/K y resulta en la pérdida de la capacidad reguladora del volumen celular. La pérdida de regulación del volumen es lo que causa la inflamación y daño celular. Un suministro amplio de oxígeno puede disminuir activamente la cantidad de esta inflamación. Sin un suministro de oxígeno adecuado, la anoxia lleva a la desintegración de los vasos más pequeños tras varias horas de perfusión. La falta de oxígeno y la subsiguiente depleción de ATP almacenado significa que la glicolisis anaeróbica es la principal fuente de energía en condiciones de conservación tradicional. La falta de oxígeno molecular para fosforilación oxidativa que tiene lugar en isquemia, lleva a la acumulación de NADH y la depleción de los almacenes de ATP dentro de la mitocondria. La subsiguiente pérdida de nucleósidos es probablemente un factor muy importante en el fallo de tejidos sometidos a una isquemia caliente y períodos prolongados de isquemia fría para regenerar ATP tras el restablecimiento del suministro de sangre. La incapacidad para suministrar oxígeno adecuado ha llevado a la dependencia rutinaria en la hipotermia para la conservación de órganos.

Así, la isquemia (bien sea isquemia caliente o isquemia fría) es una cascada de eventos de lesiones que puede ser caracterizada como una fase preletal, y una fase letal. La fase preletal produce efectos dañinos en tres maneras: hipoxia; malnutrición; y fallo en la eliminación de desperdicios metabólicos tóxicos. Con la falta de sangre circulante viene una falta en oxígeno molecular. La hipoxia resultante induce a la depleción de almacenes de energía tales como la depleción de almacenes de ATP en la mitocondria. La depleción de ATP lleva a cambios celulares incluyendo edema, pérdida de integridad celular, y pérdida de polaridad de membrana. Los cambios celulares, inducen la fase letal de la isquemia dando como resultado una acumulación de residuos metabólicos, activación de proteasas, y muerte celular.

La disolución del perfundido actual que representa la técnica más innovadora en conservación hipodérmica de órganos, y proporciona una conservación de órganos optimizada en condiciones hipodérmicas, contiene componentes que impiden el edema tisular inducido por las condiciones hipodérmicas; metabolitos que facilitan la función del órgano tras el trasplante; antioxidantes; estabilizadores de membrana; coloides, iones; y sales (Southard y otros, 1990, *Transpl.* 49:251; y Southard, 1989, *Transpl. Proc.* 21:1195). La formulación de este perfundido es designada para conservar los órganos mediante una depresión del metabolismo inducida por las condiciones hipodérmicas. Mientras que minimiza el edema y el vasoespasmo encontrados normalmente durante el almacenamiento hipotérmico, no proporciona la utilización de un agrupamiento de donantes sustancialmente expandido.

Esto es debido al hecho que un órgano o tejido, marginalmente, pero funcionalmente, dañado mediante isquemia caliente no puede tolerar un daño adicional mediado por la hipotermia. Aún con sólo 30 minutos de isquemia, la función postransplante de un órgano puede estar comprometida. Por ejemplo, usando órganos de cadáveres con corazón latiente, la tasa no funcional inmediata se estima que es del 25%; y en sólo 30 minutos de isquemia, la tasa de no funcionalidad inmediata es aumentada hasta alrededor del 60%. Así, el 60% de los riñones de cadáveres con corazón

no latiente no funcionan inmediatamente debido a un daño isquémico preletal. Además, se cree que el daño y lesiones isquémicas irreversibles tienen lugar en órganos privados de flujo sanguíneo en sólo unas pocas horas o menos (Klatz y otros, Patente norteamericana N° 5.395.314). A menos que nuevas fuentes de órganos puedan desarrollarse, el número de procedimientos de trasplantes permanecerá constante. Adicionalmente, la cantidad de donantes no puede ser sustancialmente expandida debido a que no hay un proceso/sistema disponible para reparar daños isquémicos preletales en órganos o tejidos dañados por isquemia caliente.

Esfuerzos recientes se han enfocado en la prevención de daño isquémico mediante resucitación con una reperfusión con una disolución inmediatamente después de la interrupción del suministro de sangre. Por ejemplo, una disolución protectora, descrita en el documento de Patente norteamericana N°: 4.415.556, es usada durante técnicas quirúrgicas o para órganos a ser trasplantados para prevenir el daño isquémico al órgano. La disolución protectora es usada como un perfundido para mejorar el metabolismo aeróbico durante la perfusión del órgano. El documento de patente norteamericana N° 5,395, 314 describe un método para resucitar un cerebro haciendo circular, tras la interrupción del suministro de sangre, a través del cerebro una disolución de conservación hipodérmica (aproximadamente 8-10°C) diseñada para disminuir el metabolismo del órgano, suministrar oxígeno, e inhibir el daño por radicales libres.

Aunque tales métodos y disoluciones de conservación son útiles para prevenir el daño isquémico en órganos, estos efectos beneficiosos son eclipsados por las limitaciones prácticas y funcionales. Primero, para que tales métodos y disoluciones sean eficaces a la hora de prevenir el daño isquémico, deben ser aplicadas inmediatamente (en un intervalo de minutos) tras la interrupción del suministro de sangre. Las limitaciones logísticas, por ejemplo en el caso de una víctima de un accidente como donante de órganos, puede reducir drásticamente el uso de tales métodos y disoluciones de modo que serán prácticas sólo en un entorno hospitalario. Segundo, daño y lesiones isquémicas irreversibles se piensa que tienen lugar en órganos privados de flujo sanguíneo en minutos (por ejemplo, cerebro) o en sólo unas pocas horas (corazón, riñón). Un órgano o tejido, marginalmente, pero funcionalmente, dañado por isquemia caliente no puede tolerar un daño adicional mediado por almacenamiento hipodérmico previo al trasplante, o restablecimiento del flujo sanguíneo tras el trasplante. Una razón es que el restablecimiento de la circulación tras la isquemia-reperfusión puede resultar paradójicamente en un daño tisular adicional (McCord y otros. 1985, *N Engl J Med* 312: 159-163). El restablecimiento de la circulación da como resultado una reoxigenación del tejido dañado. La reoxigenación del tejido dañado isquémicamente puede dar como resultado una lesión del tejido causada a través de la formación de radicales libres de oxígeno, depleción de eliminadores de radicales libres, y la liberación de agentes quimotácticos.

Así, hay una necesidad para un proceso y disolución que puedan superar, más que sólo inhibir, los efectos de isquemia en órganos o tejidos durante la fase preletal, y apoyar un proceso de reparación en órganos o tejidos en las etapas más tempranas de la isquemia letal. Un proceso para inducir la reparación de órganos y tejidos dañados, a tal grado que la alteración de la función pueda ser revertida, y la prevención de daño tisular adicional durante el restablecimiento de la circulación, puede llevar a que la cantidad de órganos donantes sea sustancialmente expandida.

El documento de patente WO 95/31897 describe un método y un aparato para monitorizar la viabilidad de los órganos transplantables.

El documento de patente norteamericana 5.395.314 describe un dispositivo y un método de resucitación cerebral y conservación de órganos.

El presente invento proporciona un proceso para inducir la reparación de un órgano dañado isquémicamente hasta el grado que la alteración de la función del órgano puede ser revertida, dicho proceso comprende bañar el órgano a una temperatura de alrededor de 28°C hasta alrededor de 37°C con una disolución fisiológica tamponada para eliminar la sangre y los productos acidóticos que se han acumulado en el órgano durante la privación de flujo sanguíneo; y perfusión del órgano a una temperatura de alrededor de 28°C hasta alrededor de 37°C con una disolución fisiológica tamponada que comprende además un vasodilatador para dilatar los vasos sanguíneos dentro del órgano, factores tróficos para restablecer la función del órgano y al menos un sustrato de energía química y una función celular restableciendo de ese modo la función del órgano y al menos un sustrato de energía química seleccionado a partir del grupo que consiste en AMP, UTP, coenzima A, β -nicotinamida adenin dinucleótido (Nad^+), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), flavín adenin dinucleótido (FAD), difosfopiridin nucleótido, trifosfopiridin nucleótido monosódico y cocarboxilasa, para restablecer el metabolismo oxidativo en el órgano y readaptar el órgano a un medio oxigenado.

El presente invento también proporciona una disolución de resucitación para inhibir el daño isquémico, y para inducir la reparación del daño isquémico a tal grado que la alteración de la función del órgano es revertida en un órgano privado de flujo sanguíneo, dicha disolución de resucitación comprende una disolución fisiológica tamponada y comprende además: vasodilatadores en una cantidad fisiológicamente eficaz para dilatar la vasculatura del órgano; al menos un sustrato de energía química seleccionado a partir del grupo que consiste en AMP, UTP, coenzima A, β -nicotinamida adenin dinucleótido (Nad^+), β -nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADP), flavin adenin dinucleótido (FAD), difosfopiridin nucleótido, trifosfopiridin nucleótido monosódico y cocarboxilasa, en una cantidad fisiológicamente eficaz para restablecer el metabolismo oxidativo perdido durante la privación del flujo sanguíneo al órgano; y factores tróficos en una cantidad fisiológicamente eficaz para promover uno o más proce-

505 sos de reparación celular para restablecer la función celular perdida durante la privación de flujo sanguíneo al órgano.

5 El presente invento indica que, hasta el momento del invento, se pensaba que el daño isquémico y lesiones a los órganos o tejidos privados de flujo sanguíneo era irreversible. El proceso y las composiciones son usadas *después* del daño isquémico y lesiones para inducir la reparación de los órganos y tejidos dañados isquémicamente, y la prevención de daño tisular adicional durante el restablecimiento de la circulación. Esto distingue el proceso y las composiciones según el presente invento de métodos y composiciones usados actualmente dirigidos a ser usados *después* del daño isquémico y lesiones, con el propósito de impedir o inhibir dicho daño. El proceso según el presente invento es un proceso mediante el cual la integridad y función de un órgano o tejidos dañados isquémicamente pueden ser restablecidos, durante al menos la fase preletal de la isquemia, usando una disolución de resucitación según el presente invento. Además, el proceso y disolución según el presente invento llevan la intención de impedir o inhibir daño tisular adicional que puede ser inducido durante el restablecimiento de la circulación sanguínea en un órgano o tejido privado del flujo sanguíneo.

15 El proceso según el presente invento comprende lavar el órgano a través del sistema arterial con la disolución de resucitación del presente invento a una temperatura caliente de alrededor 28°C hasta alrededor de 37°C para eliminar la sangre y los productos acidóticos que se han acumulado en el órgano o tejido durante el período de privación de flujo sanguíneo; y perfundiendo el órgano o tejido lavado con la disolución de resucitación para (i) dilatar los vasos sanguíneos, particularmente microvasos estrechos, dentro del órgano o tejido, (ii) restablecer la función del órgano o tejido suministrando factores tróficos, (iii) restablecer la integridad celular y la función al órgano o tejido dañado isquémicamente y (iv) restablecer el metabolismo oxidativo readaptando el órgano o tejido dañado isquémicamente, a una disolución de resucitación oxigenada; volviendo el órgano o tejido adecuado para el trasplante y/o el restablecimiento de la circulación sanguínea.

25 Breve descripción de los dibujos

Figura 1 es un organigrama que muestra los procesos del órgano afectado por el proceso y disolución de resucitación según el presente invento.

30 Figura 2 es una gráfica de un parámetro de la función del órgano (creatinina sérica) relacionada con el número de días postransplante en un alotransplante canino usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento.

35 Figura 3 es una gráfica de un parámetro de la función del órgano (creatinina en orina) relacionado con el número de días postransplante en un alotransplante canino usando el proceso y disolución de resucitación según el presente invento.

40 Figura 4 es una gráfica de un parámetro de una función del órgano (creatinina sérica relacionada con el número de días postransplante en un autotransplante canino usando el proceso y disolución de resucitación según el presente invento.

45 Figura 5 es un gráfico de un parámetro de la función del órgano (creatinina en orina) relacionada con el número de días postransplante en un autotransplante canino usando el proceso y disolución de resucitación según el presente invento.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

50 “Deprivado de flujo sanguíneo” es un término usado de aquí en adelante para los propósitos de la especificación y reivindicaciones que se refieren al cese de la circulación sanguínea a través de un órgano o un tejido en cualquier circunstancia en la que la circulación sanguínea puede ser cesada y seguirle una isquemia caliente. Esto incluye paradas del ritmo cardíaco para procedimientos quirúrgicos, o debido a causas naturales tales como un paro cardíaco. “Un órgano o tejido” es un término usado de aquí en adelante para los propósitos de la especificación y reivindicaciones que se refiere a un “órgano” incluyendo riñón, corazón, hígado, pulmón, intestino delgado, páncreas, cerebro, ojo, y piel. “Disolución de resucitación” es un término usado de aquí en adelante para los propósitos de la especificación y reivindicaciones que se refieren a una disolución fisiológica tamponada que proporciona medios para el restablecimiento de la integridad y función en órganos dañados isquémicamente y lesionados privados de flujo sanguíneo, y para la prevención o inhibición de daño tisular adicional que puede ser introducido durante el restablecimiento de la circulación sanguínea en un órgano privado de flujo sanguíneo.

65 El proceso según el presente invento es un proceso mediante el cual la integridad y función de un órgano dañado isquémicamente pueden ser restablecidas, durante al menos la fase preletal de la isquemia, usando una disolución de resucitación según el presente invento. El restablecimiento de la integridad y función de un órgano usando el proceso y composiciones según el presente invento fue inesperado puesto que se pensaba, en el momento del invento, que el daño isquémico y las lesiones en los órganos privados de flujo sanguíneo durante tan sólo unas pocas horas o menos era irreversible. Además, el proceso y disolución según el presente invento pretendían impedir o inhibir daños tisulares

adicionales que pueden ser inducidos durante el restablecimiento de la circulación sanguínea en un órgano privado de flujo sanguíneo.

5 El proceso y disolución según el presente invento proporciona un medio para eliminar sangre y productos acidóticos acumulados durante el período de privación de flujo sanguíneo del órgano; un medio para restablecer la integridad y función celular, restableciendo de este modo la función del órgano; y un medio para readaptar el órgano a un medio posible basado en las premisas que (1) la sangre no se coagula mientras que está en contacto con células endoteliales vasculares viables, y por lo tanto órganos isquémicamente dañados pueden ser perfundidos de nuevo siempre que el
10 endotelio esté aún viable e intacto; (2) el restablecimiento de la dinámica vascular depende de que se proporcione una vasodilatación dependiente de células endoteliales adecuada para perfundir adecuadamente y oxigenar el tejido y proporcionar los mecanismos autorreguladores normales; (3) los microvasos deben ser dilatados adecuadamente para la resucitación, pero la permeabilidad no puede ser alterada para que la integridad celular sea restablecida; y (4) factores tróficos, perdidos durante la isquemia, deben ser restablecidos, y la polaridad celular establecida para que se
15 recupere la función.

El proceso y la disolución según el presente invento actúan juntos para resucitar un órgano dañado isquémicamente con el propósito de restablecer la función del órgano y para readaptar el órgano a un medio oxigenado. La Figura 1 es un organigrama que muestra los proceso del órgano afectado mediante el proceso y la disolución de resucitación
20 según el presente invento.

Los siguientes ejemplos ilustran las realizaciones preferidas de la práctica del invento. En las siguientes realizaciones usadas para ilustrar el invento, es importante considerar el siguiente concepto. El modelo de ternera bovina y el modelo canino han sido validados para la evaluación de composiciones y métodos referidos al transplante de órganos que se pretenden emplear en humanos ya que se ha demostrado que los modelos reflejan una base fisiológica. Así,
25 mientras que la composición y métodos según el presente invento han sido validados en estos modelos experimentales, la composición y métodos han de ser utilizados ante todo en humanos. Una base fisiológica para aumentar de escala a partir de los modelos experimentales a humanos es conocida por aquellos con experiencia en la técnica, e incluye la consideración de diferencias tales como volúmenes de órganos y caudales en los órganos (Véase por ejemplo, Harrison y otros, 1977, *J. Pharm. Sci.* 66:1679-1683). Debería entenderse que estos ejemplos se usan como ilustraciones, y no como limitaciones.
30

Ejemplo 1

35 *El Proceso*

El proceso según el presente invento implica interceder durante una ventana de tiempo de privación de flujo sanguíneo en un órgano antes de que tenga lugar una muerte celular sustancial. Se puede apreciar por aquellos con experiencia en la materia que la ventana de tiempo en la que el proceso puede ser usado varía dependiendo del tipo de órgano que ha de ser tratado. Por ejemplo, la ventana para el tratamiento de un corazón usando el proceso según el presente invento puede ser menor de aproximadamente una hora; mientras que un riñón puede ser tratado usando el proceso en un período de tiempo de hasta aproximadamente 4 horas de privación del flujo sanguíneo. Para parar la cascada de daño isquémico que conduce a la muerte celular, y de una manera como la que se ilustra en la Fig. 1, el
45 proceso según el presente invento comprende las etapas de:

(1) Lavar el órgano dañado isquémicamente a través del sistema arterial con la disolución de resucitación según el presente invento a una temperatura cálida de alrededor de 28°C hasta alrededor de 37°C para (i) eliminar la sangre y los productos acidóticos que se han acumulado en el órgano durante el período de privación de flujo sanguíneo; (ii)
50 restablecer el medio celular a un pH fisiológico; (iii) dilatar adecuadamente los microvasos; (iv) apoyar el metabolismo anaeróbico como un procedimiento de rescate proporcionando compuestos de elevada energía y apoyando la glicolisis con sustratos suplementarios que pueden incluir, pero no se limitan a glucosa, piruvato, y uridina 5'-trifosfato (UTP); (v) iniciar una conversión desde metabolismo anaeróbico hasta metabolismo oxidativo proporcionando sustratos metabólicos para restablecer el conjunto del compuesto de adenina, apoyar el ciclo del ácido cítrico, y restablecer el
55 acoplamiento de la cadena transportadora de electrones, por la cual el oxígeno molecular es lentamente introducido para impedir un daño por reperfusión mediado por la toxicidad del oxígeno; (vi) proporcionar un mecanismo para vasodilatar adecuadamente el lecho de células endoteliales de los microvasos en un órgano isquémicamente dañado edematoso gravemente estrechado, sin alterar sustancialmente la permeabilidad del órgano, y en el que la vasodilatación permite la perfusión adecuada del tejido del órgano que proporciona una presión de perfusión estable, caudales estables, y temperatura constante, pH constante, y oxigenación constante; (vii) proporciona factores tróficos para restablecer la función en el órgano dañado isquémicamente, proporcionando de ese modo metabolitos para recuperar la integridad y la función celular; y

2) Perfundir el órgano dañado isquémicamente a través del sistema arterial con la disolución de resucitación según el presente invento a una temperatura cálida de alrededor de 28°C hasta alrededor de 37°C para (i) normalizar la oxigenación, temperatura, y pH; (ii) continuar proporcionando un mecanismo para vasodilatar adecuadamente la vasculatura del órgano, sin alterar sustancialmente la permeabilidad del órgano, dando de ese modo como resultado una presión de perfusión estable, y caudales de vasculatura estable; y (iii) continuar proporcionando factores tróficos para
65

ES 2 296 310 T3

restablecer la función en el órgano dañado isquémicamente, proporcionando de ese modo metabolitos para recuperar la integridad y la función celular tal como apretar las uniones celulares y restablecer la polaridad de membrana. Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica, que uno o más de los beneficios derivados durante la etapa de lavado también continuará en la etapa de perfusión, ya que la disolución de resucitación según el presente invento puede ser usada durante el proceso completo, es decir, incluyendo tanto las etapas de lavado como la de perfusión.

Para propósitos de ilustración, y no limitación, en la etapa de lavado una cantidad suficiente de la disolución de resucitación es introducida lentamente mediante infusión vía una cánula en el principal suministro de sangre arterial para ese órgano en particular hasta que el efluído esté libre de sangre. De este modo, la sangre isquémica y los productos acidóticos, que se han acumulado en el espacio vascular durante el período en el que el órgano está privado de flujo sanguíneo, se eliminan del espacio vascular. Además, el pH es restablecido y sustrato fresco es suministrado para apoyar el metabolismo anaeróbico y otras rutas celulares necesarias para la integridad y función celular. Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica que la cantidad de la disolución de resucitación suficientes para usar en el lavado puede depender del tipo de órgano en particular y el tamaño a ser lavado, así como en la longitud de tiempo de privación de flujo sanguíneo. A modo de ilustración, pero no limitación, 200 a 600 ml de la disolución de resucitación puede ser una cantidad suficiente para lavar un riñón humano que ha sido privado de flujo sanguíneo durante un período de 1-3 horas.

Para propósitos de ilustración, y no limitación, en la etapa de perfusión una cantidad suficiente de la disolución de resucitación es lentamente perfundida a una presión sistólica apropiada para el órgano dañado isquémicamente que va a ser resucitado, hasta que se alcanza un caudal que es próximo al normal para tal tipo de órgano en particular. A modo de ilustración, pero no limitación, un riñón humano que ha sido privado de flujo sanguíneo durante un período de 1-3 horas puede ser lentamente perfundido con la disolución de resucitación a una presión sistólica de <80 mmHg, hasta que se logra un caudal de >50 ml/min. El pH es normalizado en un intervalo fisiológico introduciendo lentamente oxígeno molecular vía un oxigenador, o vía un compuesto transportador de oxígeno como un componente en la disolución de resucitación. La oxigenación del órgano durante la perfusión, así como la normalización de la temperatura y pH, tiene lugar dentro de alrededor de los primeros 15-30 minutos de perfusión. Según el órgano se va vasodilatando lentamente, las presiones de perfusión y los caudales comienzan a estabilizarse, y el órgano cambia rápidamente a metabolismo oxidativo. Se aprecia por aquellos con experiencia en la técnica que la longitud de tiempo necesaria para la perfusión depende del tipo y del tamaño del órgano en particular a ser perfundido, así como en la longitud de tiempo de la privación de flujo sanguíneo. Sin embargo, el tratamiento de un órgano dañado isquémicamente con el proceso (lavado y perfusión) según el presente invento durante aproximadamente 2 horas puede ser suficiente en la resucitación de la mayoría de los órganos (por ejemplo, privados de flujo sanguíneo entre 0,5 a 4 horas) durante la reanudación de la función del órgano. También, si el órgano produce un producto, tal como un riñón produce orina, el proceso puede dar como resultado la producción de un producto normal de la función del órgano.

El proceso según el presente invento ha sido desarrollado para conservar y resucitar los órganos dañados isquémicamente *ex vivo* sin la hipotermia tradicional (4°-10°C). El proceso proporciona el suministro de oxígeno necesario, nutrientes para metabolismo, presión oncótica, pH, presiones de perfusión, y caudales para apoyar el metabolismo del órgano *ex vivo*, con más frecuencia dentro o cerca del intervalo normal respectivo *in vivo*. Una tasa próxima a la normal del metabolismo es aquí definida como alrededor del 70-90% del intervalo de tasas normales de metabolismo. Además, el proceso según el presente invento apoya un nivel de metabolismo *ex vivo* que proporciona suficiente metabolismo oxidativo que da como resultado el producto funcional normal del órgano. El desarrollo de este proceso que apoya los órganos *ex vivo*, sin hipotermia tradicional, presenta la oportunidad para apoyar una tasa casi normal de metabolismo y establece capacidades funcionales que pueden estar correlacionadas con un curso posquirúrgico o postransplantacional.

En una realización adicional, el proceso según el presente invento puede ser realizado usando un dispositivo que comprende un sistema de bombeo laminar o pulsátil para suministrar la disolución de resucitación, incluyendo medios para proporcionar y controlar la perfusión y la presión de perfusión; medios para el control de la temperatura; y medios para proporcionar y controlar la introducción de, y la ventilación de, los gases respiratorios. Tal dispositivo ha sido descrito mediante el presente invento en el documento de patente norteamericana 5.699.793. Tal dispositivo puede también incluir un medio dispositivo para ensayar y/o recoger el perfundido que ya ha circulado a través del órgano para monitorizar y medir una o más características funcionales tales como pH, diversas presiones, caudal, resistencia vascular, diversos constituyentes químicos, oxigenación, concentración de dióxido de carbono, y consumo de oxígeno. Además, los medios dispositivos o un medio dispositivo secundario junto con el dispositivo, puede ser usado para medir y/o recoger productos del órgano desviados desde el órgano, tal como orina de un riñón, en el que la medida subsiguiente de los parámetros del producto del órgano puede referirse a la integridad del órgano y la función durante o posterior al proceso según el presente invento.

Ejemplo 2

La disolución de resucitación

La conservación del órgano y las disoluciones del perfundido son conocidas en la técnica como que comprenden una disolución básica que consiste en una disolución fisiológica tamponada, tal como una disolución salada o un medio basal de tipo cultivo celular, al cual se añade una variedad de suplementos definidos. En una realización preferida, la

disolución de resucitación del presente invento también emplea tal disolución básica que contiene aminoácidos, iones, sales fisiológicas, impermeantes, proteínas y/o factores séricos, y azúcares. Además de los compuestos de la disolución base, la disolución de resucitación del presente invento contiene una nueva combinación de suplementos que pueden ser agrupados en al menos 3 categorías de componentes. Se puede apreciar por aquellos con experiencia en la técnica que los componentes en cada categoría pueden ser sustituidos por un compuesto funcionalmente equivalente para lograr el mismo resultado. Así, las siguientes especies de componentes listadas en cada categoría de componentes es para propósitos de ilustración, y no limitación.

Una primera categoría de componentes, vasodilatadores, comprende una combinación de componentes en una cantidad fisiológicamente eficaz que proporciona un medio para dilatar adecuadamente vasos grandes vía relajación de células de músculo liso, así como dilatar adecuadamente microvasos. Para asegurar que la permeabilidad normal de la vasculatura es mantenida, la vasodilatación es controlada en una manera dependiente de células endoteliales. Tal combinación de componentes puede incluir (i) sustratos para la vasodilatación mediada por células endoteliales, tal como acetilcolina, dopamina, bradiquinina, y arginina; (ii) sustratos para dilatación de microvasos, tal como prostaciclina (y análogos, es decir, carbaciclina) y Mg^{2+} ; y (iii) adenosina (y análogo, es decir ciclohexiladenosina), y verapamil para sus efectos combinados en dilatación vascular mediada por el bloqueo de canales de calcio (otros bloqueantes de canales de calcio incluyen flunarizina, nifedipina, SNX-11, clorpromazina, y diltiazem). El resultado de usar tal combinación de vasodilatadores es que la vasculatura esté bien dilatada mientras que se conserva simultáneamente su integridad y la función de barrera normal. Los vasodilatadores comprenden desde 1% hasta 50% en volumen (p/v) de la nueva combinación de suplementos que son añadidos a la disolución básica formando la disolución de resucitación del presente invento.

Una segunda categoría de componentes, sustratos de energía química, comprende una combinación de componentes en una cantidad fisiológicamente eficaz que proporciona un medio para restablecer el metabolismo oxidativo que se ha perdido durante el período de privación de flujo sanguíneo. Durante la privación de flujo sanguíneo, la pérdida resultante de la integridad de membrana lleva a la pérdida de componentes intracelulares tales como iones, componentes del grupo de compuestos de adenina, del ciclo de ácido cítrico, y de la cadena transportadora de electrones. Tales sustratos de energía química añadida a la disolución de resucitación puede incluir piruvatos; glucosa; ATP; AMP; coenzima A; β -nicotinamida adenin dinucleótido (NAD^{+}); β -nicotinamida adenin dinucleótido fosfato ($NADP^{+}$); flavín adenin dinucleótido (FAD); cloruro de tiamina pirofosfato (cocarboxilasa); uridina 5' trifosfato (UTP); cloruro; adenosina; magnesio; y una combinación de los mismos. Si el suministro de energía es restablecido en las células tisulares antes de que la muerte de las células tenga lugar, los cambios celulares durante el período de privación de flujo sanguíneo pueden ser revertidos, y el volumen de células tisulares vuelve al normal. Los sustratos de energía química comprenden desde 0.01% hasta 90% en volumen de la combinación nueva de suplementos que son añadidos a la disolución básica que forma la disolución de resucitación del presente invento.

Una tercera categoría de componentes, factores tróficos, comprende una combinación de componentes en una cantidad fisiológicamente eficaz que proporciona un medio para promover uno o más procesos de reparación celular para restablecer la función celular perdida durante el período de privación de flujo sanguíneo. La combinación de factores tróficos proporciona un medio para promover la síntesis proteica que conduce al restablecimiento de uniones celulares más fuertes y la regeneración de la polaridad de membrana conduciendo así a la recuperación de la función celular. Tales factores tróficos añadidos a la disolución de resucitación pueden incluir un concentración elevada de aminoácidos y magnesio (por ejemplo, 2 a 6 veces la concentración en plasma típica), derivados de ácidos nucleicos, y ribonucleótidos; y factores de crecimiento con potenciadores de membrana, tales como factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF), FGF básico, heparina y condroitín sulfato, y combinaciones de los mismos. Los factores tróficos comprenden desde 1% hasta 90% en volumen de la combinación nueva y suplementos que son añadidos a, y disueltos en, la disolución básica para formar la disolución de resucitación del presente invento.

Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica que los componentes en una cualquiera o más de las tres categorías de componentes pueden tener funciones deseables adicionales para el proceso según el presente invento. Por ejemplo, iones de magnesio (introducidos como parte de un compuesto que lleva magnesio) actúan tanto como vasodilatadores y como sustrato de energía química; y la glucosa actúa tanto como un factor trófico y como sustrato de energía química. Además, en una realización preferida, los aminoácidos contenidos en la disolución de resucitación incluyen cistina y cisteína en cantidades que, a parte de funcionar como factores tróficos, funcionan también como antioxidantes, preferiblemente como eliminadores de radicales libres que eliminan radicales libres tóxicos durante las etapas de lavado y perfusión del proceso. Otros antioxidantes, tales como glutatión, ciclodextrina, superóxido dismutasa (SOD), catalasa, clorpromazina, y prostaciclina pueden ser incluidos, o usados como compuestos funcionalmente equivalentes, en la disolución de resucitación del presente invento. Tales antioxidantes comprenden desde 0.000% hasta 10% en volumen de la combinación nueva de suplementos que son añadidos a, y disueltos en, la disolución básica que forma la disolución de resucitación del presente invento.

En otra realización del presente invento, en el que el tejido a ser resucitado usando la disolución de resucitación según el presente invento implica tejido neurológico (por ejemplo, cerebro), la disolución de resucitación puede comprender además drogas neuroprotectoras tales como agentes de bloqueo del receptor de NMDA (agentes bloqueantes de los canales iónicos del receptor de NMDA, por ejemplo, Aptiganel y Cerestat; agentes bloqueantes del sitio de glicina del receptor NMDA, por ejemplo ZD 9379 y GV 150-562A), agentes bloqueantes de la acumulación de óxido

ES 2 296 310 T3

nítrico (NO) (por ejemplo, lubeluzol), y bloqueantes de canales de sodio para inhibir el influjo de sodio en células que puede desencadenar la liberación de glutamato (por ejemplo, BW619-C89, fosfenitoina).

5 En otra realización del presente invento, más que introducir el oxígeno molecular vía un oxigenador en el proceso, la disolución de resucitación contiene uno o más compuestos transportadores de oxígenos (“agentes transportadores de oxígeno”) que funcionan para proporcionar oxígeno molecular para metabolismo oxidativo al órgano dañado is-
10 quémicamente y lesionado. Tales agentes transportadores de oxígeno son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, hemoglobina, derivados estabilizados de hemoglobina (hechos a partir de eritrocitos humanos hemolizados tales como hemoglobina piridoxilada), conjugados polioxietilenos (PHP), productos de hemoglobina recombinante, emulsiones perfluoroquímicas (PFC) y/o microburbujas perfluoroquímicas (llamadas colectivamente “agentes perfluoroquímicos”). Tales agentes transportadores de oxígenos comprenden desde 0,000% hasta 50% en volumen de una combinación nueva de suplementos que son añadidos a, y disueltos en, la disolución básica que forman la disolución de resucitación del presente invento; o 0,000% hasta 20% de la disolución de resuci-
15 cación total.

Las emulsiones de PFC conocidas por ser útiles como agentes que transportan oxígeno son descritas, por ejem-
20 plo, en los números de patente norteamericana: 5.403.575, 4.868.318, 4.866.096, 4.865.836, 4.686.024, 4.534.978, 4.443.480, 4.423.077, 4.252.827, 4.187.252, 4.186.253, 4.110.474, y 3.962.439. Tales emulsiones de PFC líquido incluyen bromuro de perfluorooctilo, dibromuro de perfluorooctilo, bromofluorocarbonos, perfluoroéter, Fluosol DA™, F-44E, 1,2-bisperfluorobutil-etileno, F-4-metil octahidroquinol-idizina, perfluoro aminos de 9 a 12 carbonos, per-
25 fluorodecalino, perfluoroindano, perfluoro-trimetil biciclo [3,3,1] onano, perfluorometil adamantano, perfluorodimetil adamantano. Las microburbujas de PFC que pueden ser útiles, como agentes transportadores de oxígeno, son descritas, por ejemplo, en la patente norteamericana 5.409.688 y 5.393.524. Las PFCs que son descritas como que son útiles por crear tales microburbujas incluyen dodecafluoropentano (DDFP), sulfuro de hexafluoruro, pentano, hexafluoropropile-
30 no, octafluoropropano, hexafluoretano, octafluor-2-butino, hexafluorbuta-1,3-dieno, isopreno, octafluorociclobutano, decafluorobutano, cis-2-pentano, dimetil sulfuro, etilarsina, bromoclorofluorometano, trans-2-pentano, 2 cloropropa-
no, hexafluorodisulfato, etilmercaptano, dietiléter, etilviniléter, valileno, trisfluoroarsina, bromuro furfurilo, cloruro de cis-propileno, fluoruro de butilo, 1,1 dicloroetano, metil isopropil éter, isopropilamina, metilformiato, 2-acetil-furano, etilfluoruro, 1-penteno, isopropilacetileno, perfluoropentano, isopentano, éter de vinilo, 2-butino, 1,4-pentadieno, tetrametil silano, dimetil fosfina, dibromodifluorometano, 2-cloro-propano, difluoroiodometano, acetaldehído, trimetil borato, 3-metil-2-butano, 1,1 dimetilciclopropano, aminoetano, bromuro de vinilo, disilanometano, triclorofluorome-
35 tano, bromofluoro-metano, trifluorodiclora-etano, perfluoropentano, y otros fluoruros que contienen hidrocarburos (patente norteamericana No. 5.409.688). En un proceso para preparar la disolución de resucitación según el presente invento, se añade a una disolución básica y se disuelve ahí una combinación original de suplementos que pueden ser agrupados en al menos 3 categorías de componentes que comprenden vasodilatadores, sustratos de energía química y factores tróficos.

Aunque la composición de la solución de resucitación, para el uso con el proceso según el presente invento, puede variar por componente e intervalos de componentes como se describe anteriormente, una formulación preferida es
40 expuesta abajo en la Tabla 1 para propósitos de ilustración y no limitación (nótese que un componente que puede funcionar en más de una de las al menos 3 categorías de componentes es colocado en una categoría inferior, para propósitos de claridad).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 296 310 T3

TABLA 1

*Suplementos añadidos a la disolución básica
(Las cantidades son miligramos por litro de disolución básica)*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Vasodilatadores	Cantidad
Arginina	140
Acetilcolina	2
Verapamil	0,2
Prostaciclina	0,06
Magnesio	600
Sustratos de energía química	
ATP	2
AMP	2
UTP	4
Coenzima A	10
Sifosfopiridín nucleótido	28
FAD	4
Trifosfopiridín nucleótido monosódico	4
Cocarboxilasa	4
Factores tróficos	
FGFs ácidos y/o básicos	200
Pioruvato	220
Glucosa	2.000
Heparina	180
Insulina	10
(derivados de ácidos nucleicos)	
Desoxiadenosina	40
Desoxiguanosina	40
Desoxicitidina	40
Timidina	40
(Ribonucleótidos)	
Adenosina	40
Citidina	40
Guanosina	40
Uridina	40

ES 2 296 310 T3

La disolución de resucitación así preparada debería tener una osmolaridad > 330 mOsm pero preferiblemente menor que 600 mOsm, y en un intervalo preferible de alrededor de 350 Osm hasta alrededor de 400 mOsm. El pH de la disolución de resucitación debería ser ajustado a un pH dentro de un intervalo de pH de alrededor de 6,5 hasta alrededor de 7,5 y preferiblemente en un intervalo de pH de 7,3 hasta 7,45.

Como se indica, en otra realización la disolución de resucitación puede comprender además antioxidantes adicionales, y uno o más agentes que transportan oxígeno como se indica (por litro de disolución básica):

Antioxidantes	Cantidad
Glutación	.1mg
Ciclodextrina	500 mg
Agente transportador de oxígeno	
Agente perfluorquímico	20% v/v

Ejemplo 3

Efecto de privación de sangre

Los experimentos fueron conducidos para mostrar el efecto de la isquemia caliente, causada por privar a un órgano de flujo sanguíneo durante aproximadamente 30 minutos. Tal isquemia caliente conduce a una deterioración rápida de la integridad celular. La cascada de daños isquémicos empieza con la pérdida del conjunto compuesto de adenina, que conduce al edema. La pérdida de la integridad celular y la aparición del edema da como resultado el colapso de la integridad vascular y la pérdida de la función de permeabilidad normal. En un órgano tal como el riñón, el daño isquémico causado por privar al riñón de flujo sanguíneo durante tan sólo 30 minutos puede ser visto como causa de vasoconstricciones profundas. Las vasoconstricciones profundas dan como resultado unos intervalos de flujo inadecuados que perfunden adecuadamente el riñón. Una resistencia vascular alta, en los vasos vasoconstrictores, conduce a una deterioración adicional con anoxia secundaria, por lo que conduce a una pérdida de capacidad funcional (es decir, falta de producción de orina). La Tabla 2 ilustra una comparación de características de perfusión (presión; caudal; y resistencia vascular) y función orgánica (producción de orina) en un sistema de modelo de animal experimental que comprende riñones de ternera bovina que no han sido privados de flujo sanguíneo ("normal"), y riñones de ternera bovina privados de flujo sanguíneo durante sólo 30 minutos ("isquémico"). La resistencia vascular es la media de la presión/media del caudal.

TABLA 2

Parámetros	Normal	Isquémico
Numero de riñones	25	5
Presión media	50/30	44/40
Caudal medio	> 95 cc/min	12.9 cc/min
Resistencia vascular media	0,4	3.26
Producción de orina	Si	no

Ejemplo 4

Los efectos del proceso de resucitación y de la disolución

Los experimentos fueron conducidos para mostrar la capacidad del proceso y la disolución de resucitación según el presente invento para superar, más que sólo inhibir, los efectos de la isquemia caliente en los órganos y ayudar

ES 2 296 310 T3

en un proceso de reparación a tal grado que la alteración de la función del órgano pueda ser revertida. Los riñones fueron obtenidos de terneras bovinas eutanasiadas. A los 30 minutos ó 60 minutos de privación de flujo sanguíneo, los riñones fueron retirados por incisión en la línea media. No se dio ningún tratamiento antes de retirar los riñones, incluyendo la no administración de anticoagulantes. Cada riñón testigo experimentó 30 minutos de privación de flujo sanguíneo por lo que sufrió daños isquémicos durante ese periodo. Los riñones testigo, después de retirarlos, fueron enjuagados con 100 cc de un medio de cultivo celular basal a una temperatura de 32°C, de modo que los riñones fueron limpiados de la sangre que quedaba en sus respectivos compartimentos vasculares. Cada riñón de ensayo experimentó 60 minutos de privación de flujo sanguíneo por lo que sufrió daños isquémicos durante ese período. Los riñones de ensayo, después de retirarlos, fueron enjuagados con 100 cc de la disolución de resucitación a una temperatura de 32°C. Después del enjuague, los riñones respectivos fueron bombeados con un sistema de conservación de transporte MOX-100™ modificado. Los riñones testigo fueron bombeados a 32°C, usando la tecnología previamente desarrollada para conservar los órganos usando la tecnología de conservación caliente, usando el medio de cultivo celular basal como un perfundido. Los riñones de ensayo fueron bombeados usando el proceso y solución de resucitación según el presente invento, a 32°C. Una comparación de las características de perfusión (presión; caudal; y resistencia vascular) y la función de los órganos (producción de orina) del grupo de control (30 minutos sin el invento) con el grupo de prueba (60 minutos con invento) es ilustrada en la Tabla 3.

TABLA 3

Parámetros	30' sin invento	60' con invento
Número de riñones	5	16
Presión media	44/40	54/25
Caudal medio	12,9 cc/min	97,4 cc/min
Resistencia vascular media	3,26	0,47
Producción de orina	Ninguna	si

Los riñones de ensayo, después de sufrir daños isquémicos por un período de una hora, los cuales fueron después resucitados con el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento, demostraron las características de perfusión (presión; caudal; y resistencia vascular) y la función de los órganos (producción de orina) dentro del intervalo funcional de los riñones normales ilustrados en la Tabla 2. De esta manera, es demostrada la capacidad del proceso y la disolución de resucitación según el presente invento para superar, más que sólo inhibir, los efectos de la isquemia caliente en los órganos y apoyar un proceso de reparación a tal grado que la discapacidad de la función del órgano pueda ser revertida.

Ejemplo 5

Efectividad con la variación de los tiempos de daño

Los experimentos fueron conducidos para evaluar los efectos del proceso y la disolución de resucitación según el presente invento en los órganos que han sido privados de flujo sanguíneo por unos períodos de tiempo mayores que 1 hora. Los riñones de ternera bovina fueron retirados de las terneras eutanasiadas en diversos períodos de tiempo de privación de flujo sanguíneo incluyendo 60 minutos, 90 minutos, 2 horas ó 4 horas. Ningún tratamiento fue dado antes de retirar los riñones, incluyendo la no administración de anticoagulantes. Cada riñón fue después enjuagado con 100 cc de la disolución de resucitación según el presente invento a una temperatura de 32°C. En ningún caso ninguno de los riñones se encontró que tuviera sangre coagulada en el compartimento vascular. La sangre parece mantenerse fluida siempre que esté en contacto con el endotelio vascular viable. Después del enjuague, los riñones respectivos fueron bombeados durante varias horas usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento, a 30°C. Una comparación de las características de perfusión media (presión; caudal; y resistencia vascular) y la función de los órganos (concentración de creatinina en orina/eliminación de creatinina; histología) de los riñones privados de flujo sanguíneo durante 60 minutos (60'), riñones privados de flujo sanguíneo durante 90 minutos (90'), riñones privados de flujo sanguíneo durante 2 horas (120'), y riñones privados de flujo sanguíneo durante 4 horas (240') se muestran en la Tabla 4.

ES 2 296 310 T3

TABLA 4

Parámetro	60' (N=16)	90' (N=5)	120' (N=5)	240' (N=2)
Presión (mmHg)	54/25	58/37	55/37	52/40
Caudal (cc/min)	97,4	72	68,6	36,5
Resistencia vascular	0,47	0,67	0,73	1,27
Creatinina (mg/dl)	41,8	22,9	18,5	23,5
Histología	Bien conservada	Bien conservada con aplastamiento focal del epitelio	Bien en conjunto; edema focal	Necrosis focal temprana

Los resultados mostraron que el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento pueden resucitar un órgano dañado isquémicamente en períodos de tiempo de al menos hasta 4 horas de privación de flujo sanguíneo. Por ejemplo, cuando un riñón, que ha sufrido 60 minutos de daño isquémico cálido, es bombeado durante 2 horas usando el proceso y la disolución de resucitación, las características de perfusión son equivalentes a las de los riñones normales como se muestra en la Tabla 1. Las evaluaciones histológicas soportan los datos funcionales, ya que las secciones de tejido examinadas muestran que la morfología y la integridad parecen bien conservadas.

A 90 minutos y 120 minutos de privación de flujo sanguíneo, estos riñones reflejan una incapacidad celular más extensa (es decir, presiones diastólicas elevadas y caudales reducidos) que los riñones privados de flujo sanguíneo durante 60 minutos. Sin embargo, a pesar de tal incapacidad celular, estos riñones producen todavía orina; e histológicamente aparecen bien conservados. Además, no se detecta necrosis en estos riñones. Los riñones privados de flujo sanguíneo durante 4 horas exhibieron flujos reducidos sustancialmente, con una elevación concomitante en las presiones diastólicas que incluyen constricción en los lechos de los microvasos. Sin embargo, es importante señalar que estos riñones exhibían todavía función orgánica. La orina fue producida con una concentración de creatinina en orina de 23,5 mg/dL.

Histológicamente, estos riñones mostraron los primeros signos de necrosis focal, temprana. Características mitóticas fueron observadas adyacentes a las áreas de la necrosis de tubulos focal, indicando que un proceso reparador activo parece haber sido iniciado. De este modo, incluso después de 4 horas de privación de flujo sanguíneo, se demuestra la capacidad del proceso y la disolución de resucitación según el presente invento para superar, más que sólo inhibir, los efectos de la isquemia caliente en los órganos y apoyar un proceso de reparación a tal grado que la discapacidad de la función del órgano pueda ser revertida.

Es importante notar que los riñones testigo (sin tratamiento con el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento) fueron evaluados histológicamente después de bien 2 ó 4 horas de privación de flujo sanguíneo para determinar el beneficio relativo del proceso y la disolución de resucitación. La evaluación histológica de los riñones testigo que sufrieron 2 horas de isquemia caliente mostró necrosis tubular difusa temprana. A 4 horas de daño de isquemia caliente, los riñones testigo mostraron una descomposición difusa de las células tubulares. En contraste, en los riñones sufriendo 2 horas de isquemia caliente, y luego tratados con el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento, mostraron integridad celular reestablecida. Además, los riñones que sufrieron 4 horas de isquemia caliente, y luego fueron tratados con el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento, sólo mostraron necrosis tubular focal, como se compara con el daño tubular extendido en los riñones testigo. Las evaluaciones histológicas apoyan además la eficacia sustancial del proceso y la disolución de resucitación según el presente invento en invertir la cascada de los eventos de isquemia cálida después de la privación de flujo sanguíneo.

Ejemplo 6

Función in vivo de un órgano resucitado

5 A Alotransplante

Un órgano resucitado usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento fue evaluado en lo que se refiere a una función *in vivo* subsiguiente a la resucitación. Un alotransplante canino fue realizado dejando un período de privación de flujo sanguíneo de 60 minutos *postmortem*, retirando un riñón de un donante canino; enjuagando el órgano con la disolución de resucitación según el presente invento; y perfundiendo el órgano durante 2 horas, usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento, entre 30 y 32°C. Siguiendo el proceso de resucitación, el riñón fue luego autotransplantado a un receptor canino con una nefrectomía bilateral simultánea de los riñones del receptor. Por tanto, el receptor canino fue dependiente del riñón resucitado para sobrevivir. El curso postransplante del receptor canino se muestra en las Figs. 2 y 3.

15 El riñón reperfundió bien y produjo orina dentro de las dos horas después del transplante. El riñón continuó produciendo orina a lo largo del período postransplante observado. Como se muestra en la Fig. 2, el receptor experimentó un ligero aumento en creatinina sérica a un nivel por encima de 2 mg/dl a las 24 horas después del transplante. La creatinina sérica volvió a un intervalo normal dentro de las 48 horas postransplante. Los parámetros químicos del suero permanecieron normales hasta el décimo día postransplante, cuando tuvo lugar un agudo rechazo del órgano (un régimen de inmunosupresión insuficiente fue administrado al receptor canino). Como se muestra en la Fig. 3, el valor de creatinina en orina aumentó rápidamente y estuvo dentro de un intervalo normal de aproximadamente 70 mg/dl dentro de las 48 horas postransplante. Este leve episodio de necrosis tubular aguda (ATN) que ocurrió inicialmente, fue rápidamente invertido dentro de las 48 horas postransplante. La naturaleza reversible de la necrosis tubular aguda, junto con la capacidad del riñón transplantado de soportar la supervivencia continuada del receptor, demostró la viabilidad y la función *in vivo* del órgano transplantado que había sufrido más de 60 minutos de isquemia caliente. Así pues, un órgano resucitado usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento puede funcionar *in vivo* subsiguiente a la resucitación.

30 B Autotransplante

En otra realización, un órgano resucitado usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento fue evaluado en lo que se refiere a una función *in vivo* subsiguiente a la resucitación. Usando dos perros, se realizó un auto transplante canino retirando los riñones izquierdos, que fueron luego dañados mediante isquemia caliente en un baño salino a 37°C durante 2 horas. Siguiendo el período de isquemia caliente, los riñones fueron encanulados y enjuagados con la disolución de resucitación según el presente invento; y perfundidos durante 2 horas, usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento, entre 30 y 32°C. Siguiendo el proceso de resucitación, los riñones fueron auto transplantados con una nefrectomía simultánea del riñón contralateral no tratado. Por tanto, cada perro receptor fue únicamente dependiente del riñón resucitado para su supervivencia. El curso postransplante de los perros receptores se muestra en las Figs. 4 y 5.

El riñón reperfundió bien y produjo orina a las pocas horas del transplante. Los riñones continuaron a producir orina a lo largo del período postransplante observado. Como se muestra en la Fig. 4, ambos perros experimentaron un ligero aumento en creatinina sérica consistente con ATN. En cada caso, un valor pico de creatinina sérica tuvo lugar al tercer día postransplante con valores de 3,5 mg/dl y 2,8 mg/dl, respectivamente. Sin embargo, los niveles de creatinina sérica volvieron a un intervalo normal dentro del décimo día postransplante. Los parámetros químicos del suero permanecieron normales durante el resto del período postransplante observado. Como se muestra en la Fig. 5, el valor de creatinina en orina aumentó rápidamente y estuvo dentro de un intervalo normal varios días antes de la normalización de los parámetros químicos en suero. Tras la eutanasia, los hallazgos histológicos revelaron esencialmente riñones normales. Estos hallazgos son indicativos de la regeneración del epitelio tubular. La naturaleza reversible de la necrosis tubular aguda, junto con la capacidad del riñón transplantado de soportar la supervivencia continuada del receptor, demostró la viabilidad y la función *in vivo* del órgano transplantado que había sufrido más de 2 horas de isquemia caliente. Así pues, un órgano resucitado usando el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento puede funcionar *in vivo* subsiguiente a la resucitación.

Ejemplo 7

Comparación con las disoluciones de conservación conocidas

60 Los órganos fueron resucitados usando o bien el proceso y la disolución de resucitación según el presente invento, o una disolución de conservación conocida en la técnica (o bien un medio de cultivo basal RSM-210™, o VIASPAN™), y luego comparado en lo que se refiere a función e histología. Cada grupo de riñones que sufrieron 60 minutos de privación de flujo sanguíneo fue enjuagado a 32°C usando la disolución respectiva, y luego perfundida durante 2 horas con la disolución respectiva: VIASPAN™ a 4°C; o RSM-210™ o la disolución de resucitación según el presente invento a 30-32°C, usando el mismo proceso para la resucitación. Una comparación de las características de la perfusión media (presión; flujo; y resistencia vascular) y la función orgánica (concentración de creatinina en orina;

ES 2 296 310 T3

histología) de los riñones privados de flujo sanguíneo durante 60 minutos y tratados con la disolución respectiva se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5

Parámetro	Disolución de resucitación	RSM-210™	ViaSpan™
Presión (mmHg)	54/25	44/40	54/46
caudal (cc/min)	97,4	12,9	27
Resistencia vascular	0,47	3,25	1,8
Creatinina (mg/dl)	41,8	No orina	No orina
Histología	Bien conservada	Bien conservada	Inflamación de los glomérulos, necrosis tubular temprana

Los resultados mostrados en la Tabla 5 demuestran que la disolución de resucitación según el presente invento tiene una capacidad superior, comparada con la de RSM-210™ y VIASPAN™, para restaurar las características vasculares, así como la función en los órganos isquémicamente dañados. Por ejemplo, los riñones enjuagados y perfundidos usando la disolución de resucitación según el presente invento en el proceso de resucitación deseado mostró vasoconstricción reducida, y flujos más altos comparados con los enjuagados y perfundidos con RSM-210™ y VIASPAN™. Similarmente, los riñones enjuagados y perfundidos usando la disolución de resucitación según el presente invento fueron los únicos riñones en los que la función del órgano fue restablecida, dando como resultado una producción de orina con secreción concordante de creatinina.

Histológicamente, sólo los riñones enjuagados y perfundidos usando la disolución de resucitación según el presente invento o con RSM-210™, fueron restaurados y conservados suficientemente como se indicó por la arquitectura renal bien conservada. En contraste, estos riñones enjuagados y perfundidos con la disolución VIASPAN™ demostraron evidencia de daños histológicos incluyendo inflamación de los glomérulos y necrosis tubular. Demostrada es la capacidad superior, como se comparó con las disoluciones de conservación conocidas por aquellos con experiencia en la técnica, del proceso y la disolución de resucitación según el presente invento para superar los efectos de la isquemia cálida en los órganos, y soportar un proceso de reparación al grado que la incapacidad de la función del órgano pueda ser revertida.

Ejemplo 8

Distribución de oxígeno en el proceso de resucitación

Como se discutió en detalle anteriormente, una realización del presente invento es la de incluir como componente en la formulación de la disolución de resucitación uno o más agentes que transportan oxígeno. Se evaluaron los efectos de diversos agentes que transportan oxígeno como un componente en la disolución de resucitación, y su papel relativo de distribución de oxígeno molecular; y la capacidad del proceso y la disolución de resucitación según el presente invento para soportar el metabolismo oxidativo en curso. La disolución de resucitación no complementada con un agente que transporta oxígeno (en la Tabla 6, aparece como "RS"), la disolución de resucitación complementada con células de glóbulos rojos lavadas (en la Tabla 6, aparece como "RS-RBC"; 15% v/v), la disolución de resucitación complementada con hemoglobina purificada (en la Tabla 6, aparece como "RS-Hgb"; 60 cc/litro de una preparación comercial), y la disolución de resucitación complementada con emulsión perfluoroquímica (en la Tabla 6, aparece como "RS-Pf"; 20% v/v) fueron usadas cada una para resucitar riñones que sufrieron desde 60 minutos de esquemia

ES 2 296 310 T3

caliente. Cada grupo de riñones que sufrieron desde 60 minutos de privación de flujo sanguíneo fueron enjuagados a 30 hasta 32°C usando la disolución respectiva, y luego perfundidos a 30 hasta 32°C durante 2 horas con la disolución respectiva usando el mismo proceso para la resucitación. Una comparación de las características de perfusión media (presión; caudal; y resistencia vascular) y de la función orgánica (orina, concentración de creatinina; histología) de los riñones privados de flujo sanguíneo durante 60 minutos y tratados con la disolución respectiva se muestra en la tabla 6.

TABLA 6

Disolución	Presión (mmHg)	Caudal (cc/min)	Resistencia vascular	Creatinina	Histología
RS	54/38	92.3	0,50	8,4	Bien conservada
RS-RBC	56/36	98,2	0,58	8,3	Bien conservada
RS-Hgb	58/42	66,67	0,75	18	Bien conservada
RS-Pf	54/25	97,4	0,47	41,8	Bien conservada

Los resultados mostrados en la Tabla 6 demuestran que según aumenta la concentración del oxígeno molecular en la disolución de resucitación, vía un agente transportador de oxígeno más eficaz como un componente en la disolución de resucitación, la función orgánica es mejorada como resultado del proceso de resucitación. Por ejemplo, los agentes perfluoroquímicos transportadores de oxígeno eficaces o hemoglobina purificada dan como resultado una concentración más alta de oxígeno molecular distribuido durante el proceso. La función de los riñones tratados con la disolución de resucitación que contiene o bien estos agentes de transporte es mejorada por encima de la de los riñones tratados con disolución de resucitación que carecen de un agente que transporta oxígeno añadido, o que contienen un agente que transporta oxígeno menos eficaz. Por ejemplo, usando la disolución de resucitación con bien hemoglobina purificada o bien agentes perfluoroquímicos según el presente invento dio como resultado una concentración de creatinina de orina media de 18 mg/dl y 41,8 mg/dl, respectivamente. En contraste, cuando un oxigenador no es usado en el proceso de resucitación y la disolución de resucitación carece de un agente que transporta oxígeno, o contiene una concentración baja de células de glóbulos rojos lavadas, la creatinina urinaria media es de 8,4 mg/dl y 8,3 mg/dl, respectivamente. Demostrada es otra realización de la disolución de resucitación en la que, por adición de uno o más agentes que transportan oxígeno eficaz como un componente en la disolución, la función orgánica mejorada se nota en un órgano dañado isquémicamente tratado mediante el proceso del presente invento.

Ejemplo 9

El proceso y la disolución de resucitación según el presente invento pueden ser usados para superar los efectos de la isquemia caliente en el hígado privado de flujo sanguíneo, y soportar un proceso de reparación a tal grado que el daño de la función del hígado puede ser invertido. Mientras la duración del tiempo necesario para la perfusión puede depender de la duración del tiempo de la privación de flujo sanguíneo, el tratamiento de un hígado dañado isquémicamente con el proceso (enjuague y perfusión) según el presente invento durante aproximadamente 2 horas podría ser suficiente en la resucitación de la mayoría de los hígados (por ejemplo, privados de flujo sanguíneo durante alrededor de entre 0,5 y 4 horas) para la reanudación de la función orgánica. En general la función del hígado, así como los aspectos individuales de la fisiología del hígado, pueden ser determinados por la medición de las concentraciones de los constituyentes en tanto el perfundido circulado como el producto del hígado (bilis). Las características funcionales del hígado pueden ser evaluadas por medición de los parámetros que incluyen, pero no se limitan a, concentraciones de bilis de sales de bilis, colesterol, fosfatasa alcalina; pH de la bilis; y caudal vascular del hígado, consumo de oxígeno, y utilización de glucosa (medida a partir de la perfusión). Así, de acuerdo con el proceso y las disoluciones como se ilustran en los Ejemplos 1 y 2, el hígado isquémicamente dañado podría ser tratado y luego eventualmente evaluado en lo que se refiere a la función metabólica.

Ejemplo 10

El proceso y la disolución de resucitación según el presente invento pueden ser usados para superar los efectos de la isquemia caliente en el páncreas deprivado de flujo sanguíneo, y soportar un proceso de reparación a tal grado que el

5 daño de la función del páncreas puede ser invertido. Mientras la duración del tiempo necesario para la perfusión puede depender de la duración del tiempo de la deprivación de flujo sanguíneo, el tratamiento de un páncreas isquémicamente

10 dañado con el proceso (enjuague y perfusión) según el presente invento durante aproximadamente 2 horas podría ser suficiente en la resucitación de la mayoría de los páncreas (por ejemplo, deprivados de flujo sanguíneo durante

15 alrededor de entre 0,5 y 4 horas) para la reanudación de la función orgánica. En general la función del páncreas, así como los aspectos individuales de la fisiología del páncreas, pueden ser determinados por la medición de las concentraciones de los constituyentes tanto en el perfundido circulado como en el páncreas. Las características funcionales del páncreas incluyen concentraciones de enzimas pancreáticas tales como amilasa, lipasa; la hormona de insulina; pH de la secreción pancreática, sodio y potasio; y caudal vascular del páncreas, consumo de oxígeno, y utilización de glucosa (como se mide de los perfundidos). Así, de acuerdo con el proceso y las disoluciones como se ilustra en los

20 Ejemplos 1 y 2, el páncreas isquémicamente dañado podría ser tratado y luego eventualmente evaluado en lo que se refiere a la función metabólica.

Ejemplo 11

El proceso y la disolución de resucitación según el presente invento pueden ser usados para superar los efectos de la isquemia caliente en un corazón deprivado de flujo sanguíneo, y soportar un proceso de reparación a tal grado que el

20 daño de la función del corazón puede ser invertido. Mientras la duración del tiempo necesario para la perfusión puede depender de la duración del tiempo de la deprivación de flujo sanguíneo, el tratamiento de un corazón isquémicamente

25 dañado con el proceso (enjuague y perfusión) según el presente invento durante aproximadamente 2 horas podría ser suficiente en la resucitación de la mayoría de los corazones (por ejemplo, deprivados de flujo sanguíneo durante

30 alrededor de entre 0,5 y 4 horas) para la reanudación de la función orgánica. En general la función cardíaca, así como los aspectos individuales de la fisiología del corazón, pueden ser determinados por la medición de las concentraciones de los constituyentes tanto en el perfundido circulado como en el corazón. Las características funcionales del corazón pueden ser evaluadas por medición de los parámetros que incluyen, pero no limitados a, trabajo eléctrico y mecánico, enzimas de corazón tales como las transaminasas (aspartato aminotransferasa, AST), lactato deshidrogenasa (LD), aldolasa de la fructosa 1,6 difosfato (ALS), malato deshidrogenasa (MD), glutatión reductasa (GR), creatina fosfoquinasa (CPK), hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD); caudal vascular del corazón, consumo de oxígeno, y utilización de glucosa (como se mide de los perfundidos). Así, de acuerdo con el proceso y las disoluciones como se ilustra en los

35 Ejemplos 1 y 2, el corazón isquémicamente dañado podría ser tratado y luego eventualmente evaluado en lo que se refiere a la función metabólica.

Ejemplo 12

El proceso y la disolución de resucitación según el presente invento pueden ser usados para superar los efectos de la isquemia caliente en un intestino delgado deprivado de flujo sanguíneo, y soportar un proceso de reparación a tal grado que el

40 daño de la función del intestino delgado puede ser invertido. Mientras la duración del tiempo necesario para la perfusión puede depender de la duración del tiempo de la deprivación de flujo sanguíneo, el tratamiento de un intestino delgado isquémicamente

45 dañado con el proceso (enjuague y perfusión) según el presente invento durante aproximadamente 2 horas podría ser suficiente en la resucitación de la mayoría de los intestinos delgados (por ejemplo, deprivados de flujo sanguíneo durante

50 alrededor de entre 0,5 y 4 horas) para la reanudación de la función orgánica. En general la función intestinal, así como los aspectos individuales de la fisiología del intestino delgado, pueden ser determinados por la medición de las concentraciones de los constituyentes en ambos perfundidos circulados y el intestino delgado. Las características funcionales del intestino delgado pueden ser evaluadas por medición de los parámetros que incluyen, pero se limitan a, ensayos funcionales tales como ensayos de estimulación de ácidos gástricos y ensayos de absorción usando moléculas trazadoras, caudal vascular del intestino delgado, consumo de oxígeno, y utilización de glucosa (como se mide de los perfundidos). Así, de acuerdo con el proceso y las disoluciones como se ilustra en los

55 Ejemplos 1 y 2, el intestino delgado isquémicamente dañado podría ser tratado y luego evaluado potencialmente para la función metabólica.

Ejemplo 13

El proceso y la disolución de resucitación según el presente invento pueden ser usados para superar los efectos de la isquemia caliente en un pulmón deprivado de flujo sanguíneo, y soportar un proceso de reparación a tal grado que el

60 daño de la función del pulmón puede ser invertido.

Puede ser deseable tratar primero el trasplante de pulmón con un tensioactivo justo antes de la perfusión (véase, por ejemplo, Erasmus y otros, 1996, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153:665-670). Mientras la duración del tiempo necesario para la perfusión puede depender de la duración del tiempo de la deprivación de flujo sanguíneo, el tratamiento de un pulmón isquémicamente dañado con el proceso (enjuague y perfusión) según el presente invento durante

65 aproximadamente 2 horas podría ser suficiente en la resucitación de la mayoría de los pulmones (por ejemplo, de-

ES 2 296 310 T3

privados de flujo sanguíneo durante alrededor de entre 0,5 y 4 horas) para la reanudación de la función orgánica. En general la función pulmonar, así como los aspectos individuales de la fisiología del pulmón, pueden ser determinados por la medición de las concentraciones de los constituyentes en los perfundidos circulados tales como niveles de la proteína A tensioactiva (SP-A). Las características funcionales del pulmón pueden ser evaluadas por medición de los parámetros que incluyen, pero no se limitan a, FVC (capacidad vital forzada), FEV1 (volumen expiratorio forzado en 1 segundo), PEFR (pico del caudal expiratorio), VA (volumen alveolar medio), TLC (capacidad pulmonar total), y DLCO (transferencia por monóxido de carbono). Así, de acuerdo con el proceso y las disoluciones como se ilustra en los Ejemplos 1 y 2, el pulmón isquémicamente dañado podría ser tratado y luego evaluado potencialmente para la función metabólica.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un proceso para inducir la reparación de un órgano isquémicamente dañado a tal grado que la alteración de la función del órgano puede ser revertida, dicho proceso comprende el lavado del órgano a una temperatura de alrededor de 28°C hasta 37°C con una disolución fisiológica tamponada para eliminar la sangre y los productos acidóticos que se han acumulado en el órgano durante la privación de flujo sanguíneo; y perfundiendo el órgano a una temperatura de alrededor de 28°C hasta alrededor de 37°C con una disolución fisiológica tamponada que comprende además un vasodilatador para dilatar los vasos sanguíneos dentro del órgano, factores tróficos para restablecer la integridad celular y la función celular restableciendo de ese modo la función del órgano, y al menos un sustrato de energía química seleccionado a partir del grupo que consiste en AMP, UTP, coenzima A, β -nicotinamida adenín dinucleótido (Nad^+), β -nicotinamida adenín dinucleótidos fosfato (NADP), flavín adenín dinucleótido (FAD), difosfopiridín nucleótido, trifosfopiridina nucleótido monosódica y cocarboxilasa, para restablecer el metabolismo oxidativo en el órgano readaptando el órgano a un entorno oxigenado.

15 2. Un proceso según la Reivindicación 1, en el que dicho proceso comprende además introducir oxígeno molecular mediante un modo seleccionado a partir del grupo que consiste en un oxigenador y un agente transportador de oxígeno.

20 3. Un proceso según la reivindicación 1, en el que la perfusión es realizada usando un dispositivo que comprende un sistema de bombeo laminar o pulsátil para suministrar la disolución fisiológica tamponada, y dicho dispositivo incluye además un medio para proporcionar y controlar la presión y la presión de perfusión, un medio para el control de la temperatura, y un medio para proporcionar y controlar la introducción de, y la ventilación de, gases respiratorios, y medios para ensayar o recoger para ensayos la disolución fisiológica tamponada, que ha sido ya perfundida a través del órgano para controlar y medir una o más características funcionales tales como el pH, diversas presiones, caudal, resistencia vascular, constituyentes químicos, oxigenación, concentración del dióxido de carbono, y consumo de oxígeno.

30 4. Un proceso según la Reivindicación 3, en el que la perfusión es realizada usando un segundo dispositivo, junto con el primer dispositivo, para ensayar o recoger para ensayo un producto de un órgano desviado a partir del órgano, en el que la subsiguiente medida de los parámetros del producto del órgano se refiere a la integridad y función del órgano.

35 5. Una disolución de resucitación para inhibir el daño isquémico, y para inducir la reparación del daño isquémico a tal grado que la alteración de la función del órgano es revertida en un órgano privado de flujo sanguíneo, dicha disolución de resucitación comprende una disolución fisiológica tamponada y comprende además:

vasodilatadores en una cantidad fisiológicamente eficaz para dilatar la vasculatura del órgano;

40 al menos un sustrato de energía química seleccionado a partir del grupo que consiste en AMP, UTP, coenzima A, β -nicotinamida adenín dinucleótido (Nad^+), β -nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADP), flavín adenín dinucleótido (FAD), difosfopiridina nucleótido, trifosfopiridina nucleótido monosódica y cocarboxilasa, en una cantidad fisiológicamente eficaz para restablecer el metabolismo oxidativo perdido durante la privación de flujo sanguíneo; y

45 factores tróficos en una cantidad fisiológicamente eficaz para promover uno o más procesos de reparación celular para restablecer la función celular perdida durante la privación del flujo sanguíneo en el órgano.

6. Una disolución de resucitación según la Reivindicación 5, en el que los vasodilatadores comprenden una combinación de componentes seleccionados a partir del grupo que consiste en sustratos para la vasodilatación mediada por células endoteliales, sustratos para la vasodilatación de microvasos, bloqueantes de canales de calcio.

50 7. Una disolución de resucitación según la Reivindicación 6, en la que los sustratos para la vasodilatación mediada por células endoteliales comprenden acetilcolina y arginina, en la que los sustratos para la vasodilatación de microvasos comprende prostaciclina y Mg^+ , y en la que los bloqueantes de canales de calcio comprenden adenosina y verapamil.

55 8. Una disolución de resucitación según la Reivindicación 5, en la que los factores tróficos son seleccionados a partir del grupo que consiste en aminoácidos, magnesio, derivados de ácidos nucleicos, ribonucleósidos, factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF), FGF básico, heparina, condroitín sulfato, y una combinación de los mismos.

60 9. Una disolución de resucitación según la Reivindicación 5, en la que la disolución comprende además, una cantidad fisiológicamente eficaz de un componente seleccionado a partir del grupo que consiste en un antioxidante, un agente transportado de oxígeno, y una combinación de los mismos.

65 10. Una disolución de resucitación según la Reivindicación 5, en la que la disolución comprende además, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un fármaco neuroprotector.

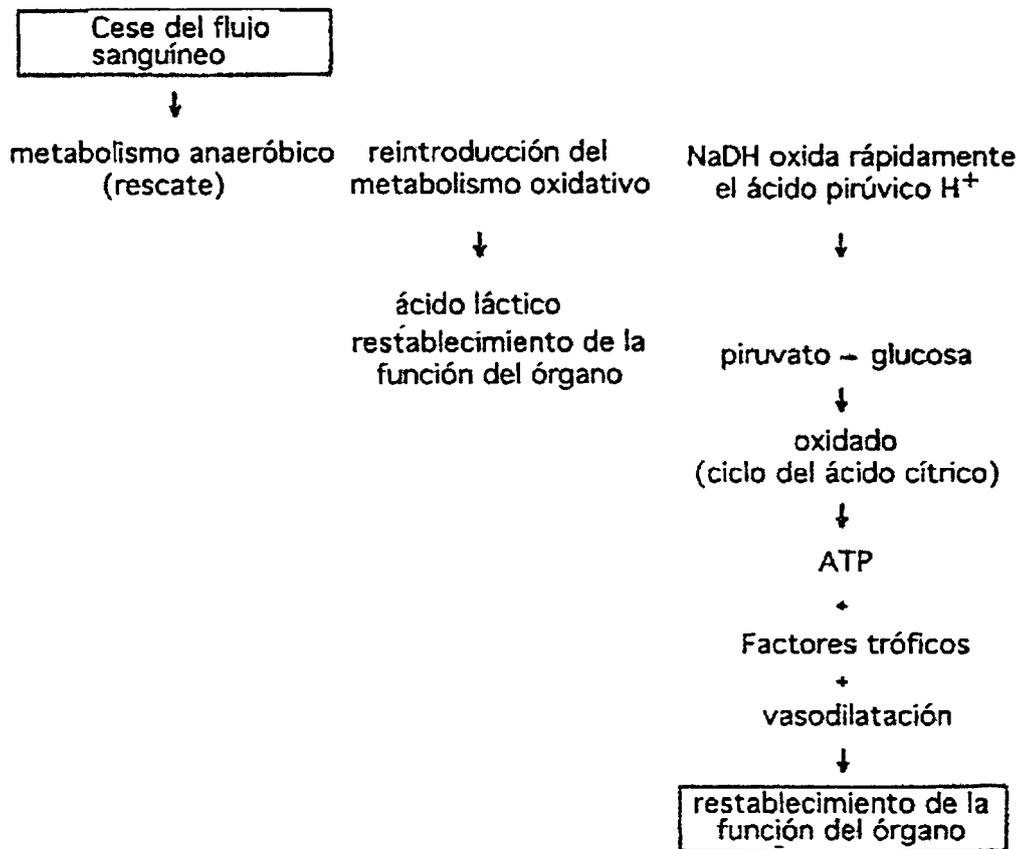
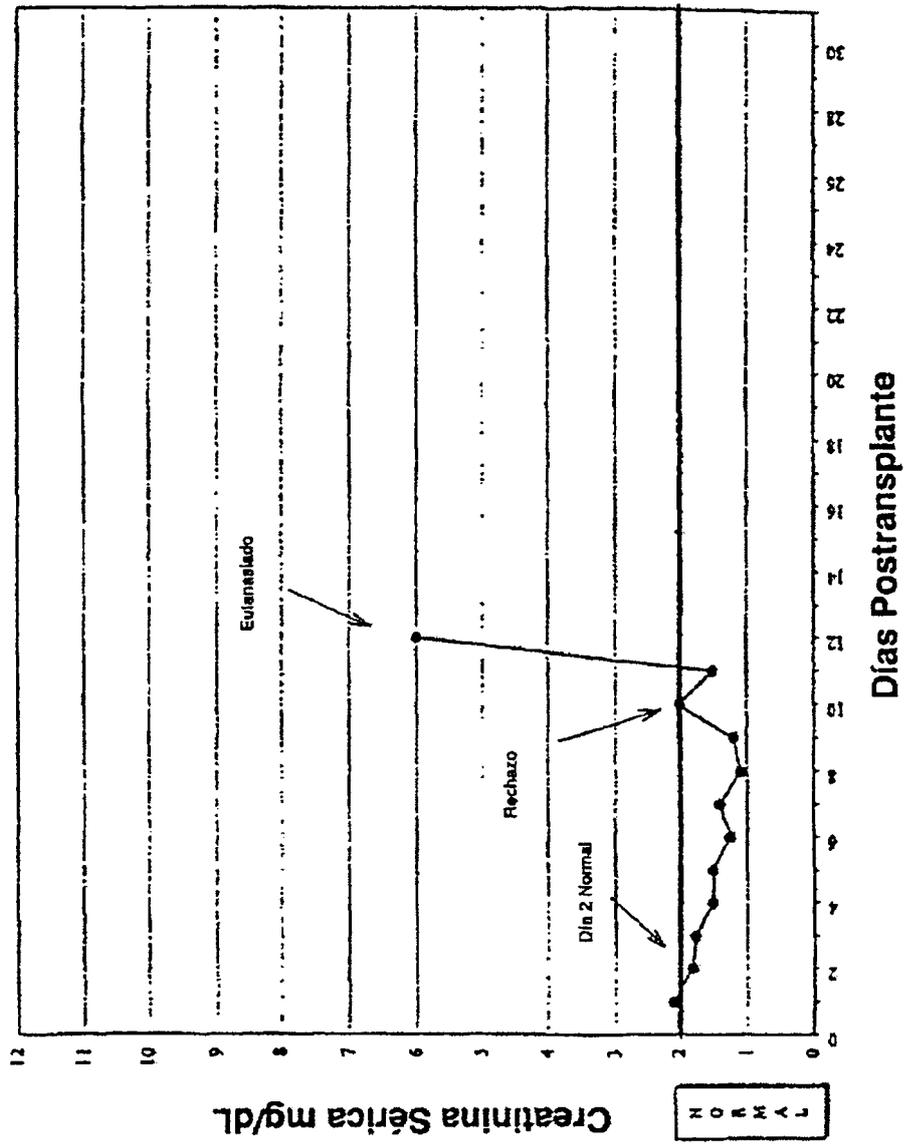
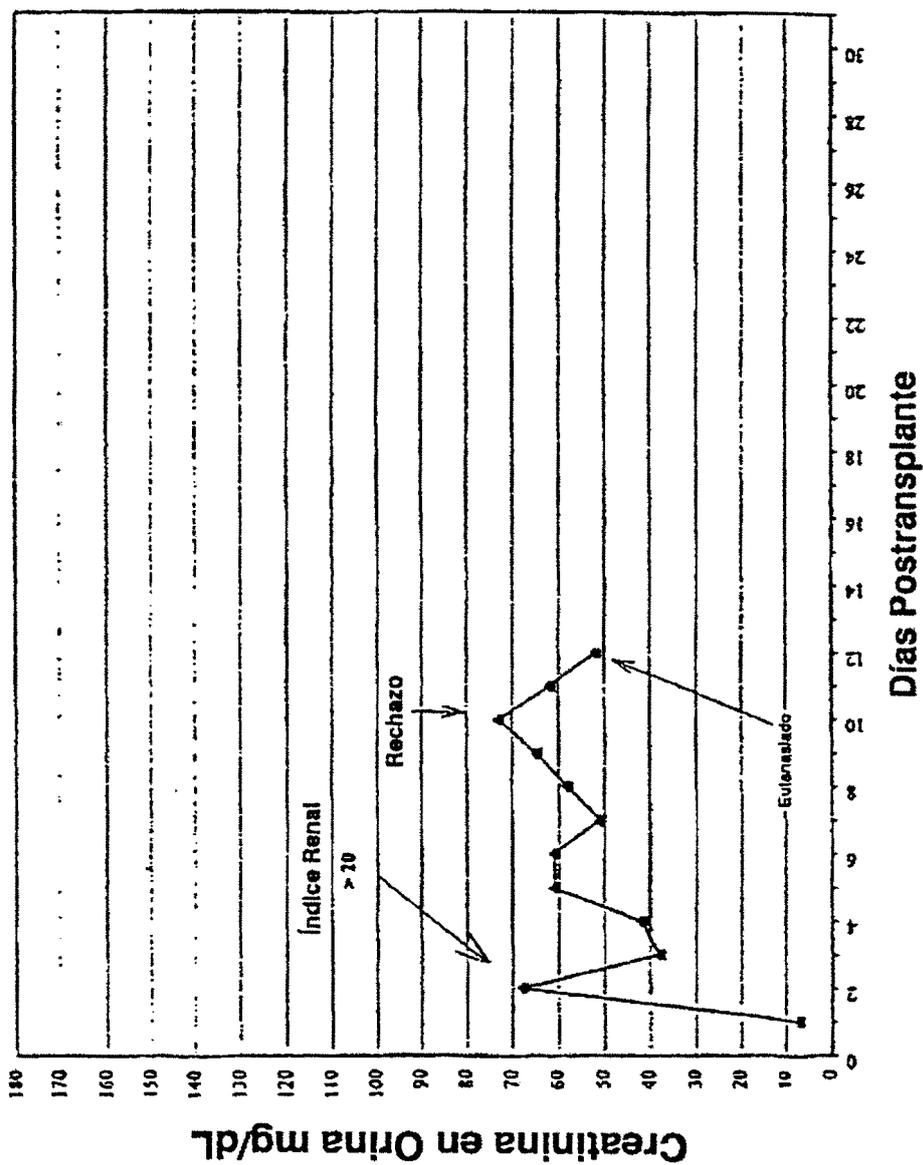


FIG. 1

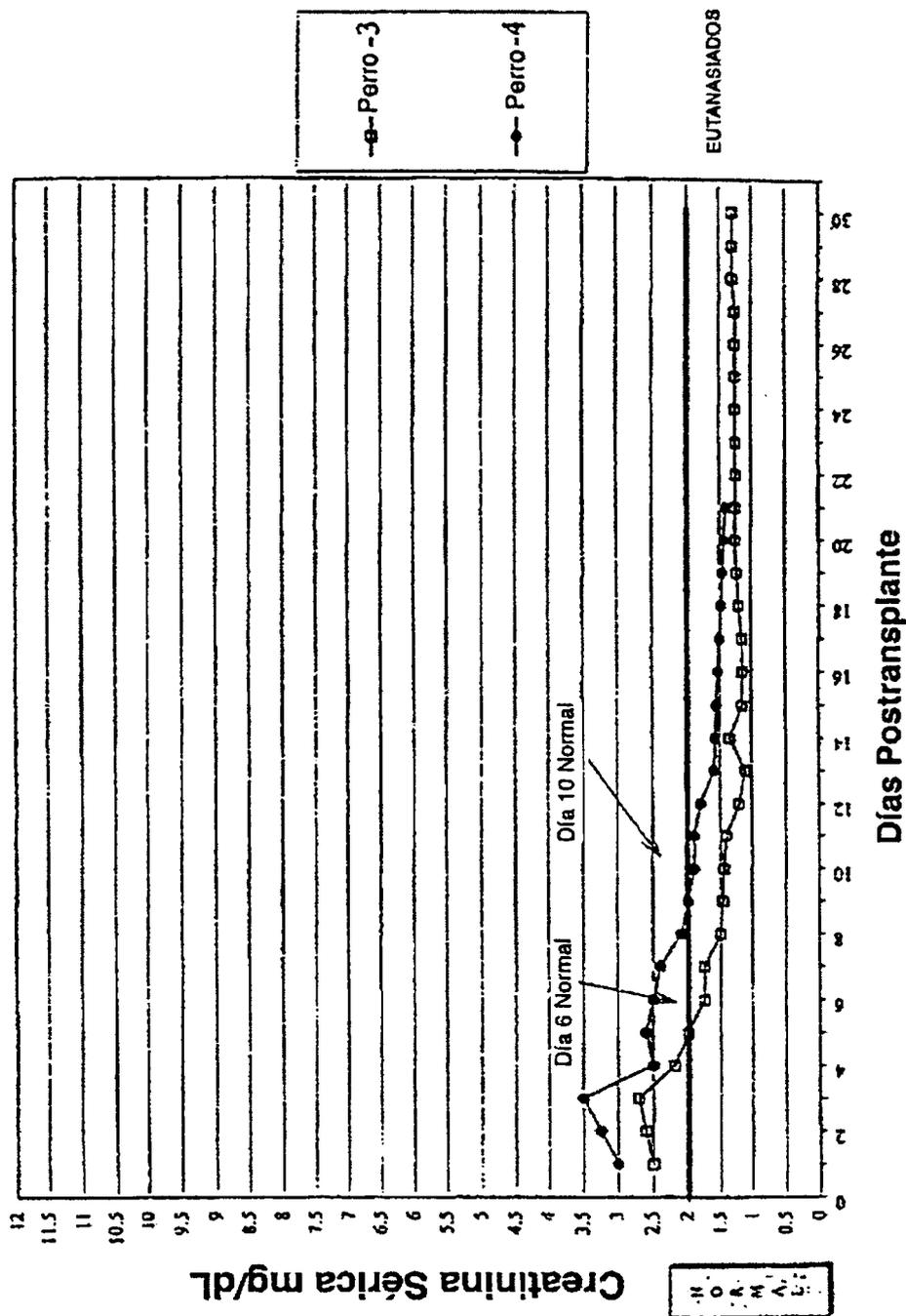
FIG. 2
ALOTRANSPLENTE TRAS 60 MINUTOS DE ISQUEMIA CALIENTE



ALOTRANSPLANTE TRAS 60 MINUTOS DE ISQUEMIA CALIENTE FIG. 3



AUTOTRANSPLANTE TRAS 2 HORAS DE ISQUEMIA CALIENTE **FIG. 4**



AUTOTRANSPLANTE TRAS 2 HORAS DE ISQUEMIA CALIENTE
FIG. 5

