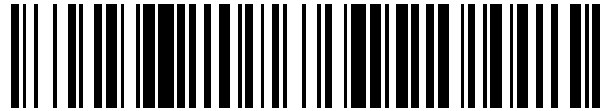


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 340**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2004 E 04784413 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 1675457**

54 Título: **Métodos y composiciones para la criopreservación de órganos**

30 Prioridad:

16.09.2003 US 503551 P

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

24.05.2016

73 Titular/es:

**21ST CENTURY MEDICINE INC. (100.0%)
10844 EDISON COURT
RANCHO CUCAMONGA, CA 91730, US**

72 Inventor/es:

**FAHY, GREGORY, M. y
WOWK, BRIAN**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 571 340 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

Métodos y composiciones para la criopreservación de órganos

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica la prioridad en virtud del título 35 del Código de los Estados Unidos § 119 de la Solicitud provisional estadounidense número de serie 60/503 551, presentada el 16 de septiembre de 2003, el contenido íntegro de la cual se incorpora como referencia en el presente documento.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] La presente invención se refiere a composiciones y métodos para la criopreservación de órganos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 **[0003]** Uno de los mayores retos en criobiología es la criopreservación de órganos enteros. Aunque resulta difícil, este objetivo es importante [14, 15, 24, 25, 28, 29], en parte porque los límites actuales en el tiempo de conservación de los órganos humanos después de su adquisición para el trasplante reducen sustancialmente la eficacia y aumentan el coste de la sustitución de órganos [15]. Estos problemas se podrían eliminar si los
15 órganos se pudieran depositar [9, 24, 25] y almacenar durante un tiempo más reducido que el tiempo de espera actual de los receptores de órganos. Aunque la criopreservación de órganos se ha conceptualizado normalmente como una manera de facilitar la sustitución de órganos vitales mediante alotrasplantes o xenotrasplantes, también existe un interés actual considerable en la utilización de la técnica para preservar las gónadas durante la quimioterapia y después devolverlas al donante después de la finalización del tratamiento [29]. La
20 criopreservación por tiempo indefinido es probablemente esencial también para solucionar el mayor problema en medicina de trasplantes, que es la escasez en la disponibilidad de órganos en relación con el número total de trasplantes que se necesitan. Para hacer frente a esta necesidad, se ha realizado una inversión de miles de millones de dólares en el campo de la ingeniería de tejidos [23], pero este enfoque requerirá también la criopreservación con el fin de lograr un control de inventario y una gestión eficiente de la cadena de suministro de los productos de ingeniería tisular [13].

25 **[0004]** La criopreservación de órganos se investigó seriamente por primera vez en los años cincuenta como consecuencia del redescubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol por parte de Polge, Smith y Parkes en 1949. Hasta 1981, se supuso que la congelación era la única opción para la criopreservación, pero en 1981 Fahy introdujo el concepto radicalmente diferente de vitrificación, en el que no se permite que se forme hielo en el órgano durante el enfriamiento o el calentamiento, eliminando de esta manera las lesiones mecánicas
30 causadas por el hielo. En 1985, Rall y Fahy [27] acuñaron el término "solución de vitrificación", que es una solución crioprotectora lo suficientemente concentrada para permitir la vitrificación en el enfriamiento y, preferiblemente, sin desvitrificación (congelación) en el recalentamiento después de la vitrificación anterior. Aunque se piensa que cualquier muestra acuosa que se pueda enfriar a velocidades ultrarrápidas se puede vitrificar en principio, en el contexto de la vitrificación de órganos, o incluso en el contexto de la vitrificación de
35 pequeños sistemas biológicos como embriones que han de enfriarse y calentarse en recipientes, una solución de vitrificación debe ser lo suficientemente concentrada para vitrificarse cuando se enfría a, por lo general, menos de 3000 °C/min.

[0005] Por ejemplo, los riñones humanos no se pueden enfriar a más de 2 °C/min en su núcleo y para dicho caso una concentración vitrificable de crioprotector se definiría como una concentración que permite la vitrificación en
40 un objeto del tamaño de un riñón enfriado a 2 °C/min o menos. En general, "vitrificación" en este contexto significa que no se formarán cristales de hielo visibles o que se formarán a lo sumo muy pocos en dicho volumen en el enfriamiento. Las formas de enfriar órganos más rápidamente mediante perfusión vascular con medios de intercambio de frío-calor flexibilizarían la definición de "concentración vitrificable" a concentraciones ligeramente inferiores, pero todavía se requerirían concentraciones muy altas. Además, en el contexto de la vitrificación de
45 órganos, por lo general será cierto que una concentración vitrificable que no permite la completa o casi completa supresión de la desvitrificación en el recalentamiento a velocidades de calentamiento factibles no será útil puesto que la desvitrificación en el calentamiento puede resultar inaceptablemente perjudicial. Como se utiliza en el presente documento, una "concentración vitrificable" se define como una concentración que es capaz de permitir la vitrificación a una velocidad de enfriamiento de ≤ 20 °C/min como indica la ausencia visual de hielo en una
50 muestra de 10 ml después del enfriamiento a una temperatura inferior a la temperatura de transición vítrea (T_g) o la ausencia de emisiones de calor detectables cuando la solución se enfría a una temperatura por debajo de la T_g en un calorímetro diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés).

[0006] Desde la introducción del concepto de vitrificación de órganos, se han realizado muchos avances en la técnica. Sin embargo, desde 2004, han pasado 23 desde que se sugirió por primera vez el concepto de vitrificación de órganos [3] y han pasado 19 años desde que se publicó el primer experimento de prueba de principio que mostraba que los embriones de mamíferos se podían vitrificar y recalentar con una alta

supervivencia [27], y el objetivo original de vitrificar órganos de manera satisfactoria sigue siendo difícil de alcanzar.

[0007] En la técnica anterior se han descrito procesos relacionados con la criopreservación de órganos, incluyendo métodos y composiciones para la introducción y la eliminación de concentraciones vitrificables de agentes crioprotectores. Por ejemplo, las patentes estadounidenses número 5 723 282 y 5 962 214 reivindican el siguiente método para la preparación de órganos, tejidos o células para la vitrificación:

a) la concentración de crioprotector se eleva de manera gradual a una primera concentración mientras que la temperatura se reduce ligeramente;

b) la primera concentración se mantiene durante un tiempo suficiente para permitir que se produzca el equilibrio osmótico aproximado del órgano o tejido (definido como una diferencia de <50-200 mM entre las concentraciones arterial y venosa de órganos);

c) la concentración se eleva a una primera concentración intermedia que no es suficiente para permitir la vitrificación (no es vitrificable);

d) la primera concentración intermedia se mantiene durante un tiempo suficiente para permitir el equilibrio osmótico aproximado del órgano o tejido con la concentración intermedia no vitrificable (diferencia de <50-200 mM entre las concentraciones arterial y venosa de órganos);

e) la temperatura se reduce de manera adicional; y

f) la concentración de crioprotector se aumenta a un nivel suficiente para la vitrificación, o a un nivel todavía insuficiente para la vitrificación seguido de una etapa de enfriamiento adicional y una etapa final de aumento de la concentración a una concentración vitrificable final.

[0008] Las patentes estadounidenses número 5 821 045 y 6 187 529 reivindican un método en el que un órgano previamente criopreservado:

a) se calienta sin perfusión a una temperatura lo suficientemente alta para permitir la reperfusión del órgano en el que los daños se minimizan, y a continuación

b) se perfunde directamente con una composición que comprende una concentración no vitrificable de crioprotector que es inferior a la concentración de crioprotector utilizada para la criopreservación, y que comprende además uno o dos agentes tampón osmóticos, donde un agente tampón osmótico se define como un soluto extracelular que contrarresta los efectos osmóticos de las concentraciones intracelulares y extracelulares mayores de los crioprotectores durante el proceso de eflujo de los crioprotectores. Cuando se está tratando un hígado, los agentes tampón osmóticos se omiten, pero la etapa b) todavía requiere la perfusión del hígado con una concentración no vitrificable de crioprotector inmediatamente después de alcanzar la temperatura de reperfusión objetivo. De acuerdo con los límites del proceso de la técnica anterior, la concentración durante la etapa b) está limitada a 20 %-40 % p/v o a aproximadamente 3-6M, o 60 % de la mayor concentración perfundida.

[0009] Resulta evidente que la técnica anterior de la adición y la eliminación de crioprotectores y para el enfriamiento y el calentamiento ha demostrado ser inadecuada para órganos, como lo demuestra la falta de éxitos demostrados reales después de enfriar órganos a temperaturas criogénicas y recalentarlos. Por consiguiente, aunque la patente estadounidense número 6 395 467 B1 y la solicitud de patente estadounidense número 09/916 396 proporcionan soluciones de vitrificación extraordinarias y una solución portadora excelente para mejorar su eficacia, en la técnica todavía se necesitan mejoras adicionales en los métodos y composiciones empleados para la adición y la eliminación de crioprotectores y para el enfriamiento y el calentamiento de órganos y tejidos.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0010] De conformidad con la presente invención, se proporcionan nuevos métodos mejores para el enfriamiento, la crioprotección, el calentamiento y la reperfusión de órganos y tejidos. La presente invención amplía las enseñanzas de la técnica anterior proporcionando soluciones de vitrificación aún más extraordinarias y efectivas sin precedentes. Por lo tanto, un objetivo de la presente exposición es describir nuevos métodos y composiciones capaces de permitir que los órganos sobrevivan y proporcionen soporte vital después de la criopreservación mediante vitrificación y trasplante.

[0011] La vitrificación de órganos requiere la utilización de una solución de perfusión que sea lo suficientemente estable frente a la formación de hielo (lo suficientemente capaz de resistir tanto la nucleación de hielo como el crecimiento de cristales de hielo) para permitir que la formación de hielo se evite o se limite de manera adecuada durante el enfriamiento y el calentamiento de un órgano después de la perfusión con la solución. Sin embargo, las soluciones que tiene la estabilidad requerida tienden a ser tóxicas cuando se perfunden a 0 °C, por lo que,

para reducir la toxicidad, a menudo conviene la perfusión por debajo de 0 °C. De conformidad con un aspecto de la presente invención, se ha desarrollado una solución especialmente ventajosa (denominada en el presente documento M22). M22 se caracteriza por la presencia simultánea de dimetilsulfóxido, etilenglicol, formamida, N-metilformamida, 3-metoxi-1,2-propanodiol, poliglicerol, alcohol polivinílico o un copolímero de alcohol polivinílico-acetato de polivinilo y polivinilpirrolidona de baja masa molecular, donde la solución está lo suficientemente concentrada para permanecer sin hielo basándose en la calorimetría diferencial de barrido cuando se vitrifica y después se recalienta a menos de 1 °C/min. Aunque la composición puede variar, como se indica con más detalle en el presente documento, de conformidad con un modo de realización de la invención preferido actualmente, M22 tiene una concentración total de aproximadamente 9,3 molar, o aproximadamente 64,8 % p/v. M22 se denomina así porque está destinado a exponerse a sistemas vivos predominantemente cerca de -22 °C para minimizar el potencial de toxicidad que se puede producir a temperaturas más altas.

[0012] No obstante, no se conocen métodos en la técnica anterior mediante los cuales se pueda perfundir un órgano de manera continua comenzando sin crioprotector por encima de 0 °C y terminando con una solución como el M22 a -22 °C con la subsiguiente retención de la capacidad de soporte vital después del trasplante, y no existe ninguna orientación en la técnica sobre cómo se puede revertir dicho protocolo de perfusión continua de manera satisfactoria, volviendo a hacer que el órgano tenga un cero por ciento de crioprotector por encima de 0 °C después de la perfusión previa a -22 °C. El enfriamiento a -22 °C se complica por la necesidad de evitar las llamadas lesiones por frío, que se pueden definir como lesiones causadas por el enfriamiento *per se*. Los órganos directamente enfriados perfundidos con crioprotector 7,5M a 8M desde -3 °C a -30 °C produjeron lesiones marcadas [21], coherentes con las observaciones anteriores en riñones perfundidos con otros crioprotectores y enfriados a temperaturas superiores a bajo cero [12, 26]. Este fenómeno también se detecta fácilmente en cortes corticales renales [11]. Aunque se observó que estas lesiones se podrían evitar mediante el enfriamiento a aproximadamente -24 °C en presencia de únicamente crioprotector 6,1M [11, 22], posteriormente se constató que este enfoque provocaba muchas más lesiones por frío cuando se añadía crioprotector adicional y la temperatura se reducía en mayor medida, resultando peor que el enfriamiento simple a partir de 0 °C [18]. Más tarde se presentó un método completamente diferente y mucho mejor para evitar las lesiones por frío (solicitud de patente estadounidense número 09/916 032), pero este método no proporciona medios explícitos para la aplicación de la técnica a órganos enteros. Además, el método para evitar las lesiones por frío no incluye métodos sumamente importantes para el recalentamiento de órganos después del enfriamiento previo y para su reperusión de manera que se eviten daños después de la exposición a concentraciones vitrificables de crioprotector tal como M22.

[0013] De conformidad con la presente invención, se han descubierto nuevos procesos que superan todos estos problemas y son muy ventajosos para la introducción y el lavado de crioprotectores y para el enfriamiento y el calentamiento de órganos durante la perfusión continua.

[0014] Se han probado con éxito métodos de la invención para el enfriamiento, la estabilización, el recalentamiento y la dilución de crioprotectores en órganos perfundidos utilizando M22 como una solución modelo como se describe en los Ejemplos que se proporcionan más adelante, pero serán igualmente aplicables a cualquier solución destinada a la vitrificación de órganos enteros. No se limitan al recalentamiento y la dilución de órganos seguido de la perfusión por encima de -15 °C y, de hecho, serán especialmente útiles después de la perfusión de órganos a temperaturas de -15 °C e inferiores, y aún más útiles después de la perfusión de órganos a temperaturas entre -20 °C y -30 °C. No se limitan al enfriamiento seguro de órganos a -15 °C o superior, sino que son especialmente útiles para el enfriamiento seguro de órganos a -15 °C o inferior, y especialmente útiles para el enfriamiento seguro de órganos a -20 °C a -30 °C. Han demostrado ser compatibles con la supervivencia y la función de soporte vital de un órgano de mamífero después de la vitrificación y el recalentamiento, un logro no alcanzado con anterioridad. Aunque la invención se refiere específicamente a órganos perfundidos principalmente a través del sistema vascular (la perfusión a través de cavidades internas distintas a los vasos sanguíneos, tales como las cámaras del corazón o los ventrículos del cerebro también se incluye en el alcance de la invención, normalmente como un suplemento a la perfusión vascular), los mismos protocolos de concentración-tiempo-temperatura se pueden aplicar también de manera efectiva a los tejidos no perfundidos tratados con crioprotectores por inmersión o superfusión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0015]

La Figura 1 presenta un "gráfico de viabilidad-estabilidad" para cortes corticales renales de conejo expuestos a las soluciones de vitrificación descritas en las Tablas 1 y 2.

La Figura 2 ilustra de manera colectiva la modificación hipertónica de las lesiones por frío causadas por la transferencia brusca de cortes de soluciones a 0 °C a soluciones a -20 °C. La Figura 2A ilustra la existencia de lesiones en los cortes transferidos a -20 °C en la tonicidad indicada. La Figura 2B presenta una comparación de los protocolos de tonicidad constante con los protocolos de tonicidad sin equilibrio. Los cortes transferidos en condiciones isotónicas constantes (1X→1X) experimentaron lesiones considerables,

los cortes transferidos en condiciones hipertónicas constantes (2X→2X) no sufrieron prácticamente lesiones, y los cortes equilibrados en condiciones isotónicas (1X) a 0 °C y transferidos a una solución previamente enfriada dos veces isotónica (2X) a -20 °C (1X→2X) mostraron lesiones intermedias entre los tratamientos 1X→1X y los tratamientos 2X→2X.

5 La Figura 3A resume un método de referencia en el que se pueden superponer los métodos de enfriamiento y calentamiento de conformidad con la presente invención. La Figura 3A también muestra la falta de toxicidad de VMP a -3 °C y proporciona un formato de datos útil para las figuras posteriores. Todos los conjuntos de datos completos se representan horizontalmente frente a una base de tiempo común en tres paneles separados (superior, medio e inferior). Se proporciona una atención más específica a los datos del intervalo de tiempo pequeño de los recuadros. Todos los recuadros muestran gráficas de respuesta frente a tiempo.

10 Figura 3A, panel superior: molaridad arterial (M; línea gruesa) y la diferencia de concentración arteriovenosa en el riñón (A-V) en unidades molares (M). (Nota: al cambiar a crioprotector 0 mM, cambia el modo de visualización para representar la concentración de manitol que se perfunde, causando un aumento aparente de la concentración en el registro).

15 Figura 3A, panel medio: temperaturas (T) arterial (línea gruesa) y venosa en °C medidas utilizando un termopar de aguja en línea arterial y un segundo termopar fino insertado directamente en el efluente venoso por la parte inferior del riñón.

20 Figura 3A, panel inferior: presión (P) de perfusión arterial en mmHg y velocidad del flujo de perfusado (línea gruesa) en ml/min por gramo de peso del riñón después de la enjuague y antes de la perfusión. La presión de perfusión se dividió por 40 para poder representarla en la misma escala que la velocidad de flujo. Antes de introducir el crioprotector, el perfusado era TransSend-B ([10], y fórmula 7 de [7]) más hidroxietilalmidón al 2 % (HEA, de masa molecular relativa $M_r \sim 450$ kilodaltons, obtenido de B. Braun, Irvine, CA). A medida que se introducía el VMP (molaridad de VMP representada en el panel superior, línea gruesa; VMP preparado en portador LM5), el HEA y el TransSend-B se diluyeron gradualmente a cero. Se siguió este procedimiento en todas las perfusiones. El VMP se lavó inicialmente con HEA al 3 % más manitol 300 mM utilizando VMP al 50 % en LM5. Conforme procedía el lavado, la solución portadora se devolvió gradualmente del LM5 al TransSend-B. Cabe señalar que al final de la meseta de VMP, se ha permitido un tiempo suficiente para el equilibrio osmótico aproximado del órgano con VMP como lo indica una diferencia de A-V de solo 50 mM (recuadro central del panel medio). Recuadro superior derecho: niveles de creatinina sérica postoperatorios (Cr); "Día" hace referencia a día postoperatorio; los valores de Cr en el tiempo cero representan las creatininas séricas en la nefrectomía y en el trasplante. Recuadro superior izquierdo: "URI" hace referencia al índice de refracción de la orina y se representa frente a la duración de la perfusión del VMP.

35 La Figura 3B monitoriza la creatinina sérica en siete trasplantes consecutivos después de la utilización del protocolo descrito en la Figura 3A. Ningún trasplante provocó lesiones detectables en el riñón y no se necesitó ni se utilizó iloprost, aspirina o heparina.

40 La Figura 4 es un diagrama esquemático del método de perfusión continua programada sin equilibrio osmótico para minimizar las lesiones por frío y los daños por dilución fría en órganos enteros. Se perfundieron riñones de conejo con VMP durante un periodo nominal de 5 o 10 minutos a aproximadamente -3 °C de conformidad con la Figura 3 y después durante otros 10 minutos mientras la temperatura del perfusado arterial se fijó a aproximadamente -22 °C de la manera más rápida posible. Cada esquema de protocolo representa el tiempo (dirección horizontal) y la temperatura (dirección vertical) de la etapa de perfusión de VMP inicial a -3 °C, implicando la etapa de enfriamiento la perfusión de VMP a temperaturas de hasta -22,5±2,5 °C y las posteriores etapas de calentamiento y dilución. "1/2 VMP+" se refiere a VMP al 50 % más manitol 300 mM como un agente tampón osmótico; HEA al 3 % también estuvo presente. La concentración perfundida en cada etapa se indica encima de la línea esquemática y la temperatura nominal perfundida en cada etapa se indica a la izquierda de cada temperatura esquemática. El **texto en negrita** de los esquemas de protocolo indica las diferencias fundamentales entre los protocolos probados. En cada caso, el riñón conservado sirvió con el único soporte renal inmediatamente después del trasplante. Para cada grupo, n=3. Medias ± 1 de error estándar de la media (SEM).

55 La Figura 5 describe un experimento específico que muestra un ejemplo de un protocolo de perfusión continua de conformidad con la presente invención para el enfriamiento después de un tiempo insuficiente para el equilibrio osmótico aproximado entre el órgano y el perfusado antes del enfriamiento, con calentamiento mediante la reperfusión con una concentración *no* menos concentrada que la concentración presente por debajo de -15°C. El recuadro superior izquierdo muestra que en el momento del inicio del enfriamiento (marcado por la línea vertical), nominalmente 5 minutos después del inicio de la perfusión de VMP, la diferencia de concentración de A-V fue extrema a aproximadamente 2,25M, lo cual está muy lejos del equilibrio osmótico aproximado. El recuadro superior central muestra que en este momento no solo la

concentración venosa sino también la concentración arterial (representada en una escala de concentración molar) no han alcanzado la concentración 8,4M objetivo de VMP, habiendo alcanzado la concentración arterial solo 8,15M. Esto enfatiza la naturaleza nominal de los protocolos de perfusión de órganos, en los que los cambios radicales programados en el tiempo y la temperatura no se producen necesariamente de manera instantánea. Por este motivo, tanto la interpretación literal como la no literal de las descripciones de procesos tales como “perfundir VMP durante 5 minutos” son adecuadas, no solo interpretaciones literales. El recuadro superior derecho ilustra el método de recalentamiento de perfusión continua de concentración constante (molaridad arterial perfundida indicada por la línea gruesa y el eje vertical izquierdo, temperatura de perfusado arterial indicada por la línea fina y el eje vertical derecho). Antes del calentamiento, el órgano ya se encuentra a una temperatura que permite la reperfusión del órgano en el que los daños se minimizan (~-23 °C), pero no se perfunde con una solución no vitrificable que contiene tampones osmóticos a -20 °C. En su lugar, se perfunde con una solución que se calienta rápidamente, no diluida, vitrificable y sin tampón osmótico hasta que la temperatura arterial supera -10 °C y se aproxima a -5 °C, y solamente entonces se perfunde con más solución diluida no vitrificable. Los recuadros izquierdo y derecho del panel medio representan los niveles de creatinina postoperatorios y las concentraciones de crioprotector que se perfundieron justo antes de cambiar a un perfusado totalmente libre de crioprotector, respectivamente.

La Figura 6 resume los resultados de otro método de ejemplo de conformidad con la presente invención para el recalentamiento de perfusión continua desde por debajo de -10 °C con dilución simultánea de concentraciones altamente vitrificables de crioprotector y su efecto en los niveles de creatinina postoperatorios. El recuadro muestra tres historias de temperatura arterial frente a tiempo y los tiempos y las temperaturas a los que la concentración arterial medida empezó primero a disminuir (indicado por los triángulos blancos marcados como crioprotector 9,3M) y finalmente empezó a aproximarse a la concentración de VMP (indicada por los triángulos negros que designan la consecución del crioprotector 8,5M). El tiempo cero del recuadro representa el tiempo que la máquina de perfusión estuvo configurada para cambiar de M22 a VMP; se requirieron aproximadamente 2,5 minutos para que el cambio programado diera lugar a una disminución real de la concentración en estos experimentos. Los tipos de líneas del recuadro de protocolos coinciden con los tipos de líneas para los mismos grupos del panel principal que muestra los resultados postoperatorios. El tiempo de perfusión de M22 antes del lavado a -22 °C fue 15-25 minutos; no hubo una influencia aparente del tiempo de perfusión de M22 en los niveles de creatinina postoperatorios (datos no mostrados). Medias \pm 1 SEM. La notación n=11 para el grupo de “dilución caliente” de rápido calentamiento se refiere a los datos térmicos del recuadro únicamente, con n=8 para los datos de creatinina del mismo grupo (algunos riñones no se trasplantaron por razones no relacionadas con la eficacia del método descrito para este grupo).

La Figura 7 resume los resultados con otro protocolo de ejemplo de conformidad con la presente invención para la recuperación satisfactoria de los órganos después de la perfusión con concentraciones vitrificables de crioprotector por debajo de -10 °C utilizando el método de recalentamiento y dilución simultáneo de la Figura 6. Aquí se emplean el mismo formato y abreviaturas que en las Figuras 3 y 5. Los recuadros muestran la falta de equilibrio osmótico aproximado al inicio del enfriamiento (recuadro superior izquierdo), la falta de equilibrio osmótico aproximado al inicio de la perfusión con la solución de vitrificación final (recuadro superior central), la falta de equilibrio osmótico aproximado en el momento del inicio del calentamiento, que es el tiempo nominal para enfriar y vitrificar el órgano (recuadro medio izquierdo), la relación entre la molaridad arterial y la temperatura durante la perfusión-recalentamiento (recuadro medio derecho), y los niveles de creatinina sérica postoperatorios (recuadro superior derecho). Las inestabilidades en el control de la temperatura que se muestran inmediatamente después del calentamiento rápido a partir de -22 °C no fueron las típicas de este protocolo, sino que ilustran la tolerancia del órgano a fluctuaciones de temperatura leves dentro de este intervalo.

La Figura 8 presenta la historia térmica ambiental e intrarrenal de un riñón de un conejo expuesto a -50 °C por convección forzada durante 6 minutos y después recalentado. C = temperatura cortical (2 mm por debajo de la superficie renal); M = temperatura medular (7 mm por debajo de la superficie renal); P = temperatura papilar/pélvica (12 mm por debajo de la superficie renal); BF1 = temperatura del aire que se mueve rápidamente en contacto con la superficie renal en un congelador biológico Linde BF-1; A = temperatura arterial durante la reperfusión, V = temperatura venosa durante la reperfusión. Las temperaturas intrarrenales se monitorizaron utilizando una sonda de aguja de triple esfera (*bead*) de PhysiTemp (Huron, PA). Las líneas horizontales ilustran que todas las partes del riñón estaban entre -40 °C y -50 °C en el momento del inicio del calentamiento. La reperfusión para el recalentamiento se consiguió utilizando el Método 1 descrito junto con la Figura 9.

La Figura 9 ilustra los efectos de dos métodos de ejemplo de conformidad con la presente invención para la prevención de daños después del enfriamiento de un órgano a -45 °C. El método de recalentamiento 1 (rombos) utilizó el método de lavado de M22 descrito en relación con las Figuras 6 y 7. En este método, el M22 de la línea de perfusión arterial se mantuvo a -22 °C hasta que el órgano enfriado se volvió a conectar a la máquina de perfusión y se reperfundió, después de lo cual se realizó un calentamiento rápido del perfusado arterial como en la Figuras 6 y 7. En el método de recalentamiento 2 (triángulos invertidos), la

temperatura del perfusado se aumentó a -3 °C durante el tiempo en el que no se perfundió el órgano. Cuando el órgano se volvió a conectar a la máquina de perfusión, se reperfundió directamente con concentraciones vitrificables de crioprotector a -3 °C durante un total de $2,4 \pm 0,7$ minutos antes de comenzar a experimentar la dilución del perfusado arterial. El recuadro muestra una línea vertical que marca la discontinuidad en la perfusión requerida para el enfriamiento a aproximadamente -45 °C y el recalentamiento desde aproximadamente -45 °C; excepto la desviación de calibración en el refractómetro arterial, no hay ningún cambio en la concentración arterial, pero hay un cambio radical en la temperatura cuando el órgano se reperfunde después de haber sido previamente enfriado a -45 °C. En el momento del inicio de la reducción de la concentración arterial, la temperatura venosa es de aproximadamente -17 °C a pesar del calentamiento más rápido del Método 2, pero aumenta por encima de -10 °C en menos de 10 minutos, lo que sugiere que 10 minutos de perfusión a -3 °C serán suficientes para devolver todas las partes de un órgano a una temperatura a la que la dilución a concentraciones inferiores es segura. El grupo de -45 °C del Método 1 se perfundió con M22 a ~ -22 °C (temperatura arterial, $-22,5 \pm 2,5$ °C) durante 20 (n=2) o 25 (n=6) minutos antes de un enfriamiento y recalentamiento adicional como en la Figura 7. El grupo de -45 °C del Método 2 se perfundió con "M22MX", que consiste en M22 que carece de "X1000" (un copolímero de alcohol polivinílico y acetato de polivinilo descrito con detalle en otra parte), durante 25 minutos como en el Método 1, enfriado a -45 °C como en el Método 1, y reperfundido a -3 °C con M22MX después del calentamiento exterior previo a una temperatura superficial de aproximadamente -22 °C. Medias ± 1 SEM.

La Figura 10 es un gráfico del efecto de la presión de perfusión arterial durante la perfusión de M22 en el equilibrio de tejido con crioprotector medido por la diferencia de concentración arteriovenosa (A-V). En todos los casos, las diferencias A-V se midieron al final de los 25 minutos de perfusión con M22, la presión de perfusión arterial fue 40 mmHg antes de la perfusión con M22 y la presión se ajustó al valor representado en el momento del inicio de la perfusión de M22. La diferencia A-V es la concentración de perfusado arterial menos la concentración del efluente del órgano (concentración venosa).

La Figura 11 resume el registro de perfusión y los datos de recuperación postoperatoria del riñón de un conejo que se perfundió con M22, se vitrificó, se recalentó, se trasplantó y proporcionó soporte vital como el único riñón hasta que al receptor se le practicó la eutanasia 40 días después del trasplante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] De conformidad con un modo de realización de la invención, se proporcionan métodos para el enfriamiento de órganos desde una temperatura superior a -10°C hasta una temperatura objetivo entre -10 °C y -40 °C mediante perfusión vascular continua con lesiones mínimas, comprendiendo los métodos:

la perfusión del órgano con una solución crioprotectora (por ejemplo, una primera mezcla de crioprotectores permeables y no permeables con un punto de congelación inferior a dicha temperatura baja deseada) durante un tiempo insuficiente para permitir que tenga lugar el equilibrio osmótico aproximado del órgano con dicha mezcla de crioprotectores;

la disminución de la temperatura del perfusado arterial a o por debajo de dicha temperatura baja deseada; y la continuación de la perfusión de dicha mezcla hasta que se considera que la temperatura de al menos una parte del órgano ha alcanzado la temperatura objetivo;

en el que la presión de perfusión arterial es 32-110 mmHg, y

en el que la concentración arterial es superior a la concentración venosa en más de 200 mM en el momento en que se inicia el enfriamiento por debajo de -10 °C.

[0017] Un ejemplo de una primera mezcla de crioprotectores permeables y no permeables, VMP, que se puede utilizar de manera efectiva en el método descrito anteriormente es la siguiente. El VMP se prepara normalmente en una solución portadora cuya tonicidad en ausencia de los crioprotectores de VMP se define como isotónica o 1X isotónica. El VMP en la solución portadora LM5 (cuya composición se proporciona en [5, 10] y en las notas a pie de página de la Tabla 1) tiene una tonicidad efectiva de 1,2 veces isotónica, donde la tonicidad se define como la relación entre la osmolalidad de los componentes de VMP menos los crioprotectores permeables (los crioprotectores permeables se definen como los crioprotectores cuya masa molecular es inferior a 150 daltons) y la osmolalidad de la solución portadora sin crioprotector (preferiblemente, la solución conocida como LM5). El aumento de la tonicidad por encima de la isotónica se debe a la presencia en VMP de dos agentes antinucleantes o "bloqueadores de hielo", poliglicerol (a veces denominado PG-1, o "Z-1000") y alcohol polivinílico o un copolímero de alcohol polivinílico y acetato de polivinilo (a veces denominado PVA o "X-1000") de masa > 150 daltons. La inclusión de los bloqueadores de hielo en el VMP proporciona protección frente a las lesiones por frío durante el enfriamiento del órgano a -15 °C a -40 °C y proporciona también más tiempo para que estos polímeros penetren a través de los espacios extracelulares, incluyendo cavidades tales como los ventrículos o espacios urinarios, del órgano, asegurando de esta manera en mayor medida su adecuada distribución antes de la vitrificación.

[0018] Los componentes de VMP no bloqueadores de hielo pueden variar cada uno en $\pm 25\%$ sin pérdida de la eficacia de la variante de solución de VMP. El VMP también se puede modificar para que incluya otros polímeros destinados a contribuir a las propiedades de bloqueo del hielo y de inhibición del crecimiento del hielo de la solución de vitrificación posteriormente perfusionada primaria o final, y puede incluir de manera opcional una solución portadora ligeramente (0-50 % más) concentrada siempre y cuando la tonicidad deseable del VMO modificado en la solución portadora, elevada por la suma de la presencia de los bloqueadores de hielo, el otro o los otros polímeros destinados a inhibir el crecimiento de hielo y más de una cantidad isotónica de solución portadora, tenga una tonicidad que se encuentre normalmente en el intervalo en general más preferido de 1,1 a 1,6 veces isotónica. En otras palabras, la mezcla más preferida en general de crioprotectores permeables y no permeables (en la solución portadora) para utilizarse en este método tiene una tonicidad después del equilibrio completo con células vivas, tejidos y órganos que va de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,6 veces isotónica. La cantidad total de bloqueador de hielo en VMP se puede variar de 0 % a aproximadamente 7 % p/v, en consonancia con las limitaciones de tonicidad anteriores, pero la cantidad más preferida es 1-4 % p/v. Normalmente, la temperatura baja deseada por debajo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ irá desde aproximadamente $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta aproximadamente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo lo más preferible desde aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[0019] La presión de perfusión durante el método descrito anteriormente puede ser constante o variable pero debe estar dentro de aproximadamente 40-110 mmHg, o más preferiblemente dentro de aproximadamente 50-90 mmHg o aún más preferiblemente dentro de aproximadamente 55-85 mmHg. En una variante del método, la presión de perfusión está a 40 ± 8 mmHg antes del enfriamiento y se eleva a 50-80 mmHg durante el enfriamiento. El intervalo de presión de perfusión deseable para los órganos más grandes será mayor que para los órganos más pequeños y puede ir de 50-110 mmHg, o más preferiblemente de 60-100 mmHg. Como se utiliza en la presente memoria, "arterial" significa "que fluye en el interior del órgano" y pretende incluir la perfusión del hígado a través de la vena porta y la perfusión retrógrada de órganos a través de sus venas.

[0020] El método puede incluir una etapa para el calentamiento de órganos desde por debajo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta una temperatura alta deseada de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o superior mediante perfusión vascular continua con lesiones mínimas, comprendiendo la etapa:

El aumento de la temperatura del órgano aumentando la temperatura del perfusado arterial hasta o por encima de la temperatura alta deseada sin cambiar la concentración arterial y mientras se continúa perfundiendo el órgano.

La etapa para el calentamiento de órganos puede incluir también continuar perfundiendo el órgano sin cambiar la concentración arterial hasta que la temperatura del órgano alcance la temperatura alta deseada.

[0021] Las temperaturas altas deseadas típicas pueden ir desde aproximadamente $-9,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta aproximadamente $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo el intervalo más preferido $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se considera que el órgano ha alcanzado de manera óptima la temperatura alta deseada cuando las partes más frías del órgano están lo suficientemente cerca de la temperatura alta deseada para minimizar las lesiones tras la posterior dilución del crioprotector a la vez que se minimiza la toxicidad causada por el retraso de la dilución. Este método se puede utilizar para el calentamiento de órganos que contienen concentraciones no vitrificables de crioprotector y para órganos que contienen concentraciones vitrificables de crioprotector que pueden vitrificarse a velocidades de enfriamiento de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ o por debajo. En el último caso, el órgano se perfunde durante un tiempo con medios vitrificables a la temperatura alta deseada o por encima antes de cualquier dilución posterior. En este método, no está implicada ninguna inclusión de agentes tampón osmóticos en un diluyente debido a la falta de dilución crioprotectora en el método de calentamiento.

[0022] De conformidad con otro modo de realización adicional de la presente invención, se proporcionan métodos para perfundir órganos con una concentración vitrificable de crioprotector, en los que el órgano primero se enfría mediante el método de enfriamiento descrito anteriormente, hasta la temperatura baja deseada por debajo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a continuación se perfunde el órgano con la concentración vitrificable de crioprotector. Como se utiliza en el presente documento, la palabra "crioprotector" es genérica y se puede referir a una mezcla de crioprotectores individuales de masa baja ($<100\text{-}200$ daltons) y alta (≥ 150 daltons). La expresión "concentración vitrificable de crioprotector" como se emplea en el presente documento se refiere a una concentración que permitirá que las regiones del órgano que estén saturadas con el crioprotector se vitrifiquen cuando el órgano se enfríe a una velocidad de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ o por debajo. Una solución particularmente preferida para utilizarse en este método contiene DMSO, formamida, etilenglicol, poliglicerol más de 1 % p/v, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, N-metilfounamida y 3-O-metil-rac-glicerol. Un modo de realización específico de esta solución es la fórmula conocida como M22 cuya composición se describe en el presente documento (véase la Tabla 2). Los componentes de M22 pueden variarse en $\pm 25\%$ sin pérdida de eficacia de las variantes de M22 resultantes de este método. Asimismo, el M22 se puede modificar para que contenga polietilenglicol, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,5-4 % p/v.

[0023] También en este método, la perfusión se puede llevar a cabo a una primera presión, que puede ser aproximadamente 40 mmHg, antes de la perfusión con dicha concentración vitrificable de crioprotector y se

puede elevar a una segunda presión, que es preferiblemente 41-110 mmHg, y más preferiblemente a 55-85 mmHg, cuando se inicia la perfusión con dicha solución. También puede resultar efectiva la perfusión de presión constante en el intervalo de 32-110 mmHg de conformidad con la presente invención.

5 **[0024]** También se proporcionan métodos para diluir inicialmente crioprotectores en órganos previamente perfundidos con crioprotector a una temperatura de -10 °C o inferior, comprendiendo los métodos:

el aumento de la temperatura del perfusado arterial hasta o por encima de una temperatura alta deseada por encima de -10 °C durante la perfusión del órgano sin cambiar la concentración de crioprotector.

10 continuar perfundiendo el órgano sin cambiar la concentración de crioprotector durante un tiempo suficientemente prolongado para proteger el órgano de lesiones resultantes de la dilución de perfusado posterior, pero no tan prolongado como para causar lesiones indeseadas por la continua exposición a dicho crioprotector no diluido a la temperatura alta deseada; y

la dilución del crioprotector.

15 **[0025]** Normalmente, el tiempo que es lo suficientemente prolongado para proteger el órgano de lesiones por dilución osmótica pero no lo suficientemente prolongado para causar lesiones no deseadas por la exposición a la solución a la temperatura alta deseada es 1 a 10 minutos. En una variación de este método, la perfusión por debajo de -10 °C se puede interrumpir por ejemplo desconectando el órgano de la máquina de perfusión y el perfusado arterial se puede calentar a la temperatura alta deseada por encima de -10 °C mientras que el órgano sigue desconectado y sin perfundir, después de lo cual el órgano se puede volver a conectar a la máquina de perfusión y perfundirse con perfusado arterial a la temperatura alta deseada.

20 **[0026]** En cualquiera de las variantes del método, la presión de perfusión al inicio, durante, o después de la dilución crioprotectora se puede disminuir a una presión por debajo de la utilizada durante la perfusión por debajo de -10 °C y antes del inicio de la elevación de la temperatura de perfusión y/o el inicio de la dilución. En un modo de realización preferido actualmente, la presión de perfusión disminuida está preferiblemente en el intervalo de 40-85 mmHg.

25 **[0027]** En cualquiera de las variantes del método, un medio de dilución preferido consiste en utilizar un diluyente que no contenga ningún tampón osmótico añadido. La solución conocida como VMP, que contiene solo crioprotectores permeables y no permeables y ningún tampón osmótico, es un diluyente prototípico útil para utilizarse en el método de dilución descrito. El método es particularmente útil cuando la concentración perfundida por debajo de -10 °C y a la temperatura alta deseada por encima de -10 °C antes de la dilución es vitrificable a una velocidad de enfriamiento de 20 °C/min o menos y preferiblemente a una velocidad de enfriamiento de 2 °C/min o menos. Además, la etapa de dilución se puede llevar a cabo utilizando una concentración de crioprotector inferior a la concentración más alta añadida a por debajo de -10 °C pero aún lo suficientemente alta para ser vitrificable a una velocidad de enfriamiento de ≤ 20 °C/min.

35 **[0028]** En algunos modos de realización de la presente invención, el método incluye etapas para la dilución del crioprotector en y el calentamiento de órganos desde por debajo de -10 °C hasta una temperatura alta deseada de -10 °C o superior mediante perfusión vascular continua con lesiones mínimas, comprendiendo las etapas:

el aumento de la temperatura del perfusado arterial a o por encima de dicha temperatura alta deseada mientras se perfunde el órgano de manera continua.

40 Las etapas pueden comprender también de manera simultánea la reducción de la concentración arterial mientras la temperatura del órgano está aumentando hacia dicha temperatura alta deseada durante la perfusión arterial continua del órgano.

45 **[0029]** Normalmente, la temperatura alta deseada contemplada para utilizarse en este método irá desde aproximadamente -9,9 °C hasta aproximadamente 0 °C, siendo el intervalo más preferido -8 °C a -2 °C. Normalmente, en este método la concentración del perfusado arterial se disminuye en 0,5-1,5 molar mientras la temperatura se aumenta desde una temperatura por debajo de -10 °C hasta una temperatura por encima de -10 °C. También normalmente en este método, la velocidad de calentamiento desde por debajo de -10 °C hasta por encima de -10 °C está entre 0,5 °C/min y 20 °C/min y es preferiblemente superior a 1 °C/min, siendo dos velocidades satisfactorias aproximadamente 2 °C/min y aproximadamente 10 °C/min. Normalmente, la velocidad de dilución de la concentración arterial durante el calentamiento desde por debajo de -10 °C hasta por encima de 50 **[0030]** También se proporcionan métodos en los que un órgano se perfunde con una solución capaz de permitir que el órgano se vitrifique cuando el órgano se enfría a una velocidad de 20 °C/min o menos a la temperatura

baja deseada a o por debajo de -10 °C de conformidad con el método de enfriamiento descrito anteriormente pero que comprende además:

la interrupción de la perfusión continua a la temperatura baja deseada, y;

5 el enfriamiento del órgano a una temperatura por debajo de dicha temperatura baja deseada a o por debajo de -10 °C.

10 **[0031]** La interrupción de la perfusión como se contempla en el presente documento puede continuar hasta que el órgano se recalienta a una temperatura lo suficientemente alta para permitir que el órgano se perfunda a una temperatura de perfusado arterial igual o mayor que dicha temperatura baja deseada. La interrupción de la perfusión también puede continuar mientras el órgano se almacena a una temperatura por debajo de la temperatura baja deseada. Además, la interrupción de la perfusión antes del enfriamiento puede producirse después de un tiempo de perfusión previo insuficiente para permitir el equilibrio osmótico aproximado del órgano. Además, el órgano se puede vitrificar mediante enfriamiento después de la perfusión con dicha solución capaz de permitir que el órgano se vitrifique cuando el órgano se enfría a una velocidad de 20 °C/min o menos a dicha temperatura baja deseada a o por debajo de -10 °C durante un tiempo insuficiente para permitir el equilibrio osmótico aproximado del órgano con dicha solución.

15 **[0032]** En el presente documento también se describen métodos para la dilución de crioprotector en un órgano después de que el órgano se haya perfundido a una temperatura por debajo de -10 °C, comprendiendo los métodos:

20 el calentamiento del órgano de manera externa; y
la perfusión del órgano a una temperatura arterial igual o superior a la temperatura alta deseada de ≥ 10 °C. con una concentración reducida de crioprotector que no contiene un agente tampón osmótico no penetrante.

[0033] En este método, la concentración reducida de crioprotector puede ser tanto no vitrificable (para órganos distintos del hígado) como vitrificable (para todos los órganos).

25 **[0034]** Los métodos y composiciones de la invención se describirán a continuación con más detalle en relación con los siguientes Ejemplos no limitantes que describen cada componente inventivo de la invención, de la siguiente manera:

Ejemplo 1

M22 y otros soluciones de vitrificación preferidas

30 **[0035]** En la **Tabla 1** se describen varias soluciones preferidas de utilidad en la presente invención y en la **Figura 1** se describen sus efectos en la formación de hielo y la viabilidad del corte del riñón. En este tipo de gráfico, la recuperación biológica del sistema después de la exposición a una solución de vitrificación se representa frente a la velocidad de calentamiento crítica de la solución de vitrificación probada. En esta figura, la velocidad de calentamiento crítica se definió como la velocidad que fue suficiente para suprimir la cristalización de toda la masa de la solución de prueba menos el 0,2 %, medido por la entalpía media de fusión de muestras triplicadas enfriadas y calentadas en un calorímetro diferencial de barrido (DSC). Los números en el interior de los símbolos representados se refieren a los números de las soluciones correspondientes enumeradas en la Tabla 1, salvo que el punto 13 que se refiere a los datos obtenidos para una nueva solución, M22, cuya fórmula se proporciona en la **Tabla 2**. La viabilidad se evalúa mediante la relación K^+/Na^+ en estado estacionario lograda por los cortes después del lavado de crioprotector y 90 minutos de incubación a 25 °C seguido del lavado de la mayoría de los cationes extracelulares con manitol isotónico [2, 4, 8]. Se cree que los métodos utilizados para la adición y el lavado de crioprotector evitan las lesiones osmóticas y permiten que se midan únicamente los efectos intrínsecos de las soluciones probadas y siguen la metodología básica de las Figuras 5 o 7 que aparecen más adelante pero sin perfusión.

45 **[0036]** La metodología preferida de la presente invención se ilustra a continuación utilizando ejemplos que implican la solución de vitrificación M22 particularmente preferida y la solución de transición VMP. La Figura 1 muestra la posición de M22 como una nueva solución de vitrificación particularmente ventajosa. Una de las ventajas del M22, como se indica anteriormente, es que tiene una velocidad de calentamiento crítica muy baja. La velocidad de calentamiento crítica, denominada en el presente documento v_{WCR} , se define aquí como la velocidad de calentamiento necesaria para suprimir de manera adecuada o total la cristalización detectable. La Figura 1 representa la recuperación de la funcionalidad de los cortes corticales renales de conejo frente a la v_{WCR} de la solución a la que estuvieron expuestos (Tabla 1). Los datos para la exposición a la solución de la técnica anterior conocida como VS41A o VS55, que consta de dimetilsulfóxido 3,1M más formamida 3,1M más 1,2-propanodiol 2.6M, se incluyen como un punto de referencia (círculos). Como se puede observar, mediante la selección juiciosa de los factores de composición y las condiciones de exposición, es posible acercarse cada vez
55 más a, y quizás incluso lograr literalmente, una solución que no se desvitrifique (velocidad de calentamiento

crítica, ~ 0 °C/min) manteniendo a la vez una alta viabilidad funcional. Por ejemplo, la adición de 0,5 % p/v de cada uno de los antinucleantes ("bloqueadores de hielo") alcohol polivinílico (PVA) y poliglicerol (PGL) y el cambio de la solución portadora de un portador de glucosa alta a un portador de glucosa más baja conocido como LM5 (véase la Tabla 1) redujo la v_{WCR} de aproximadamente 26 °C/min a aproximadamente 12 °C/min (punto 9 frente a punto 4) sin ninguna penalización en toxicidad. La misma maniobra más la sustitución de PVP K30 por PVP K12 disminuyó la v_{WCR} de 63 °C/min a 14 °C/min (punto 8 frente a punto 1). La elevación de los bloqueadores de hielo en otro 0,5 % p/v cada uno y el aumento del nivel de crioprotector permeable en 1 % p/v (punto 11 frente a punto 8) produjo una ganancia adicional de 3,7 veces sin, de nuevo, ninguna reducción en la recuperación funcional. En general, en comparación con VS41A, la utilización de bloqueadores de hielo, PVP K12 y LM5 en combinación con las mezclas de crioprotectores permeables basadas en la combinación de dimetilsulfóxido, formamida y etilenglicol [10], permite aproximadamente una mejora de 20 veces en la v_{WCR} con una mejora simultánea en la relación de K^+/Na^+ desde aproximadamente 55 % de control hasta aproximadamente 85 % de control en los cortes expuestos a la solución de vitrificación final durante 40 minutos a 0 °C (Figura 1, cuadrados frente a círculos). La reducción de la exposición en solo 10 minutos, a 30 minutos, dio lugar a aún menos toxicidad (puntos en forma de rombo).

Tabla 1: Algunas soluciones^a de vitrificación muy estables y biológicamente aceptables

Punto	Nombre	v _{WCR}	D	F	E	A	PK30	PK12	PVA	PGL	Portador	% p/v
1	V _{EG} -4%D(1)F+7 PK30	63	21,671	12,492	16,837	0	7	0	0	0	RPS-2	58
2	V _{EG} +1% PVA	60,3	24,208	13,955	16,837	0	0	0	1	0		56
3	V _{EG} +2%D	53,3	24,208	13,955	16,837	0	0	0	0	0	RPS-T	57
4	E[D(,7)F] _{38,16+} 6 PK12	26,3	20,926	17,234	16,840	0	0	6	0	0	GHP-2	61
5	52% V _{EG} S+6PK12+0,5+0,5	22,2	22,887	13,194	15,919	0	0	6	0,5	0,5	LM5	59
6	52% V _{EG} S+6PK12+1%PVA	16,7	22,887	13,194	15,919	0	0	6	1	0	RPS-2	59
7	50% V _{EG} S+8PK12+1% PVA	15,6	22,007	12,686	15,307	0	0	8	1	0	RPS-2	59
8	V _{EG} -4%D(1)F+7PK12+,5+,5	14,1	21,671	12,492	16,837	0	0	7	0,5	0,5	LM5	59
9	E[D(,7)F] _{38,16+} 6PK12+,5+,5	11,7	20,926	17,234	16,840	0	0	6	0,5	0,5	LM5	62
10	V _{EG} -3%D(1)F+7A+1PVA+4	5,1	22,305	12,858	16,837	7	0	0	1	4	LM5	64
11	V _{EG} -3%D(1)F+7PK12+1+1	3,8	22,305	12,858	16,837	0	0	7	1	1	LM5	61
12	V _{EG} -3%D(1)F+7E+1PVA+4	2,9	22,305	12,858	23,837	0	0	0	1	4	LM5	64

^aLos números de las soluciones se refieren a puntos en la Figura 1. v_{WCR} es la velocidad de calentamiento requerida para suprimir la formación de hielo a 0,667 julios/100 g, que es el equivalente a la cantidad de calor que se produciría por el cristalización de 0,2 gramos de agua por 100 gramos de solución a 0 °C. La v_{WCR} se midió después del enfriamiento a -150 °C a 100 °C/min. Las concentraciones de crioprotector se proporcionan en unidades (g/dl) % p/v. Abreviaturas: D = dimetilsulfóxido; F = formamida; E = etilenglicol; A = acetol; PK30 = PVP K30, de Mr 40 000 daltons; PK12 = PVP K12, de M_r 5000 daltons; PVA= alcohol polivinílico o un copolímero de alcohol polivinílico y acetato de polivinilo, particularmente el bloqueador de hielo Supercool X-1000 comercialmente disponible de 21st Century Medicine (21CM) en Rancho Cucamonga, California; PGL = poliglicerol, específicamente decaglicerol, particularmente el bloqueador de hielo Supercool Z-1000 comercialmente disponible de 21CM; (1) y (,7) se refieren a la proporción molar de dimetilsulfóxido en relación con formamida en la solución; V_{EG} = una solución crioprotectora descrita en otra parte [9, 10] y recapitulada para el punto 2; V_{EG}S = " Solutos V_{EG}", que se refiere a la cantidad total de la suma de los componentes de D, F y E de V_{EG} (en las proporciones que se encuentran en V_{EG}); las soluciones portadoras RPS-2, RPS-T y GHP-2 se describen en otra parte [5, 9]. La solución portadora LM5 [5] consta de glucosa 90 mM, manitol 45 mM, lactosa 45 mM, KCl 28,2 mM, K₂HPO₄ 7,2 mM, glutatión reducido 5 mM, adenina HCl 1 mM, NaHCO₃ 10 mM y, cuando el crioprotector está ausente, CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 2 mM. La solución 11 también se conoce como VM3. La solución 10 también se conoce como "1,5X". Las cantidades absolutas y las proporciones relativas de todos los componentes de las soluciones 1-12 se pueden variar en ± 20 % sin perder eficacia en la invención.

Tabla 2: Propiedades de M22

Componente ¹	Concentración o Propiedad
Dimetilsulfóxido	2,855 M (22,305 % p/v)
Formamida	2,855 M (12,858 % p/v)
Etilenglicol	2,713 M (16,837 % p/v)
N-metilformamida	0,508 M (3 % p/v)
3-metoxi,1,2-propanodiol*	0,377 M (4 % p/v)
PVP K12	2,8 % p/v (~ 0,0056M)
PVA ^a	1% p/v ^b (~ 0,005M)
PGL ^a	2% p/v ^b (~ 0,0267M)
5XLM5 ^c	20 ml/dl
Concentración total de crioprotector	9,345 M (64,8 % p/v)
pH	8,0
Tonicidad nominal	1,5 veces isotónica
Punto de fusión ^d	~-54,9 °C (estimado)
Velocidad de calentamiento crítica	<1 °C/min

¹ Los 5 primeros componentes enumerados se pueden variar en $\pm 25\%$ sin perder eficacia en la invención. Los 3 componentes siguientes (polímeros) pueden variarse hasta tres veces sin perder eficacia en la invención. No obstante, las cantidades de los componentes que figuran son las mejores cantidades. PVP K12 ~ 1300-5000 daltons.

*Esta molécula también se denomina 3-O-metil-rac-glicerol.

^aPVA (también denominado "Supercool X-1000") y PGL (también denominado "Supercool Z-1000") son bloqueadores de hielo comercialmente disponibles que se pueden obtener en 21st Century Medicine, Inc. y constan de un copolímero de alcohol polivinílico- acetato de polivinilo (en los que aproximadamente el 80 % de las fracciones de alcohol o acetato son grupos hidroxilo y el 20 % son grupos acetilo) y poliglicerol, respectivamente.

^bConcentraciones finales de polímero.

^c1X LM5 (véase la Tabla 1 para la fórmula) contiene CaCl_2 1 mM y MgCl_2 2 mM, pero estos se omiten del 5X LM5 para evitar la formación de precipitados. "5X LM5" se refiere a un aumento de 5 veces en las concentraciones molares de los componentes de LM5. Se utiliza 5X LM5 por conveniencia en la preparación de la solución pero los componentes de 1X LM5 pueden pesarse directamente y utilizarse en su lugar si se desea. Aunque LM5 es la solución portadora preferida para M22, no es parte de la definición de M22, puesto que el M22 también se puede preparar de manera efectiva en otras soluciones portadoras. Además, se puede variar la cantidad de 5X LM5, o de los componentes de 1X LM5 secos si no se utiliza un concentrado de LM5 para preparar la solución. La tonicidad se puede mantener constante a 1,5X aumentando la cantidad de LM5 y disminuyendo la cantidad de polímero(s) presente (PVP K12, PVA y PGL), o reduciendo la cantidad de LM5 y aumentando la cantidad de polímero(s) presente (véase la Tabla 3 para los equivalentes de tonicidad de LM5 y polímeros). La tonicidad de la solución total también se puede variar de 1 a 3 veces isotónica. Sin embargo, 1X LM5 y 1,5 veces isotónica se prefieren en el mejor modo de la invención.

^dEsta solución no podría congelarse y, por lo tanto, un punto de fusión teórico podría obtenerse únicamente por extrapolación de los datos para 94 % v/v y 97 % v/v de M22 sin diluir. Nota: también se puede utilizar de manera efectiva el polietilenglicol (PEG) en esta solución a aproximadamente 0,5-4 % p/v en lugar de y/o además de otro polímero (PGL y PVP). Se prefiere el PEG de 600 o más daltons y especialmente de 600-4000 daltons.

[0037] Finalmente, la exposición a -22 °C durante 30 minutos permitió una buena recuperación (puntos en forma hexagonal) después de la exposición a soluciones con velocidades de calentamiento críticas de aproximadamente 0 a 2,9 °C/min. El punto representado a 0 °C/min representa el M22. El calentamiento de esta solución desde por debajo de su T_g a 1 °C/min (el límite de velocidad de calentamiento más bajo de nuestro calorímetro diferencial de barrido) no reveló ninguna endoterma de fusión y los numerosos esfuerzos para congelar esta solución utilizando varios protocolos de enfriamiento y templado fracasaron. Evidentemente, sería muy deseable poder perfundir los riñones con M22 cerca de -22 °C basándose en los resultados de la Figura 1.

Ejemplo 2

- 10 Método para (1) el enfriamiento seguro de riñones mediante perfusión vascular continua a -20 °C a -25 °C sin equilibrio osmótico aproximado previo entre el órgano y el perfusado; (2) el calentamiento mediante perfusión vascular continua a una temperatura superior a una temperatura que permita que el órgano se perfunda y (3) la perfusión con una concentración vitrificable no reducida de crioprotector que no contenga ningún agente tampón osmótico

[0038] El diseño de la primera etapa de un proceso de vitrificación que implica la perfusión de una solución de vitrificación tal como M22 a una temperatura cerca de -22 °C se basó en parte en la información previa sobre lesiones por frío en la corteza renal de conejo (Solicitud de patente estadounidense nº 09/916 032, "Hypertonic Reduction of Chilling Injury") como se ilustra en la **Figura 2**. De conformidad con los datos de la Figura 2A, el enfriamiento en presencia de una tonicidad elevada puede evitar las lesiones por frío en los cortes corticales renales de conejo casi por completo, con una tonicidad óptima de 1,2-1,5 veces isotónica. La **Tabla 3** proporciona algunos datos útiles de tonicidad de referencia y una definición operacional de tonicidad.

Tabla 3: Algunos datos útiles de tonicidad de referencia

Solución	Osmolalidad ^a	Tonicidad (X) ^b	Osmolalidad de polímero ^c
LM5	283 ± 3 mOsm	1,0	--
LM5 + 1 % Z ^d	321 ± 3 mOsm	1,13	Z = 38 mOsm
LM5 + 1 % X ^e	291 ± 1 mOsm	1,03	X = 8 mOsm
LM5 + 1 % Z + 1 % X	330 ± 3 mOsm	1,17	S ^f = 46 mOsm
LM5 + 7 % PVP K12	413 ± 2 mOsm	1,46	P ^g = 130 mOsm
LM5 + 7 % PVP K12 + 1 % Z + 1 % X	474 ± 5 mOsm	1,67	S = 191 mOsm
LM5 + 2 % Z + 1 % X + 2,8 % PVP K12	421 ± 3 mOsm	1,49	S = 138 mOsm

^aMedia ± ½ el intervalo de la media.

^bTonicidad relativa en relación con LM5. La tonicidad se define como π_{Prueba}/π_{Iso} , donde π_{Prueba} = la osmolalidad de la solución de prueba sin crioprotector (realizada mediante la adición de impermeantes nominales a la solución portadora sin crioprotector de referencia) y π_{iso} = la osmolalidad de la solución portadora de referencia (en este caso, la osmolalidad de LM5, es decir, 283 mOsm). Se supone que todos los componentes de la solución portadora son impermeantes por razones prácticas. Se supone además que la presencia de crioprotectores permeables no tiene prácticamente ningún efecto relevante en la tonicidad efectiva de la solución. Se supone además que todos los solutos que tienen una masa de ≥ 150 daltons son nominalmente impermeantes.

^cOsmolalidad media menos 283 mOsm.

^dZ = Supercool Z-1000 (1 % se refiere a 1 % p/v de poliglicerol, no 1 % de la solución madre 40 % p/p comercialmente disponible).

^eX = Supercool X-1000 (1 % se refiere a 1 % p/v de alcohol polivinílico, no 1 % de la solución madre 20 % p/p comercialmente disponible).

^fS se refiere a la suma de los polímeros enumerados (X+Z o X+Z+P).

^gP = PVP K12 ($M_r \sim 1300$ daltons).

[0039] Estas observaciones fueron útiles, pero muchos problemas requerían todavía soluciones para diseñar y demostrar un procedimiento satisfactorio para el enfriamiento y el recalentamiento de los riñones enteros con minimización de las lesiones por frío y cualquier otro factor potencialmente dañino. Nadie nunca antes había intentado determinar si un órgano entero se podía enfriar a una temperatura por debajo de -10 °C mediante la perfusión de líquido frío y recuperarlo posteriormente en buenas condiciones verificado por la función de soporte vital después del trasplante, y tuvieron que inventarse los métodos específicos. No estaba claro que los métodos de inmersión de tejidos para el ajuste de la tonicidad y el enfriamiento pudieran también aplicarse a los órganos enteros cuya temperatura, tonicidad y concentración de crioprotector debe controlarse mediante perfusión vascular continua.

[0040] Por lo tanto, una solución preferida para la protección frente a las lesiones por frío se concibió de la siguiente manera. En primer lugar, se seleccionó una tonicidad de 1,2X para la solución como una tonicidad que maximizó la protección pero que fue también máximamente distante de una tonicidad de 1,5X. Este último criterio surgió de tres consideraciones. Primero, las tonicidades superiores a 1,5X (1,5 veces isotónica) son peligrosas porque no protegen de manera progresiva frente a las lesiones por frío a medida que aumenta la tonicidad por encima de 1,5X (Figure 2A). Segundo, se consideró probable que la perfusión con crioprotector durante un tiempo insuficiente para que el órgano se acercara al equilibrio osmótico podría aumentar la tonicidad efectiva de la solución. Tercero, la Figura 2B indica que el tejido renal es capaz de responder con una gran rapidez a los transitorios osmóticos durante el enfriamiento. De conformidad con la Figura 2B, el enfriamiento mediante la transferencia de los cortes equilibrados a 1X a 0 °C a una solución con una tonicidad 2X a -20 °C proporciona una mayor protección que el enfriamiento mediante transferencia a una solución 1X a -20 °C a pesar de la velocidad de enfriamiento extremadamente alta en estos experimentos. En general, una propiedad favorable de una solución que deba utilizarse para el enfriamiento por debajo de -10 °C para la minimización de las lesiones por frío es que la solución sea hipertónica.

[0041] En segundo lugar, se seleccionó una solución 1,2X específica modificando una de las soluciones más favorables de la Tabla 1, VM3 (solución 11). VM3 es seguro para su utilización en cortes de tejidos a 0 °C (Figura 1) pero está lo suficientemente concentrado (8,4M) para tener un punto de fusión por debajo de -22 °C. VM3 tiene una tonicidad en 1X LM5 de aproximadamente 1,7X, pero las contribuciones osmóticas de copolímero de

alcohol polivinílico-acetato de polivinilo (PVA, por sus siglas en inglés) al 1 % y decaglicerol (PGL, por sus siglas en inglés) al 1 % en VM3 suman aproximadamente 0,2X (Tabla 3). Por lo tanto, VM3 se convirtió en una solución de prueba 1,2 veces isotónica para el enfriamiento por perfusión del riñón entero mediante el recurso de la supresión del PVP K12. La nueva solución se denominó VMP, de "VM3 Menos PVP." VMP es una solución totalmente vitrificable que contiene una concentración vitrificable de crioprotector, que significa que el método de dilución de crioprotector de la invención incluye un método que implica la dilución de una primera concentración vitrificable con una segunda concentración más diluida pero aún así vitrificable, sin la inclusión de agentes tampón osmóticos. De manera similar, durante la adición del crioprotector, el método incluye la perfusión del órgano con una primera solución vitrificable y después con una segunda solución vitrificable más estable. La velocidad de enfriamiento crítica de VMP es ≤ 10 °C/min, pero su velocidad de calentamiento crítica, cuando esta se define como en la Figura 1, es ~ 200 °C/min, que es demasiado alta para utilizarse con la mayoría de los órganos y tejidos que no se pueden calentar a al menos 100-200 °C/min mediante conducción u otros medios. Por consiguiente, la utilización preferida de VMP en la presente invención es como una solución transitoria útil para la introducción y la eliminación de soluciones de vitrificación más estables.

[0042] La siguiente etapa fue mostrar que el VMP sería inocuo cuando se perfundiera a través de un órgano entero. La **Figura 3** describe un método efectivo para la introducción y la eliminación del VMP en el modelo de riñón de conejo. Este método es típico de los métodos que se conocen en la técnica. No obstante, lo extraordinario, como se muestra en el recuadro, fue la observación de que la solución de VMP, que tiene una concentración total de 8,4M, era completamente no tóxica para el riñón de conejo después de la perfusión durante un total de 20 minutos, que fueron suficientes para que el riñón se acercara al equilibrio osmótico con el VMP a -3 °C. La falta de toxicidad de VMP representa un tremendo avance en la técnica, puesto que la única otra solución de vitrificación 8,4M jamás probada en riñones de conejo, VS55 (también conocida como VS41A, que es otra solución $\sim 8,4$ M que consta de dimetilsulfóxido 3,1 M, formamida 3,1M, y 1,2-propanodiol 2,21M), es absolutamente letal en las mismas condiciones de exposición [1, 17, 21]. De hecho, incluso una solución solo 52/55 tan concentrada como VS55 es también extremadamente dañina para el riñón del conejo a -3°C [19, 20].

[0043] Después de haber concebido y establecido la seguridad del VMP, la siguiente etapa fue establecer métodos para utilizar realmente VMP para enfriar los riñones enteros mediante perfusión continua a aproximadamente -22 °C. Sin embargo, este problema no se podría estudiar sin un método para el recalentamiento de los riñones también. La técnica disponible no ofrecía ninguna orientación en cuanto a si este grado de enfriamiento y recalentamiento mediante perfusión vascular continua era compatible con la posterior función vascular *in vivo* o, en el caso de que fuera potencialmente compatible, la forma en la que debería llevarse a cabo.

[0044] Un problema con la perfusión de una solución 8,4M durante 20 minutos a 0 °C y después la continuación con este tratamiento mediante perfusión con una solución similar a M22 es la cantidad total de tiempo pasado con el riñón en contacto con concentraciones de 8,4M o superiores. Por lo tanto, se intentó desviarse de los métodos de la técnica anterior abandonando el requisito de que el órgano se acercara al equilibrio osmótico con una solución proporcionada antes de que se perfundiera con la siguiente solución o antes de que comenzara el enfriamiento. Sin embargo, se desconocía qué extensión del periodo de perfusión con VMP sería suficiente para evitar que el riñón se congelara tras el posterior enfriamiento a aproximadamente -22 °C. Por tanto, se probó la perfusión con VMP de conformidad con el protocolo proporcionado en la Figura 3, pero durante solo 5 o 10 minutos antes de enfriar abruptamente el perfusado arterial de la manera más rápida posible mediante el aumento del flujo de refrigerante a ~ -25 °C en un intercambiador de calor arterial en línea. Estos dos tiempos de perfusión con VMP son insuficientes para permitir que el riñón alcance el equilibrio osmótico aproximado con el crioprotector. Después de 10 minutos de enfriamiento a la velocidad máxima que se podía lograr utilizando una combinación de enfriamiento intravascular y enfriamiento de la pared interior de la cámara que contenía el riñón, las temperaturas arterial y venosa se aproximaron a -22 °C. Este procedimiento no produjo ningún signo de congelación en el riñón o el perfusado arterial después de 5 o 10 minutos de perfusión con VMP antes del enfriamiento.

[0045] Además de la variación del tiempo de perfusión con VMP antes del enfriamiento, también se probaron dos métodos diferentes para el recalentamiento de los riñones y la eliminación del VMP. En el primer método de recalentamiento, que implicaba una perfusión con VMP de 10 minutos a -3 °C antes del enfriamiento a -22 °C, se inició inmediatamente el lavado con VMP a -3 °C, con VMP no vitrificable al 50 % (una concentración 4.2M inferior a la concentración perfundida a -22 °C) más el tampón osmótico de manitol 300 mM y el tampón oncótico de HES al 3 % p/v. Este método tiene la ventaja de limitar el tiempo total de exposición a VMP a los 20 minutos que anteriormente se ha demostrado que eran seguros a -3 °C. No obstante, 3 riñones consecutivos tratados de esta manera no sobrevivieron después del trasplante (Figura 4).

[0046] Sospechando que la causa de las lesiones observadas podría ser la rápida expansión osmótica de los tejidos frágiles cerca de -20 °C como resultado de la dilución del crioprotector antes de finalizar el recalentamiento, se modificó el procedimiento anteriormente descrito mediante la introducción de una etapa de calentamiento de 10 minutos antes del inicio del lavado con crioprotector. Esto se consiguió utilizando la misma

técnica de calentamiento de antes, pero *sin dilución inmediata* del VMP durante o después del recalentamiento. Aunque este segundo método de recalentamiento expuso al riñón a una perfusión con VMP durante un total de 30 minutos, todos los riñones sobrevivieron y la función después del trasplante se mejoró considerablemente (Figura 4).

5 **[0047]** Como se indica anteriormente, el método descrito se basa en el enfriamiento sin permitir que el riñón alcance el equilibrio osmótico aproximado con VMP antes del enfriamiento. Esto podría ser importante para la supresión de las lesiones por frío en vista del grupo 1X→2X de la Figura 2B. Si el desequilibrio osmótico antes del enfriamiento es importante para los resultados obtenidos utilizando el segundo método de calentamiento, entonces la modificación del desequilibrio podría ser capaz de mejorar aún más el protocolo. Para investigar esta posibilidad, y la posibilidad de que algunas de las lesiones observadas en el método de perfusión continua para el enfriamiento y el recalentamiento se debiera a un prolongado periodo de exposición total a VMP, el periodo de perfusión con VMP se redujo de 10 minutos a 5 minutos antes del enfriamiento a -22 °C. Esto limitó el tiempo total de exposición a VMP a 25 minutos y prácticamente cuadruplicó el desequilibrio osmótico al inicio del enfriamiento medido por la diferencia de concentración de crioprotector A-V (arteriovenosa) (521 ± 129 después de 10 minutos de perfusión frente a 1967 ± 374 mM durante 5 minutos de perfusión; medias ± 1 desviación estándar). Este cambio redujo sustancialmente los valores máximos medios de creatinina (Figura 4). Basándose en el hecho de que los niveles de creatinina sérica en este grupo alcanzaron su máximo en valores similares a los obtenidos previamente con animales de control con operación simulada [16], resulta evidente que las lesiones por frío pueden, de hecho, suprimirse casi por completo a ~ -22 °C en riñones de conejo enteros utilizando el último método que se muestra en la Figura 4 y de manera más explícita en la Figura 5, especialmente el recuadro de la Figura 5. La velocidad de calentamiento arterial lograda entre -20 °C y -10 °C en la Figura 5 fue $3,15$ °C/min. Se describen resultados y detalles adicionales sobre este procedimiento en la leyenda de la figura. Como se demuestra en los ejemplos posteriores, las diferencias A-V de 2,25M justo antes del enfriamiento por debajo de -10 °C también son efectivas en la práctica de la presente invención. Entonces, en general, las diferencias A-V superiores a 200 mM, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500-3000 mM, son por lo general deseables justo antes del enfriamiento por debajo de -10 °C en presencia de una solución nominal (en equilibrio osmótico) ligeramente hipertónica (en este caso, 1,2 veces isotónica) de conformidad con la presente invención.

Ejemplo 3

30 Método para la perfusión de órganos con una solución de vitrificación superestable y el lavado de manera simultánea con el calentamiento con lesiones mínimas

[0048] La siguiente etapa consistió en explorar la posibilidad de perfundir los riñones con M22 en vista de su extraordinaria estabilidad frente a la formación de hielo y la toxicidad razonable a -22 °C (Figura 1). Sin embargo, los experimentos en los cortes de tejido indicaron que la exposición a M22 a -3 °C produciría una toxicidad inaceptable, que descartó provisionalmente un procedimiento de recalentamiento como el utilizado para VMP en el que era posible evitar el *shock* de dilución mediante el recalentamiento antes de la dilución.

[0049] A pesar de la fatalidad de la transición de VMP a VMP al 50 % + manitol a -22 °C (reducción del 50 % en la concentración molar), la magnitud de la dilución implicada en la transición de M22 a VMP (reducción de ~ 10 % en molaridad) es mucho menor. Por lo tanto, primero se consideró que esta transición podría ser tolerable a -22 °C a pesar de los evidentes riesgos de la expansión osmótica a esta temperatura. Para probar esta hipótesis, se enfriaron dos riñones a -22 °C según el mejor protocolo de la Figura 4, se cambió a la perfusión con M22 a ~ -22 °C durante 15 minutos y después se diluyó el M22 a -22 °C mediante perfusión con VMP antes de la perfusión de VMP a -3 °C. Este protocolo de lavado está detallado por la línea negra gruesa del recuadro de la **Figura 6**. Uno de los dos riñones probados sobrevivió, pero con un máximo de creatinina alto a 18,2 mg/dl (línea negra gruesa del panel principal de la Figura 6).

[0050] Suponiendo que los daños por expansión osmótica (es decir, los daños causados por el aumento del volumen celular y/o intersticial debido a la entrada osmótica de agua en estos compartimentos) a temperaturas por debajo de -10 °C fue la razón principal de las lesiones observadas en este protocolo, el siguiente protocolo implicó el protocolo de compromiso de dilución y calentamiento simultáneo del riñón mediante perfusión con VMP a -3 °C durante 10 minutos (protocolo del medio de la Figura 6). De los 6 riñones de este grupo, todos sobrevivieron y en general los daños parecieron menores que cuando la dilución comienza a temperaturas inferiores.

[0051] Estos resultados indicaron que los daños por expansión osmótica a temperaturas bajas fueron un factor más importante que la toxicidad de M22 durante la breve exposición por encima de -22°C. Por lo tanto, se instaló un elemento calefactor potente en la trayectoria del intercambio de calor con el fin de acelerar sustancialmente la

etapa de recalentamiento, para lograr el protocolo de calentamiento final que se muestra en la Figura 6 (línea gris del recuadro). La velocidad de calentamiento conseguida en este protocolo fue $9,9 \pm 3$ °C/min entre -20 °C y -10 °C, a diferencia de la velocidad de calentamiento de $2,3 \pm 0,7$ °C/min (medias ± 1 desviación estándar) en el mismo intervalo de temperatura que en el protocolo anterior. En ambos protocolos, la velocidad de dilución del crioprotector fue la misma (134 ± 41 mM/min frente a 121 ± 56 mM/min, $p > 0,05$; medias ± 1 DE), pero la dilución en sí se produjo a temperaturas diferentes en los dos grupos puesto que el calentamiento comenzó inmediatamente mientras que la respuesta de la concentración se retrasó aproximadamente 2,5 minutos, permitiendo que el calentamiento precediera a la dilución cada vez más conforme aumentaba la velocidad de calentamiento. El resultado del tratamiento de calentamiento acelerado fue que los riñones se expusieron brevemente a la perfusión de M22 a temperaturas en general superiores a -10 °C antes de experimentar la dilución mediante VMP y esto produjo una mejora considerable en la recuperación después de 15, 20, o incluso 25 minutos de perfusión de M22 previa, sin aumento de las lesiones con el aumento del tiempo de perfusión de M22 en este intervalo (datos no mostrados).

[0052] El mejor protocolo de perfusión de M22 de 25 minutos general resultante de estos experimentos se ilustra en la Figura 7 y se analiza de manera adicional en la leyenda de la Figura 7. Cabe observar que la Figura 7 demuestra una falta clara y evidente de equilibrio osmótico aproximado del órgano con el perfusado en cada punto de transición clave del proceso, como se expone con mayor detalle en los recuadros. La Figura 7 contiene también un recuadro en el que se representa la molaridad arterial frente a la temperatura arterial. Este recuadro muestra que la molaridad arterial empezó a disminuir ligeramente justo antes de que la temperatura aumentara a -10 °C. Sin embargo, el riñón se recuperó muy bien, indicando que aunque la dilución por encima de -10 °C es deseable en el mejor modo de la invención, la dilución moderada entre -15 °C y -10 °C también es totalmente compatible con la práctica satisfactoria de la invención y la temperatura de dilución ideal de -10 °C y superior no es un requisito absoluto de la invención. Sin embargo, la dilución por debajo de -10 °C en este recuadro es pequeña y la dilución nominalmente si no literalmente está de hecho por encima de -10 °C, y está literalmente por encima de -10 °C para la gran mayoría de la dilución.

Ejemplo 4

Métodos para el enfriamiento satisfactorio de órganos a ~ -22 °C y el calentamiento de órganos desde temperaturas inferiores a ~ -22 °C

[0053] Con el fin de desarrollar procedimientos para el enfriamiento de los riñones retirados de la máquina de perfusión y de investigar el impacto de las lesiones por frío por debajo de -22 °C, se colocaron varios riñones perfundidos con M22 en un medio a -50 °C durante 6 minutos y a continuación se recalentaron en aire durante 4 minutos y después se reperfundieron para el lavado de M22 de conformidad con el método descrito anteriormente, con el perfusado comenzando a -22 °C y aumentando rápidamente. El enfriamiento se consiguió utilizando una unidad de refrigeración de aire Linde BF1 en la que se inyectó nitrógeno líquido en una cámara de aire que circulaba enérgicamente según fue necesario para alcanzar las temperaturas deseadas. Después del calentamiento, se introdujo nitrógeno seco a temperatura ambiente en la cámara para mantener una presión positiva en la unidad y, por lo tanto, evitar la formación de escarcha por la entrada de aire ambiente en la cámara de frío. El tiempo total transcurrido desde la retirada del riñón de la máquina de perfusión hasta el inicio de la reperfusión fue de aproximadamente 11 minutos. La **Figura 8** muestra un ejemplo del procedimiento de enfriamiento y calentamiento utilizado en estos experimentos y los perfiles térmicos resultantes en un riñón de muestra obtenidos utilizando un termopar de aguja de triple unión insertado directamente en el riñón. Las mediciones de temperatura intrarrenal directa fueron en consonancia con las expectativas y confirmaron que todas las partes del riñón estaban al menos tan frías como -40 °C a -50 °C al final del enfriamiento. Supuestamente, la corteza más superficial se aproximó a la temperatura ambiental de -50 °C a -55 °C. Debido a la interferencia eléctrica, las sondas vasculares no documentaron correctamente la transición desde -22 °C hasta -3 °C en este experimento y los datos erróneos se omiten de la gráfica para estas sondas.

[0054] La **Figura 9** compara los daños causados por el enfriamiento por debajo de -40 °C y el calentamiento utilizando dos métodos diferentes con los efectos de simplemente perfundir M22. En el primer protocolo a -45 °C, los riñones de conejo enfriados a -45 ± 5 °C se recalentaron en aire hasta una temperatura superficial cerca de -20 °C, después se conectaron a la máquina de perfusión y se perfundieron con M22 comenzando a aproximadamente -22 °C y continuando como se muestra en la Figura 6. Esto dio lugar a la recuperación de todos los riñones tratados de esta manera (8/8), pero los niveles de creatinina postoperatorios fueron elevados. Sin embargo, las temperaturas intrarrenales interiores al inicio de la reperfusión con VMP se aproximaron a -35 °C (Figura 8), lo cual podría poner estas zonas en riesgo adicional de daños (de dilución) por expansión osmótica de los tejidos frágiles.

[0055] En un esfuerzo por reducir aún más las supuestas lesiones por expansión osmótica de los tejidos frágiles (*shock* de dilución), se probó un segundo método radical de recalentamiento de los riñones desde temperaturas por debajo de -15°C. Por razones ajenas a la naturaleza de esta prueba, estos experimentos se llevaron a cabo utilizando una variación de M22 denominada M22MX (de "M22 Menos X-1000"). M22MX es M22 del que se omitió PVA (o, más en concreto, un copolímero de alcohol polivinílico y acetato de polivinilo realizado mediante la hidrólisis del 80 % de las fracciones de acetato del acetato de polivinilo a grupos de alcoholes, un producto comercialmente disponible denominado "Supercool X-1000"). En el método nuevo, el perfusado de M22MX no se recalentó gradualmente a partir de -22 °C durante la perfusión continua del órgano, sino que se restableció a una temperatura de -3 °C mientras que el riñón se desconectó de la máquina de perfusión y se enfriaba a -45 °C. Tras 4 minutos de recalentamiento en aire como antes, el riñón se perfundió directamente con M22MX a aproximadamente -3 °C o por encima para recalentar rápidamente el núcleo renal durante aproximadamente 2-3 minutos, después de los cuales el perfusado comenzó a revertir a VMP como es habitual (véase el recuadro de la Figura 9). El tiempo total durante el que se perfundió el M22MX a aproximadamente -3 °C o por encima antes del inicio de la dilución a VMP fue $2,38 \pm 0,69$ min (media \pm 1 desviación estándar). El resultado sorprendentemente radical de esta modificación del proceso, como se muestra en la Figura 9, fue la supresión total de todas las lesiones por frío aparentes por debajo de -22 °C.

[0056] Siguiendo la temperatura venosa del riñón de ejemplo que se muestra en el recuadro de la Figura 9, se puede observar que la temperatura venosa permaneció por debajo de -10 °C durante ~6-7 min. Esta observación indica que para la mayoría de los órganos, la perfusión "caliente" con medios vitrificables no necesita prolongarse más de 10 minutos para devolver las estructuras internas a una temperatura segura para la dilución. Por lo tanto, en general, 1-10 minutos de perfusión "caliente" (nominalmente ≥ 10 °C) deberían ser suficientes.

[0057] Las fluctuaciones relativamente extremas de la temperatura arterial que se muestran en el recuadro no fueron típicas del último método, pero muestran que el riñón se puede perfundir brevemente con una solución de vitrificación supervitrificable y superestable a temperaturas tan altas como aproximadamente 0°C a +5°C con la subsiguiente recuperación renal excelente incluso después del enfriamiento previo a una temperatura interna media de aproximadamente -45 °C.

Ejemplo 5

Optimización de la presión de perfusión en el protocolo de criopreservación de órganos

[0058] Tradicionalmente, las presiones de perfusión superiores a 40 mmHg se han considerado altamente peligrosas y, durante la perfusión de concentraciones vitrificables de crioprotector, las presiones de perfusión de 30 mmHg se han preferido en vista de los daños vasculares causados por las soluciones de vitrificación anteriormente disponibles. No obstante, los resultados tales como los mostrados anteriormente indicaron que las presiones superiores a 40 mmHg podrían tolerarse utilizando M22 como la solución de vitrificación debido a la extraordinaria falta de toxicidad de esta solución cuando se utiliza dentro de los límites del proceso de la invención. Por lo tanto, se evaluó la elevación de la presión de perfusión por su efecto en la diferencia de concentración arteriovenosa (A-V) al final de la perfusión de M22. De conformidad con la presente invención, se descubrió que la elevación de la presión de perfusión a 60 mmHg redujo la diferencia de concentración A-V casi tanto como aumentarla a 90 o 100 mmHg y no hubo ninguna mejora aparente a 80 mmHg en comparación con 60 mmHg (**Figura 10**). Además, cuando los riñones se perfundieron a 40, 60, o 100 mmHg, la estabilidad de los tejidos, medida por la cantidad de hielo que se formó en la médula interna después de la vitrificación y el recalentamiento, por la temperatura de transición vítrea del tejido y por el punto de fusión del tejido, fue mejor en todos los casos a 60 mmHg que a 40 mmHg o a 100 mmHg en un número limitado de observaciones (Tabla 4). Asimismo, la desviación estándar de las diferencias A-V a 60 mmHg fue menor que las desviaciones estándar tanto a presiones inferiores como a presiones superiores (Figura 10). Por lo tanto, aunque las mejores (las más bajas) diferencias A-V se observaron a 90 y 100 mmHg, el hecho de que la mejora no fuera consistente sugiere la posibilidad de daños vasculares que provocan la distribución alterada de crioprotector en tejidos en algunos riñones. Sin embargo, no hubo una tendencia clara de aumento de los niveles de creatinina sérica postoperatorios con el aumento de la presión de perfusión en el número limitado de observaciones realizadas, por lo que las presiones de perfusión de hasta 100 mmHg para órganos pequeños y 110-120 mmHg para órganos grandes pueden ser aceptables. No obstante, la gráfica de la Figura 10 indica que la combinación óptima de eficacia y seguridad puede obtenerse utilizando presiones de 50-90 mmHg o más preferiblemente de 55-85 mmHg, o aún más preferiblemente de 60-80 mmHg para órganos pequeños (≤ 50 gramos de peso). Para órganos grandes (> 50 gramos de peso), el intervalo más preferido es 50-90 mmHg y las presiones óptimas serán generalmente 10-20 mmHg más altas que para los órganos más pequeños.

[0059] La Figura 10 indica que 60 mmHg es suficiente también en relación con otro criterio importante. La Figura 10 muestra un punto representado a 80 mmHg y una diferencia A-V de 334 mM. Esta diferencia A-V (línea de

puntos) tiene un significado particular porque es la diferencia A-V de un riñón que fue capaz de mantener de manera permanente la vida de un conejo receptor después de la vitrificación, el recalentamiento, el lavado de M22 y el trasplante, como se describe con más detalle en el Ejemplo 6. Como se puede observar en la Figura 10, una presión de perfusión de 60 mmHg conseguirá en general una diferencia A-V al menos tan baja como era necesario para mantener la función de soporte vital después de la vitrificación y el recalentamiento. Aunque la imposibilidad de alcanzar el equilibrio osmótico aproximado entre el órgano y el perfusado es ventajosa antes del enfriamiento por debajo de -10 °C y antes del inicio de la perfusión con la solución de vitrificación final tal como M22, la imposibilidad de alcanzar el equilibrio osmótico aproximado con la solución de vitrificación final no se debe aumentar innecesariamente aunque sea compatible con la supervivencia después de la vitrificación y el recalentamiento, puesto que produce menos estabilidad frente a la formación de hielo en el órgano. Por lo tanto, se debe alcanzar un equilibrio adecuado entre la estabilización del órgano y la evitación de una exposición excesiva a la solución de vitrificación final. Para M22, una diferencia A-V entre 200 mM y 300 mM, e incluso de 100-300 mM, es deseable para la buena estabilización de los riñones frente a la formación de hielo.

[0060] La supervivencia de un riñón vitrificado-recalentado después de la perfusión con M22 a 80 mmHg como se muestra en el Ejemplo 6 que aparece a continuación también demuestra claramente que 80 mmHg es eficaz en la invención.

Tabla 4: Efecto de la presión de perfusión en la estabilidad de la médula interna frente a la congelación y las concentraciones de crioprotector en tejidos después de la perfusión^a de M22

Presión	ΔH_M tejido	T_g tejido	T_m tejido	M22 tejido (% p/v)	% Equilibrio tejido	% Equilibrio venoso	100 % x C_T/C_V
40	5,3	-121,6	-42,9	58,85	90,8	97,9	92,7
60	2,8	-120,3	-45,9	60,7	93,7	96,7	96,9
100	4,3	-121,6	-41,6	58,0	89,5	95,9	93,3

^aExplicación de los títulos de las columnas: **presión** = presión arterial, en mmHg; **ΔH_M tejido** = calor (en julios/gramo) requerido para fundir todo el hielo que se ha formado previamente en la muestra de tejido durante el enfriamiento y el calentamiento medido a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min; **T_g tejido** = temperatura de transición vítrea del tejido medida a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min; **T_m tejido** = punto de fusión del tejido medido durante el calentamiento a 20 °C/min; **M22 tejido** = concentración tisular aparente de solutos de M22, en unidades % p/v, derivado como se describe a continuación y en el texto; **% equilibrio tejido** = $100 \% \times (M22 \text{ tejido})/64,8$, donde 64,8 es la concentración total de M22 en unidades % p/v; **% equilibrio venoso** = concentración (efluente) venosa aparente de solutos de M22, expresada como un porcentaje de la concentración de M22; **100 % x C_T/C_V** = la concentración tisular de crioprotector aparente (C_T) expresada como un porcentaje de la concentración venosa de crioprotector aparente (C_V). Los valores de T_m del tejido se convirtieron en concentraciones tisulares aparentes leyendo el valor de % p/v de solutos de M22 con el mismo T_m que el T_m del tejido en una gráfica de T_m frente a la concentración de diluciones de M22 en LM5 (sin calcio, sin magnesio). Estas diluciones se realizaron diluyendo M22 preparado en LM5 (sin calcio, sin magnesio) con LM5 (sin calcio, sin magnesio).

Ejemplo 6

Supervivencia de un riñón de conejo vitrificado, recalentado y trasplantado y soporte vital por parte del mismo con nefrectomía contralateral inmediata

[0061] Se perfundió un riñón de conejo de conformidad con el protocolo que se muestra en la Figura 11. La diferencia A-V después del enfriamiento (recuadro medio izquierdo) fue aproximadamente 1,25M y fue aproximadamente 0,4M después de la transición a M22 (recuadro superior izquierdo), representando ambas grandes desviaciones del equilibrio osmótico aproximado. Al final de la perfusión de M22, cuando el riñón se retiró de la máquina de perfusión y se vitrificó realmente (eliminando como es habitual del registro de perfusión el tiempo transcurrido para mostrar el registro de perfusión total sin mostrar la interrupción de la perfusión), la diferencia A-V fue 334 mM (recuadro superior derecho). El riñón se enfrió por debajo de la temperatura de transición vítrea del M22 (aproximadamente -122 °C a -124 °C), se recalentó y se reperfundió a -3 °C con la solución de VMP vitrificable carente de agentes tampón osmóticos. La temperatura venosa se aproximó a la temperatura arterial en aproximadamente 15 minutos. Este riñón produjo un nivel de creatinina máximo de 14,6 mg/dl. Este riñón se perfundió a 80 mmHg durante la fase de M22 únicamente (panel inferior). En este experimento, el órgano se calentó externamente a una temperatura superior a una temperatura que permite que el órgano se perfunda y se perfundió con una concentración de crioprotector reducida pero todavía vitrificable (VMP) que no contenía ningún agente tampón osmótico. Cabe observar que como se entiende comúnmente en la técnica, un agente tampón osmótico debe ser un agente recientemente presente en o aumentado en la concentración en un diluyente con el fin de tamponar o al menos compensar parcialmente el efecto osmótico de

la reducción de la concentración de crioprotector permeable (≤ 150 dalton) en el mismo diluyente. Se utiliza un tampón osmótico para elevar la osmolalidad total del diluyente distinta de la contribución osmótica de los crioprotectores (nominalmente permeables) ≤ 150 dalton en el diluyente, para tamponar el hecho de la reducción de la osmolalidad total de esos crioprotectores permeables. No hay ninguna sustancia química en VMP que no esté presente en M22, o presente en una concentración superior en VMP que en M22, o utilizada para elevar la osmolalidad de los componentes de VMP distintos de sus crioprotectores permeables en comparación con la osmolalidad de los componentes de M22 distintos de sus crioprotectores permeables. Por lo tanto, resulta evidente que el VMP no contiene ni un agente tampón osmótico.

[0062] Aunque la invención se ha descrito en detalle con referencia a determinados modos de realización preferidos de la misma, se entenderá que las modificaciones y las variaciones están dentro del espíritu y el alcance de lo que se describe y se reivindica.

Referencias

[0063]

1. Arnaud, F.G., B. Khirabadi y G.M. Fahy, *Physiological evaluation of a rabbit kidney perfused with VS41A*. Cryobiology, 2003. 46: pp. 289-294.
2. Fahy, G.M., *Analysis of "solution effects" injury: cooling rate dependence of the functional and morphological sequelae of freezing in rabbit renal cortex protected with dimethyl sulfoxide*. Cryobiology, 1981. 18: pp. 550-570.
3. Fahy, G.M., *Prospects for vitrification of whole organs*. Cryobiology, 1981. 18: p. 617.
4. Fahy, G.M., *Cryoprotectant toxicity: biochemical or osmotic?* Cryo-Letters, 1984. 5: pp. 79-90.
5. Fahy, G.M., *An advantageous carrier solution for vitrifiable concentrations of cryoprotectants, and compatible cryoprotectant mixtures*. 2001: Solicitud de patente estadounidense 09/916 396.
6. Fahy, G.M. y B. Wowk, *Cryoprotectant solution containing dimethyl sulfoxide, an amide and ethylene glycol*, in *May 28th*. 2002: Patente estadounidense 6 395 467 B1.
7. Fahy, G.M. y J. Wu, *Polyglycerol and lactose compositions for the protection of living systems from states of reduced metabolism*, en PCT; 14 de agosto 2003: número de patente internacional WO 03/065801 A2.
8. Fahy, G.M., D.I. Levy y S.E. Ali, *Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions*. Cryobiology, 1987. 24: pp. 196-213.
9. Fahy, G.M., D.R. MacFarlane, C.A. Angell y H.T. Meryman, *Vitrification as an approach to cryopreservation*. Cryobiology, 1984. 21: pp. 407-426.
10. Fahy, G.M., B. Wowk, J. Wu y S. Paynter, *Improved vitrification solutions based on predictability of vitrification solution toxicity*. Cryobiology, 2004. 48: pp. 22-35.
11. Fahy, G.M., C. da Mouta, L. Tsonev, B.S. Khirabadi, P. Mehl, y H.T. Meryman, *Cellular injury associated with organ cryopreservation: chemical toxicity and cooling injury*, in *Cell Biology of Trauma*, J.J. Lemasters and C. Oliver, Editors. 1995, CRC Press: Boca Raton.
12. Jacobsen, I.A., D.E. Pegg, H. Starklint, C.J. Hunt, P. Barfort, y M.P. Diaper, *introduction and removal of cryoprotective agents with rabbit kidneys: assessment by transplantation*. Cryobiology, 1988. 25: pp. 285-299.
13. Karlsson, J.O. y M. Toner, *Cryopreservation, in Principles of Tissue Engineering*, Segunda edición, R.P. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2000, Academic Press: San Diego. pp. 293-307.
14. Karow, A.M., Jr, *The organ bank concept, in Organ Preservation for Transplantation*, A.M. Karow, Jr, G.J.M. Abouna, and A.L. Humphries, Jr, Editors. 1974, Little, Brown and Company: Boston. pp. 3-8.
15. Khirabadi, B. y G.M. Fahy, *Permanent life support by kidneys perfused with a vitrifiable (7.5 molar) cryoprotectant solution*. Transplantation, 2000. 70(1): pp. 51-57.
16. Khirabadi, B.S. y G.M. Fahy, *Cryopreservation of the mammalian kidney. I. Transplantation of rabbit kidneys perfused with EC and RPS-2 at 2-4oC*. Cryobiology, 1994. 31: pp. 10-25.
17. Khirabadi, B.S., G.M. Fahy y L.S. Ewing, *Survival of rabbit kidneys perfused with 8.4 Mcryoprotectant*. Cryobiology, 1995. 32: pp. 543-544.
18. Khirabadi, B.S., F. Arnaud y E. Kapnik, *The effect of vitrification on viability of rabbit renal tissue*. Cryobiology, 1998. 37: p. 447.
19. Khirabadi, B.S., G.M. Fahy, J. Saur y H.T. Meryman, *Perfusion of rabbit kidneys with 8 molar cryoprotectant (V52)*. Cryobiology, 1993. 30: pp. 611-612.
20. Khirabadi, B.S., G.M. Fahy, P. Nannini, J. Saur y H.T. Meryman, *Life support function of rabbit kidneys perfused with 8 molar cryoprotectant*. Cryobiology, 1993. 30: p. 612.
21. Khirabadi, B.S., G.M. Fahy, J. Saur, L. Ewing y H.T. Meryman, *Failure of rabbit kidneys to survive shilling to -30oC after perfusion with 8 M cryoprotectant at -3oC*. Cryobiology, 1994. 31: pp. 596-597.
22. Khirabadi, B.S., G.M. Fahy, L. Ewing, J. Saur y H.T. Meryman, *100% survival of rabbit kidneys chilled to -32oC after perfusion with 8 M cryoprotectant at -22oC*. Cryobiology, 1994. 31: p. 597.
23. Lysaght, M.J., N.A. Nguy y K. Sullivan, *An economic survey of the emerging tissue engineering industry*. Tissue Engineering, 1998. 4(3): pp. 231-238.
24. Pegg, D.E., *Banking of cells, tissues, and organs at low temperatures, in Current Trends in Cryobiology*, A.U. Smith, Editor. 1970, Plenum Press: Nueva York. pp. 153-180.

25. Pegg, D.E., *Theory and experiments towards subzero organ preservation*, in *Organ Reservations*, D.E. Pegg, Editor. 1973, Churchill Livingstone: Londres. pp. 108-122.
26. Pegg, D.E. y M.P. Diaper, *The mechanism of cryoinjury in glycerol-treated rabbit kidneys*, in *Organ Preservation, Basic and Applied Aspects*, D.E. Pegg, I.A. Jacobsen, and N.A. Halasz, Editors. 1982, MTP Press, Ltd: Lancaster. pp. 389-393.
- 5 27. Rall, W.F. y G.M. Fahy, *Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification*. *Nature*, 1985. 313: pp. 573-575.
28. Starzl, T.E., *A look ahead at transplantation*. *Journal of surgical research*, 1970. 10: pp. 291-297.
- 10 29. Wang, X., H. Chen, H. Yin, S. Kim, S. Lin Tan, y R. Gosden, *Fertility after intact ovary transplantation*. *Nature*, 2002. 415(385).

REIVINDICACIONES

1. Un método para el enfriamiento de un órgano desde una temperatura superior a -10 °C hasta una temperatura objetivo entre -10 °C y -40 °C mediante perfusión vascular continua con una solución crioprotectora con lesiones mínimas, comprendiendo dicho método:
- 5 la perfusión del órgano con un perfusado de solución crioprotectora durante un tiempo insuficiente para que el órgano alcance un equilibrio osmótico aproximado con dicho perfusado de solución crioprotectora; la disminución de la temperatura de dicho perfusado de solución crioprotectora a dicha temperatura objetivo mientras se continúa perfundiendo el órgano; y
- 10 la continuación de la perfusión de dicho perfusado de solución crioprotectora hasta que la temperatura de al menos una parte de dicho órgano alcanza la temperatura objetivo; en el que la presión de perfusión arterial es 32-110 mmHg, y en el que la concentración arterial es superior en más de 200 mM a la concentración venosa en el momento en que se inicia el enfriamiento por debajo de -10 °C.
2. Método de conformidad con la reivindicación 1, en el que la concentración arterial es 500-3000 mM superior a la concentración venosa en el momento en el que comienza el enfriamiento por debajo de -10 °C.
3. Método de conformidad con la reivindicación 1, en el que el órgano se perfunde inicialmente con una solución de preservación de órgano y el perfusado de solución crioprotectora tiene un componente de solución portadora que es diferente de la solución de preservación de órgano inicial.
4. Método de conformidad con la reivindicación 1, en el que el perfusado de solución crioprotectora tiene una tonicidad suficiente para minimizar las lesiones por frío durante el enfriamiento por debajo de -10 °C.
- 20 5. Método de conformidad con la reivindicación 4, en el que la tonicidad es 1,1-1,6 veces isotónica.
6. Método de conformidad con la reivindicación 1, en el que el órgano se perfunde de manera adicional con una concentración vitrificable de crioprotector después del enfriamiento por debajo de -10 °C.
7. Método de conformidad con la reivindicación 6, en el que el órgano se vitrifica mediante enfriamiento después de dicha perfusión adicional del órgano con una concentración vitrificable de crioprotector después del enfriamiento del órgano por debajo de -10 °C.
- 25 8. Método de conformidad con la reivindicación 1, en el que dicho perfusado de solución crioprotectora comprende una concentración vitrificable de crioprotector.
9. Método de conformidad con la reivindicación 8, que comprende además la perfusión del órgano con una segunda solución crioprotectora vitrificable más estable después de la perfusión con dicha primera solución vitrificable.
- 30 10. Método de conformidad con la reivindicación 9, en el que el perfusado de solución crioprotectora vitrificable de la reivindicación 8 es como se define en la reivindicación 32 y el segundo perfusado de solución crioprotectora vitrificable de la reivindicación 9 es como se define en la reivindicación 31.
- 35 11. Método de conformidad con la reivindicación 6, en el que el órgano se perfunde a 40 ± 8 mmHg antes de dicha perfusión adicional con una concentración vitrificable de crioprotector por debajo de -10 °C y el órgano se perfunde a una presión no superior a 110 mmHg durante dicha perfusión adicional con una concentración vitrificable de crioprotector.
12. Método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además el recalentamiento de al menos una parte del órgano por encima de -10 °C mediante el aumento de la temperatura del perfusado de solución crioprotectora arterial mientras se continúa perfundiendo el órgano.
- 40 13. Método de conformidad con la reivindicación 12, en el que la concentración arterial no cambia durante dicho recalentamiento.
14. Método de conformidad con la reivindicación 12, en el que la concentración arterial se reduce a medida que se aumenta la temperatura.
- 45 15. Método de conformidad con la reivindicación 6, que comprende además el recalentamiento de al menos una parte del órgano por encima de -10 °C mediante el aumento de la temperatura del perfusado arterial mientras se continúa perfundiendo el órgano con una solución crioprotectora.
- 50 16. Método de conformidad con la reivindicación 15, en el que la concentración arterial de crioprotector no cambia durante dicho recalentamiento.

17. Método de conformidad con la reivindicación 15, en el que la concentración arterial de crioprotector se reduce a medida que se aumenta la temperatura.
18. Método de conformidad con la reivindicación 17, en el que la concentración del perfusado arterial se reduce en 0,5-1,5 molar mientras se aumenta la temperatura del perfusado arterial desde por debajo de -20 °C hasta por encima de -10 °C.
19. Método de conformidad con la reivindicación 17, en el que la mayoría de la reducción de la concentración del perfusado arterial tiene lugar por encima de -10 °C.
20. Método de conformidad con la reivindicación 19, en el que la mayoría de la reducción de la concentración del perfusado arterial tiene lugar por encima de -5 °C.
21. Método de conformidad con la reivindicación 17, en el que la velocidad de calentamiento desde por debajo de -20 °C hasta por encima de -10 °C es superior a 0,5 °C/min y la velocidad de reducción de la concentración arterial mientras se aumenta la temperatura desde por debajo de -20 °C hasta por encima de -10 °C está entre 50 mM/min y 1000 mM/min.
22. Método de conformidad con la reivindicación 15, en el que la velocidad de calentamiento desde por debajo de -20 °C hasta por encima de -10 °C está entre 2 °C/min y 20 °C/min.
23. Método de conformidad con la reivindicación 12, en el que, después del aumento de la temperatura del perfusado de solución crioprotectora arterial desde por debajo de -20 °C hasta por encima de -10 °C, la reducción de la concentración del perfusado de solución crioprotectora se pospone durante un tiempo que minimiza las lesiones procedentes tanto de la reducción de la concentración de dicho perfusado como de una perfusión prolongada con el perfusado de solución crioprotectora no diluido.
24. Método de conformidad con la reivindicación 15, en el que, después del aumento de la temperatura de la solución crioprotectora arterial desde por debajo de -20 °C hasta por encima de -10 °C, la reducción de la concentración de la solución crioprotectora se pospone durante un tiempo que minimiza las lesiones procedentes tanto de la reducción de la concentración de dicha solución como de una perfusión prolongada con la solución crioprotectora no diluida.
25. Método de conformidad con la reivindicación 23, en el que dicho tiempo es 1-10 minutos.
26. Método de conformidad con la reivindicación 7, que comprende además, después de la vitrificación y el recalentamiento, la reperfusión inicial del órgano con una solución crioprotectora preestablecida a una temperatura superior a -10 °C.
27. Método de conformidad con la reivindicación 26, en el que dicha reperfusión inicial del órgano se realiza con una concentración vitrificable de crioprotector.
28. Método de conformidad con la reivindicación 6, que comprende además la reducción de la concentración de crioprotector mediante una perfusión de una concentración vitrificable de crioprotector.
29. Método de conformidad con la reivindicación 6, que comprende además la reducción de la concentración de crioprotector mediante una perfusión de una solución que no contiene agentes tampón osmóticos.
30. Método de conformidad con la reivindicación 6, que comprende además la reducción de la concentración de crioprotector mediante una perfusión de una solución que tiene una composición diferente a la de dicha concentración vitrificable de crioprotector.
31. Solución de vitrificación que tiene la siguiente composición y propiedades:

Dimetilsulfóxido	2,855 M (22,305 % p/v)
Formamida	2,855 M (12,858 % p/v)
Etilenglicol	2,713 M (16,837 % p/v)
N-metilformamida	0,508 M (3 % p/v)
3-metoxi-1,2-propanodiol	0,377 M (4 % p/v)
Polivinilpirrolidona (PVP) K12	2,8 % p/v (~0,0056 M)
Alcohol polivinílico o un copolímero de alcohol polivinílico y acetato de polivinilo	1 % p/v (~0,005 M)
Poliglicerol (PGL)	2 % p/v (~0,0267 M)
5X LM5	20 ml/dl
Concentración total de crioprotector	9,345 M (64,8 % p/v)
pH	8,0
Tonicidad nominal	1,5 veces isotónica
Punto de fusión	~54,9 °C

Velocidad de calentamiento crítica <1 °C/min;

en la que las concentraciones de alcohol polivinílico, copolímero de alcohol polivinílico y acetato de polivinilo y PGL se proporcionan como concentraciones de polímero finales, y en la que 5X LM5 significa un aumento de 5 veces en las concentraciones molares de los componentes de LM5, donde LM5 consta de glucosa 90 mM, manitol 45 mM, lactosa 45 mM, KCl 28,2 mM, K₂HPO₄ 7,2 mM, glutatión reducido 5 mM, adenina HCl 1 mM y NaHCO₃ 10 mM.

5

32. Solución de vitrificación que tiene la siguiente composición y propiedades:

Dimetilsulfóxido	22,3 % p/v
Formamida	12,9 % p/v
Etilenglicol	16,8 % p/v
Alcohol polivinílico o un copolímero de alcohol polivinílico y acetato de polivinilo	1 % p/v
Poliglicerol	1 % p/v
Concentración total de crioprotector	54 % p/v
5X LM5	20 ml/dl
Tonicidad nominal	1,2X
Velocidad de enfriamiento crítica	≤10 °C/min

en la que las concentraciones de los polímeros son sus concentraciones finales, y en la que 5X LM5 significa un aumento de 5 veces en las concentraciones molares de los componentes de LM5, donde LM5 consta de glucosa 90 mM, manitol 45 mM, lactosa 45 mM, KCl 28,2 mM, K₂HPO₄ 7,2 mM, glutatión reducido 5 mM, adenina HCl 1 mM y NaHCO₃ 10 mM.

10

Figura 1

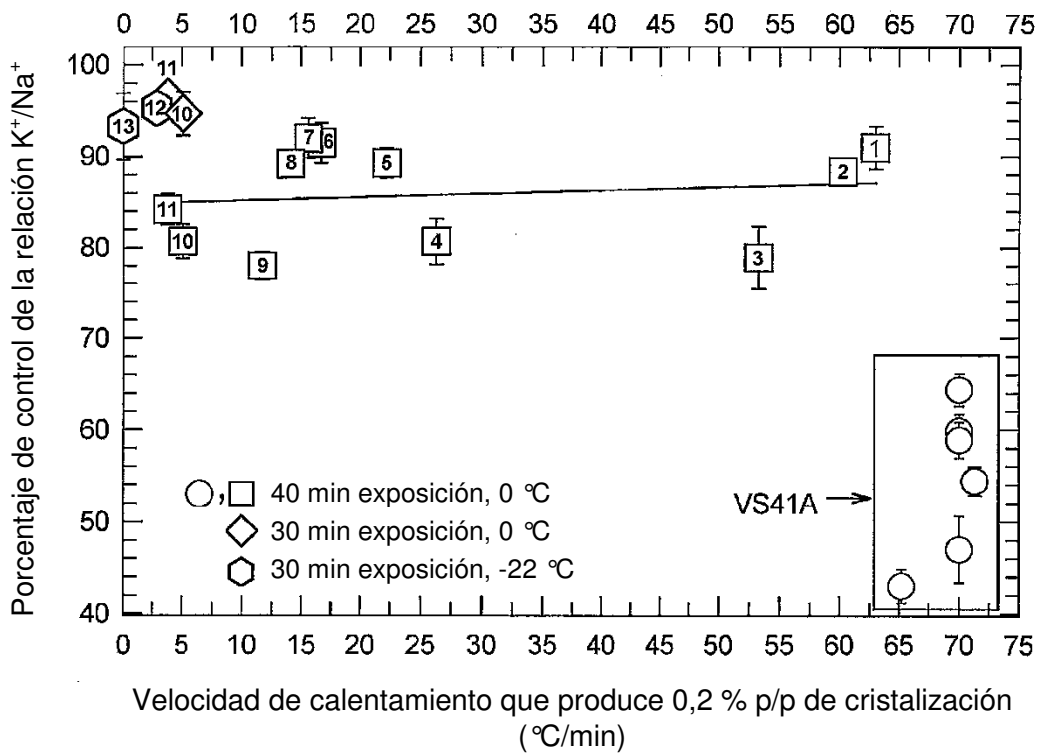


Figura 2

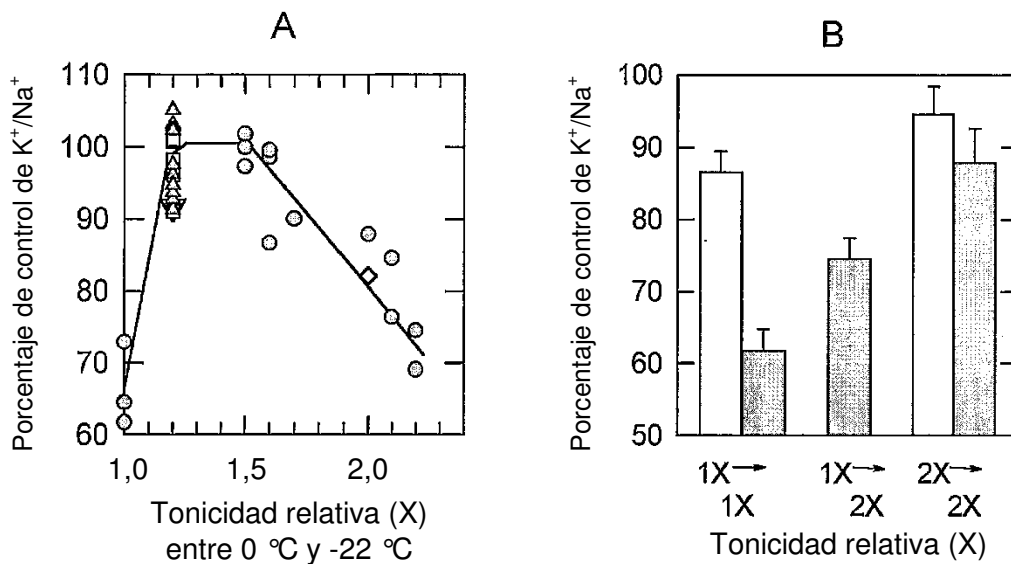


Figura 3

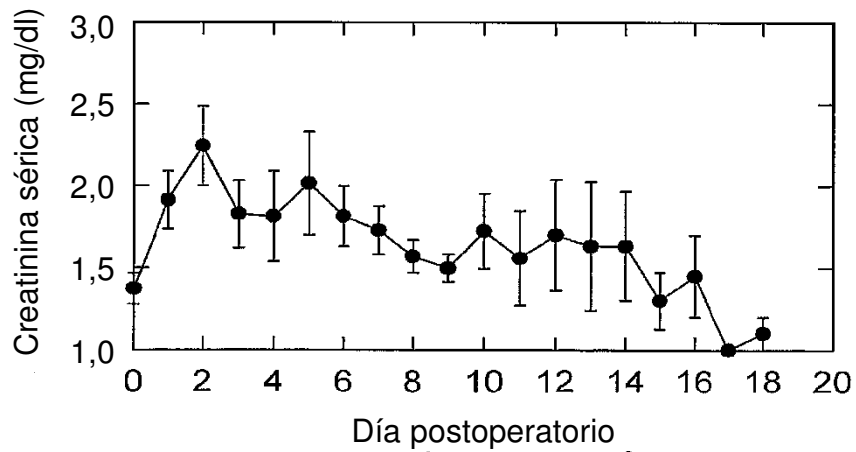
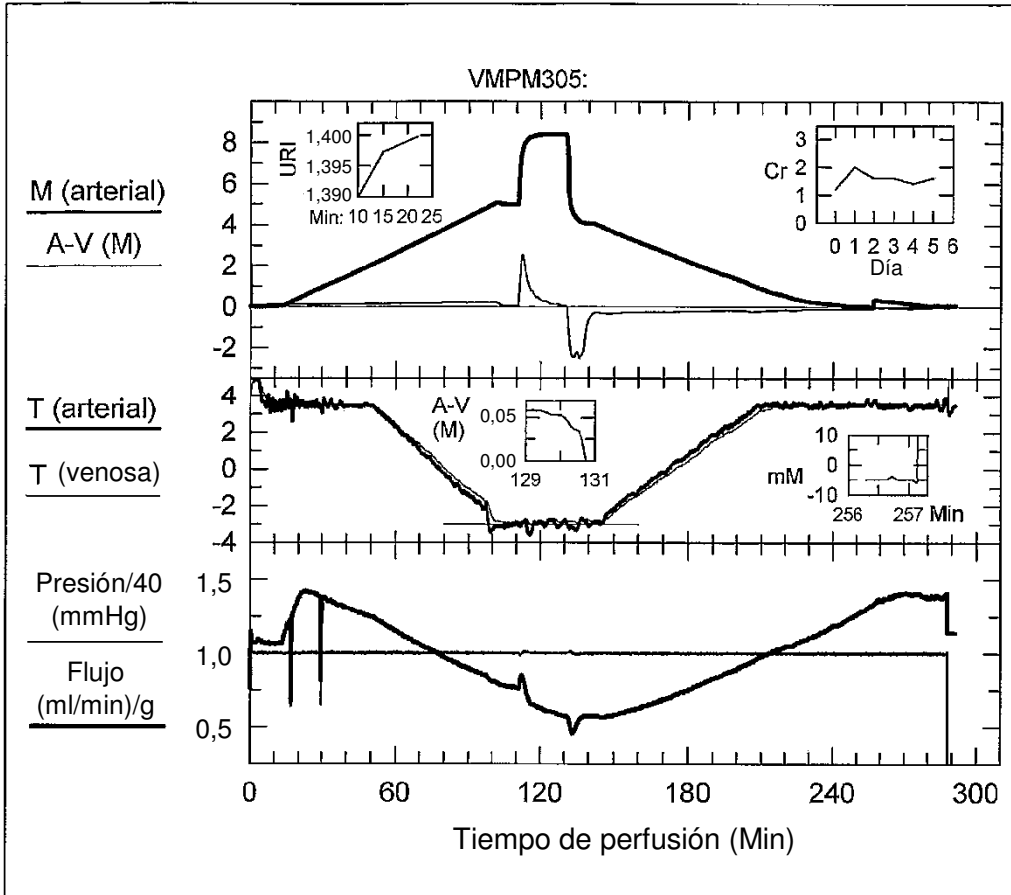


Figura 4

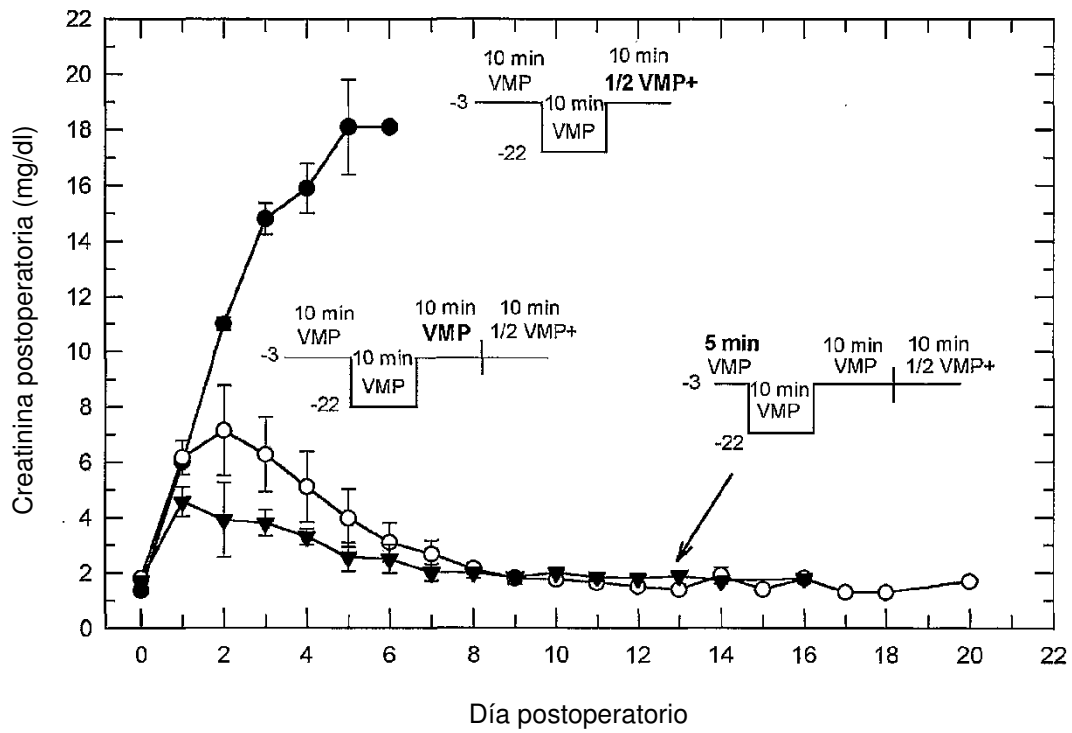


Figura 5

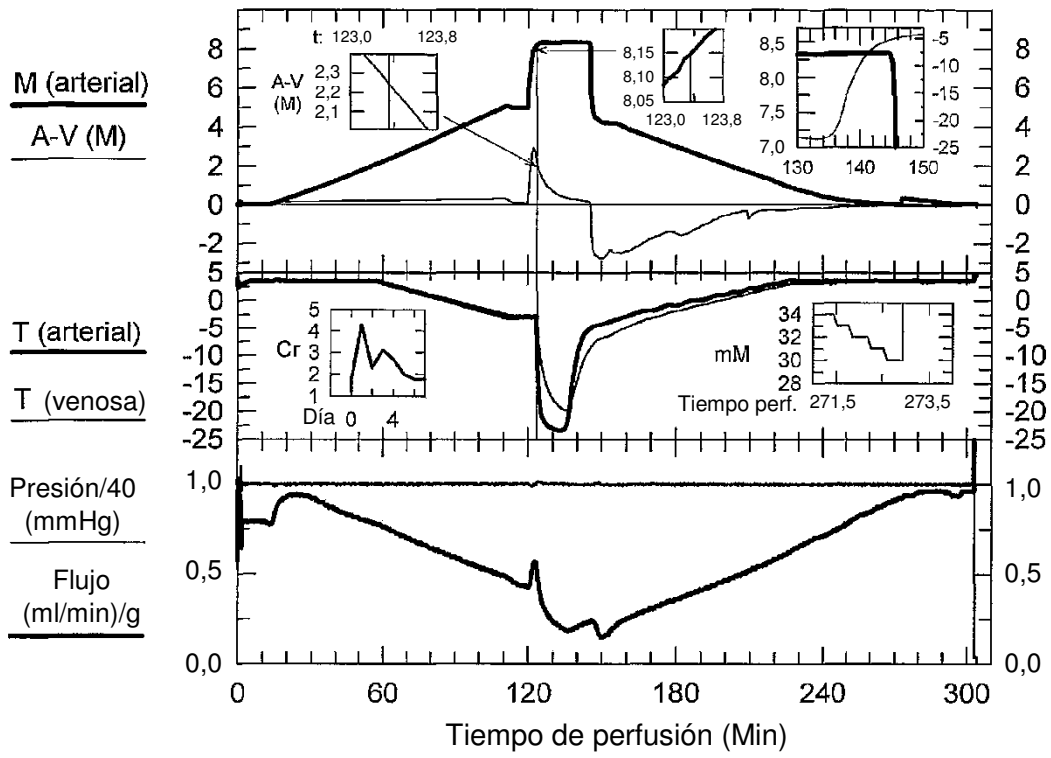


Figura 6

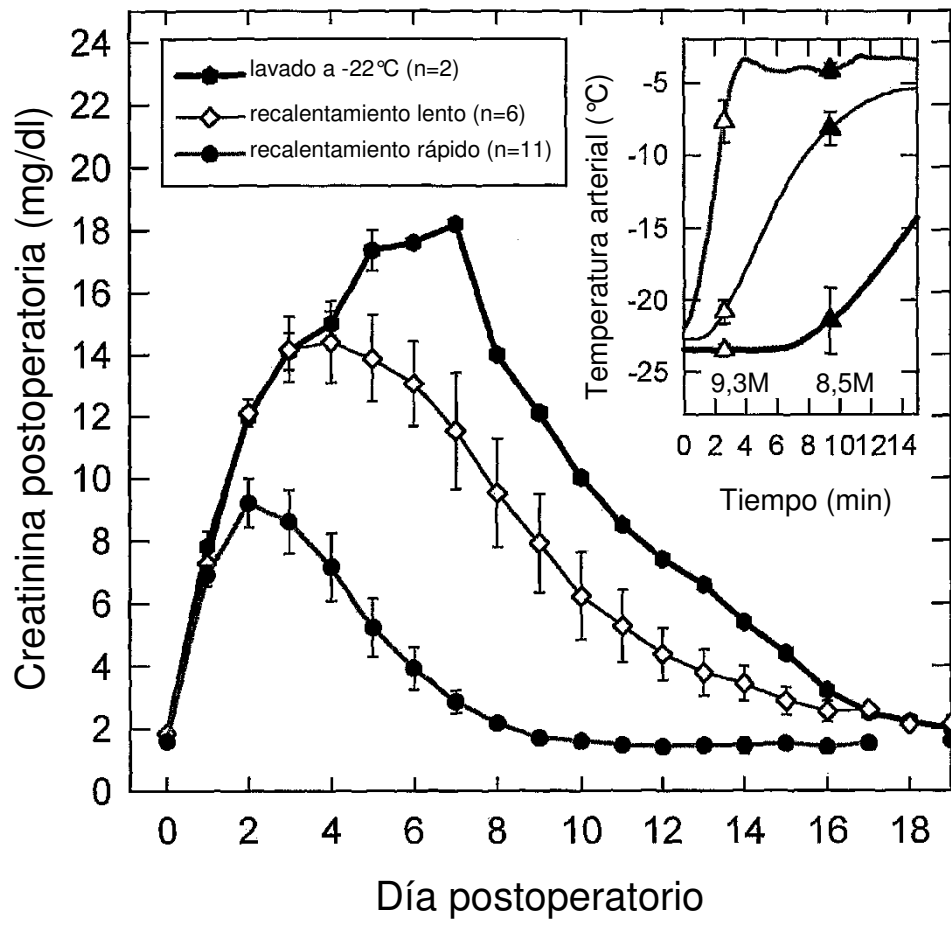


Figura 7

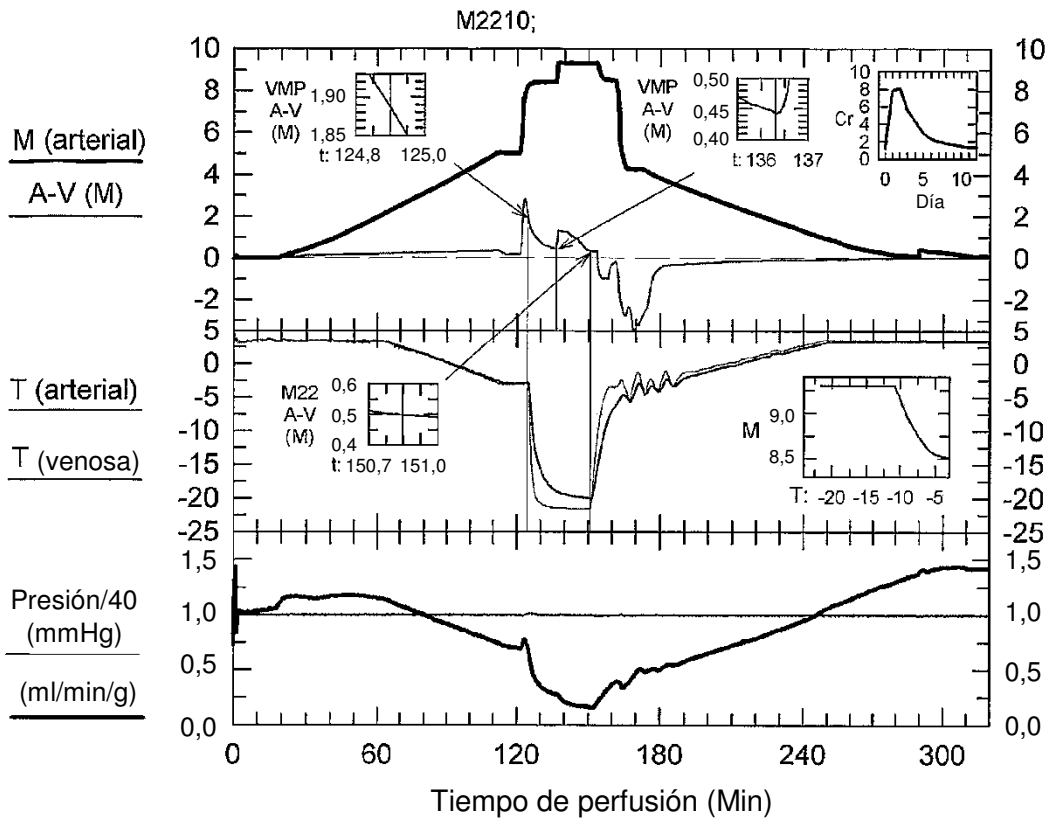


Figura 8

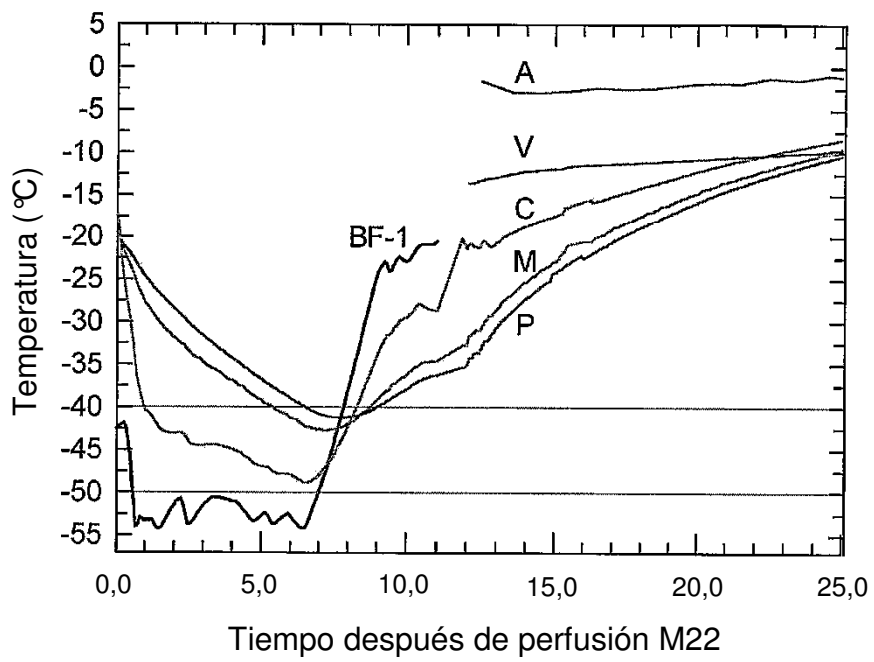


Figura 9

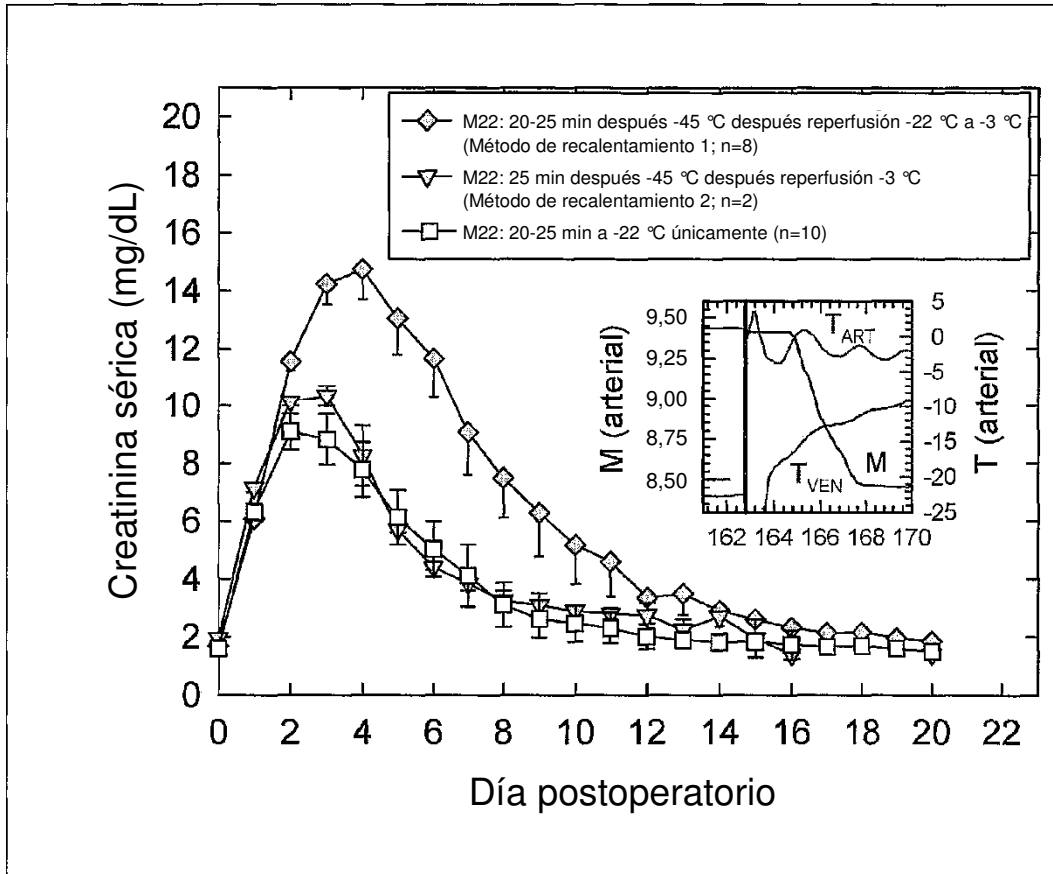


Figura 10

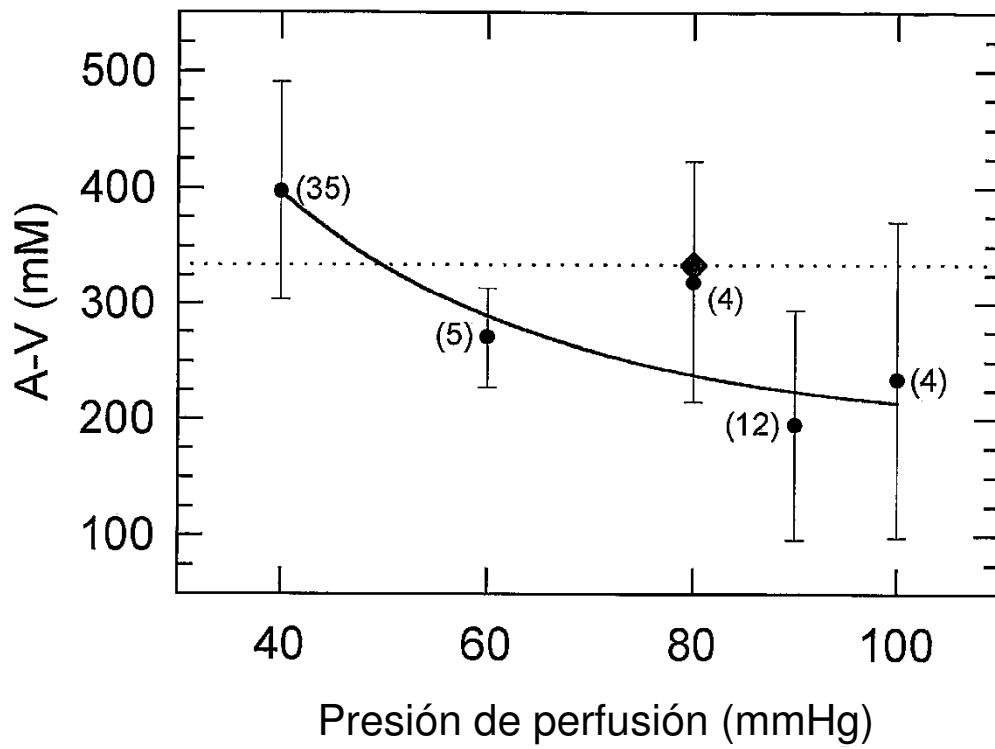


Figura 11

