

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 651**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2012 E 12718702 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2704559**

54 Título: **Solución de enjuague de un injerto o de un tejido y procedimiento de enjuague de dicho injerto o tejido antes de la revascularización**

30 Prioridad:

02.05.2011 FR 1153745

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

28.03.2016

73 Titular/es:

**GROUPE IGL (100.0%)
Route Nationale 6, Parc Tertiaire de Bois Dieu
69380 Lissieu, FR**

72 Inventor/es:

**LOPEZ, GEORGE-ANTOINE;
RAMELLA VIRIEUX, SILVINA y
NET ABRAHAM, MARCOS JUAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 651 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 de enjuague de un injerto o de un tejido y procedimiento de enjuague de dicho injerto o tejido antes de la revascularización

5 La presente invención tiene por objeto una solución de enjuague de un órgano o injerto tal como riñón, hígado, corazón sin que sea limitativo pero igualmente de tejidos tales como venas, arterias, válvulas, vasos sanguíneos... tiene igualmente por objeto un procedimiento de enjuague de injerto o tejido antes en la revascularización.

10 La invención se describe más particularmente en relación con el enjuague del riñón el transcurso de un proceso de trasplante.

15 El trasplante renal es, de lejos, el más frecuente de los injertos de órganos. Se realiza en las personas con insuficiencia renal terminal. Se trata desde ahora del tratamiento de elección de la atención renal por el hecho de que aventaja a la diálisis en términos de calidad de vida de los pacientes.

20 Las consecuencias de un trasplante renal pueden estar salpicadas de diversas complicaciones inmunológicas y no inmunológicas que pueden además poner en juego el pronóstico funcional del injerto. Además de los problemas presentados por el riesgo de rechazo, la nefropatía isquémica presenta una complicación mayor que acompaña al proceso de trasplante. En efecto, todas las etapas del trasplante renal son otro tanto circunstancias que comprenden una tensión isquémica. La comprensión de los sucesos fisiológicos relacionados con la isquemia - reperfusión acompañado de posibles terapias representa por lo tanto un envite mayor.

25 Se han puesto en práctica varias estrategias para prevenir el síndrome de isquemia - reperfusión en trasplante, entre otros, el enfriamiento de los injertos (a +4 °C) con la utilización de soluciones de conservación y en particular de la solución UW. Esta estrategia, por más que largamente utilizada, presenta ciertos inconvenientes. La conservación en frío será el origen de lesiones celulares y de los tejidos. La solución de conservación UW (Universidad de Wisconsin) de tipo intracelular conocida igualmente bajo la denominación BELZER - VIASPAN contiene una fuerte concentración de potasio (125 mM). Ahora bien, en el momento del periodo de isquemia, los injertos liberan diversos catabolitos (por ejemplo, la endotelina...). Pueden además acumular grandes cantidades de este ion (K+) y de éstos catabolitos, lo que puede provocar lesiones en el receptor en el momento de la fase de reperfusión. Además, la hipercaliemia del injerto es susceptible de provocar trastornos de ritmo cardiaco en el receptor.

35 Es por lo tanto indispensable enjuagar cuidadosamente el órgano antes de su vascularización para eliminar el exceso de potasio residual en el injerto y también todos los productos de degradación del metabolismo celular que se acumulan durante el periodo de conservación y que participarán en la puesta en juego de la cascada resultante que conduce a las lesiones de reperfusión.

40 Se conoce a partir del documento US - A - 5 145 771, una solución de conservación y de enjuague del órgano y de los tejidos denominado "enjuague Carolina". Esta solución es a base de adenosina y contiene además sodio, calcio, magnesio y menos de 6MEQ/L de potasio.

El documento EP - A - 713 363 describe una mejora de la solución anterior en cuanto concierne además a la glicina.

45 El documento EP - A - 1 178 726 describe en cuanto a ella se refiere una solución de conservación de un órgano del tipo extracelular que contiene calcio y PEG de peso molecular igual a 35.000. No se contempla utilizar la solución para el enjuague. Además, las concentraciones descritas de PEG están comprendidas entre 0,01 y 5 mmol/l, es decir 0,35 g/l y 175 g/l. Los valores preferidos son inferiores a 1 mmol (35 g/l), ventajosamente igual a 0,03 mmol/l, es decir 1 g/l. Igualmente, la concentración de potasio en la formulación descrita está comprendida entre 10 y 40 mmol.

50 El problema que se propone resolver la invención es poner a punto una nueva solución de enjuague que permita optimizar la fase de recalentamiento del injerto durante su implantación en el receptor, cuando se utiliza después de la conservación en frío y antes de la revascularización.

55 El solicitante ha constatado, de manera de hecho totalmente sorprendente, que la puesta en práctica de una concentración de PEG de peso molecular igual a 35.000 por lo menos 4 veces superior a la concentración ventajosa descrita en el documento EP - A - 1 178 726 combina una débil concentración de potasio que permite hacer la solución de conservación descrita utilizable para el enjuague del órgano.

60 En otros términos, la invención tiene por objeto una solución de enjuague de órganos o de tejidos del tipo extracelular, que comprende calcio, PEG de peso molecular 35.000 en una concentración de por lo menos 4 g/l, ventajosamente 5 g/l y potasio, en una concentración superior o igual a 1 mmol/l, pero inferior a 10 mmol/l.

65 La solución es del tipo extracelular por cuanto contiene más Na+ que K+.

ES 2 564 651 T3

Según otra característica, la concentración de calcio está comprendida entre 0,1 y 2, ventajosamente igual a 1,3 mmol/l.

5 En un modo de realización preferida, la solución de enjuague de la invención contiene sodio en una concentración comprendida entre 10 y 150, ventajosamente igual a 20 mmol/l.

La solución de enjuague de la invención contiene potasio, en una concentración comprendida entre 1 y 9, ventajosamente igual a 5 mmol/l.

10 La solución de enjuague de la invención contiene además ventajosamente:

- rafinosa pentahidratada en una concentración comprendida entre 20 y 40, ventajosamente igual a 30 mmol/l,

15 - lactobionato en una concentración comprendida entre 70 y 140, ventajosamente igual a 100 mmol/l.

Además, el pH de la solución de enjuague de la invención ventajosamente está comprendido entre 6,5 y 8, de preferencia igual a 7,4.

20 La osmolaridad de la solución en cuanto ella se refiere está comprendida entre 290 y 330, ventajosamente igual a 320 mosm/kg.

En un modo de realización preferido, la composición de la solución de enjuague de la invención es la siguiente:

CaCl ₂ , 2H ₂ O (mmol/l)	1,3
KH ₂ PO ₄ (mmol/l)	5
NaH ₂ PO ₄ (mmol/l)	20
MgSO ₄ , 7H ₂ O (mmol/l)	5
Lactobionato (mmol/l)	100
Rafinosa (mmol/l)	30
PEG 35000 (g/l)	5
pH	7,4
osmolaridad (mosm/kg)	320

25 La invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de enjuague de un órgano o de un tejido antes de la implantación en el paciente, según el cual se enjuaga el órgano o el tejido con la solución descrita antes en este documento.

30 La invención y las ventajas que se derivan se pondrán de manifiesto a partir de los ejemplos de realización siguientes, con la ayuda de las figuras adjuntas.

La figura 1 es una representación gráfica de la producción de bilis de un hígado reperfundido y previamente lavado con la solución de la invención.

35 La figura 2 es una representación gráfica de la resistencia vascular de un hígado reperfundido y previamente lavado con la solución de la invención.

La figura 3 es una representación gráfica de la actividad del óxido nítrico sintetasa endotelial (e NOS) de un hígado reperfundido y previamente lavado con la solución de la invención.

40 La figura 4 es una representación gráfica de la peroxidación lipídica de un hígado reperfundido y previamente lavado con la solución de la invención.

45 La figura 5 es una representación gráfica de la producción de proteínas citoprotectoras del shock térmico (HSP - Heat Shock Protein) inducida por un hígado reperfundido y previamente lavado con la solución de la invención.

La figura 6 es una representación gráfica de la dosificación de la AMP kinasa fosforilada en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

La figura 7 es una representación gráfica de la dosificación del óxido nítrico sintetasa endotelial en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

5 La figura 8 es una representación gráfica de la dosificación del malondialdehído en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

La figura 9 es una representación gráfica de la dosificación del superóxido dismutasa y la glutatióna dismutasa en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

10 La figura 10 es una representación gráfica de la dosificación de la hemo oxigenasa 1 en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

15 La figura 11 es una representación gráfica de la dosificación del factor de transcripción activador 6 (ATF-6) en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

La figura 12 es una representación gráfica de la dosificación de la quinasa retículo endoplásmica fosforilada y la proteína Kinasa RNA (p-PERK) total en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

20 La figura 13 es una representación gráfica de la dosificación de la X-box binding protein- 1 (XBP-1) en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

La figura 14 es una representación gráfica de la dosificación de la caspasa 12 (Casp 12) en un riñón trasplantado previamente lavado con la solución de la invención.

25 1. Preparación de la solución de enjuague de la invención

Se prepara una solución de composición y características siguientes por mezcla de los ingredientes (para 1 litro):

CaCl ₂ , 2H ₂ O (mmol/l)	1,3
KH ₂ PO ₄ (mmol/l)	5
NaH ₂ PO ₄ (mmol/l)	20
MgSO ₄ , 7H ₂ O (mmol/l)	5
Lactobionato (mmol/l)	100
Rafinosa (mmol/l)	30
PEG 35 M (g/l)	5
pH	7,4
osmolaridad (mosm/kg)	320

30 En el punto 2/ y en las figuras correspondientes, esta solución está designada como SB PEG 5.

2/ Caso de un hígado en vivo

a/ Preparación de las soluciones

35 Además de la solución de enjuague de la invención se preparan las tres soluciones siguientes:

SB PEG 1 (para 1 litro)

CaCl ₂ , 2H ₂ O (mmol/l)	1,3
KH ₂ PO ₄ (mmol/l)	5
NaH ₂ PO ₄ (mmol/l)	20
MgSO ₄ , 7H ₂ O (mmol/l)	5
Lactobionato (mmol/l)	100

Rafinosa (mmol/l)	30
PEG 35 M (g/l)	1
pH	7,4
osmolaridad (mosm/kg)	320

SB (para 1 litro)

CaCl ₂ , 2H ₂ O (mmol/l)	1,3
KH ₂ PO ₄ (mmol/l)	5
NaH ₂ PO ₄ (mmol/l)	20
MgSO ₄ , 7H ₂ O (mmol/l)	5
Lactobionato (mmol/l)	100
Rafinosa (mmol/l)	30
pH	7,4
osmolaridad (mosm/kg)	320

RLS (Solución láctica de Ringer - Ringer Lactate Solution)

5

Para 100 ml:

Cloruro de sodio	600 mg
Cloruro de potasio	40 mg
Cloruro de calcio	27 mg
Lactato de sodio	312 mg
osmolaridad (mosm/l)	277
pH	5 à 7

b/ Condiciones experimentales

10

El hígado se toma y se lava con una solución UW (50 ml) a 4 °C. El órgano es a continuación conservado de manera estática en la misma solución UW (100 ml) durante 24 horas a 4 °C. El hígado a continuación se lava mediante cada una de las 4 soluciones anteriores. Los diferentes parámetros se miden a continuación sobre el hígado reperfundido en condiciones normales de temperatura a 37 °C durante 2h.

15

c/ Producción de bilis

Como se muestra en la figura 1, la producción de bilis después de 120 minutos de la reperfusión se mejora cuando el hígado ha sido enjuagado previamente con la solución de la invención (SB PEG 5) con relación a las soluciones de la técnica anterior.

20

d/ Resistencia vascular

Como se muestra en la figura 2, la presencia de PEG a 5 g/l en la solución de la invención permite disminuir la resistencia vascular con respecto a la misma solución que contiene PEG en razón de 1 g/l.

25

e/ Protección del endotelio

- e NOS

30

Como se muestra en la figura 3 la solución de enjuague de la invención permite mejorar la actividad del óxido nítrico sintetasa endotelial (e NOS).

- Peroxidación de los lípidos

Como se muestra en la figura 4, la solución de enjuague de la invención permite disminuir ligeramente la peroxidación de los lípidos y por lo tanto mejorar la conservación del endotelio. No tiene un efecto perjudicial.

f/ Producción de proteínas citoprotectoras del shock térmico (HSP - Heat Shock Protein)

Como se muestra en la figura 5, la producción de proteínas citoprotectoras del shock térmico (Hemo oxigenasa 1 y HSP 70) está inducida por la presencia del PEG 35. El efecto es todavía más evidente a 5 g/l de PEG.

3/ Caso de un riñón, experiencias en vivo

Se utilizan ratas de Wistar de peso comprendido entre 180 y 280 g, que tienen libre acceso a la alimentación y al agua. El estudio se realiza sobre 25 ratas repartidas por sorteo en 5 grupos experimentales:

- Grupo de control: ratas no injertadas son utilizadas para el establecimiento de los parámetros fisiológicos.
- Grupo sin enjuague 2h: los injertos renales no son enjuagados antes de su implantación en el receptor, son revascularizados durante 2h después del injerto.
- Grupo sin enjuague 6h: los injertos renales no son enjuagados antes de su implantación en el receptor, son revascularizados durante 6h después del injerto.
- Grupo con enjuague 2h: los riñones son enjuagados antes de su trasplante y son revascularizados durante 2h después del injerto.
- Grupo con enjuague 6h: los riñones son enjuagados antes de su trasplante y son revascularizados durante 6h después del injerto.

Después de su toma, los riñones de todos los grupos, excepto aquellos del grupo de control, son conservados en la solución UW a 4 °C durante 18 h. A continuación son insertados en los animales receptores.

La solución de enjuague utilizada es aquella de la invención descrita anteriormente.

Los riñones injertados son tomados y conservados a -20 °C. Los tejidos son utilizados para efectuar las dosificaciones siguientes:

a/ la AMP kinasa fosforilada (p-AMPk, una enzima implicada en el metabolismo energético) (figura 6)

El perfil electroforético muestra la misma tasa de AMPk total para todos los grupos experimentales. Sin embargo, es la tasa de fosforilación de esta enzima la que varía según las condiciones experimentales. Los dos grupos sin enjuague no presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de control. Por el contrario, se observa que el enjuague aumenta significativamente ($p < 0,05$) la fosforilación y la de la AMPK con relación a la falta de enjuague.

b/ el óxido nítrico sintetasa endotelial (e NOS, una enzima constitutiva implicada en la síntesis del NO) (figura 7)

El estudio del efecto del enjuague sobre el monóxido de nitrógeno sintetasa endotelial se realiza con relación a la β -actina. Es una proteína cuya concentración no varía entre las muestras. Puede servir entonces de control interno. Se puede observar que el monóxido de nitrógeno sintetasa endotelial aumenta bajo el efecto del enjuague y de la duración de la reperusión. El análisis estadístico provee una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos con enjuague de 2h y 6h, por una parte, y el grupo de control, por otra parte. Además, después de 6h de reperusión, el monóxido de nitrógeno sintetasa endotelial es más elevado en el grupo con enjuague frente al grupo sin enjuague ($p < 0,05$).

c/ disminución de la tensión oxidativa

- Dosificación del malondialdehído (MDA-tbar, un producto de la peroxidación lipídica) (figura 8)

Se observa que las concentraciones más elevadas de MDA-tbar se encuentran en los grupos sin enjuague de 2h y 6h. El enjuague de los riñones antes de su trasplante permite una reducción significativa ($p < 0,05$) de la peroxidación lipídica con relación al grupo sin enjuague.

- Dosificación del superóxido dismutasa y la glutatióna dismutasa (figura 9)

Como se muestra en la figura 9, las concentraciones de superóxido dismutasa y de glutatióna dismutasa aumentan en el riñón trasplantado que ha sido enjuagado por la solución de la invención lo que caracteriza una disminución de la tensión oxidativa.

d/ proteína HSP: hemo oxigenasa 1 (HO-1) (figura 10)

La variación de la hemo oxigenasa 1 entre los diferentes grupos se evalúa con relación a la β -actina. En los dos grupos sin enjuague, la presencia de hemo oxigenasa 1 es menos importante ($p < 0,05$) con relación a aquella medida en los grupos con el enjuague en los diferentes tiempos. La producción de HSP cito protectora (hemo oxigenasa 1) se induce por la presencia del PEG 35 en 5 g/l.

e/ marcadores de la tensión del retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico es un organito intracelular estructura compleja que forma una red membranosa que se extiende desde el núcleo a la membrana celular. Constituye un entorno óptimo para la maduración y la reunión de las proteínas nativas. En el transcurso de este proceso, controles de calidad sobrevienen al nivel transcripcional, traduccional y conformacional. Las proteínas nuevamente sintetizadas deben ser perfectamente dobladas a fin de adquirir su funcionalidad.

Una de las consecuencias de una isquemia o de una tensión oxidativa es un desarreglo del proceso de maduración y de repliegue de las proteínas en el interior del retículo endoplásmico. En estas condiciones, no serán transportadas a su destino final en el interior de la célula y eventualmente serán degradadas por los proteasomas. Sin embargo, cuando son producidas en exceso, las proteínas mal conformadas no pueden ser todas degradadas y acabarán por acumularse en el interior del lumen del retículo endoplásmico, conduciendo a la célula a activar una respuesta adaptativa particular denominada UPR (por "Unfolded Proteine Response"). Esta respuesta está caracterizada por una reducción global de la síntesis proteica por bloqueo traduccional, un aumento de la actividad de degradación proteasomal y un aumento de las capacidades enzimáticas de maduración proteica.

Sin embargo, si este proceso adaptativo se suspende y la tensión se prolonga, la célula activa entonces las vías induciendo la muerte celular programada.

Las tomas de tejido después de 2h y 6h de revascularización del injerto son efectuadas por la dosificación de los marcadores siguientes:

- Activación del factor 6 de transcripción (ATF-6) (figura 10)
- Kinasa retículo endoplásmica fosforilada y la proteína Kinasa RNA (p-PERK) (figura 11)
- Proteína X-box de unión - 1 (XBP-1) (figura 12)
- Caspasa- 12 (Casp 12) (figura 13)

Se observa que los mediadores más elevados de la respuesta UPR se encuentran en los grupos sin enjuague de 2h y 6h en comparación con los grupos de enjuague ($p < 0,05$). El enjuague de los riñones antes de su trasplante permite una reducción significativa de la tensión del retículo endoplásmico.

La caspasa 12 es un activador de la apoptosis a continuación de una tensión del retículo endoplásmico. Se encuentra que la caspasa 12 es más activa en los grupos sin enjuague con relación a los grupos de enjuague ($p > 0,05$).

En resumen, los resultados muestran que el enjuague del injerto renal después de la conservación en frío produce:

- Una activación del monóxido de nitrógeno sintetasa endotelial y una liberación incrementada de monóxido de nitrógeno
- Un aumento de la fosforilación de la AMP porK
- Un aumento de las capacidades antioxidantes (HO-1 y SOD) y una disminución de la peroxidación de los lípidos (MDA)
- Una disminución de la tensión al nivel del retículo endoplásmico.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Solución de enjuague de órganos o de tejidos del tipo extracelular, que comprende calcio, PEG de peso molecular 35.000 en una concentración de por lo menos 4 g/l y potasio, en una concentración comprendida entre 1 y 9 mmol/l.
2. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que la concentración en PEG es de 5 g/l.
- 10 3. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que la concentración de calcio está comprendida entre 0,1 y 2 mmol/l.
4. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que contiene además sodio en una concentración comprendida entre 10 y 150 mmol/l.
- 15 5. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que la concentración de potasio es igual a 5 mmol/l.
6. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que contiene además:
- 20 - rafinosa pentahidratada en una concentración comprendida entre 20 y 40 mmol/l,
- lactobionato en una concentración comprendida entre 70 y 140 mmol/l.
- 25 7. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que el pH está comprendido entre 6,5 y 8.
8. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que la osmolaridad está comprendida entre 290 y 330 mosm/kg.
9. Solución de enjuague según la reivindicación 1 caracterizada por que tiene la composición siguiente:

CaCl ₂ , 2H ₂ O (mmol/l)	1,3
KH ₂ PO ₄ (mmol/l)	5
NaH ₂ PO ₄ (mmol/l)	20
MgSO ₄ , 7H ₂ O (mmol/l)	5
Lactobionato (mmol/l)	100
Rafinosa (mmol/l)	30
PEG 35 M (g/l)	5
pH	7,4
osmolaridad (mosm/kg)	320

10. Procedimiento de enjuague de órganos o de tejidos antes de la implantación en un paciente según el cual se enjuaga el órgano o el tejido con la solución objeto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

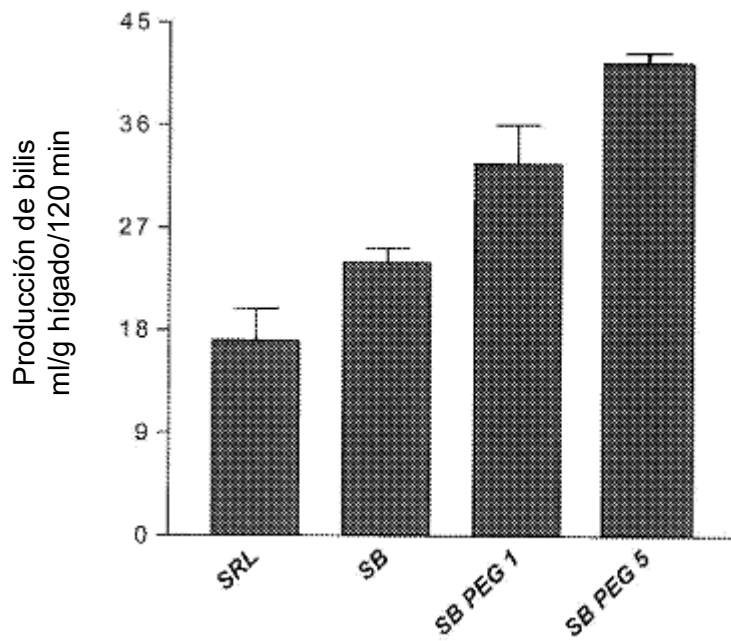


FIGURA 1

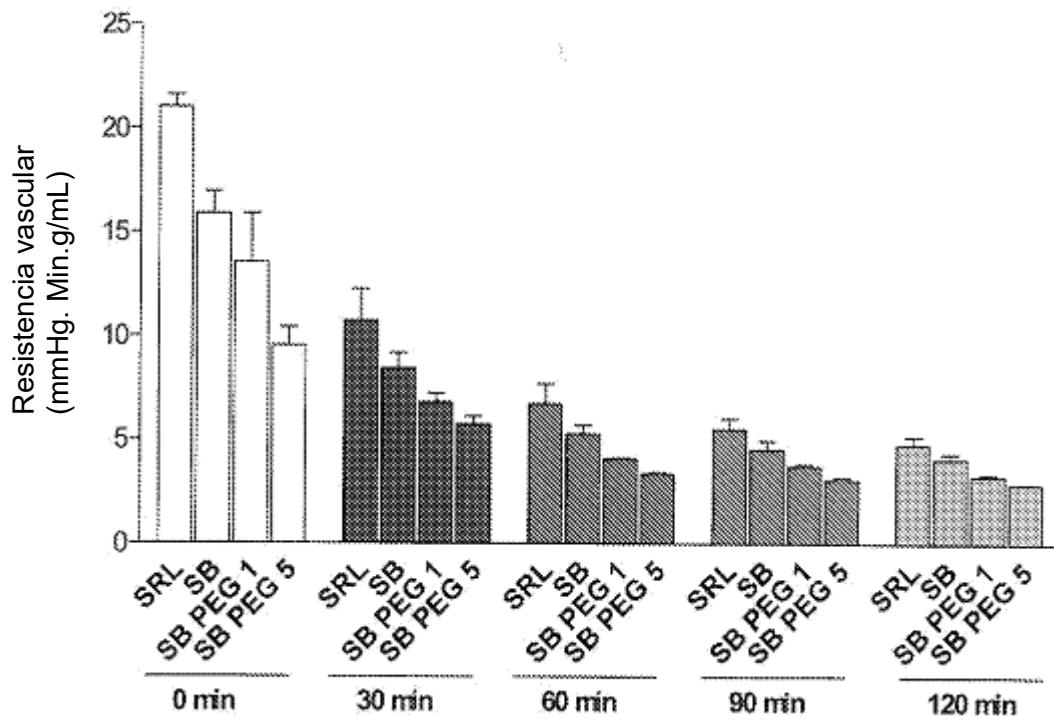


FIGURA 2

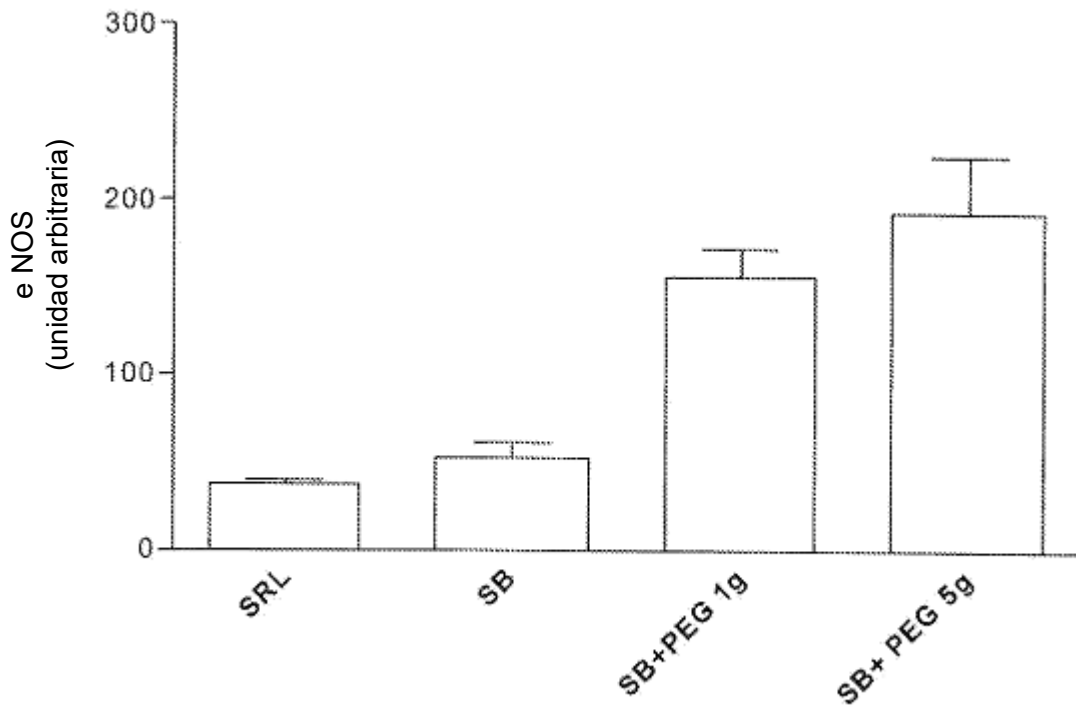


FIGURA 3

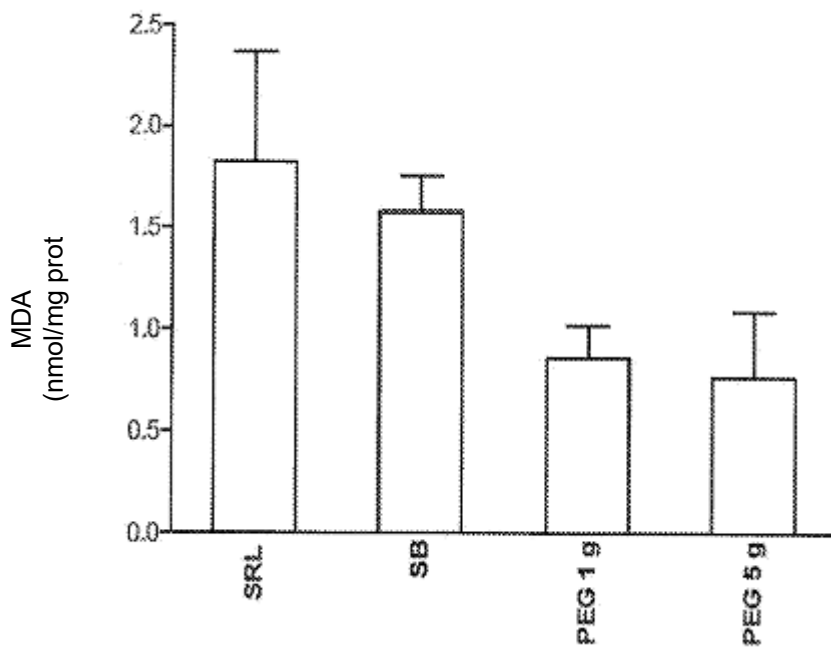


FIGURA 4

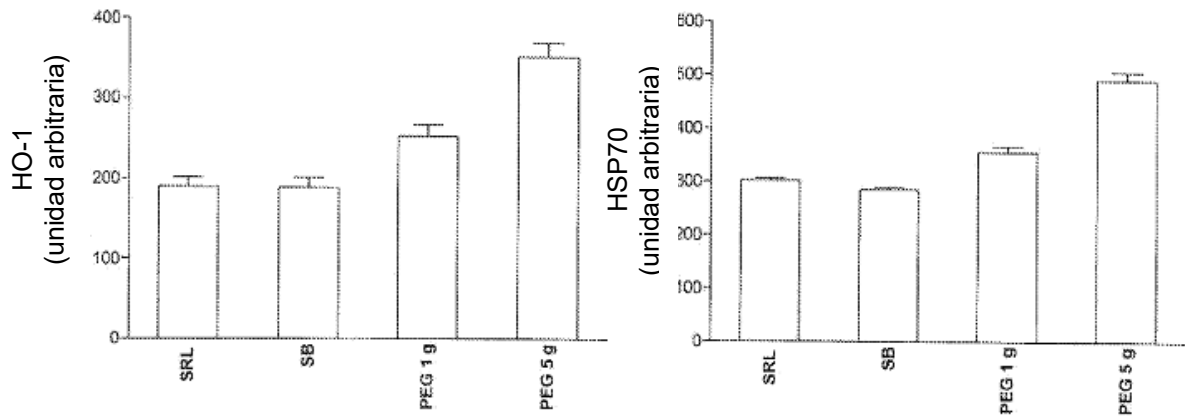


FIGURA 5

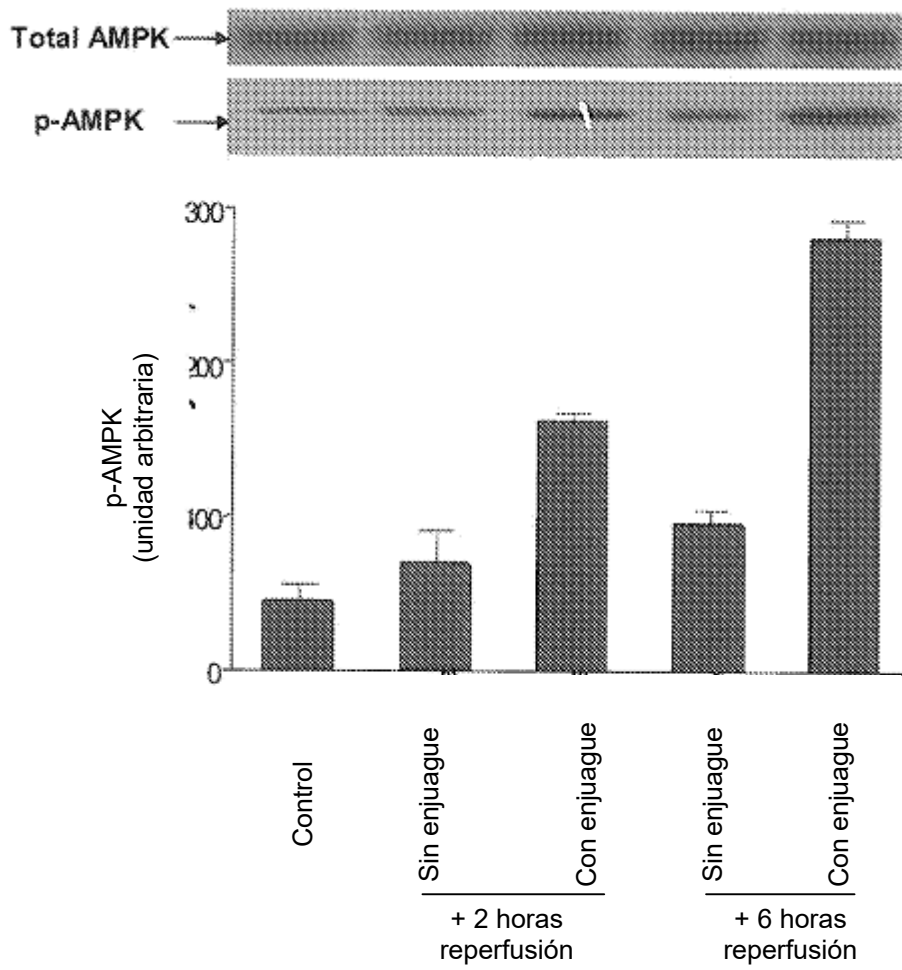


FIGURA 6

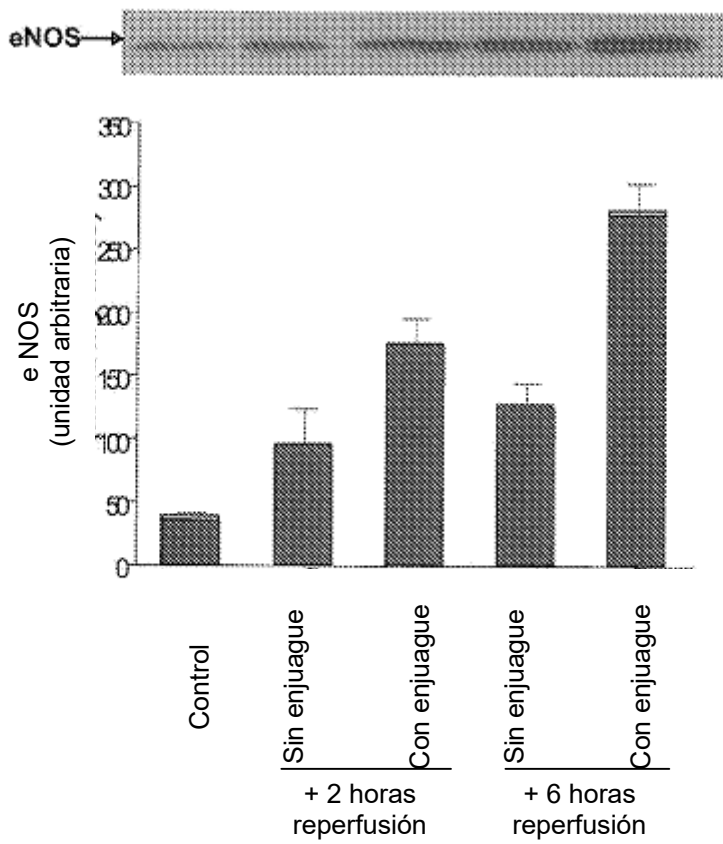


FIGURA 7

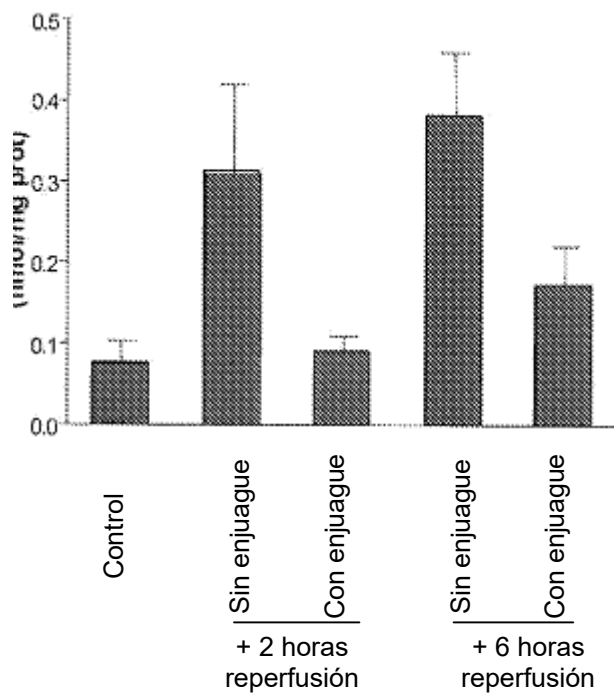


FIGURA 8

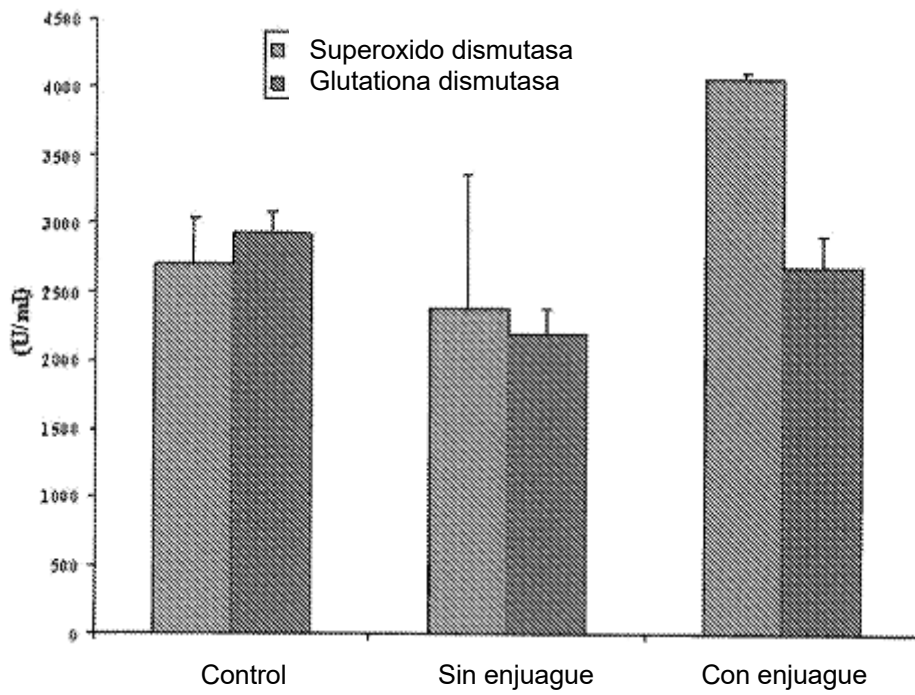


FIGURA 9

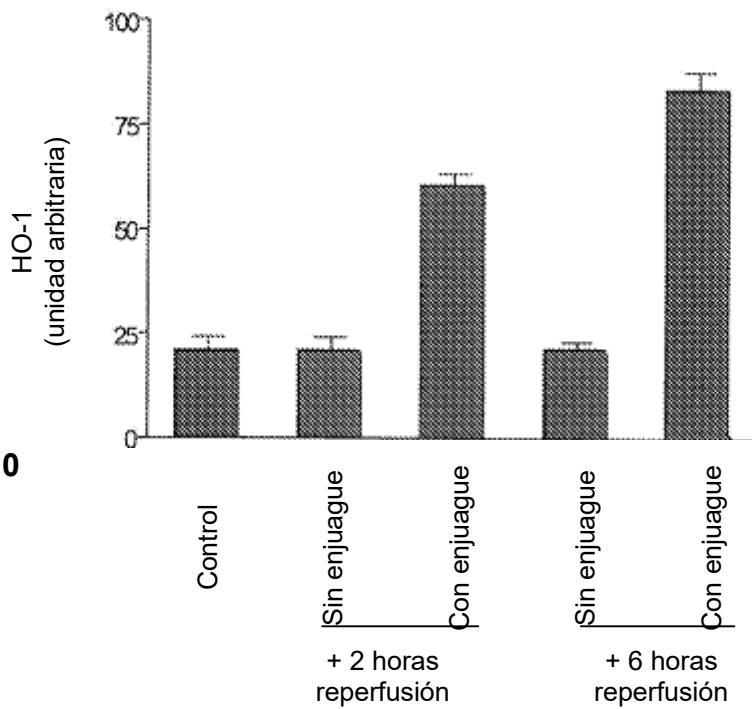
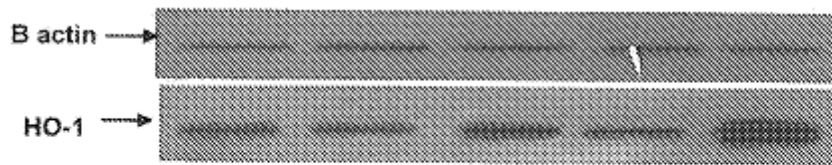


FIGURA 10

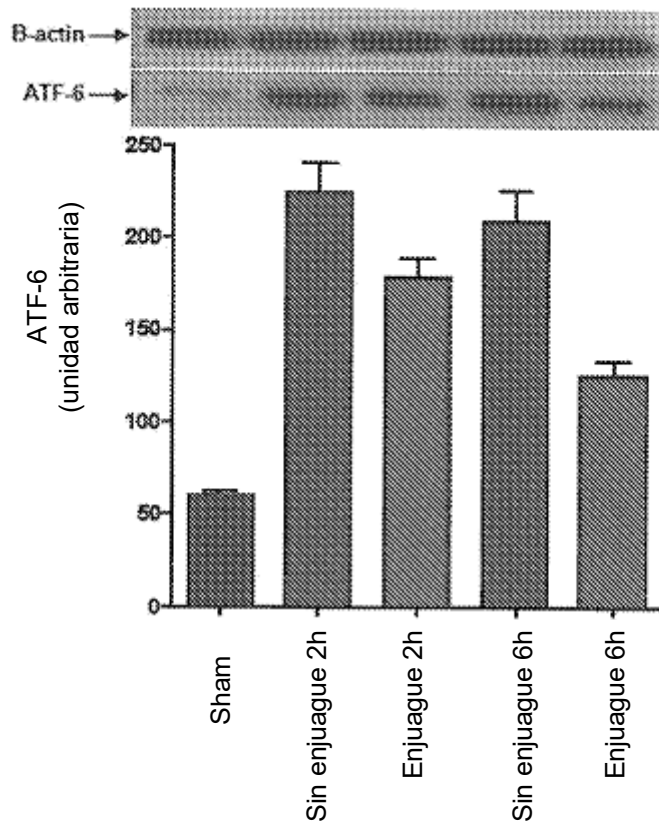


FIGURA 11

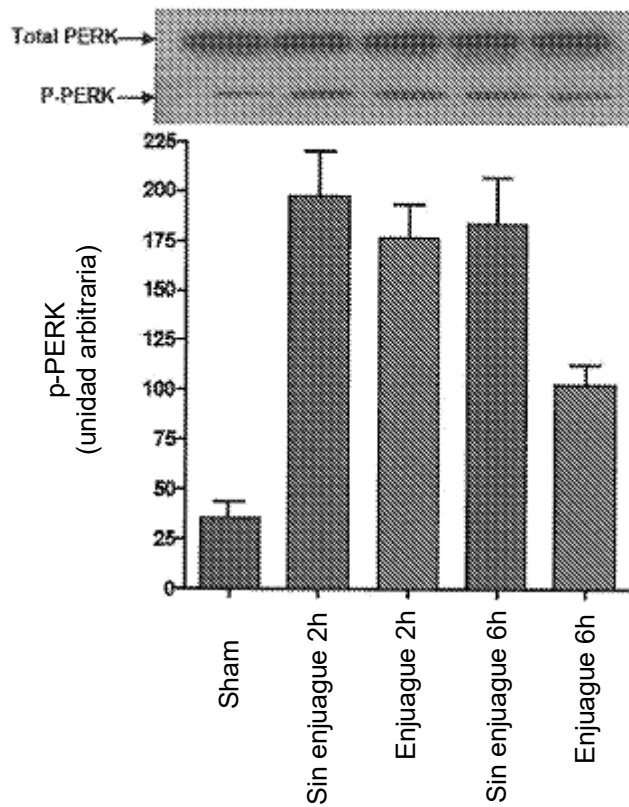


FIGURA 12

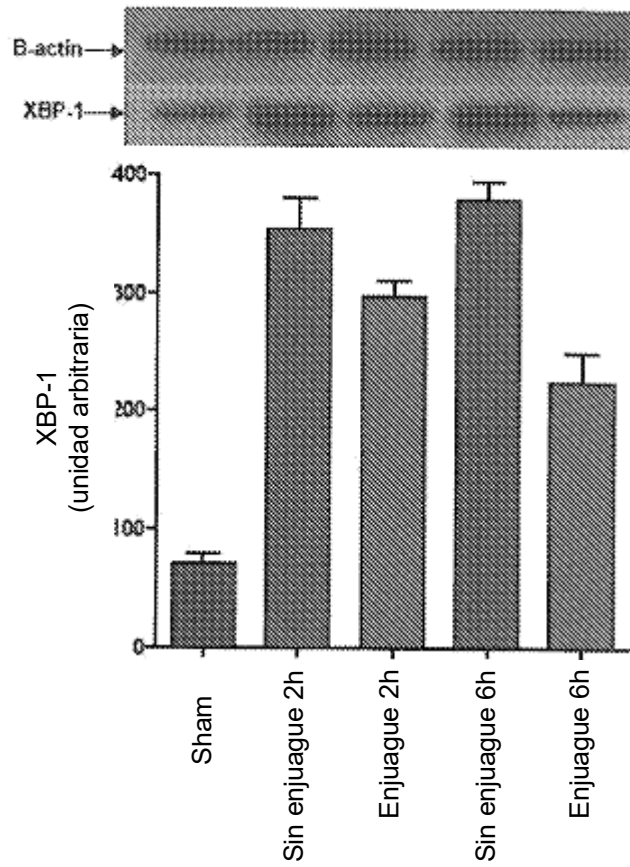


FIGURA 13

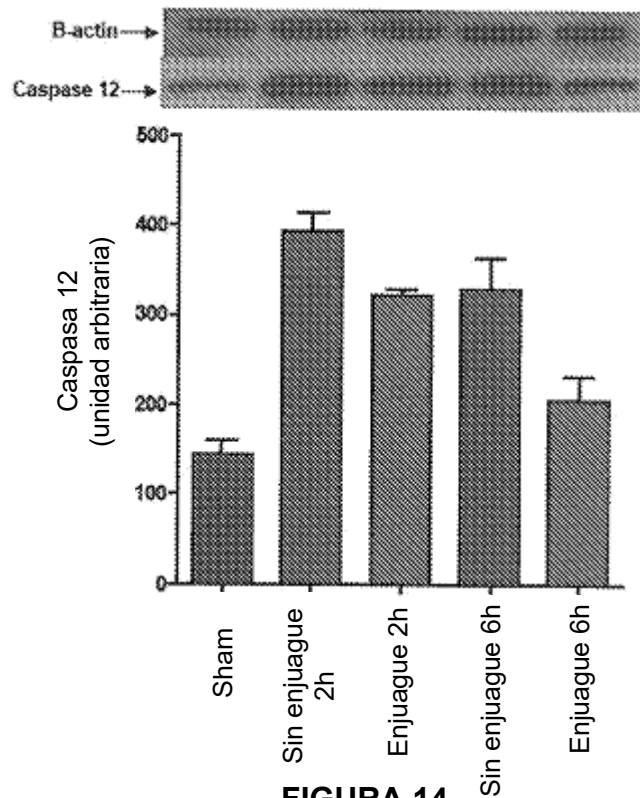


FIGURA 14