



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 867**

51 Int. Cl.:  
**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03010783 .3**

96 Fecha de presentación : **14.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1362511**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54

Título: **Solución protectora para la evitación de daños causados por isquemias.**

30

Prioridad: **17.05.2002 DE 102 22 561**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.07.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.07.2011**

73

Titular/es: **DR. FRANZ KÖHLER CHEMIE GmbH**  
**Neue Bergstrasse 3 - 7**  
**64665 Alsbach-Hähnlein, DE**

72

Inventor/es: **Bruns, Wilfried;**  
**Köhler, Gernot;**  
**De Groot, Herbert y**  
**Rauen, Ursula**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 362 867 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 protectora para la evitación de daños causados por isquemias

5 El presente invento se refiere a una composición mejorada de soluciones destinadas a la protección de órganos, de manera preferida del corazón, de los pulmones, de los riñones, del hígado, del páncreas y de los sistemas vasculares, con el fin de poder llevar a cabo unas operaciones quirúrgicas que eventualmente duran un largo tiempo, en un órgano isquémico, no irrigado por la sangre, para la conservación de los mismos órganos para realizar el trasplante con un daño para el tejido que ha sido reducido frente al causado por otros procedimientos de conservación durante el período de tiempo de transporte o respectivamente de almacenamiento, o para la reperusión de órganos isquémicos. El presente invento pone a disposición unas soluciones adecuadas para ello, así como unos procedimientos para su producción según los requisitos de las normas de GMP (acrónimo de Good Manufacturing Praxis = buena práctica de producción).

15 Con la introducción de la parada cardíaca hipercalémica por Melrose en el año 1955, los cirujanos cardiacos estuvieron en situación de poder llevar a cabo intervenciones complejas en corazones no latentes, vaciados de sangre. Si bien con las soluciones cardioplégicas de entonces sólo se podía operar durante un período de tiempo de hasta 40 minutos, fueron posibles por primera vez unas reconstrucciones quirúrgicas en el caso de malformaciones cardíacas congénitas, y el empleo de prótesis de válvulas cardíacas. En 1967, Barnard estableció un hito de la cirugía cardíaca con el trasplante de corazón llevado a cabo por primera vez.

20 El objetivo de la investigación ulterior consistió en prolongar la duración de las operaciones quirúrgicas, que hasta entonces era limitada, con unas soluciones adecuadas y con unos correspondientes procedimientos de uso. Ya en los años sesenta (60), el grupo de trabajo de Bretschneider pudo prolongar considerablemente los períodos de tiempo de isquemia con unos nuevos conceptos para el mejoramiento de la protección del miocardio. Por primera vez, mediante una privación de sodio se induce la parada cardíaca y con unos sustratos, tales como p.ej. procaína, acetilcolina y novocaína, se protege a la membrana celular, a fin de contrarrestar la génesis de un edema intracelular.

25 En el documento de patente europea 12272 se describe una solución protectora para el corazón, los riñones y otros órganos, la cual está caracterizada por un sistema tamponador constituido sobre la base de histidina + histidina-HCl, y que contiene además iones de sodio, potasio y magnesio, así como un poliol o un azúcar. Con esta solución protectora se consigue el período de tiempo de isquemia tolerable multiplicado por el factor de 8 con respecto a los períodos de tiempo de los corazones no tratados. Un mejoramiento adicional de esta solución se describe en el documento de patente europea EP 54635, según el cual, mediante la adición de un  $\alpha$ -cetoglutarato al metabolismo aerobio, se disminuye la pérdida de ATP durante la perfusión del órgano con la solución protectora, que dura aproximadamente de 8 a 10 minutos, por medio del influjo favorable sobre el ciclo del citrato. En los siguientes años, la atención de los profesionales clínicos y fisiólogos se dirigió hacia la fase cronológica de la terminación de la isquemia, que es terminada con el calentamiento del órgano hipotérmico e hipóxico, y con la reperusión con sangre, y en la que los órganos recuperan su función completa. Ciertos estudios acerca de esto ponen de manifiesto que, precisamente en la denominada fase de reperusión transcurren diferentes procesos patofisiológicos, que son recopilados con el concepto de daños causados por reperusión (daños I-R). En este caso, se trata sobre todo de daños para las células endoteliales, que se interpretan en parte como una causa, y en parte como una consecuencia, de procesos inflamatorios, y en cuya patogénesis parece corresponder una considerable importancia a ciertas especies oxigenadas reactivas. En los últimos años, además, el frío empleado para la protección de los órganos se manifestó como un factor autónomo de daño; ninguna de las soluciones de conservación empleadas actualmente es capaz de ofrecer una protección contra este daño.

El objetivo del presente invento consiste en impedir o respectivamente disminuir los siguientes procesos patofisiológicos, que se presentan durante la isquemia y la reperusión:

- 45
- daño causado por isquemia
  - daño causado por frío (apoptosis inducida por el frío)
  - daños por reperusión
  - procesos inflamatorios.

50 Para esto, en la reivindicación 1 se indica una solución protectora de órganos, que sirve para cumplimentar la misión mencionada. A partir de los mecanismos expuestos del daño para células y tejidos en los casos de una cardioplegia y de una conservación de órganos, resulta una serie de requisitos para la composición de una solución destinada a la protección de órganos. Para la realización de estos requisitos, hemos encontrado unas sustancias, que permiten la concepción de las nuevas soluciones protectoras de órganos, de acuerdo con la reivindicación 1, que son activas efectivamente. La composición de la solución se escoge de tal manera que ella ofrezca una protección eficaz contra todos los componentes dañinos precedentemente mencionados. Por medio de los componentes orientados a los mecanismos, y que no son tóxicos, se pueden disminuir manifiestamente los daños causados durante una

conservación. De esta manera se evita la conocida toxicidad de las soluciones de conservación utilizadas hasta ahora, en el caso de un calentamiento (accidental o respectivamente que tiene lugar durante el período de tiempo de anastomosis) del órgano. De esta manera se mejoran la funcionalidad y la viabilidad del correspondiente tejido de un órgano y se aumenta la tolerancia frente a una isquemia y a un almacenamiento en frío; con esto se hacen posibles unos más largos períodos de tiempo de conservación del órgano. Este hecho puede prestar también una contribución a la logística, con el fin de mejorar la disponibilidad de órganos para el trasplante.

Se ha acreditado como ventajoso el hecho de que se emplee un derivado del ácido hidroxámico, en el que el átomo de hidrógeno situado junto al nitrógeno del ácido hidroxámico está sustituido con un radical alquilo, arilo o alquil-arilo con C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub>.

Además, se recomienda que, en el derivado de ácido hidroxámico, el átomo de hidrógeno que está situado junto al carbono del ácido hidroxámico, sea sustituido por un radical alquilo, arilo o alquil-arilo con C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub>, pudiendo contener este sustituyente también heteroátomos y/o grupos hidroxilo, amino o metoxi.

También es favorable que los sustituyentes situados junto al nitrógeno del ácido hidroxámico se cierren para formar un anillo con los sustituyentes situados junto al carbono del ácido hidroxámico.

Para el invento se recomiendan uno o varios de los compuestos y/o sus sales escogidos entre el conjunto que se compone de

- ácido aceto-hidroxámico,
- ácido aceto-N-metil-hidroxámico,
- ácido N-bencil-aceto-hidroxámico
- ácido hexano-hidroxámico,
- ácido hexano-N-metil-hidroxámico,
- ácido benzo-hidroxámico,
- ácido N-metil-benzo-hidroxámico,
- ácido salicil-hidroxámico,
- ácido salicil-N-metil-hidroxámico,
- ácido salicil-N-bencil-hidroxámico,
- ácido 2-fenil-aceto-hidroxámico,
- ácido 2-fenil-aceto-N-metil-hidroxámico
- ácido 3,4-dimetoxi-benzo-hidroxámico
- ácido 3,4-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico
- ácido 2,3-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico
- ácido 2,4-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico
- ácido 3,5-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico
- ácido 2,4-dihidroxi-benzo-hidroxámico
- ácido 2,3-dihidroxi-benzo-hidroxámico
- ácido 3,4-dihidroxi-benzo-hidroxámico
- ácido 3,4,5-trimetoxi-benzo-hidroxámico
- ácido 3,4,5-trimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico
- ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzo-hidroxámico
- ácido 2-hidroxi-3-metoxi-benzo-hidroxámico
- ácido 2-hidroxi-5-metoxi-benzo-hidroxámico
- 2-hidroxi-3-metil-isocarboestirilo
- ácido 4-cloro-N-metil-benzo-hidroxámico
- 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona.

Además, entra en consideración ventajosamente una adición de desferroxamina, recomendándose una concentración de desferroxamina de hasta aproximadamente 10 mmol/l.

Es recomendable una adición de un derivado del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico o del correspondiente éster metílico.

Convenientemente, el tampón está constituido sobre la base de N-acetil-histidina, en particular sobre la base de una histidina acilada en N, eventualmente en combinación con una base orgánica adecuada, p.ej. una mezcla de N-glicil-histidina y del hidrocloreto de N-glicil-histidina o una mezcla de N-acetil-histidina y lisina y/o arginina y/o colina.

Ventajosamente, la solución tiene un cierto contenido de cationes de lisina y/o de un derivado de lisina, de manera preferida de unos dipéptidos que contienen lisina, así como eventualmente un cierto contenido de aniones de un aspartato.

Convenientemente, el ácido hidroxámico y/o sus derivados están contenidos en una concentración de hasta aproximadamente 10 mmol/l en la solución.

También es ventajoso el hecho de que el Trolox esté contenido en una concentración de hasta aproximadamente 10 mmol/l en la solución.

- 5 Ventajosamente, la N-acetil-histidina/el N-acetil-histidina-HCl está contenida/o en una concentración de desde aproximadamente 20 mmol/l hasta aproximadamente 265 mmol/l.

Además, se recomienda prever en la solución el sodio como electrólito, de manera conveniente en una concentración de desde aproximadamente 10 mmol/l hasta aproximadamente 120 mmol/l. Alternativamente o de una manera complementaria, puede estar contenido el potasio de manera conveniente en una concentración de desde aproximadamente 5 mmol/l hasta aproximadamente 25 mmol/l.

Además, el magnesio debería estar contenido de manera conveniente en una concentración de desde aproximadamente 3 mmol/l hasta aproximadamente 27 mmol/l.

Finalmente, el calcio está contenido ventajosamente en una concentración libre, de manera conveniente, de desde aproximadamente 0,0001 mmol/l hasta aproximadamente 1,5 mmol/l.

- 15 Se han de recomendar especialmente la lisina y/o sus derivados, de manera preferida en la forma de un dipéptido que contiene lisina, de manera conveniente en una concentración de hasta aproximadamente 140 mmol/l.

Es ventajoso un contenido de un aspartato en una concentración de hasta aproximadamente 140 mmol/l en la solución.

- 20 En el caso de que esté contenido un cloruro en la solución, se recomienda prever el aspartato en un exceso en relación con el cloruro.

De manera conveniente, se ha acreditado también un contenido de un  $\alpha$ -cetoglutarato en una concentración de desde aproximadamente 1 mmol/l hasta aproximadamente 9 mmol/l.

Ventajosamente, el osmolito está contenido convenientemente en una concentración de hasta aproximadamente 140 mmol/l en la solución.

- 25 Para la producción de una solución de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, se recomienda un procedimiento, en el que, en un exceso de agua, de manera conveniente en aproximadamente un 90 % de la cantidad requerida de agua, los electrólitos se disuelven mediando agitación, se añaden el tampón y a continuación el ácido hidroxámico y/o sus derivados, seguidamente se ajusta el valor del pH, se añaden el o los osmolito(s) y la solución se completa con agua hasta llegar al volumen nominal.

- 30 Para la obtención del ácido hidroxámico y/o de sus derivados se pueden emplear convenientemente unos alcoholes inferiores y/o DMF (dimetilformamida) y/o THF (tetrahidrofurano) como disolvente.

El procedimiento se desarrolla de un modo especialmente favorable cuando la reacción con un éster de un ácido carboxílico se lleva a cabo de una manera catalizada por una base.

- 35 El invento se puede emplear para el alivio o la evitación de los daños causados por una reperfusión después de un infarto cardiaco, de una apoplejía, de intervenciones quirúrgicas después de accidentes o por una reperfusión de las extremidades. Además, se recomienda su utilización en la terapia de unas enfermedades, que tienen su causa original en una hiperferremia (p.ej. en la enfermedad de Alzheimer), en un deterioro celular causado por radicales en general, por radicales de oxígeno o por  $H_2O_2$ .

- 40 Unos compuestos quelantes del hierro pueden servir para la inhibición del daño causado por frío dependiente del hierro o respectivamente de la apoptosis inducida por frío. Como compuestos destinados a la disminución de estos daños para células no se adecua cualquier compuesto formador de complejos. Así, p.ej. el EDTA, así como también la histidina, que está contenida en el Custodiol, son aquí menos ineficaces, a pesar de que estos ligandos forman también unos fuertes compuestos complejos con el hierro. El hierro tiene, en vez de esto, que ser fijado de un modo especial por el ligando, y el ligando tiene que llegar a los compartimentos intracelulares rápidamente y en una concentración suficiente.

45

Se pudo demostrar que al elemento estructural del ácido hidroxámico I o respectivamente II, que está contenido tres veces en la desferroxamina, le corresponde una importancia especial como un adecuado elemento estructural o respectivamente ligando para el hierro.



5 realizándose que  $R^1$  significa alquilo, arilo o alquil-arilo de  $C_1$  a  $C_{20}$ , lineal o ramificado, y puede abarcar también unos heteroátomos y/u otros sustituyentes tales como  $-OH$ ,  $-NH_2$ , etc., y que  $R^2$  significa H y por lo demás puede tener el mismo significado que  $R^1$ , y realizándose que  $R^1$  y  $R^2$  pueden cerrarse para formar un anillo y/o contener otros sustituyentes adicionales, tales como p.ej. el del N-óxido de 2-hidroxi-piridina y sus derivados, que tan sólo representan una estructura tautómera distinta de este caso, realizándose que  $R^1$  y  $R^2$  pueden cerrarse para formar un anillo con enlaces dobles conjugados. Con las sustancias que son pequeñas en comparación con la desferroxamina y lipófilas, se realiza la estrategia de establecer una rápida disponibilidad intracelular de un fuerte compuesto quelante del hierro.

También unos sencillos ácidos hidroxámicos muestran ya un efecto positivo; sin embargo, para conseguir una buena eficacia es necesaria una determinada relación de la hidrofilia a la lipofilia. Además de esto, se pudo demostrar que los compuestos, que están sustituidos con alquilo ( $R^2 =$  alquilo) junto al nitrógeno del ácido hidroxámico, son generalmente más eficaces que los que están sin sustituir ( $R^2 = H$ ). Si  $R^2$  es un fuerte grupo atractor de electrones tal como p.ej.  $-CO-R^3$  ( $R^3$  tiene el mismo significado que  $R^1$ ), esto conduce a la ineficacia, a pesar de que también estos compuestos forman todavía fácilmente compuestos complejos con hierro, tales como p.ej.:

20 N-hidroxi-succinimida  
3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina

La eficacia de dos sustancias ilustrativas se muestra en las Figuras 1 y 2.

El ácido hidroxámico y/o sus derivados pueden estar contenidos, por lo tanto, en las soluciones conformes al invento, de manera conveniente en unas concentraciones de hasta aproximadamente 10 mmol/l.

25 La Fig. 1 muestra la inhibición mediante el ácido salicil-N-metil-hidroxámico del daño causado por frío de células endoteliales del hígado. Unas células endoteliales cultivadas del hígado de una rata se incubaron durante 72 h a  $4^\circ C$  en la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) en condiciones aerobias, en presencia y ausencia de ácido salicil-N-metil-hidroxámico 1 mM, y a continuación se calentaron otra vez durante 3 h en el medio de cultivo celular (a  $37^\circ C$ ). Como parámetro del daño para las células sirvió la liberación de la lactato-deshidrogenasa (LDH) citosólica.

30 La Fig. 2 muestra la inhibición del daño causado por frío de hepatocitos, por medio del ácido 3,4-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico. Unos hepatocitos cultivados de una rata se incubaron durante 24 h a  $4^\circ C$  en la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) en condiciones aerobias, en presencia y ausencia de ácido 3,4-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico 1 mM, y a continuación se calentaron otra vez durante 3 h en el medio de cultivo celular (a  $37^\circ C$ ). Como parámetro del daño para las células sirvió la liberación de la lactato-deshidrogenasa (LDH) citosólica.

35 La desferroxamina es un fuerte compuesto quelante del hierro, que fija al hierro como un ligando hexadentado de una forma no activa en redox. Ella sirve, por consiguiente, para proporcionar una protección óptima en el caso de una prolongada exposición al frío. La desferroxamina es, no obstante, una molécula hidrófila, relativamente grande, con una capacidad de paso a través de las membranas que es limitada por este motivo. La desferroxamina no llega, por lo tanto, a todos los compartimentos intracelulares en una concentración y a una velocidad suficientes, como para ofrecer una protección completa. Ella puede estar contenida en la solución en una concentración de manera preferida de hasta aproximadamente 10 mmol/l.

Otros compuestos, que pueden ser añadidos convenientemente a la solución protectora de órganos conforme al invento, se indican en la reivindicación 3.

En otra forma de realización adicional del invento, a la solución conforme a las reivindicaciones se le añade el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox) o un derivado de éste. El agente captador de radicales Trolox, o respectivamente sus derivados, que es/son relativamente hidrófilo/s, pero bien capaz/capaces de pasar a través de las membranas, es/son añadido/s a fin de capturar a los radicales que resultan intracelularmente en el caso del daño causado por frío y del daño causado por una reoxigenación. El derivado de Trolox se presenta en la solución conforme al invento de manera conveniente en una concentración de hasta aproximadamente 10 mmol/l.

Todas las soluciones protectoras de órganos disponen de unas sustancias tamponadoras, que contrarrestan la inevitable acidosis durante la isquemia. Unos fosfatos o bicarbonatos son en este caso los sistemas tamponadores inorgánicos utilizados en la mayor parte de los casos. Como absolutamente superior en lo que respecta a la capacidad tamponadora y a la estabilidad del valor del pH se ha acreditado el sistema tamponador orgánico histidina/histidina-HCl, empleado en el Custodiol®. Se establecen unas ventajas especiales cuando se usan ciertos derivados de la histidina, tales como p.ej. la N-acetil-histidina, en lugar del sistema de histidina/histidina-HCl como sistema tamponador en las soluciones protectoras precedentemente mencionadas, pero también en otras soluciones protectoras conocidas. La Figura 3 muestra una capacidad tamponadora, mejorada en el factor de 2, de la N-acetil-histidina en el intervalo fisiológico, en comparación con el sistema de histidina/histidina-HCl. Mediante el empleo del derivado de histidina se evitan también algunos efectos secundarios indeseados de la histidina (la toxicidad, en particular en el calor pero también en el frío, en el caso de algunos tipos de células, tal como p.ej. en el caso de los hepatocitos) sin afectar a la buena capacidad tamponadora (véase la Figura 4).

La Fig. 3 muestra las respectivas curvas de neutralización del sistema de histidina/histidina-HCl y de N-acetil-histidina, a partir de las que se establecen las capacidades tamponadoras útiles en la región del valor del pH fisiológico; en el caso de la N-acetil-histidina, ésta es de aproximadamente 60 % y en el caso de la histidina, ésta es de aproximadamente 30 %, referida a la relación de la base consumida al sustrato.

El sistema tamponador mencionado puede estar contenido en la solución conforme al invento en una concentración de aproximadamente 20 mmol/l hasta aproximadamente 265 mmol/l.

La Fig. 4 muestra un ejemplo acerca de la toxicidad de la histidina en condiciones moderadamente calientes y la disminución de esta toxicidad por medio de ciertos derivados de histidina. Unos hepatocitos cultivados de rata se incubaron durante 5 h a 37°C en condiciones aerobias, en presencia y ausencia de L-histidina 198 mM o respectivamente de N-acetil-histidina 198 mM. Como solución de base sirvió el tampón de Krebs-Henseleit (KH), una solución salina fisiológica que se utiliza frecuentemente en cultivos de células; en las soluciones que contienen (derivados de) histidina, la concentración de NaCl se redujo en 99 mM, y el valor del pH se ajustó a un pH 7,2 mediante la adición de HCl o respectivamente de NaOH.

Este perfeccionamiento permite un mantenimiento todavía mejor de las funciones celulares después de una conservación.

Uno de los cationes es convenientemente el de sodio. Unas concentraciones relativamente pequeñas de sodio son, por una parte, ventajosas para el desacoplamiento electromecánico junto a la membrana celular (una parada cardíaca), por otra parte, ellas disminuyen el daño hipóxico a causa de la evitación/disminución de la afluencia de sodio inducida por la hipoxia. Además, permanece mantenida una reserva osmótica para otras sustancias (p.ej. unas sustancias tamponadoras, véanse más abajo). También en el caso de una baja concentración de sodio, es posible un rápido ajuste de la homeostasis en la fase de reperfusión, puesto que el aumento intersticial de sodio (140 mM) se efectúa rápidamente. Por lo tanto, se recomienda una concentración de sodio de desde aproximadamente 10 mmol/l hasta aproximadamente 120 mmol/l en la solución conforme al invento.

Una concentración de potasio relativamente pequeña, pero que está situada por encima del valor extracelular fisiológico, apoya al desacoplamiento electromecánico junto a la membrana celular (una parada cardíaca), pero evita las desventajas de unas soluciones fuertemente hipercalémicas (con alto contenido de potasio) (las soluciones fuertemente hipercalémicas inducen una rápida parada cardíaca, pero en la fase de reoxigenación son también responsables de unos trastornos del ritmo y de unos daños causados por reperfusión eventualmente acrecentados; en la fase de reperfusión, el ajuste de la concentración intersticial de potasio está retrasado cronológicamente, con lo que en estas soluciones aumenta la cuota de las funciones iniciales retardadas de los órganos). Unas soluciones sólo ligeramente hipercalémicas poseen además la ventaja, de que no es necesaria ninguna separación por lavado de la solución desde el órgano que ha de ser trasplantado, antes de la reperfusión (las soluciones pueden desarrollar, por lo tanto, sus propiedades protectoras hasta el final del período de tiempo de isquemia), y disponen de una alta tolerabilidad sistémica. Por lo tanto, se recomienda una concentración de potasio de desde aproximadamente 5 mmol/l hasta aproximadamente 25 mmol/l en la solución conforme al invento.

Se pretende una concentración de magnesio manifiestamente aumentada (por encima del valor normal en suero), puesto que el magnesio, como cofactor de numerosos sistemas enzimáticos glicolíticos, apoya al metabolismo anaerobio, y, por consiguiente, contribuye a la formación de ATP también durante la isquemia fría. Además, el magnesio contribuye al mantenimiento de la actividad de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  de la membrana plasmática y

contrarresta de esta manera las modificaciones de la homeostasis iónica. Como antagonista fisiológico del  $\text{Ca}^{2+}$ , el magnesio puede contrarrestar además los efectos nocivos de una acumulación intracelular de calcio. En la fase de reperfusión es necesaria una elevada agrupación (en inglés pool) de magnesio a fin de estimular al metabolismo energético aerobio. Las propiedades vasodilatadoras del magnesio contrarrestan además los efectos constrictivos en el caso de unos daños por reperfusión. Por lo tanto, se recomienda una concentración de magnesio de desde aproximadamente 3 mmol/l hasta aproximadamente 27 mmol/l en la solución conforme al invento.

En condiciones isquémicas (y en la acidosis intracelular y la perturbación de la homeostasis del sodio, que están vinculadas con ellas), existe el riesgo de un aumento de la concentración citosólica de calcio. Esto conduce al aumento de unas actividades indeseadas, p.ej. una estimulación de proteasas y fosfolipasas, y va acompañada, en el caso del corazón, por una hipercontractura con un alto consumo de ATP. Las funciones fisiológicas del calcio, por consiguiente, deben de ser reprimidas amplísimamente durante la isquemia, por lo que la concentración de calcio en la solución debería fluctuar en el intervalo de las concentraciones citoplasmáticas. Por lo tanto, se recomienda una concentración de calcio libre de desde aproximadamente 0,0001 mmol/l hasta aproximadamente 1,5 mmol/l en la solución conforme al invento.

Se puede hacer uso de los aminoácidos básicos lisina y arginina o respectivamente de sus derivados en forma de dipéptidos con glicina (Lys-Gly, Gly-Lys o respectivamente Arg-Gly, Gly-Arg) para la provisión de los equivalentes de bases que falten, puesto que la concentración y la relación de los cationes de sodio, potasio, magnesio y calcio, están preestablecidas debido a los motivos ya descritos. La concentración de lisina y/o de los derivados de lisina o respectivamente de arginina y/o de los derivados de arginina en la solución conforme al invento puede ser en cada caso de hasta aproximadamente 140 mmol/l.

El anión extracelular fisiológico de cloruro se emplea en una concentración manifiestamente disminuida en comparación con los valores fisiológicos, a fin de disminuir los trastornos de la homeostasis iónica durante la isquemia fría. Esto es válido en particular para una afluencia inducida por la hipoxia, de cationes tales como los de sodio. Por motivos de la neutralidad eléctrica, esta afluencia es dependiente de la afluencia paralela de aniones, de manera preferida de los de cloruro. Ciertas menciones de diferentes autores permiten sacar la conclusión de que unas altas concentraciones de cloruro favorecen la magnitud de un edema intracelular. Por ello, se recomienda mantener una concentración de cloruro en la solución conforme al invento que esté lo más ampliamente que sea posible por debajo del nivel fisiológico, llegando hasta como máximo 90 mmol/l. Junto al de cloruro, se puede añadir también uno de lactobionato como anión impermeable, en una concentración de hasta aproximadamente 140 mmol/l.

Las concentraciones de aniones, que se emplean en las soluciones protectoras de órganos, resultan por lo general a partir de la elección de los cationes y del tampón (in)orgánico utilizado. La utilización de aniones impermeables, tales como p.ej. los de un lactobionato, debe de contrarrestar la génesis de un edema intracelular. Un aspartato constituye una sobresaliente alternativa, especialmente porque con la utilización de un aspartato se pueden perseguir varios objetivos.

- a) Un aspartato, como equivalente de ácido, reemplaza al desventajoso cloruro.
- b) El ácido aspártico apoya activamente al intercambio de sustancias junto a las membranas y acelera el restablecimiento de la homeostasis.
- c) Un aspartato, en unión con un  $\alpha$ -cetoglutarato, favorecen al metabolismo energético aerobio en la fase crítica de la reperfusión o respectivamente de la reoxigenación del órgano, y acelera sus funciones iniciales.

En particular, en la fase de reoxigenación, cuando, con un calentamiento creciente del órgano, aumenta considerablemente el consumo de energía, es necesario forzar la puesta a disposición de energía, puesto que un defecto de ATP precisamente en esta fase de calentamiento perjudicaría considerablemente a la funcionalidad del órgano y aumentaría la magnitud de un daño causado por reperfusión. Se recomienda una concentración de aspartato de hasta aproximadamente 140 mmol/l en la solución conforme al invento. Convenientemente, en la solución conforme al invento, un aspartato está presente en un exceso en relación con un cloruro.

El aminoácido glicina se emplea en una concentración milimolar más alta, puesto que la glicina impide, en estas concentraciones, la afluencia de sodio inducida por la hipoxia mediante una estabilización de la membrana plasmática (evitación de un intercambio de sustancias orientado por difusión) y además inhibe la activación de macrófagos. Es recomendable una concentración de glicina de hasta aproximadamente 30 mmol/l en la solución conforme al invento.

También durante la isquemia fría, el consumo de energía del correspondiente órgano no es insignificante, por lo que, para el apoyo, se han de añadir a la solución unos substratos que proporcionen energía o unas sustancias que favorezcan el metabolismo energético. En este caso se persiguen diferentes conceptos (véanse también el aspartato, véase más arriba, y el  $\alpha$ -cetoglutarato, véase más abajo), uno de ellos es la adición de glucosa.

- Una concentración fisiológica de glucosa en la solución permite también a las células que, debido a unas reservas comparativamente escasas de glicógeno, están necesitadas de una oferta exógena de glucosa, tales como p.ej. las células endoteliales, la obtención de energía a través de una glicólisis anaerobia durante la isquemia. La concentración de glucosa se escoge, no obstante, de tal manera que se evite una asimilación excesiva de glucosa por parte de otras células, en particular por los hepatocitos (lo que constituía un problema en el caso de anteriores soluciones de conservación, con unas concentraciones extremadamente altas de glucosa). Por ello, las soluciones conformes al invento pueden contener hasta 10 mmol/l de glucosa. Un  $\alpha$ -cetogluturato sirve, en común con un aspartato, para apoyar al metabolismo en/después de unas condiciones hipóxicas. De manera conveniente, se escoge una concentración de desde aproximadamente 1 mmol/l hasta aproximadamente 9 mmol/l.
- 5
- 10 La adición de sustancias osmóticamente eficaces es requerida en la medida en que ella es necesaria para alcanzar la presión osmótica fisiológica requerida, de aproximadamente 300 mosm/l. Por lo general, para esto se utilizan polioles / azúcares (p.ej. manitol, rafinosa, sacarosa) o también ciertas sustancias de alto peso molecular (p.ej. HES (hidroxietil-almidones), dextrano). Las citadas en último lugar no se han acreditado para algunos órganos, puesto que las desventajas de la alta viscosidad producida con los HES y el dextrano pueden perjudicar a la calidad de la
- 15 protección.  
 Viscosidad a 4°C:  
 Custodiol® 1,8 cP  
 Solución de UW 4,8 cP
- 20 Como osmolitos han de pasar a emplearse, según sea el órgano, manitol, xilitol, sorbitol, sacarosa o rafinosa. La concentración del osmolito es convenientemente de hasta 140 mmol/l en la solución conforme al invento.
- Para una evitación de un edema intersticial, en algunos órganos / tejidos es ventajosa la adición de una sustancia eficaz por osmosis coloidal, p.ej. una mezcla de dextrano-40 y de dextrano 70. Esto es válido en grado especial para la protección de los pulmones y del páncreas.
- 25 Para la congelación de células y tejidos es ventajosa además la adición de agentes crioprotectores adicionales, tales como p.ej. el dimetil-sulfóxido (DMSO).
- La Fig. 5 muestra el deterioro celular de hepatocitos causado por el peróxido de hidrógeno y su protección con diferentes ácidos hidroxámicos, y ciertamente corresponden:
- 30 La curva 1) a N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM/l  
 La curva 2) a N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM/l + ácido 4-cloro-N-metil-benzo-hidroxámico 1 mM/l  
 La curva 3) a N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM/l + 2-hidroxil-3-metil-isocarboestirilo 1 mM/l  
 La curva 4) a N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM/l + ácido 3,4,5-trimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico 1 mM/l  
 La curva 5) a N4 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM/l + ácido 3,4-dimetoxi-N-metil- hidroxámico 1 mM/l,
- significando **N4** la solución de acuerdo con el Ejemplo II, pero sin Trolox ni el derivado de ácido hidroxámico.
- 35 La Fig. 6 muestra la inhibición del daño causado por frío de los hepatocitos por medio de la nueva solución de conservación. Unos hepatocitos cultivados de rata se incubaron durante 24 h a 4°C en una solución conforme al invento con N-acetil-histidina como tampón y mediando una adición de Trolox, 1 mM/l, y del derivado de ácido hidroxámico ácido veratril-N-metil-hidroxámico, 0,5 mM/l, y, como comparación, en un tampón de Krebs-Henseleit (KH). La incubación fría se efectuó en condiciones aerobias; después de 24 h, las células se calentaron otra vez a
- 40 37°C para la simulación de una reperfusión en el medio de cultivo de células. Como indicador de un daño para las células sirvió la liberación de la lactato-deshidrogenasa (LDH) citosólica.



**Ejemplos**

En lo sucesivo, se exponen unos Ejemplos de soluciones, que corresponden a los requisitos planteados al alcance de la protección que aquí se reivindica..

Ejemplo I:

	<b>mmol/l</b>
Na(+)	25
K(+)	15
Mg(++)	10
Ca(++)	0,1
Cl(-)	25
Aspartato(-)	33
Ac-N-His	60
Ac-N-His(-)	60
Lisina-H(+)	60
Glicina	10
Triptófano	2
Ácido veratril-N-metil-hidroxámico	2
Trolox	2
Cetoglutarato(-)	2
Ácido N-metil-salicil-hidroxámico	2
pH	7,2
Osmolaridad	310

5

Ejemplo II:

	<b>mmol/l</b>
Na(+)	15
K(+)	10
Mg(++)	8
Ca(++)	0,015
Cl(-)	0,03
Aspartato(-)	38
Ac-N-His	60
Ac-N-His(-)	60
Lisina-H(+)	60
Glicina	10
Triptófano	2
Ácido 2,3-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico	2
Trolox	2
Cetoglutarato(-)	3
Ácido N-metil-salicil-hidroxámico	2
Manitol	30
pH	7,2
Osmolaridad	310

Ejemplo III:

	mmol/l
Na(+)	15
K(+)	10
Mg(++)	16
Ca(++)	0,04
Cl(-)	0,03
Aspartato(-)	54
Ac-N-His	60
Ac-N-His(-)	60
Lisina-H(+)	60
Glicina	6
Triptófano	2
Ácido 2,3-dimetoxi-benzo-hidroxámico	1
Trolox-OCH <sub>3</sub>	2
Cetoglutarato(-)	3
2-Hidroxi-3-metil-isocarboestirilo	1
Manitol	20
pH	7,2
Osmolaridad	310

Ejemplo IV:

	mmol/l
Na(+)	15
K(+)	10
Mg(++)	8
Ca(++)	0,015
Cl(-)	0,03
Aspartato(-)	31
Ac-N-His	70
Ac-N-His(-)	70
Lisina-H(+)	70
Glicina	8
Triptófano	2
2-Hidroxi-3-metil-isocarboestirilo	2
Cetoglutarato(-)	2
Ácido N-metil-salicil-hidroxámico	2
Manitol	20
pH	7,2
Osmolaridad	310

5 Ejemplo V:

	mmol/l
Na(+)	16
K(+)	10
Mg(++)	8
Ca(++)	0,05
Cl(-)	0,1
Aspartato	16
N-Ac-His	80
Histidina	88
L-arginina	12
Glicina	20
L-alanina	10
Triptófano	2
Alfa-cetoglutarato	3
Manitol	40
Ácido 3,4-dimetoxi-N-metil-hidroxámico	2
pH	7,1
Osmolaridad	307

5 Correspondientemente a los componentes funcionales de una solución protectora de órganos, a saber, el sistema tamponador, los electrólitos, las sustancias que actúan de manera protectora, y los osmolitos, se produce la solución conforme al invento. Para ello, las sustancias tamponadoras se disuelven primero en aproximadamente un 90 % de la cantidad de agua requerida. Luego, se añaden las sales neutras, que son necesarias como electrólitos, de los cationes, por lo tanto, por ejemplo, las de sodio, potasio, magnesio y calcio, en las concentraciones fisiológicamente convenientes que se indican, y se disuelven mediando agitación. Siguen como otros componentes adicionales las sustancias que son eficaces de una manera protectora, que se añaden a la solución. Después de esto se comprueba el valor del pH de la solución y eventualmente se ajusta al valor indicado en la reivindicación 1. Finalmente, se añade la cantidad indicada de los osmolitos y se diluye la solución al volumen nominal. Después de haberla envasado en unos recipientes adecuados, la solución es esterilizada.

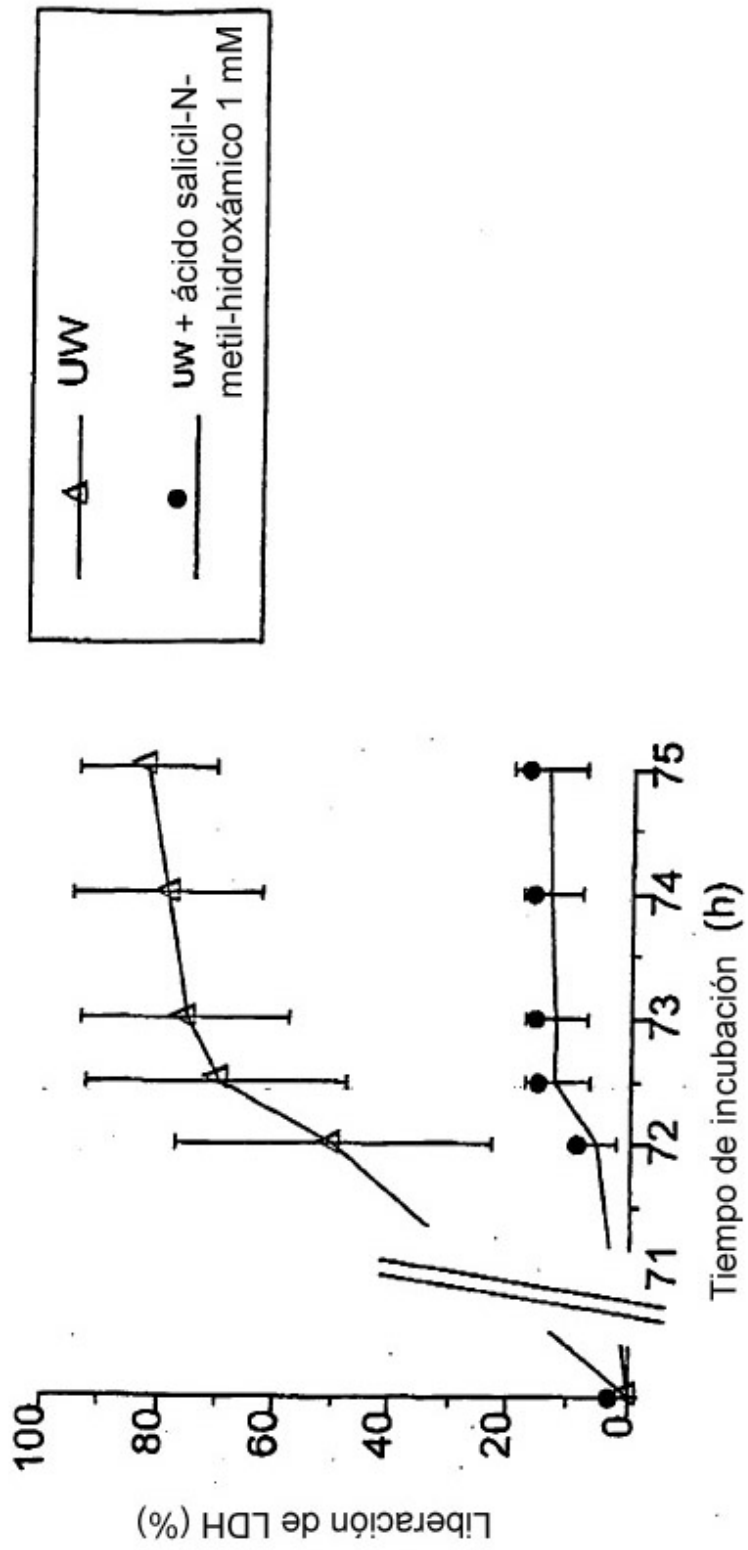
10 La preparación de ácidos hidroxámicos cíclicos, por ejemplo, la de los compuestos que se derivan del N-óxido de 2-hidroxi-piridina, se describe, por ejemplo, en Organic Synthesis Collectiv [Colectivo de síntesis orgánicas] Volumen V, páginas 623 y siguientes. Un procedimiento de preparación para ácidos hidroxámicos a partir de derivados de ácidos carboxílicos se encuentra en la obra Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie (Métodos de la química orgánica), páginas 686 y siguientes, utilizándose como disolventes unos alcoholes inferiores, DMF o THF. La reacción con los correspondientes ésteres de ácidos carboxílicos puede efectuarse de una manera catalizada por una base (NaOMe, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaO). Finalmente, para la preparación de ácidos hidroxámicos cíclicos se hace referencia a la obra de A. Kleemann, J. Engel, Pharmazeutische Wirkstoffe (Sustancias activas farmacéuticas), segunda edición de 1982, páginas 206 y siguientes.

## REIVINDICACIONES

1. Solución protectora destinada a la evitación de daños causados por un almacenamiento o una isquemia o una reperfusión en órganos, o en sistemas aislados de células o en partes de tejidos después de una perfusión, de una operación quirúrgica, de un trasplante o de una criopreservación, y de una subsiguiente reperfusión, la cual contiene como electrólitos unos iones de metales alcalinos y eventualmente también unos iones de metales alcalino-térreos, un tampón así como un poliol y/o un azúcar, tiene una osmolaridad de desde 290 mosm/l hasta 350 mosm/l así como un valor del pH de 6,8 a 7,4, así como con un derivado del ácido hidroxámico, en el que el átomo de hidrógeno situado junto al carbono del ácido hidroxámico está sustituido con un radical alquilo o arilo o alquil-arilo con C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub>, conteniendo este sustituyente heteroátomos o grupos hidroxilo o amino o metoxi, y en el que el átomo de hidrógeno situado junto al nitrógeno del ácido hidroxámico está sustituido con un radical alquilo o arilo o alquil-arilo con C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub>.
2. Solución de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los sustituyentes situados junto al nitrógeno del ácido hidroxámico se cierran con los sustituyentes situados junto al carbono del ácido hidroxámico para formar un anillo.
3. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2, que contiene uno/a o varios/as de los compuestos y/o de sus sales tomados/as del conjunto formado por  
 ácido 2-hidroxi-N-metil-benzo-hidroxámico,  
 ácido 2-hidroxi-N-bencil-benzo-hidroxámico,  
 ácido 3,4-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico,  
 ácido 2,3-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico,  
 ácido 2,4-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico,  
 ácido 3,5-dimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico,  
 ácido 3,4,5-trimetoxi-N-metil-benzo-hidroxámico,  
 2-hidroxi-3-metil-isocarboestirilo  
 ácido 4-cloro-N-metil-benzo-hidroxámico  
 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona.
4. Solución de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones anteriores, con una adición de desferroxamina.
5. Solución de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones anteriores, de un derivado del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico
6. Solución de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el derivado es el correspondiente éster metílico.
7. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, con un cierto contenido de cationes de lisina y/o de un derivado de lisina.
8. Solución de acuerdo con la reivindicación 7, con un cierto contenido de cationes de dipéptidos que contienen lisina.
9. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, con un cierto contenido de aniones de un aspartato.
10. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que los derivados del ácido hidroxámico están contenidos en una concentración de hasta 10 mmol/l.
11. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 hasta 10, en la que la desferroxamina está contenida en una concentración de hasta 10 mmol/l.
12. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 hasta 10, en la que el Trolox está contenido en una concentración de hasta 10 mmol/l.
13. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 hasta 12, en la que la N-acetil-histidina está contenida en una concentración de 20 mmol/l hasta 265 mmol/l.
14. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que como electrólito está contenido el sodio, convenientemente en una concentración de 10 mmol/l hasta 120 mmol/l.
15. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que como electrólito está contenido el potasio, convenientemente en una concentración de 5 mmol/l hasta 25 mmol/l.

16. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que está contenido el magnesio, convenientemente en una concentración de 3 mmol/l hasta 27 mmol/l.
17. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que está contenido el calcio, convenientemente en una concentración de 0,0001 mmol/l hasta 1,5 mmol/l.
- 5 18. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que como catión está contenido el de lisina y/o de sus derivados convenientemente en una concentración de hasta 140 mmol/l.
19. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el aspartato está contenido en una concentración de hasta 140 mmol/l.
20. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que está contenido un cloruro
- 10 21. Solución de acuerdo con las reivindicaciones 19 y 20, en la que el aspartato está contenido en un exceso en relación con el cloruro.
22. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que está contenido un  $\alpha$ -cetoglutarato, convenientemente en una concentración de 1 mmol/l hasta 9 mmol/l.
- 15 23. Solución de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que está contenido un osmolito, convenientemente en una concentración hasta de 140 mmol/l.
- 20 24. Procedimiento para la preparación de una solución de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones anteriores, en el que en un exceso de agua, convenientemente en un 90 % de la cantidad requerida de agua, los electrólitos se disuelven mediando agitación, se añaden el tampón y a continuación el ácido hidroxámico y/o sus derivados, seguidamente se ajusta el valor del pH, se añaden el o los osmolito(s) y la solución se completa con agua hasta llegar al volumen nominal.
25. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, en el que se utilizan unos derivados de ácido hidroxámico para cuya obtención se habían empleado alcoholes inferiores y/o DMF y/o THF como disolventes.
26. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la reacción con un éster de ácido carboxílico se había llevado a cabo de una manera catalizada por una base.

25



**Fig. 1**

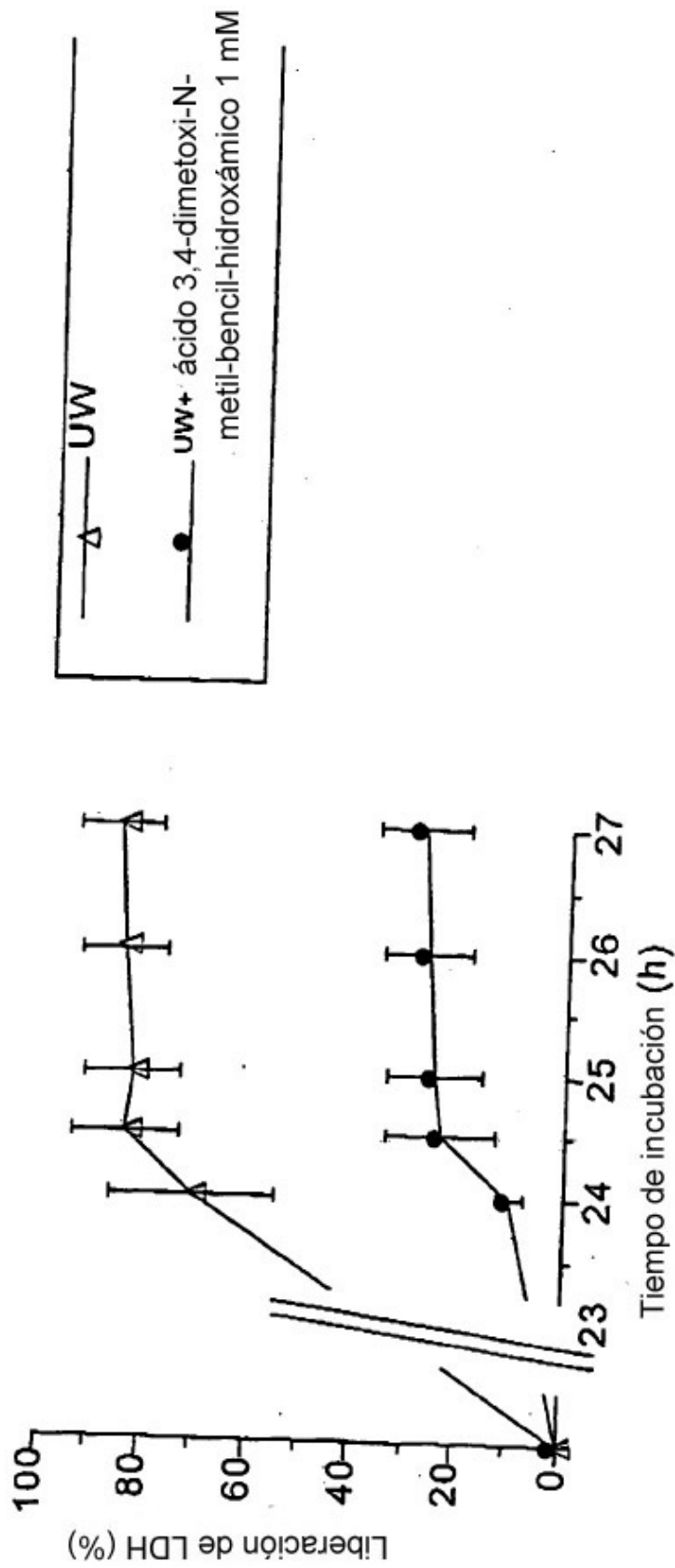


Fig. 2

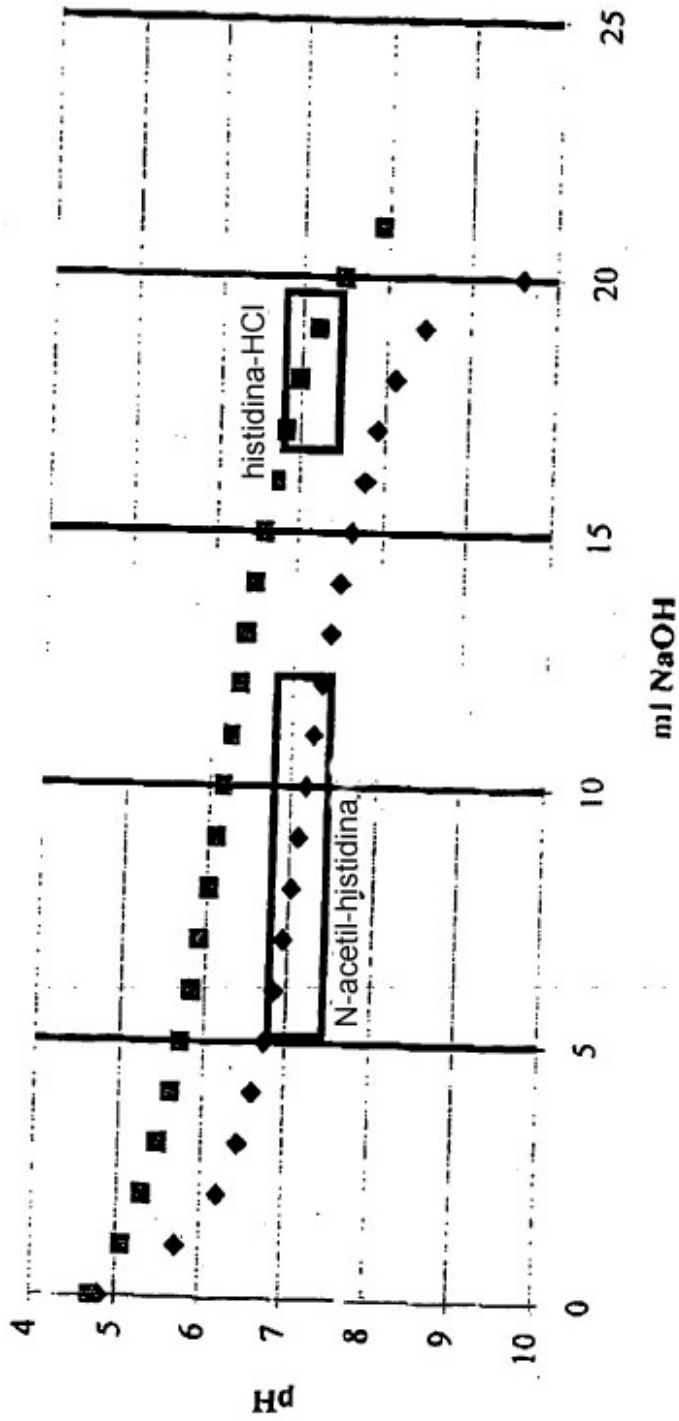


Fig. 3



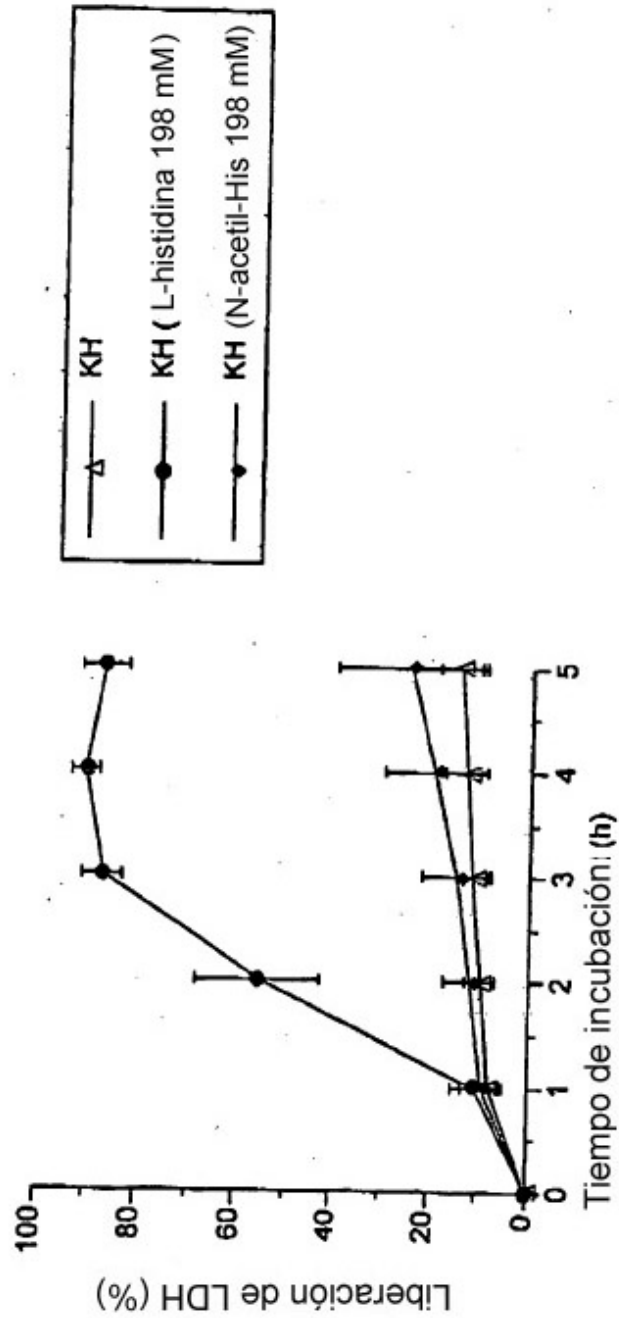
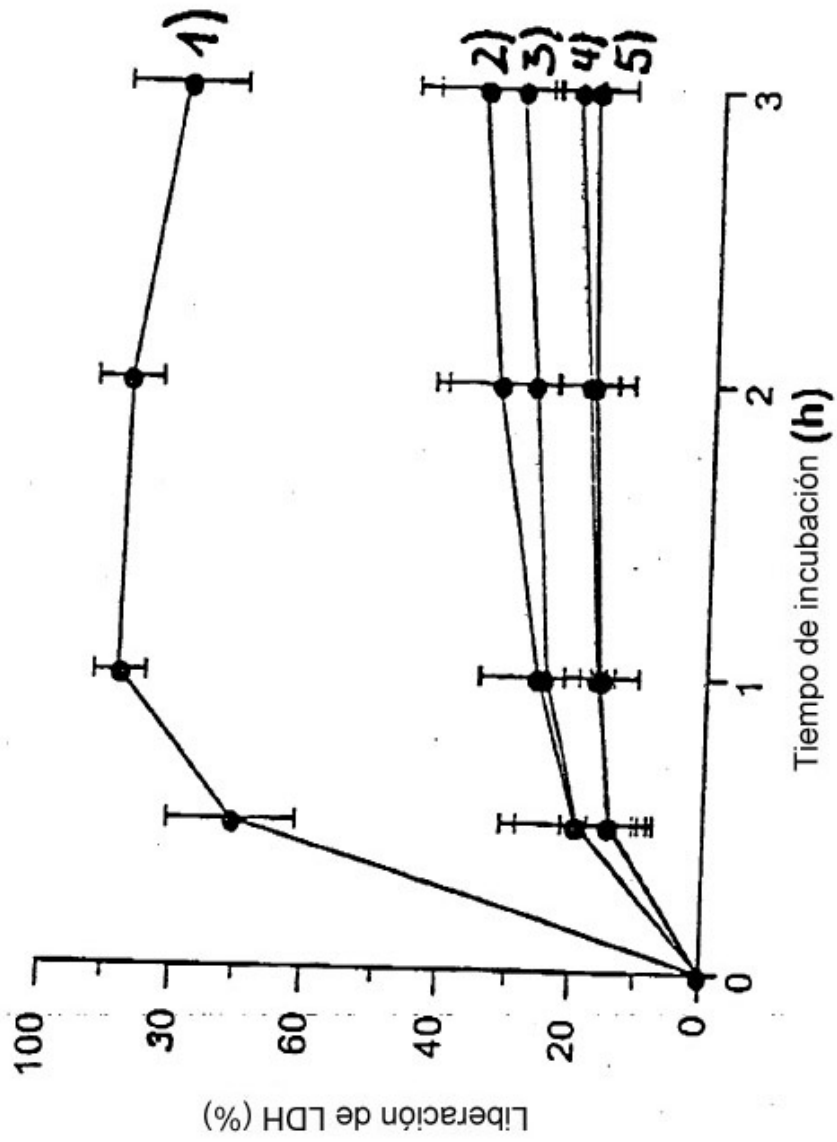


Fig. 4



**Fig. 5**

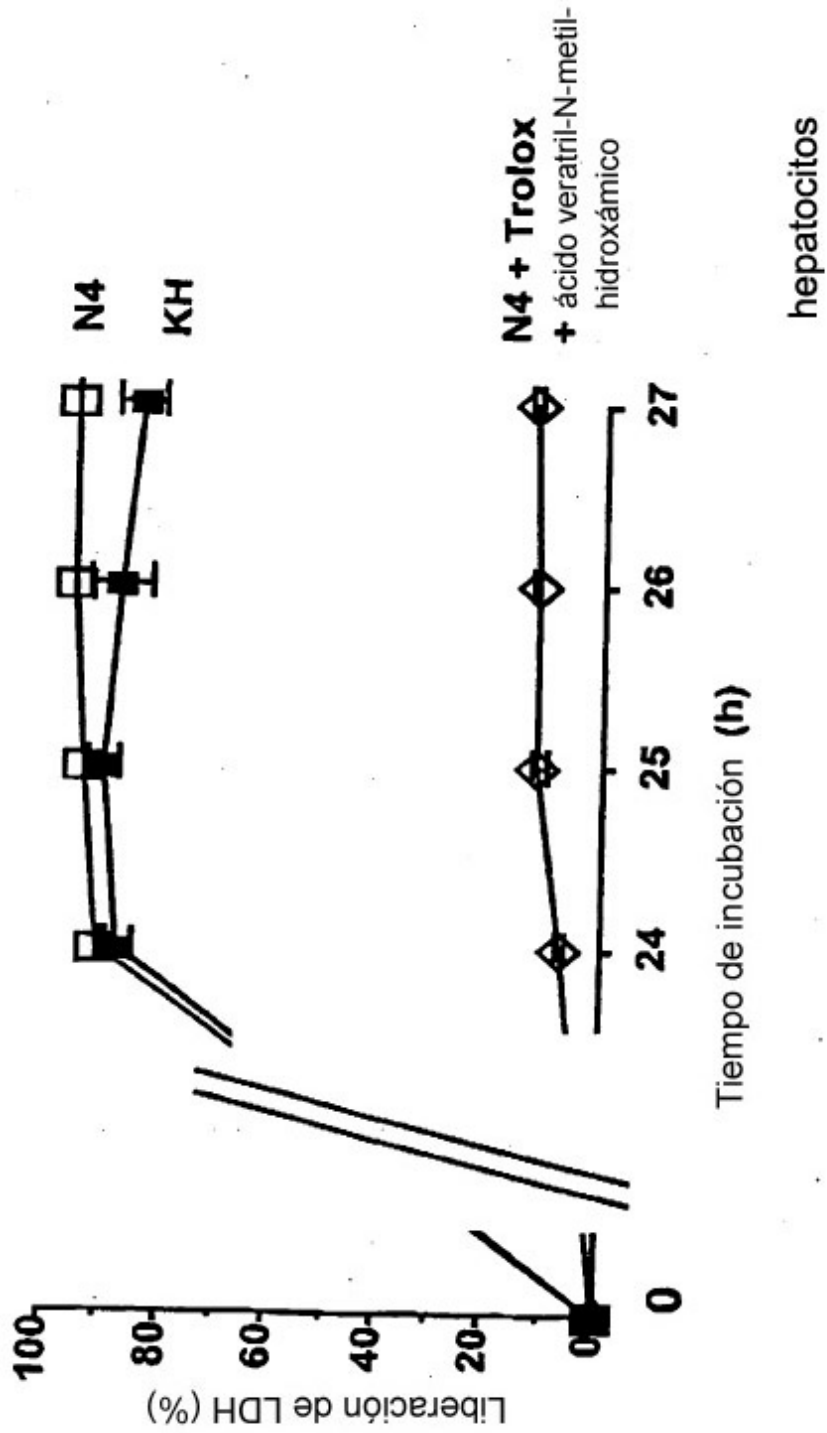


Fig. 6