

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 948**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2006** **E 06847547 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013** **EP 2056851**

54 Título: **Conservación y/o perfusión de órganos**

30 Prioridad:

09.12.2005 US 748645 P

08.12.2006 US 635507

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

18.12.2013

73 Titular/es:

**PHILADELPHIA COLLEGE OF OSTEOPATHIC
MEDICINE (100.0%)**

**4190 City Avenue
Philadelphia, Pennsylvania 19131, US**

72 Inventor/es:

YOUNG, LINDON

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 434 948 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

Conservación y/o perfusión de órganos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una solución para la conservación, perfusión y/o reperfusión de un órgano, especialmente el corazón, para trasplante. La solución contiene inhibidor(es) peptídico(s) de la proteína quinasa C ϵ (PKC ϵ).

10 Antecedentes de la invención

El trasplante de órganos con éxito con frecuencia está limitado debido a lesión isquémica/reperfusión. Los corazones humanos aislados privados de oxígeno durante más de cuatro horas progresivamente pierden vigor y con frecuencia no sobreviven en los huéspedes receptores. Otros órganos tal como el riñón, hígado, páncreas y pulmón también están sometidos a daño tisular y celular cuando se retiran de sus huéspedes antes del trasplante. Este daño se debe a condiciones hipóxicas y una falta de circulación, que normalmente administra concentraciones fisiológicas de oxígeno y nutrientes, y elimina compuestos tóxicos producidos por las células de un órgano. Los trasplantes de órganos tienen una mayor frecuencia de éxito cuando se realizan inmediatamente después de la extracción de sus huéspedes.

Avances recientes han aumentado el índice de trasplantes de órgano con éxito y cirugía de órganos, tal como cirugía de revascularización coronaria. El primero incluye soluciones de conservación del órgano y de perfusión del órgano. El segundo es métodos y dispositivos mejorados para la administración de soluciones de perfusión de órganos a un órgano.

La conservación miocárdica a corto plazo actualmente está proporcionada por almacenamiento en frío después de la parada cardiopléjica. Sin embargo, existe una variedad de procesos que se diferencian por la composición de la solución usada, la temperatura de conservación y el protocolo de administración. Se han desarrollado diferentes soluciones para parar y conservar el corazón para proteger el miocardio en cirugía cardíaca. Los ejemplos de estas soluciones incluyen la solución de Krebs-Hanseleit, solución UW, solución St. Thomas II, solución Collins y solución Stanford. (Véanse, por ejemplo las patentes en EE UU Nos. 4.798.824 y 4.938.961; Southard y Belzer, *Ann. Rev. Med.* 46:235-247 (1995); y Donnelly y Djuric, *Am. J. Hosp. Pharm.* 48:2444-2460 (1991)). No obstante, los rechazos de órganos aún permanecen debido al deterioro en el estado del órgano trasplantado entre el tiempo de retirada y el restablecimiento del flujo sanguíneo en el receptor.

El restablecimiento del flujo sanguíneo es el objetivo principal para el tratamiento de tejido de órgano que experimenta isquemia prolongada, por ejemplo, durante el trasplante. Sin embargo, la reperfusión del flujo sanguíneo induce lesión en el endotelio y miocitos, lo que produce disfunción del órgano (Buerke et al., *Am J Physiol* 266: H128-136, 1994; Lucchesi y Mullane, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 26: 2011-2024, 1986; y Lucchesi et al., *J Mol Cell Cardiol* 21: 1241-1251, 1989). Los sucesos secuenciales asociados con la lesión de reperfusión se inician por la disfunción endotelial que se caracteriza por una reducción de la liberación basal por las células endoteliales de óxido nítrico (NO) en los primeros 2,5-5 minutos tras la reperfusión (Tsao y Lefer, *Am J Physiol* 259: H1660-1666, 1990). La disminución en el NO de origen endotelial se asocia con el aumento de moléculas de adhesión en membranas de células endoteliales y leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Ma et al., *Circ Res* 72: 403-412, 1993; y Weyrich et al., *J Leuko Biol* 57: 45-55, 1995). Este suceso fomenta la interacción PMN/endotelial, que se produce a los 10 a 20 minutos tras la reperfusión, y la posterior infiltración de PMN en el miocardio se observa a los 30 minutos tras la reperfusión (Lefer y Hayward, En *The Role of Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion: Contemporary Cardiology*, Loscalzo et al. (Eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 357-380, 2000; Lefer y Lefer, *Cardiovasc Res* 32: 743-751, 1996; Tsao et al., *Circulation* 82: 1402-1412, 1990; y Weyrich et al., *J Leuko Biol* 57: 45-55, 1995).

Las sustancias quimiotácticas liberadas del tejido reperfundido y factores del plasma activan las PMN que aumentan la liberación de sustancias citotóxicas de PMN (es decir, anión superóxido) y contribuyen a la disfunción de órganos después de isquemia/reperfusión (Lucchesi et al. *J Mol Cell Cardiol* 21: 1241-1251, 1989; Ma et al., *Circ Res* 69: 95-106, 1991; Tsao et al., *Circulation* 82: 1402-1412, 1990; y Tsao et al., *Am Heart J* 123: 1464-1471, 1992). El superóxido se combina con NO para producir anión peroxinitrito reduciendo de esta manera la biodisponibilidad de NO y fomenta la disfunción endotelial y la infiltración de PMN después de isquemia/reperfusión miocárdica (Clancey et al., *J Clin Invest* 90: 1116-1121, 1992; Hansen, *Circulation* 91: 1872-85, 1995; Lucchesi et al., *J Mol Cell Cardiol* 21: 1241-1251, 1989; Rubanyi y Vanhoutte, *Am J Physiol* 250: H815-821, 1986; Tsao et al., *Am Heart J* 123: 1464-1471, 1992; y Weiss, *New Eng J Med* 320: 365-375, 1989).

Por tanto, permanece una necesidad para una solución de calidad mejorada que pueda extender el tiempo de conservación de un órgano para trasplante y proteger el órgano de lesión de reperfusión tras la isquemia, de modo que el órgano pueda continuar la función adecuada después del restablecimiento del flujo sanguíneo.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una solución para la conservación, perfusión y/o reperfusión de un órgano, especialmente el corazón, que contiene inhibidor(es) peptídico(s) de la proteína quinasa C ϵ (PKC ϵ), que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1. La solución protege los tejidos y células de un órgano de daño mientras el órgano está aislado del sistema circulatorio. El presente inventor ha descubierto que los inhibidores peptídicos de PKC ϵ pueden ejercer efectos protectores sobre órganos sometidos a isquemia/reperfusión.

En una forma de realización, la solución contiene aproximadamente de 1-10 μ M, preferiblemente aproximadamente 1-5 μ M, del inhibidor peptídico de la PKC ϵ disuelto en una solución, preferiblemente una solución salina.

La solución de la presente invención se puede usar como una solución de perfusión o una solución de conservación. Como solución de perfusión, se bombea en la vasculatura del órgano para proteger los tejidos y células del órgano. Como solución de conservación, sirve como una solución de baño en la que el órgano se sumerge. Preferiblemente, el órgano se perfunde con y se sumerge en la presente solución. Además, la presente solución también sirve como solución de reperfusión tras el restablecimiento del flujo sanguíneo al órgano después de la isquemia.

La presente invención también incluye métodos de usar la solución de la presente invención. Estos incluyen métodos para conservar un órgano para trasplante, para proteger un órgano isquémico del daño, para atenuar la disfunción de un órgano después de la isquemia, y para proteger un órgano del daño cuando se aísla del sistema circulatorio.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra la evolución temporal de la LVDP (presión desarrollada ventricular izquierda = presión telesistólica ventricular izquierda (LVESP) - presión telediastólica ventricular izquierda (LVEDP)) en corazones de rata perfundidos I/R de referencia, I/R, I/R+PMN e I/R+PMN+ inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M).

La figura 2 es un gráfico que muestra la evolución temporal de LVEDP en grupos de I/R de referencia, I/R, I/R+PMN e I/R+PMN+ inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M).

La figura 3 es un gráfico que muestra las LVDP inicial y final expresadas en mm Hg de corazones de rata perfundidos aislados antes de la isquemia (I) (Inicial) y después de 45 minutos tras la reperfusión (Final). Los corazones se perfundieron en presencia o ausencia de PMN. Las PMN indujeron una disfunción contráctil significativa, que se atenuó por el inhibidor peptídico de la PKC ϵ . Todos los valores se expresan como media $\pm$ EEM. Los números de los corazones examinados están en la parte inferior de las barras.

La figura 4 es un gráfico que muestra las velocidades máximas de LVDP inicial y final (+dP/dt max) expresadas en mm Hg/s en corazones de rata perfundidos aislados antes de la isquemia (Inicial) y después de la reperfusión (Final). Los corazones se perfundieron en presencia o ausencia de PMN. Las PMN indujeron una disfunción contráctil significativa, que se atenuó por el inhibidor peptídico de la PKC ϵ . Todos los valores se expresan como media $\pm$ EEM. Los números de los corazones examinados están en la parte inferior de las barras.

La figura 5 es un gráfico que muestra los flujos coronarios entre los siete grupos en los experimentos de función cardíaca (I/R de referencia, I/R de referencia + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M), I/R, I/R + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M), I/R+PMN e I/R+PMN+ inhibidor peptídico de PKC ϵ (1 y 5 μ M)).

La figura 6 es un gráfico que muestra las frecuencias cardíacas entre los siete grupos en los experimentos de función cardíaca (I/R de referencia, I/R de referencia + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M), I/R, I/R + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M), I/R+PMN e I/R+PMN+ inhibidor peptídico de PKC ϵ (1 y 5 μ M)).

La figura 7 es un gráfico que muestra la liberación de NO del endotelio aórtico de rata en segmentos sin tratar (basal) comparados con segmentos tratados con inhibidor peptídico de PKC ϵ (1, 5 y 10 μ M).

Descripción detallada de la forma de realización preferida

La presente invención proporciona una solución para la conservación, perfusión y/o reperfusión de un órgano, especialmente el corazón. La solución contiene inhibidor(es) peptídico(s) de la proteína quinasa ϵ (PKC ϵ) que tiene la secuencia de aminoácidos de EAVSLKPT (SEQ ID NO: 1). Preferiblemente, el inhibidor peptídico de la PKC ϵ está presente en la solución en una cantidad de aproximadamente 1-10 μ M, más preferiblemente aproximadamente 1-5 μ M, más preferiblemente aproximadamente 3-5 μ M. Además, en otras formas de realización, se prefiere que el inhibidor peptídico esté miristilado para facilitar una mejor adsorción en las células del órgano. La miristilación es preferiblemente en el extremo N del inhibidor peptídico.

En una forma de realización preferida, el/los inhibidor(es) peptídico(s) se disuelve(n) en una solución salina, preferiblemente solución salina normal (NaCl al 0,9%). El/los inhibidor(es) peptídico(s) también se puede(n) disolver

en una solución de conservación conocida, tal como solución de Krebs-Hanseleit, solución UW, solución St. Thomas II, solución Collins, solución Stanford, y similares. La solución también puede contener uno o más de sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), glutamato, arginina, adenosina, manitol, alopurinol, glutatión, rafinosa y ácido lactobiónico en concentraciones de aproximadamente 4-7 mM, aproximadamente 0,2-0,3 mM, aproximadamente 108-132 mM, aproximadamente 13-16 mM, aproximadamente 18-22 mM, aproximadamente 2-4 mM, aproximadamente 0,5-1 mM, aproximadamente 27-33 mM, aproximadamente 0,9-1,1 mM, aproximadamente 2,7-3,3 mM, aproximadamente 25-35 mM, y aproximadamente 80-120 mM, respectivamente. El Na^+ puede estar en forma de NaOH; el K^+ puede estar en forma de KCl y/o KH_2PO_4 , lo más preferiblemente a una relación de aproximadamente 2-3,5 mM de KCl y aproximadamente 2-3,5 mM de KH_2PO_4 ; el Ca^{2+} puede estar en forma de CaCl_2 ; y el Mg^{2+} puede estar en forma de MgCl_2 . La solución también puede contener uno o más inhibidor(es) peptídico(s) de proteína quinasa C β II (PKC β II), de proteína quinasa C ξ (PKC ξ) y activador(es) peptídico(s) de proteína quinasa C δ (PKC δ). La solución preferiblemente se mantiene a pH fisiológico de aproximadamente 7,0-7,5, más preferiblemente aproximadamente 7,2-7,4.

La solución de la presente invención se puede usar durante todas las fases de un trasplante de órgano, especialmente el corazón, que incluyen, pero no están limitadas a, 1) aislamiento del órgano del donante (solución cardiopléjica); 2) conservación del órgano (almacenamiento/transporte hipotérmico); y 3) reimplantación del órgano en el receptor (solución de reperfusión).

Durante la perfusión o reperfusión, especialmente para el corazón, se prefiere que el órgano se perfunda a una velocidad de aproximadamente 1 ml/min durante aproximadamente 5 minutos. La velocidad de perfusión puede variar, pero no debe superar aproximadamente 25 ml/min. En conjunto, la velocidad de perfusión no debe ser tan alta para que imponga presión excesiva sobre la vasculatura del órgano.

La solución de la presente invención se puede preparar 1) disolviendo y diluyendo el/los inhibidor(es) peptídico(s) y los diferentes constituyentes en agua destilada; 2) ajustando el pH a aproximadamente 7,2-7,4, por ejemplo con NaOH; y 3) esterilizando la solución, por ejemplo, filtrando con un filtro de 0,2 μm . La solución esterilizada se mantiene después aislada de contaminantes en el medio ambiente.

Ejemplo

Se anestesiaron ratas Sprague Dawley macho (275-325 g, Ace Animals, Boyertown, PA) con pentobarbital sódico 60 mg/ml por vía intraperitoneal (i.p.). También se administró heparina sódica (1.000 U) i.p. Los corazones se extirparon rápidamente, las aortas ascendentes se canularon, y la perfusión retrógrada del corazón se inició con un tampón de Krebs modificado mantenido a 37°C a una presión constante de 80 mm Hg. El tampón de Krebs tenía la siguiente composición (en mmol/l): 17 de dextrosa, 120 de NaCl, 25 de NaHCO_3 , 2,5 de CaCl_2 , 0,5 de EDTA, 5,9 KCl y 12 de MgCl_2 . El perfundido se aireó con O_2 al 95% y CO_2 al 5% y se equilibró a un pH de 7,3-7,4. Los dos brazos laterales en la línea de perfusión proximal a la cánula del flujo de entrada al corazón permitieron que PMN, plasma sin inhibidor peptídico de PKC ϵ (corazones control) o plasma que contenía diferentes concentraciones de inhibidor peptídico de PKC ϵ (1 o 5 μM) se infundieran directamente en la línea de flujo de entrada coronaria. El flujo coronario se siguió por un flujómetro (T106, Transonic System, Inc., Ithaca, NY). Se siguieron LVDP y $+dP/dt_{\text{max}}$ usando un transductor de presión (SPR-524, Millar Instruments, Inc., Houston, TX), que se colocó en la cavidad ventricular izquierda. Los corazones se sumergieron en un depósito revestido con agua que contenía 160 ml de tampón de Krebs mantenido a 37°C. Se registraron el flujo coronario, LVDP y $+dP/dt_{\text{max}}$ usando un sistema de adquisición Powerlab Station (ADInstruments, Grand Junction, CO) junto con un ordenador.

Se midieron LVDP, $+dP/dt_{\text{max}}$, y el flujo coronario cada 5 minutos durante 15 minutos para equilibrar los corazones y obtener una medida basal. Se definió LVDP como la presión telesistólica ventricular izquierda menos la presión telediastólica ventricular izquierda. Después de 15 minutos, el flujo del tampón de Krebs se redujo a cero durante 20 minutos para inducir isquemia global. En la reperfusión, los corazones se infundieron durante 5 minutos con 200×10^6 PMN resuspendidas en 5 ml de tampón Krebs más 5 ml de plasma a una velocidad de 1 ml/min. En algunos experimentos, el inhibidor peptídico de PKC ϵ (Genemed Synthesis, Inc., San Francisco, CA) se añadió al plasma a una concentración final de 1 o 5 μM . Los corazones de I/R de referencia no se sometieron a isquemia y no se perfundieron con PMN.

Se usaron los siguientes grupos de corazones de ratas perfundidos:

Grupo 1: Los corazones de I/R de referencia no se sometieron a isquemia y no se perfundieron con PMN, pero se perfundieron con 5 ml de plasma (1 ml/min) a los 35 minutos en la perfusión (el mismo punto en el tiempo que a los corazones I/R se les daría 5 ml de plasma, 15 minutos de registros basales más 20 minutos de isquemia). Estos corazones representaban un grupo control para determinar si el corazón de rata aislado puede mantener LVDP y $+dP/dt_{\text{max}}$ a lo largo del protocolo de 80 minutos ($n=6$).

Grupo 2: Los corazones de I/R de referencia + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μM) no se sometieron a isquemia y no se perfundieron con PMN. A estos corazones se administró el inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μM , disuelto en

plasma de una solución madre 5 mM en H₂O) 35 minutos en la perfusión. Este grupo se empleó para determinar si el inhibidor peptídico de PKC ϵ produce un efecto cardiotónico o cardiodeprimente (n=6).

Grupo 3: Los corazones I/R se sometieron a 20 minutos de isquemia y se perfundieron con 5 ml de plasma (1 ml/min) durante los primeros 5 minutos de reperfusión, pero no se perfundieron con PMN. Estos corazones representaban un grupo control para determinar si 20 minutos de isquemia seguido por reperfusión aturdirían el corazón, pero LVDP y $+dP/dt_{max}$ se recuperarían a valores basales (inicial) al final del periodo de reperfusión de 45 minutos (n=7).

Grupo 4: Los corazones de I/R + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M, disuelto en plasma) se sometieron a 20 minutos de isquemia y no se perfundieron con PMN. Estos corazones se perfundieron con 5 ml de plasma + inhibidor peptídico de PKC ϵ durante los primeros 5 minutos de la reperfusión. Este grupo se empleó para determinar si inhibidor peptídico de PKC ϵ produce un efecto cardiodeprimente en el marco de I/R sin PMN (n=6).

Grupo 5: Los corazones de I/R + PMN se sometieron a 20 minutos de isquemia y se perfundieron con 5 ml de plasma (1 ml/min) y PMN (resuspendidos en 5 ml de tampón Krebs) durante los primeros 5 minutos de reperfusión. Estos corazones representaban un grupo control para determinar si 20 minutos de isquemia seguida por 45 minutos de reperfusión en presencia de PMN (200×10^6) producía una disfunción contráctil cardíaca sostenida a lo largo del periodo de reperfusión de 45 minutos comparado con los valores basales iniciales (n=7).

Grupo 6: Los corazones de I/R + PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ (1 μ M) se sometieron a 20 minutos de isquemia y se perfundieron con inhibidor peptídico de PKC ϵ 1 μ M (disuelto en plasma) y PMN (200×10^6) durante los primeros 5 minutos de reperfusión. Estos corazones representaban un grupo control para determinar el efecto de la inhibición de PKC ϵ en la atenuación de la disfunción contráctil cardíaca inducida por PMN (n=6).

Grupo 7: Los corazones de I/R + PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M) se sometieron a 20 minutos de isquemia y se perfundieron con inhibidor peptídico de PKC ϵ 5 μ M (disuelto en plasma) y PMN (200×10^6) durante los primeros 5 minutos de reperfusión. Estos corazones representaban un grupo control para determinar el efecto de la inhibición de PKC ϵ en la atenuación de la disfunción contráctil cardíaca inducida por PMN (n=6).

La figura 1 mostró la evolución temporal de la función contráctil cardíaca (LVDP) para los grupos I/R de referencia, I/R, I/R+PMN e I/R+PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M), e ilustró los cambios en la LVDP durante el periodo de perfusión de 80 minutos. Los corazones en el grupo I/R de referencia permanecieron al $100 \pm 0,2\%$ de los valores basales iniciales de LVDP durante la duración entera del periodo de perfusión. Los corazones en el grupo I/R experimentaron una depresión en la LVDP durante las fases iniciales de la reperfusión, pero al final de la reperfusión se habían recuperado al $92 \pm 3\%$ de los valores basales iniciales. Sin embargo los corazones en el grupo I/R+PMN mostraron disfunción contráctil cardíaca grave, recuperándose solo al $55 \pm 5\%$ de los valores basales iniciales al final de la reperfusión. Por contraste, los corazones en el I/R + PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M) recuperaron notablemente en LVDP a los 15 minutos tras la reperfusión ($88 \pm 9\%$ de los valores basales iniciales) y continuaron mejorando a lo largo del periodo de reperfusión de 45 minutos y recuperaron hasta el $99 \pm 6\%$ de los valores basales iniciales.

Las diferencias significativas entre los corazones tratados con inhibidor peptídico de PKC ϵ y corazones I/R+PMN controles observadas en la evolución temporal de LVDP se pueden atribuir mayoritariamente a la presión telediastólica (LVEDP). La figura 2 es la evolución temporal de la LVEDP en los grupos I/R de referencia, I/R, I/R+PMN e I/R + PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M). No había diferencias significativas en la LVEDP inicial (5-8 mm Hg). Sin embargo, se observaron diferencias significativas ya a los 15 minutos tras la reperfusión y esta diferencia se sostuvo a lo largo de la reperfusión de 45 minutos. Los corazones I/R+PMN control tenían una LVEDP final de 42 ± 7 mm Hg comprados con los corazones tratados con I/R + PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ que tenían una LVEDP final de 16 ± 2 mm Hg, y esta diferencia era significativa ($p < 0,01$).

Para establecer si el inhibidor peptídico de PKC ϵ producía algún efecto inotrópico directo en la función contráctil cardíaca, los corazones I/R de referencia se perfundieron con inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M). Este grupo sirvió como uno de los controles para el estudio. Estos corazones no mostraron ningún cambio significativo en LVDP (figura 3) o $+dP/dt_{max}$ (figura 4) al final del periodo de reperfusión de 80 minutos, por tanto, indicando que a esta dosis el inhibidor peptídico de PKC ϵ no tenía efecto directo en la función contráctil cardíaca. Las figuras 3 y 4 mostraron los valores iniciales y finales para LVDP y $+dP/dt_{max}$ de corazones perfundidos aislados, respectivamente. No hubo diferencia significativa entre los valores basales iniciales de todos los grupos estudiados. Tampoco hubo diferencia significativa entre los valores iniciales y finales de LVDP y $+dP/dt_{max}$ para los grupos I/R de referencia, I/R, I/R de referencia + inhibidor peptídico de PKC ϵ e I/R + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M). Sin embargo, hubo una diferencia significativa entre los valores iniciales y finales de LVDP y $+dP/dt_{max}$ para el grupo I/R+PMN. Se observó una disminución significativa ($p < 0,01$) del valor basal inicial del $55 \pm 5\%$ en LVDP y del $47 \pm 4\%$ en $+dP/dt_{max}$ a los 45 minutos tras la reperfusión. La dosis de 5 μ M fue la más cardioprotectora ya que los corazones en el grupo I/R + PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ (5 μ M) se recuperaron al $99 \pm 6\%$ y el $87 \pm 5\%$ del basal inicial a los 45 minutos tras la reperfusión para LVDP y $+dP/dt_{max}$, respectivamente. Estos valores eran significativamente diferentes de I/R+PMN a los 45 minutos tras la reperfusión ($p < 0,01$). La dosis de 1 μ M del inhibidor peptídico de PKC ϵ no era

cardioprotectora ya que los corazones en el grupo I/R + PMN + inhibidor peptídico de PKC ϵ (1 μ M) solo se recuperaron al 66 $\pm$ 9% y el 55 $\pm$ 9% para LVDP y +dP/dt_{max}, respectivamente. Los valores finales de LVDP y +dP/dt_{max} en el grupo de dosis 1 μ M no eran significativamente diferentes de los valores finales del grupo I/R+PMN.

- 5 La figura 5 ilustra el flujo coronario entre los siete grupos en los experimentos de función cardíaca. No hubo diferencias significativas en el flujo coronario inicial (16-21 ml/min). Los grupos I/R+PMN control solo se recuperaron al 34 $\pm$ 8% del basal inicial mientras que, los corazones tratados con I/R+PNM inhibidor ϵ se recuperaron al 62 $\pm$ 3% del basal inicial y esta diferencia era significativa (p<0,01).
- 10 La figura 6 ilustra la frecuencia cardíaca entre los siete grupos en los experimentos de función cardíaca. No hubo diferencias significativas en la frecuencia cardíaca inicial (295-265 latidos/min). Los grupos I/R+PMN control solo se recuperaron al 72 $\pm$ 7% del basal inicial mientras que, los corazones tratados con I/R+PNM_inhibidor de PKC ϵ se recuperaron al 85 $\pm$ 4% del basal inicial y esta diferencia era significativa (p<0,05).
- 15 La figura 7 ilustra la liberación de NO del endotelio aórtico de rata en segmentos sin tratar (basal) comparados con segmentos tratados con inhibidor peptídico de PKC ϵ (1-10 μ M). Se usó acetilcolina (Ach) (10 μ M) como control positivo. Había un efecto dosis-respuesta de los segmentos tratados con el inhibidor peptídico de PKC ϵ que inhibieron significativamente la liberación de NO basal desde 2,12 $\pm$ 0,39 pmoles/mg de tejido a 0,66 $\pm$ 0,28 (5 μ M; p<0,05) y 0,26 $\pm$ 0,42 (10 μ M) pmoles/mg de tejido. Aunque el aumento del NO de origen endotelial habitualmente se asocia con cardioprotección después de I/R, se especula que la enzima responsable para la liberación de NO endotelial (NOe) pueda cambiar su perfil de producto a la producción de liberación de superóxido cuando el sustrato (L-arginina) o un cofactor (BH₄) no está fácilmente disponible durante la reperfusión temprana.
- 20

Lista de secuencias

- 25 <110> Philadelphia College of Osteopathic Medicine
<120> Conservación y/o perfusión de órganos
- 30 <130> JWJ01490EP
<140> 06847547.4
<141> 11-12-2006
- 35 <150> PCT/US2006/047152
<151> 11-12-2006
<150> US 60/748.645
<151> 09-12-2005
- 40 <160> 1
<170> PatentIn versión 3.3
- 45 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 50 <400> 1
Glu Ala Val Ser Leu Lys Pro Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método para conservar un órgano para trasplante, proteger un órgano isquémico, atenuar una disfunción de órgano después de isquemia, o proteger un órgano de daño después de su aislamiento del sistema circulatorio, que comprende el paso de perfundir el órgano con una solución que comprende al menos un inhibidor peptídico de la proteína quinasa ϵ (PKC ϵ), en donde el al menos un inhibidor peptídico de PKC ϵ tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en donde dicho órgano se aísla del sistema circulatorio.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde el al menos un inhibidor peptídico se disuelve en solución salina.
3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la solución comprende además cloruro de potasio.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración del al menos un inhibidor peptídico de PKC ϵ es aproximadamente 1-10 μ M.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el órgano es un corazón.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el órgano es un órgano de mamífero.
7. Un método según la reivindicación 6, en donde es mamífero es humano.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el órgano se conserva para trasplante.
9. Una solución que comprende al menos un inhibidor peptídico de la proteína quinasa ϵ (PKC ϵ), para su uso en conservar un órgano para trasplante, proteger un órgano isquémico, atenuar una disfunción de órgano después de isquemia, o proteger un órgano de daño después de su aislamiento del sistema circulatorio, en donde el al menos un inhibidor peptídico de PKC ϵ tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
10. Una solución para uso según la reivindicación 9, en donde el al menos un inhibidor peptídico está miristilado.
11. Uso de una solución que comprende al menos un inhibidor peptídico de la proteína quinasa ϵ (PKC ϵ) para perfusión, conservación y/o reperfusión de un órgano aislado para trasplante, en donde el al menos un inhibidor peptídico de PKC ϵ tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en donde dicho órgano se aísla del sistema circulatorio.
12. Uso según la reivindicación 11, en donde el órgano es un corazón.

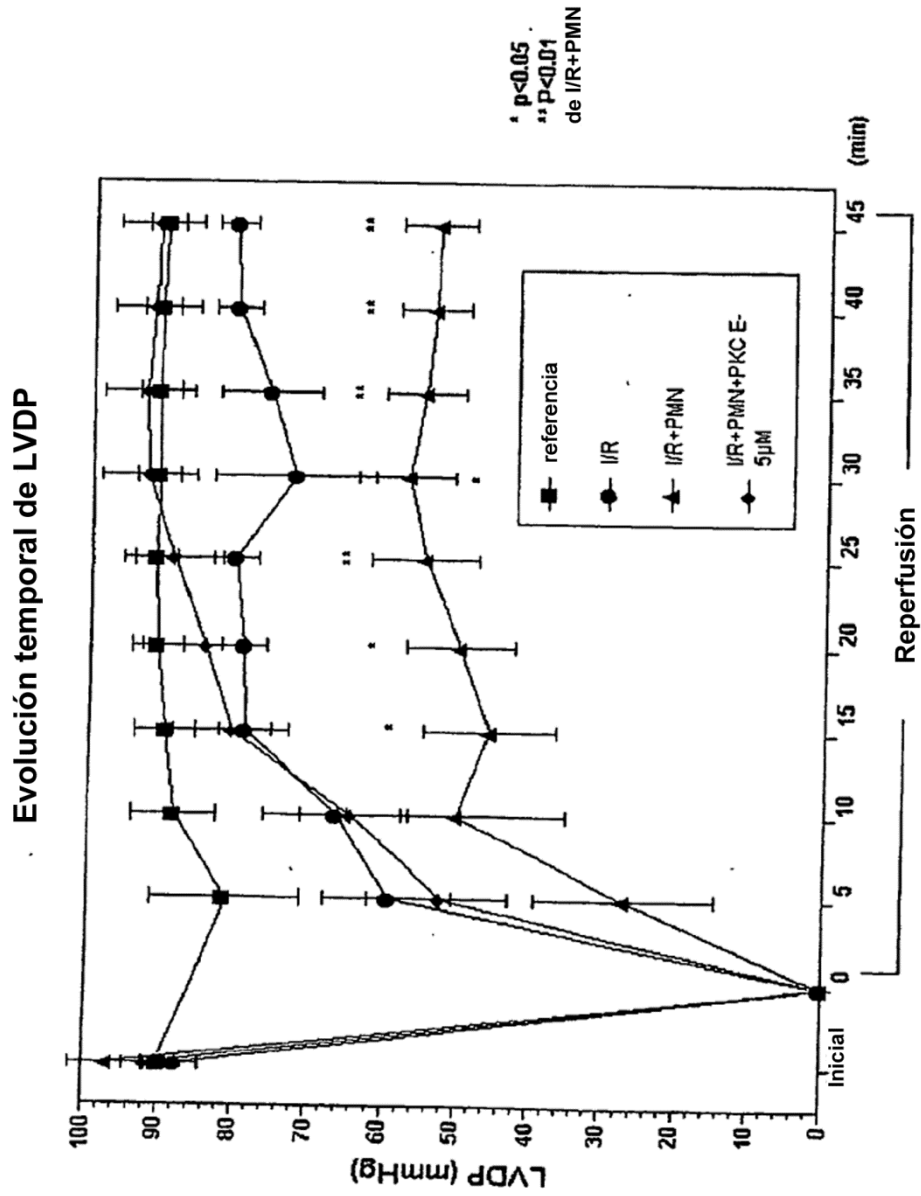


FIGURA 1

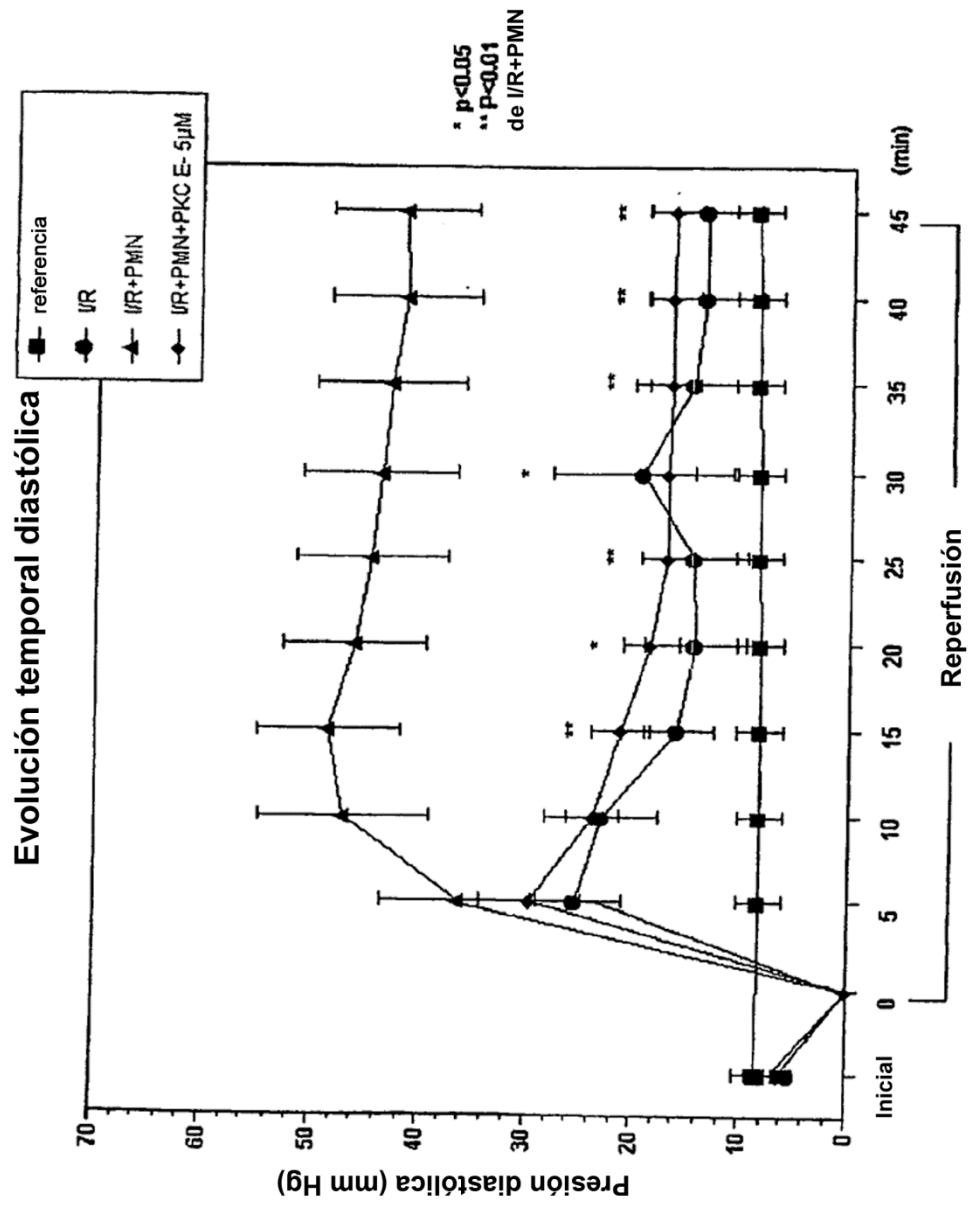


FIGURA 2

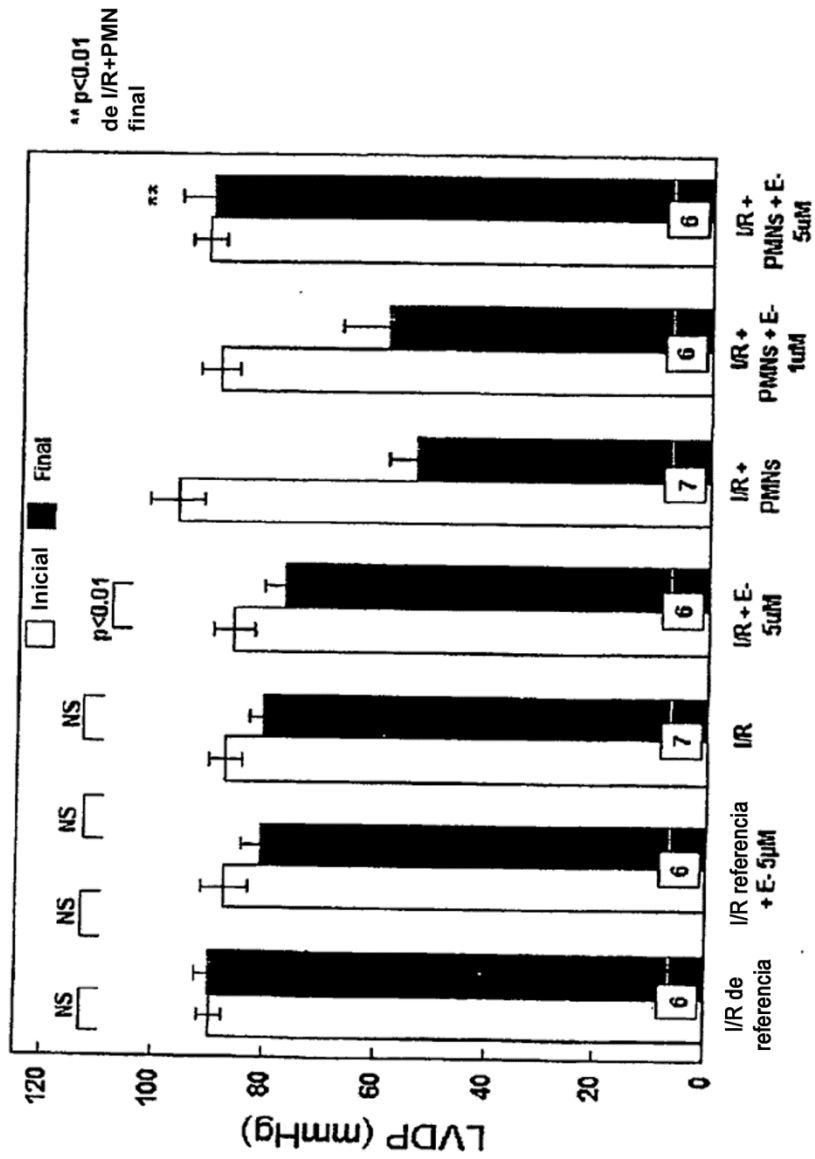


FIGURA 3

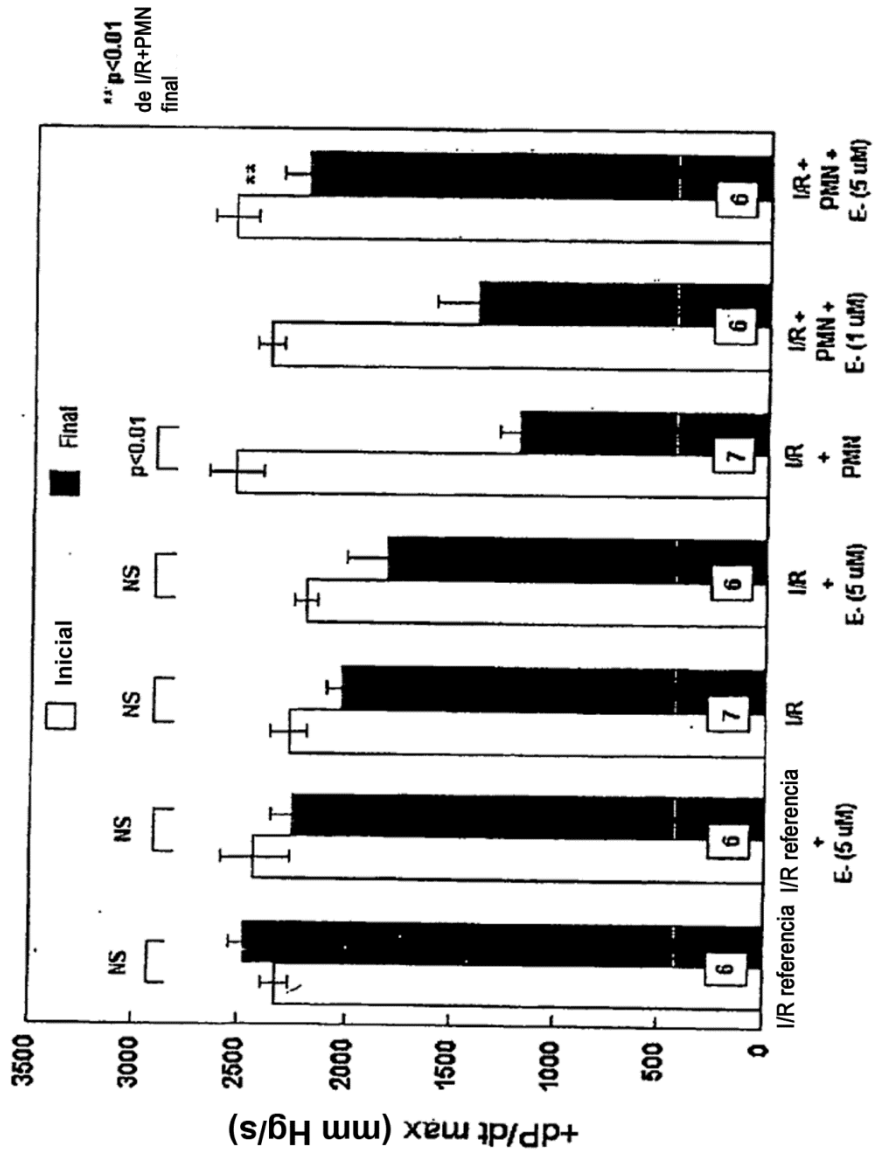


FIGURA 4

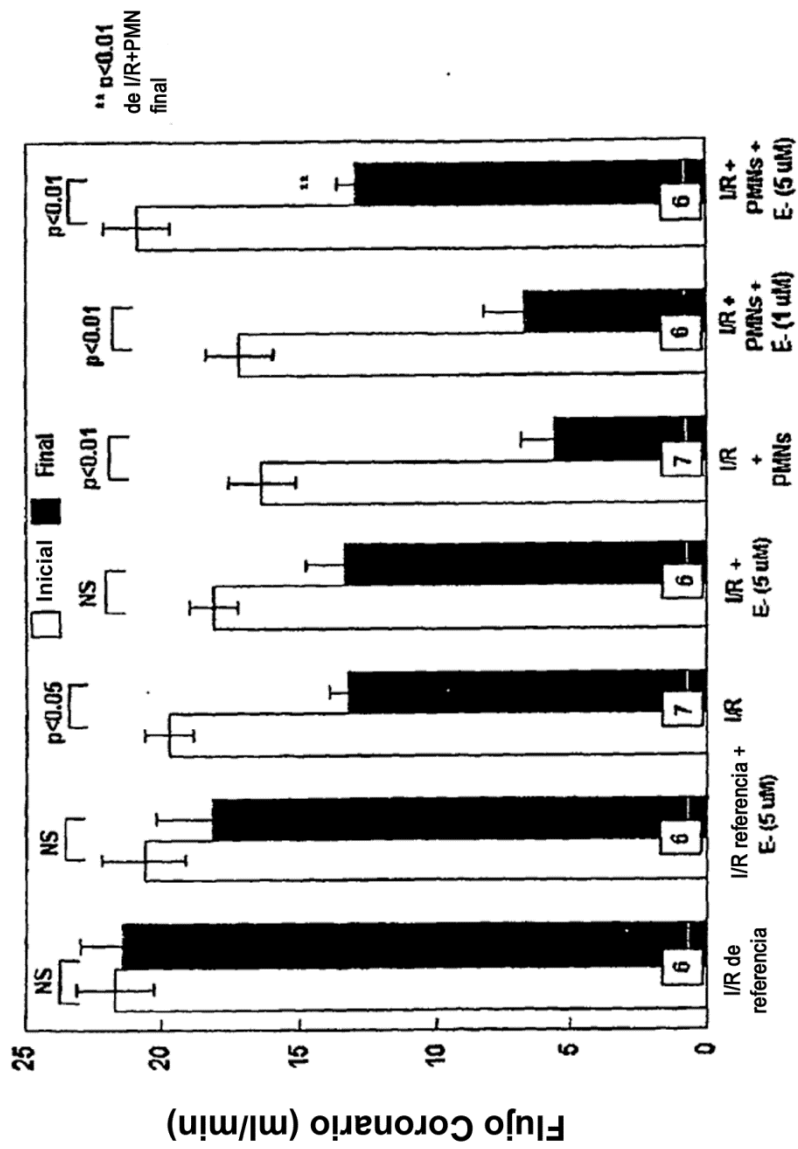


FIGURA 5

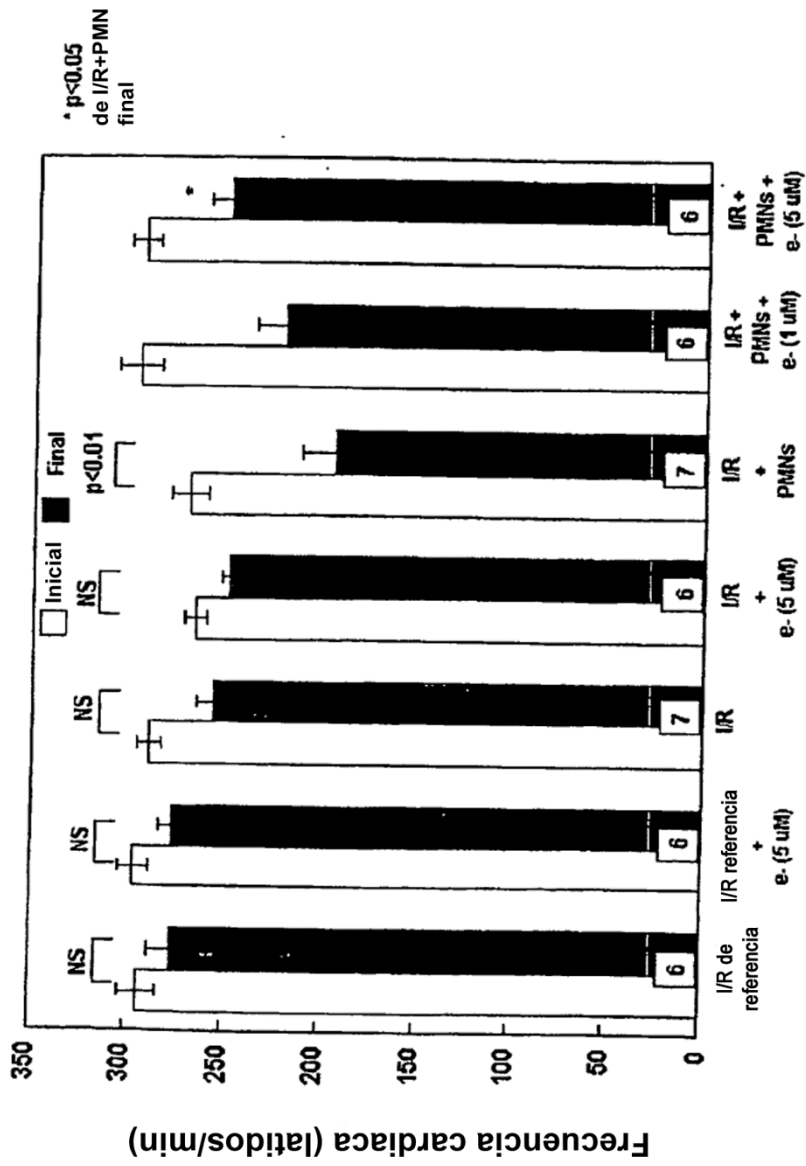


FIGURA 6

