

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 937**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06100589 .8**
96 Fecha de presentación: **19.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1815741**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **USO DE COMPOSICIONES DE DERIVADOS DE N-PIPERIDINA PARA PROTEGER SISTEMAS BIOLÓGICOS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

73 Titular/es:
Medestea Research & Production S.p.A.
Via Ribes, 5
10010 Colletterto Giacosa (TO), IT

72 Inventor/es:
Merizzi, Gianfranco y
Soleti, Antonio

74 Agente: **Linage González, Rafael**

ES 2 368 937 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

Uso de composiciones de derivados de N-piperidina para proteger sistemas biológicos

5 La presente invención se refiere a composiciones y al uso de estas composiciones en la formulación de soluciones de conservación para proteger mamíferos (incluidos seres humanos), sistemas biológicos como preparaciones biotecnológicas (incluidas proteínas recombinantes), órganos, tejidos (incluidos sangre completa y derivados sanguíneos como plaquetas y plasma) y células (incluidos glóbulos rojos, células β pancreáticas, células madre y células germinales) del deterioro oxidativo que se produce, por ejemplo, durante las diferentes fases de trasplantes y cirugía. Más particularmente, esta invención se refiere a un método para proteger y/o mejorar la viabilidad de preparaciones biotecnológicas/células/tejidos/órganos de mamíferos durante el aislamiento (o recolección), conservación (o almacenamiento), expansión (o cultivo), trasplante y cirugía usando composiciones que contienen una cantidad eficaz de (bis)-hidroxilaminas cíclicas antioxidantes derivadas de N-piperidina.

15 La generación de radicales libres altamente reactivos, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical perhidroxilo ($H O_2^{\cdot}$), el singleton de oxígeno ($^1A O_2$), el radical hidroxilo ($HO\cdot$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dióxido de nitrógeno (NO_2), peroxinitrito (NOO^{\cdot}) y otros radicales (R^{\cdot}) (alquilo- L^{\cdot} , alcoxi- LO^{\cdot} , peroxi- LOO^{\cdot} , etc.) tiene un efecto perjudicial sobre la viabilidad de sistemas biológicos como preparaciones biotecnológicas (incluidas proteínas recombinantes), órganos, tejidos (incluidos derivados de sangre completa como plaquetas y plasma) o células (incluidos glóbulos rojos, células β pancreáticas, células madre y células germinales) durante el aislamiento, conservación (o almacenamiento), expansión (o cultivo), trasplante o cirugía de bypass de órganos (por ejemplo, cardiopulmonar) (véase, por ejemplo, la publicación de Bottino R., *Diabetes*, 53, 2559-2567, 2004).

25 Es conocido, por ejemplo, que el trasplante satisfactorio de órganos está limitado a menudo debido a la lesión isquémica/de reperfusión: el fallo se origina de los riesgos de degradaciones e incluso necrosis del injerto, que se manifiestan por sí mismos durante la reoxigenación del órgano trasplantado y que están asociados con la isquemia, habitualmente prolongada, que se produce entre el inicio del propio trasplante del donante y la compleción del implante en el receptor. Por tanto, el minimizar la morbilidad y la mortalidad por el deterioro de tejidos del injerto durante la lesión de isquemia y reperfusión es de una enorme relevancia clínica (véase, por ejemplo, la publicación de Tsuchihashi S.I. et al., *Curr. Opin. Organ Transplant.*, 9, 145-152, 2004).

30 Una isquemia de cinco a seis horas debida a una "isquemia en calor", que se produce durante la extirpación del donante, la "isquemia en frío", que sigue a la fase de almacenamiento hipotérmico (universalmente aceptada como la estrategia básica para el mantenimiento y transporte de órganos para trasplantes), y la "isquemia global", que se produce durante el implante, constituyen (por ejemplo, en el caso del corazón) el límite superior tolerable y no descarta un gran número de accidentes. Naturalmente, otros órganos/tejidos como el hígado, colgajos cutáneos/musculares, tráquea, dedos amputados, páncreas, riñón, pulmón, intestino o células (por ejemplo, células de islotes pancreáticos) son sometidos a un deterioro cuando son extirpados del hospedante antes (o durante) el cultivo, la expansión y el trasplante. En este último caso, durante la reperfusión del órgano en el receptor, se producen realmente radicales libres de oxígeno en grandes cantidades (véase, por ejemplo, la publicación de Vega D.J. et al., *Am. Thorac. Surg.*, 71, 1442-1447, 2001).

45 Para superar el límite, han sido diseñadas muchas soluciones diferentes de conservación de órganos, ya que los investigadores han buscado no solamente prolongar el tiempo en que un órgano puede permanecer extracorporalmente, sino también hacer máxima la función de los órganos/células a continuación del implante.

Ejemplos de soluciones convencionales de conservación son los siguientes:

- 50 • solución de Celsior, descrita en Menosche P. et al., *Eur. J. Cardiothoracic Surg.* 8, 207-215, 1994;
- solución de University of Wisconsin, descrita en la patente de EE.UU nº 4.798.824;
- solución de Collins, descrita en Maurer E.J. et al., *Iran-plant. Proc.* 22, 548-550, 1990;
- 55 • solución de Euro-Collins, descrita por Collins G. M. and Holsz N. A., *Surgery* 39, 432, 1976 & *Eurotransplant Formation Annual Report*, 1976;
- solución de Columbia University, descrita en la patente de EE.UU nº 5.552.267;
- 60 • solución de Krebs-Henseleit, descrita por Sharek H.J. et al., *Pfluger's Arch.* 354, 349-365, 1975;
- solución de Stanford, descrita en Swanson D. K. et al., *J. Heart Transpl.* 7, 456, 467, 1988;
- 65 • solución de Lactate Ringer, también denominada solución de Hartmann, descrita en Dreikorn K. et al., *Eur. Urol.* 6, 221-224, 1980;

- solución de S. Thomas II, descrita por Jynge P. et al., *Scand. J. Thorac. Cardio. Surg. Suppl.* 30, 1-28, 1981;
- solución de CRMBM, descrita en Bernard M. et al., *J. Heart Lung Transplant* 18, 572-581, 1999;
- solución de LYPS, descrita en Michel P. et al., *J. Heart Lung Transplant* 21, 1030-1039, 2002;
- ET-Kyoto solution, descrito en Chen F. et al., *Yonsei Med. J.* 45, 1107-1114, 2004;
- solución de CMU-I, descrita en Cheng Y. et al., *World J. Gastroenterol.* 11, 2522-2525, 2005;
- solución de Polysol, descrita en Bessems M. et al., *Transpl. Proc.* 37, 326-328, 2005.

Sin embargo, hasta la fecha, las soluciones de conservación anteriormente citadas presentan ventajas solamente limitadas para luchar eficazmente contra el deterioro oxidativo. Esto es debido al hecho de que los agentes protectores contenidos en las soluciones, que son sustancias convencionales (que incluyen antioxidantes) capaces de contrarrestar la producción o los efectos de los radicales libres reactivos, como derivados de trolox de vitamina E (Trolox C), allopurinol, desferoxamina, indanoindoles, catalasa, prooxidasa, superóxido dismutasa, glutatión, N-acetilcisteína, nitróxidos, ginkgolidas, coenzima Q, β-caroteno, cianidol (véanse, por ejemplo, el documento WO 88/05044, la patente de EE.UU. nº 5.002.965, la patente de EE.UU. nº 6.054.261, la patente de EE.UU. nº 5.498.427, la patente de EE.UU. nº 4.877.810; el documento WO 95/02323, el documento WO 02/102149) usados solos o en combinación (véase, por ejemplo, la publicación de Nelson S.K. et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 149-157, 2005), no son la mejor alternativa para la protección de sistemas biológicos contra el deterioro oxidativo. La utilidad limitada de los compuestos citados se basa en el hecho de que, por ejemplo, las enzimas antioxidantes pueden actuar de forma extracelular y selectiva respecto a solamente un tipo de radical (por ejemplo, superóxido dismutasa respecto a anión superóxido O₂⁻) y compuestos orgánicos como glutatión (el agente más ampliamente usado en soluciones de conservación) se puede comportar realmente como pro-oxidante (véase, por ejemplo, Gnaiger E. et al., *Transplantation Proc.* 32, 14, 200) o no tienen efectos si se separan de la solución (véase, por ejemplo, Urushihara T. *Transplantation* 53, 750-754, 1992).

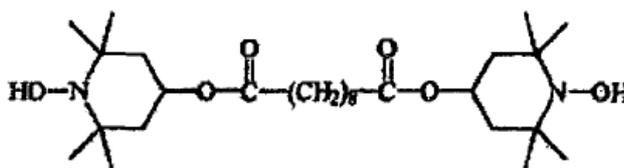
La necesidad de nuevas soluciones de conservación refinadas, que contengan más aditivos eficaces para la lesión de isquemia y reperfusión, está fuertemente provocada de hecho por la comunidad científica internacional (véase, por ejemplo, Kupiec-Weglinski J.W., *Curr. Op. Organ Transpl.* 9, 130-131, 2004).

Para resolver estos problemas, la presente invención proporciona un método para conservar y/o mejorar la viabilidad ex vivo de un sistema biológico de mamífero y soluciones para proteger sistemas biológicos, como se define en las reivindicaciones anejas.

El método de la invención hace uso de composiciones protectoras eficaces que contienen hidroxilaminas cíclicas antioxidantes derivadas de N-piperidina. Estos antioxidantes muy potentes sobre los convencionales (por ejemplo, actúan sobre la mayoría, si no la totalidad, de radicales centrados de carbono, nitrógeno y oxígeno de interés biológico que incluyen radicales peroxilo, superóxido y peroxinitrito), que se ha encontrado actualmente que son útiles para soluciones de conservación de sistemas biológicos de mamíferos de acuerdo con la presente invención, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.981.548 y el documento WO 2005/084677, así como los procedimientos para su preparación.

La invención proporciona soluciones de conservación/perfusión para proteger contra el deterioro oxidativo los sistemas biológicos de mamíferos (incluidos seres humanos), como preparaciones biotecnológicas (incluidas proteínas recombinantes), órganos, tejidos (incluidos derivados de tejidos como plaquetas y plasma) o células (incluidas células madre, islotes pancreáticos, células germinales y glóbulos rojos), durante el aislamiento (o recolección), conservación (por ejemplo, perfusión, almacenamiento), expansión (o cultivo), trasplante y cirugía (por ejemplo, bypass cardiopulmonar).

En las soluciones de conservación, es compuesto conocido como bis(1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)decanodioato, que tiene la fórmula



debe ser preferido y usado preferentemente en el intervalo de 0,001 a 50 mM, preferentemente en la forma de una

sal fisiológicamente aceptable. Ejemplos no limitativos de estas sales son cloruro, fumarato y maleato. El cloruro es la primera alternativa.

5 Las soluciones para la conservación de materiales biológicos, según la invención, comprenden, además del derivado de N-piperidina de fórmula (I) o (III), uno o más antioxidantes o agentes protectores adicionales, como los anteriormente citados.

10 Las soluciones de la invención son preferentemente sustancialmente isotónicas con el material biológico que va a ser conservado. Como se usa en la presente memoria descriptiva, una solución isotónica se refiere a una solución en la que las células no se hinchan ni se contraen sustancialmente. Preferentemente, las soluciones de conservación de la invención tienen una osmolalidad sustancialmente igual a la del material biológico que va a ser conservado. Sin embargo, esto no es un requisito de todas las soluciones de la invención, ya que algunas soluciones pueden incluir uno o más componentes que eleven la osmolalidad de la solución pero que sean capaces de atravesar libremente membranas semi-permeables, elevando así la presión osmótica igualmente en ambos lados de las membranas celulares. A modo de ejemplo, la osmolalidad puede variar en el intervalo de aproximadamente 15 270 a 450 mOsm/l.

20 Preferentemente, las soluciones de la invención comprenden una cantidad fisiológica aceptable de iones, seleccionado entre el grupo que consiste en iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato mono- y di-ácido, bicarbonato, cloruro y sus mezclas. Las cantidades típicas de iones de potasio, sodio, magnesio, calcio y cloruro se muestran, por ejemplo, en el documento US 5.498.427 (véase la reivindicación 6). La solución puede comprender adicionalmente una fuente de hidratos de carbono, como glucosa y manitol. El pH de la solución es normalmente entre 7,4 y 8,5.

25 Según una realización preferida, las composiciones comprenden desferoxamina, preferentemente a la concentración final en el intervalo de 0,001 a 55 mM, Na⁺ preferentemente de 0,1 a 200 mM y K⁺, preferentemente de 0,2 a 220 mM. La determinación de la dosificación óptima está entre las selecciones posibles que quedan abiertas al experto en la técnica y están ampliamente recogidas en la bibliografía.

30 Alternativamente, al menos un derivado de N-piperidina, aisladamente o junto con desferoxamina, o la combinación de K⁺ y Na⁺, si no están originalmente presentes, pueden ser usados como aditivo para soluciones de conservación disponibles en el comercio.

35 El (o los) ingrediente(s) debe(n) ser envasado(s) de la forma que es práctica común en este tipo de compuesto, como en una ampolla bajo atmósfera inerte o a vacío, de forma que el (o los) componente(s) sea(n) reconstituido(s) en un tampón adecuado fisiológicamente aceptable, o directamente en soluciones convencionales de conservación, antes de su uso.

40 La composición de la invención es para ser usada preferentemente en la conservación de sistemas o materiales biológico de origen humano, pero puede ser usada también para la conservación de materiales de origen animal, como animales de granja, gatos, perros, ganado, ovejas y cerdos.

45 El siguiente ejemplo hace posible que un experto en la técnica lleve a cabo la invención. Por lo tanto, el ejemplo es ilustrativo de esta invención y se incluye únicamente como una realización de la invención y no como una limitación. Por lo tanto, se describe el uso de la invención en un modelo en animales para un experimento de conservación de órganos (corazón de conejos), como por ejemplo isquemia en frío.

El ejemplo que sigue hace referencia a los dibujos anejos, en los cuales:

50 - la figura 1 es un diagrama que muestra la presión desarrollada expresada en mm de Hg después de una reperfusión cardíaca (1 h) bajo una potencia antioxidante equimolar, GSH frente a MP1001 **p<0,01 (método de categorías de Wilcoxon);

55 - la figura 2 es un diagrama que muestra la expresión de la peroxidación de lípidos, proteínas de carbonilo y niveles de LDH en corazones de conejos después de 1 h de reperfusión bajo una potencia antioxidante equimolar de GSH frente a MP1001 **p<0,01 (método de categorías de Wilcoxon); y

60 - la figura 3 es un diagrama que muestra en análisis histológico de corazones de conejos después de 1 h de reperfusión bajo potencia antioxidante equimolar de GSH frente a MP1001 **p<0,01 (método de categorías de Wilcoxon).

Ejemplo

65 Los informes plantean controversias sobre las ventajas de las soluciones de conservación para la conservación de injertos cardíacos durante la hipotermia. Las soluciones de almacenamiento en frío pueden ser clasificadas en 2 tipos, extracelular e intracelular, basadas en las concentraciones de K⁺ y Na⁺. Dicho de otro modo, las soluciones de

tipo extracelular emulan los fluidos extracelulares, $[Na^+] \geq 70$ mmol/l, $[K^+] = 5 \sim 30$ mmol/l, y las soluciones de tipo intracelular emulan los fluidos intracelulares, $[Na^+] < 70$ mmol/l, $[K^+] = 30 \sim 125$ mmol/l. Unas recientes investigaciones comparativas sobre las soluciones más ampliamente usadas mostraron que las soluciones de tipo extracelular proporcionaban una mejor conservación de lo que lo hacían las de tipo intracelular (véase, por ejemplo, la publicación de Michel P. et al., *J. Heart & Lung Transpl.* 21, 1030-1035, 2002). Entre las soluciones extracelulares, las Celsior mostraron una elevada eficacia para la conservación de corazones. Además, las evidencias de crecimiento a partir de ensayos clínicos al azar en múltiples centros apoyan el uso de una solución de conservación Celsior en la recolección de múltiples órganos como una solución de almacenamiento en frío universal para órganos intra-abdominales y para órganos intra-torácicos (véase, por ejemplo, Faenza A. et al., *Transplantation* 72, 1274-1277, 2001).

Por estas razones, la solución Celsior se está convirtiendo en la solución estándar relevante a nivel mundial y, por lo tanto, es seleccionada como la más indicativa para verificar la eficacia de compuestos o composiciones clínicas según la presente invención.

A continuación se da una breve explicación de una técnica convencional para la conservación de órganos (corazones), ya que el método expuesto en la presente memoria descriptiva está ampliamente descrito en la bibliografía.

Se mantuvieron conejos de Nueva Zelanda machos (1,4-1,8 kg de peso) bajo dieta de laboratorio estándar complementada con "gránulos Nossan" (tanto los animales como los gránulos están disponibles en la empresa Nossan Company, Milán, Italia) y fueron albergados durante tres semanas (humedad relativa $50\% \pm 10\%$, temperatura $22^\circ C \pm 1^\circ C$ y en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas, con la primera luz a las 7,30 a.m.) antes de los experimentos; los alimentos y el agua estuvieron disponibles a discreción.

Los corazones fueron rápidamente extirpados de animales anestesiados (55 mg/kg de peso corporal de pentobarbital de sodio; seguidamente se usaron diez conejos para cada grupo de experimentos) se inundaron con las respectivas soluciones experimentales y se colocaron en Celsior en frío ($4^\circ C$) más MP1001 5 mM o Celsior más GSH 5 mM durante 24 horas. Como la solución estándar Celsior contiene glutatión reducido 3 mM (GSH), se realizaron experimentos comparativos en términos de "potencia antioxidante total" usando una cantidad antioxidante equimolar (por ejemplo, añadiendo MP1001 5 mM o GSH 5 mM a Celsior).

Al final de la conservación en frío, los órganos fueron seguidamente sometidos a reperfusión en un modelo de corazón de funcionamiento Langerdoff con tampón de Krebs-Henseleit oxigenado (NaCl 120 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, CKI 4,9 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, $MgSO_4$ 1,25 mM y glucosa 10 mM). Los tampones se hicieron burbujear regularmente con una mezcla de O_2 (95%) y CO_2 (5%); el CO_2 ayudó a mantener el tampón a un pH fisiológico (7,4). Al mismo tiempo, el aparato tenía un encamisado de agua extensivo conectado a un calentador de agua que mantenía los tampones y corazones a $37^\circ C$. Los tampones se filtraron a través de un dispositivo Gelman GA-4, 0,8 μm de membrana métrica, antes de ser usados. Un balón de látex relleno de solución salina conectado a través de un transductor de presión a un registrador de polígrafo fue insertado en el ventrículo izquierdo a través de una atriotomía izquierda y fue afianzado por medio de un punto de sutura la válvula mitral. La sutura era suficientemente floja para permitir la salida de fluido del ventrículo.

Después de 24 horas de conservación en frío y una reperfusión durante 1 hora, la presión desarrollada (como una medida de la protección) de los corazones conservados en Celsior (estándar/testigo) era una media de $34 \pm 9,55$ mm de Hg. Los órganos ya no pudieron convertir ni mantener un buen ritmo sinusoidal ni contraerse eficazmente. Se determinó que este nivel de recuperación no era suficiente y se procedió a añadir el antioxidante cardioprotector MP1001 (5 mM) o GSH (5 mM), para tener una "concentración de antioxidante" final de 8 mM equimolar.

La figura 1 muestra claramente que el antioxidante MP1001, cuando es añadido a solución Celsior estándar, es capaz de proporcionar una protección considerable y significativa ($p < 0,01$). Cuando los corazones fueron conservados con esta solución modificada, sometidos a cardioplegia durante 24 horas y a reperfusión, la recuperación medida mediante la presión desarrollada fue de $88 \pm 9,02$ mm de Hg. Por el contrario, la presencia en un dispositivo Celsior de una cantidad equimolar (GSH 8 mM) del antioxidante convencional más usado (glutatión reducido), no proporcionó ninguna protección adicional en comparación con una solución estándar (GSH 3 mM).

La peroxidación de lípidos se determinó mediante la cuantificación de la liberación de malondialdehído (MDA) acumulado en células que usaron un biomarcador, esencialmente según Buege Y.A. y Aust S.G., *Method Enzymol*, 52, 302-310, 1978. La figura 2a muestra claramente en elevado desarrollo de productos de peroxidación de lípidos en presencia de solución Celsior estándar. El uso de GSH 5 mM adicional no modificó significativamente este parámetro. Por el contrario, la adición de MP1001 a la solución de conservación Celsior provocó una reducción considerable y significativa ($p < 0,01$) de la peroxidación de lípidos ($1,28 \pm 0,37$ Celsior frente a $0,31 \pm 0,10$ Celsior + MP1001). La modificación oxidativa de proteínas es un biomarcador típico de la lesión de reperfusión como consecuencia de un ataque por radicales reactivos libres (*Fundam. Clin. Pharmacol.*, 19, 491-946, 2005). La figura 2b muestra la presencia de una disminución significativa ($p < 0,01$) y simultánea en los niveles de proteínas tanto de

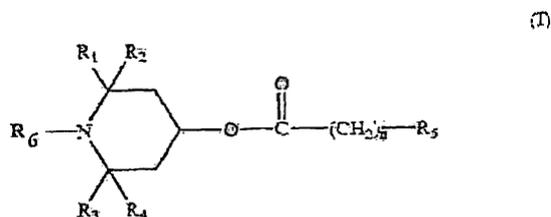
peroxidación como de carbonilo determinada mediante MP1001 (198 ± 18 Celsior frente a 48 ± 11 Celsior + MP1001). Nuevamente, los niveles de LDA en el perfusado se redujeron significativamente ($p < 0,01$) mediante MP1001 en comparación con Celsior (figura 2c) ($11 \pm 2,5$ Celsior frente a $0,3 \pm 0,1$ Celsior + MP1001). Tanto las carbonil-proteínas como LDA no fueron modificadas mediante el complemento de GSH.

5 Es conocido que la rotura de la arquitectura miocárdica indica un deterioro de la reperfusión. El análisis histopatológico del tejido graduado para el grado de lesión de miocitos, edema y deterioro endotelial fue congruente con los resultados previos, mostrando la menor cantidad de rotura de la arquitectura miocárdica. El análisis histopatológico muestra la protección de los corazones almacenados en presencia de MP1001 en comparación con
10 GSH (figura 3). Los corazones mantuvieron una lesión menor en todos los criterios examinados.

Estos ensayos muestran que, según la presente invención, la presencia de MP1001 en la solución Celsior es capaz de reducir enormemente el deterioro isquémico después de una reperfusión del corazón almacenado en comparación con un almacenamiento en solución Celsior estándar. Estos datos demuestran la capacidad del
15 compuesto de la invención para ejercer un efecto protector excepcional de los corazones isquémicos, mejorando así la viabilidad de órganos conservados en frío.

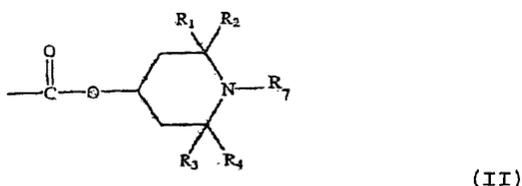
REIVINDICACIONES

1. Un método para conservar y/o mejorar la viabilidad ex vivo de un sistema biológico de mamífero, que comprende poner en contacto dicho sistema biológico con una solución de conservación que comprende un compuesto de fórmula:



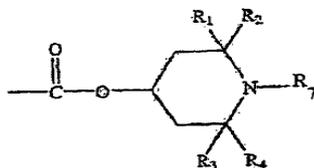
en la cual:

R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente uno de otro, alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, R₆ es oxígeno o hidroxilo y R₅ es



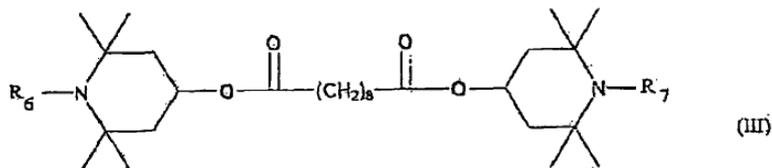
en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente uno de otro, alquilo que tiene de 1 a 6 átomo de carbono, R₇ es oxígeno o hidroxilo y n es un número entero de 2 a 14; o una sal fisiológicamente aceptable de dicho compuesto.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente uno de otro, un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono y R₅ es:



en el que R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente uno de otro, un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, R₇ es oxígeno o hidroxilo y n es un número entero de 6 a 10.

3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el compuesto es de fórmula



en la que R₆ y R₇ son iguales o diferentes y se seleccionan entre oxígeno e hidroxilo.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los sistemas biológicos se seleccionan entre preparaciones biotecnológicas como proteínas recombinantes, órganos como el corazón, hígado, páncreas, riñón, pulmón, intestino, tráquea así como órganos amputados como dedos, tejidos como colgajos cutáneos/musculares, sangre completa, derivados sanguíneos como plaquetas y plasma y células como glóbulos rojos, células de islotes pancreáticos, células madre y células germinales.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los compuestos están en la forma de sales fisiológicamente aceptables, preferentemente seleccionadas entre el grupo que consiste en cloruro, fumarato y maleato.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto está presente en la solución de conservación en una cantidad antioxidante eficaz, preferentemente en el intervalo de 0,001 a 50 mM.
- 5 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto es añadido a una solución de conservación estándar disponible en el comercio como solución Celsior, solución University of Wisconsin (UW-1), Solución Modified University of Wisconsin (UW-2), solución Krebs-Henseleit, solución St. Thomas 1 (STH-1) y 2 (STH-2), solución de Collins, Solución Euro-Collins (EC), solución de Ringer lactada, solución Columbia University, solución Standford (STF), solución de conservación Lyon (LYPS), solución Bretschneider (HTK), solución RMBM, solución ET-Kioto, solución CMV-1, solución Polysol o solución de NaCl.
- 10 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto es usado en combinación con desferoxamina, preferentemente en el intervalo de 0,01 a 55 mM y, si no está ya presente, Na⁺, preferentemente a la concentración final en el intervalo de 0,1 a 200 mM y K⁺, preferentemente a la concentración final en el intervalo de 0,2 a 220 mM.
- 15 9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho compuesto está comprendido en una solución tamponante acuosa isotónica que comprende desferoxamina, en el intervalo de 0,01 a 55 mM, Na⁺ en el intervalo de 0,1 a 200 mM y K⁺ en el intervalo de 0,2 a 220 mM.
- 20 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sistema biológico se pone en contacto con la solución de conservación mediante infusión, inmersión, inundación, perfusión o cultivo.
- 25 11. Una solución acuosa basada en solución salina para la conservación de materiales biológicos, particularmente para el almacenamiento, perfusión y reperfusión *ex vivo* de órganos de mamíferos, que comprende una cantidad antioxidante eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se define o en la reivindicación 1 o (III) como se define en la reivindicación 3, o en una sal fisiológica aceptable de los mismos y que comprende adicionalmente un compuesto conservante o antioxidante seleccionado entre el grupo de derivados de trolox de vitamina E (Trolox C), allopurinol, desferoxamina, indaindoles, catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, glutatión, N-acetilcisteína, nitróxidos, ginkólidos, coenzima Q, β-caroteno, cianidol y sus mezclas.
- 30 12. Una solución según la reivindicación 11, que comprende una cantidad fisiológicamente aceptable de un ion seleccionado entre el grupo que consiste en sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato mono- y bi-ácido, bicarbonato, cloruro y sus mezclas.
- 35 13. Una solución según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende adicionalmente una fuente de hidratos de carbono.
- 40 14. Una solución según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que tiene un pH de 7,4 a 8,5.
15. Una solución según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende desferoxamina, preferentemente en la concentración de 0,01 a 55 mM.
16. Una solución según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende iones de sodio, preferentemente de 0,1 a 200 mM e iones de potasio, preferentemente de 0,2 a 220 mM.

FIG. 1

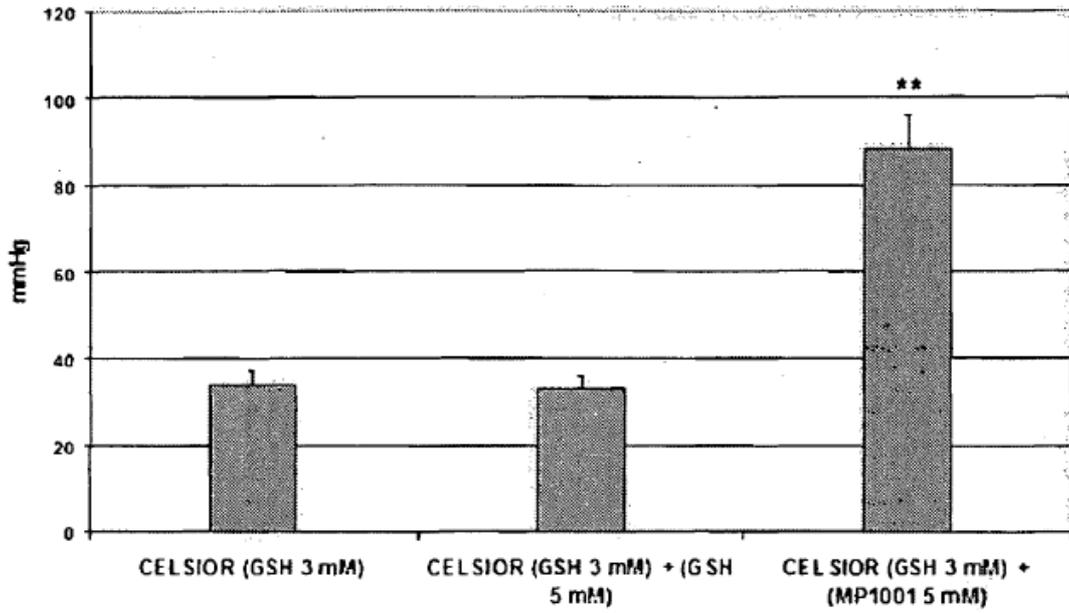


FIG. 2

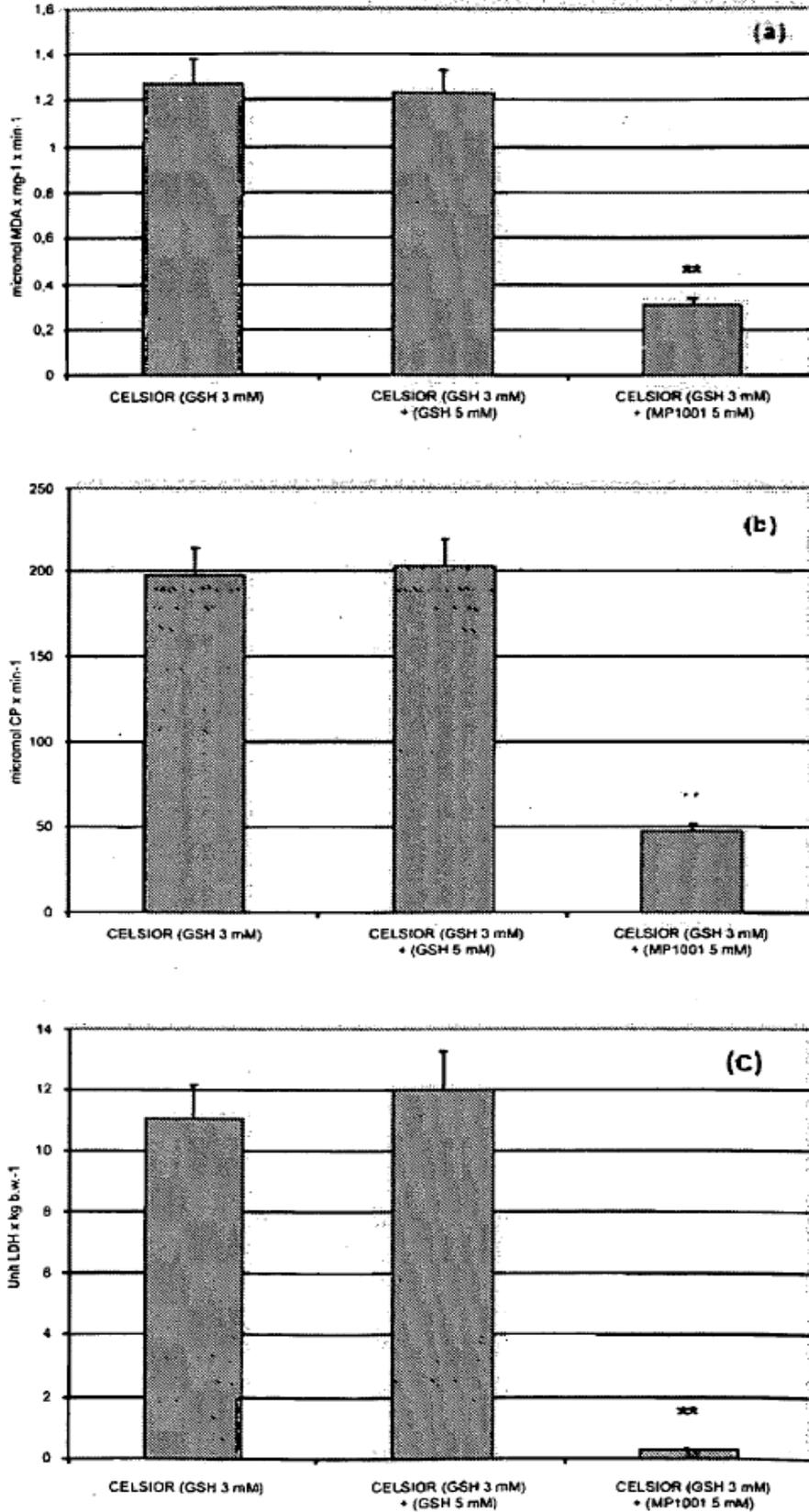


FIG. 3

