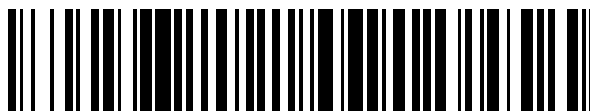


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 811**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2012** **PCT/FR2012/051206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013** **WO13001196**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2012** **E 12731088 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2713716**

54 Título: **Composición que comprende una hemoglobina extracelular de Arenicolidae para la preservación de los órganos y su uso**

30 Prioridad:

31.05.2011 FR 1154778

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

22.02.2017

73 Titular/es:

**HEMARINA (100.0%)
Aeropole Centre
29600 Morlaix, FR**

72 Inventor/es:

**DUTHEIL, DELPHINE;
ROUSSELOT, MORGANE;
HAUET, THIERRY y
ZAL, FRANCK**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 602 811 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

Composición que comprende una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae* para la preservación de los órganos y su uso

Sector de la técnica

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende al menos una globina, uno protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos utilizada clínicamente, teniendo dicha composición una temperatura de entre 0°C y 37°C, para la preservación de al menos un órgano *in situ* en una donación de donante después de muerte cerebral o una donación de donante después de parada cardíaca.

Estado de la técnica

La donación de órganos es la recolección de órganos de un cuerpo humano, llamado donante, con el propósito de tratar a un paciente, llamado receptor, cuyos órganos están seriamente dañados.

Una de las dificultades de esta donación radica en el tiempo de conservación de los órganos. De hecho, en la normotermia (37°C), antes y/o después de la recolección en el donante, un órgano se somete a un período de isquemia caliente, es decir, un periodo en el que el órgano ya no se perfunde por la sangre del donante, y todavía no se refrigera. Se deteriora rápidamente y ya no se suministra con oxígeno. El tiempo aceptable para asegurar la posterior reanudación de la función del órgano de trasplante varía de un órgano a otro, cuando dicho órgano se conserva en la hipotermia (es decir, a alrededor de 4°C). Por ejemplo, es aproximadamente de 4 a 6 horas para un corazón o un pulmón, de 8 a 12 horas para un hígado, de 24 a 48 horas para un riñón y de 8 a 10 horas para un páncreas o un intestino. Por tanto, el trasplante debe llevarse a cabo dentro de un periodo bien definido, a fin de garantizar que se mantiene la funcionalidad del órgano.

Por otra parte, la hipotermia es el componente esencial de la conservación. Tan pronto como se retira, el órgano trasplantado se enfría, con el fin de llevar rápidamente su temperatura de 37°C a 4°C; para esto, el órgano se enjuaga con una solución de preservación a través de los vasos y luego simplemente se sumerge en esta solución de preservación mantenida a baja temperatura mediante hielo picado según unas condiciones asépticas garantizadas. La disminución de la temperatura de los tejidos conduce a una disminución en el metabolismo celular, es decir, una ralentización de la actividad enzimática catalítica requerida para la viabilidad celular, pero sin detenerla (Belzer, F.O., Southard J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation 1988; 45(4): 673-676). El órgano de trasplante colocado a 4°C experimenta una disminución de su metabolismo de aproximadamente el 85%. Así, la hipotermia permite combatir los efectos nocivos de la falta de oxígeno y de nutrientes inducida por la detención de la circulación sanguínea y aplaza la muerte celular, responsable de la necrosis de los tejidos.

A pesar de la escasez de donaciones, la preservación del órgano de trasplante y la oxigenación del mismo, durante un tiempo más largo, son preocupaciones esenciales; esto permite que la calidad del órgano se mantenga, la supervivencia prolongada del órgano, y por lo tanto un trasplante exitoso. De hecho, a pesar de que se reduce el metabolismo de un órgano de trasplante conservado a 4°C, todavía necesita oxígeno, al igual que todos los tejidos aeróbicos.

Además, la mayoría de los sustitutos de sangre disponibles en la actualidad, tales como los perfluorocarbonos (PFC), los HBOC o la sangre humana, son capaces de oxigenar los órganos, pero no se pueden utilizar en cualquier temperatura. En particular, no son funcionales o estables a 4°C. Por otra parte, los PFC no son transportadores de oxígeno, sino solutos capaces de disolver una gran cantidad de oxígeno según la presión parcial de oxígeno. No pueden, por tanto, ser utilizados simplemente, y pueden crear problemas de estrés oxidativo.

El documento FR2919785 describe el uso de una composición que comprende al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de Anélidos y un medio de conservación de órganos para la preservación de un órgano durante trasplantes. Esta globina, protómero de globina o hemoglobina extracelular pertenecen en particular a unos gusanos marinos tales como *Arenicola marina*.

El documento WO2010/128159 describe el uso de una composición que comprende una hemoglobina extracelular de *Nereis virens*. Esta composición comprende también una solución de conservación de órganos, como la solución UW o la Custodiol. La composición protege unos órganos contra el deterioro por la isquemia y/o anoxia. Puede usarse para preservar un órgano aislado o en un donante fallecido en estado de muerte cerebral.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto ahora que la administración, preferiblemente por inyección intracorpórea, de una composición específica, dicha composición teniendo una temperatura de entre 0°C y 37°C, en una donación de donante después de muerte cerebral o después de parada cardíaca, hace que sea posible preservar y oxigenar dichos órganos de donantes en condiciones óptimas, con el fin de mantener sus funciones antes de su recolección de dicho donante. La composición específica comprende una hemoglobina extracelular de

Arenicolidae, una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos. La administración *in situ* de dicha composición hace que sea posible mantener las funciones de los órganos en condiciones óptimas antes de que se recolecten, y enfriar dichos órganos o mantenerlos a cualquier temperatura entre 0 y 37°C, preferiblemente en la normotermia. La composición de acuerdo con la invención, que contiene un transportador de oxígeno, también hace que sea posible de manera eficiente oxigenar los órganos *in situ* en el donante y garantizar su calidad. Finalmente, la composición según la invención es estable y funcional tanto a 4°C como a 37°C.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere por tanto al uso de una composición que comprende al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos, teniendo dicha composición una temperatura de entre 0°C y 37°C, para la preservación de un órgano en una donación de donante después de muerte cerebral o después de parada cardíaca. Por tanto, la preservación del órgano se lleva a cabo directamente *in situ* en el donante fallecido. La composición de acuerdo con la invención puede ser perfundida directamente en el donante en espera de la recolección de los diversos órganos para trasplante (corazón, pulmón, hígado, riñones, páncreas, intestino, córnea...).

La presente invención se refiere igualmente al uso de una composición que comprende al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos, teniendo dicha composición una temperatura de entre 0°C y 37°C, para preparar una composición farmacéutica para preservar al menos un órgano en una donación de donante después de muerte cerebral o después de parada cardíaca. La presente invención se refiere igualmente a una composición que comprende al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos, teniendo dicha composición una temperatura de entre 0°C y 37°C, para usarse para preservar al menos un órgano en una donación de un donante después de muerte cerebral o después de parada cardíaca.

Se describe igualmente el uso de una solución acuosa que comprende cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, gluconato de sodio y acetato de sodio, y opcionalmente uno o más antioxidantes, dicha solución acuosa teniendo un pH de entre 6,5 y 7,6, preferiblemente igual a $7,1 \pm 0,5$, preferiblemente de aproximadamente 7,35, para la preservación de al menos un órgano *in situ* en una donación después de muerte cerebral o después de parada cardíaca. Esta solución acuosa se puede combinar con una solución de conservación de órganos, es decir, puede ser mezclada con una solución de conservación de órganos. Preferentemente, dicha solución acuosa comprende 90 mM de NaCl, 23 mM de gluconato de Na, 2,5 mM de CaCl₂, 27 mM de acetato de Na, 1,5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, y tiene un pH de $7,1 \pm 0,5$, y opcionalmente entre 0 y 100 mM de antioxidante de tipo ácido ascórbico y/o reducción de glutatión. Dicha solución tiene preferiblemente una osmolaridad de entre 300 y 350, y preferentemente de 302 mOsm/l.

Según la invención, la preservación de órganos se lleva a cabo directamente en el donante post mortem. El donante fallecido puede estar en estado de muerte cerebral o parada cardíaca. En este último caso, se hace referencia a la obtención de órganos sin latidos de corazón.

La muerte cerebral, también conocida como coma irreversible o coma en etapa IV, se define como el cese irreversible completo y definitivo de la actividad del cerebro, a pesar de que la circulación de sangre persiste. Un donante está en estado de muerte cerebral, o muerte encefálica, cuando el encéfalo se destruye de forma irreversible, a pesar de la persistencia temporal de una actividad hemodinámica y de una vascularización de los órganos.

Un donante está en parada cardíaca si esta parada cardíaca es irreversible después de haber cesado las medidas de reanimación. El tiempo después del cual la asistolia se considera que es irreversible es de aproximadamente un minuto, después de haber dejado de realizar las medidas de reanimación. Sin embargo, las recomendaciones requieren un período de más de 5 minutos.

La composición según la invención comprende:

- al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, y
- una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos.

La composición de acuerdo con la invención puede, pues, comprender o bien al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, y una solución estabilizante; o bien al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, y una solución de conservación de órganos; o bien al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, una solución estabilizante y una solución de conservación de órganos.

La composición de acuerdo con la invención por lo tanto comprende al menos un compuesto elegido entre la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, sus protómeros de globina y sus globinas.

La hemoglobina extracelular de Anélidos está presente en las tres clases de Anélidos: los Poliquetos, los Oligoquetos y los Aquetos. Se hace referencia a la hemoglobina extracelular, ya que, naturalmente, no está contenida en una célula, y por lo tanto puede circular libremente en el torrente sanguíneo sin modificación química para estabilizarla o hacerla funcional.

La hemoglobina extracelular de Anélidos es un biopolímero gigante con un peso molecular de entre 2.000 y 4.000 kDa, que consiste en aproximadamente 200 cadenas polipeptídicas de entre 4 y 12 tipos diferentes que generalmente se agrupan en dos categorías.

La primera categoría, con 144 a 192 componentes, agrupa a las cadenas denominadas "funcionales" de polipéptidos que llevan un sitio activo de tipo hemo, y son capaces de unirse de manera reversible al oxígeno; estas son cadenas de tipo globina, cuyos pesos son entre 15 y 18 kDa y que son muy similares a las cadenas tipo α y β de vertebrados.

La segunda categoría, con 36 a 42 componentes, agrupa a las cadenas de polipéptidos denominadas "estructurales" o "enlazadoras" que tienen poco o ningún sitio activo, pero que permiten el ensamblaje de las subunidades llamadas subunidades de una doceava parte o protómeros.

Cada molécula de hemoglobina consiste en dos hexágonos superpuestos que han sido nombrados bicapa hexagonal (hexagonal-bilayer), y cada hexágono está en sí mismo formado por el ensamblaje de seis subunidades (o "subunidades de una doceava parte" o "protómeros") en la forma de una gota de agua. La molécula original se compone de doce de estas subunidades (dodecámero o protómero). Cada subunidad tiene un peso molecular de entre 200 y 250 kDa, y constituye la unidad funcional de la molécula original.

Según la invención, la hemoglobina extracelular de Anélidos se elige entre las hemoglobinas extracelulares de la familia de los *Arenicolidae*. Aún más preferentemente, la hemoglobina extracelular de Anélidos es la hemoglobina extracelular de *Arenicola marina*.

Según la invención, la composición también puede comprender al menos un protómero de globina de la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*. Dicho protómero constituye la unidad funcional de la hemoglobina original, como se indica más arriba.

Finalmente, la composición también puede comprender al menos una cadena de globina de la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*. Tal cadena de globina en particular, puede ser elegida entre las cadenas de globina tipo Ax y/o Bx de hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*.

La hemoglobina extracelular de Anélidos y los protómeros de globina de la misma tienen actividad de superóxidos de dismutasa intrínseca (SOD, por sus siglas en inglés), y por lo tanto no requieren ningún antioxidante con el fin de funcionar, al contrario del uso de una hemoglobina mamífera, para la cual las moléculas antioxidantes se encuentran en el interior de las células rojas y no se unen a la hemoglobina. Por otra parte, la hemoglobina extracelular de Anélidos, sus protómeros de globina y/o sus globinas no requieren un cofactor para funcionar, al contrario de la hemoglobina mamífera, en particular, humana. Por último, la hemoglobina extracelular de Anélidos, sus protómeros de globina y/o sus globinas que no poseen tipo de sangre, evitan cualquier problema de reacción inmunológica.

La composición de acuerdo con la invención puede comprender también una solución estabilizante, la composición de la cual es compatible con una solución de conservación de órganos. Esta solución estabilizante crea un entorno salino que es adecuado para la hemoglobina, sus protómeros y sus globinas, y por lo tanto permite que la estructura cuaternaria y por lo tanto la funcionalidad de esta molécula se mantenga. En virtud de la solución estabilizante, la hemoglobina, sus protómeros y sus globinas son capaces de realizar su función de oxigenación de los órganos.

La solución estabilizante según la invención es una solución acuosa que comprende sales, preferiblemente iones de cloruro, sodio, calcio, magnesio y potasio, y confiere a la composición de acuerdo con la invención, un pH de entre 6,5 y 7,6; su formulación es similar a la de un líquido inyectable fisiológicamente, y puede ser utilizada sola como una solución de conservación, o en combinación con la hemoglobina, o en combinación con una solución de preservación de órganos comercial. En estas condiciones, la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, sus protómeros de globina y sus globinas siguen siendo funcionales, y la composición de acuerdo con la invención, que se administra a entre 0°C y 37°C al donante, es compatible con los órganos a ser preservados y oxigenados.

En la presente descripción, el pH se entiende que es a temperatura ambiente (25°C), a menos que se indique lo contrario.

Preferiblemente, la solución estabilizante es una solución acuosa que comprende cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, y también gluconato de sodio y acetato de sodio, y tiene un pH de entre 6,5 y 7,6, preferiblemente igual a $7,1 \pm 0,5$, preferiblemente de aproximadamente 7,35. Más preferentemente, la solución estabilizante es una solución acuosa que comprende 90 mM de NaCl, 23 mM de gluconato de Na, 2,5 mM de CaCl₂, 27 mM de acetato de Na, 1,5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, y tiene un pH de $7,1 \pm 0,5$, que puede contener entre 0 y

100 mM de antioxidante de tipo ácido ascórbico y/o glutatión reducido. Dicha solución tiene preferiblemente una osmolaridad de entre 300 y 350, y preferentemente de 302 mOsmol/l.

Finalmente, la composición según la invención puede comprender una solución de conservación de órganos. Esta solución hace que sea posible mantener el metabolismo basal de las células que constituyen el órgano de trasplante. Cumple con un triple objetivo: lavar la sangre arterial del órgano de trasplante, lleva el órgano de trasplante de forma homogénea a la temperatura de conservación deseada, y protege y previene el daño causado por la isquemia y la reperfusión y optimiza la reanudación de la función. Por consiguiente, la solución de conservación de órganos es clínicamente aceptable.

La solución de conservación de órganos es una solución acuosa que tiene un pH de entre 6,5 y 7,5, que comprende sales, preferiblemente iones de cloruro, sulfato, sodio, calcio, magnesio y potasio; azúcares, preferentemente manitol, rafinosa, sacarosa, glucosa, fructosa, lactobionato (que es un impermeante), o gluconato; antioxidantes, preferiblemente glutatión; agentes activos, preferiblemente inhibidores de la xantina oxidasa, tales como alopurinol, lactatos, aminoácidos tales como histidina, ácido glutámico (o glutamato), triptófano; y coloides opcionalmente, tales como almidón de hidroxietilo, polietilenglicol o dextrano.

De acuerdo con una modalidad de realización preferida de la invención, se elige la solución de conservación de órganos entre:

- la solución de la Universidad de Wisconsin (UW o Viaspan®), que tiene una osmolaridad de 320 mOsm/kg y un pH de 7,4, que tiene la siguiente formulación para un litro en agua:

Lactobionato de potasio: 100 mM
KOH: 100 mM
NaOH: 27 mM
KH₂PO₄: 25 mM
MgSO₄: 5 mM
Rafinosa: 30 mM
Adenosina: 5 mM
Glutatión: 3 mM
Alopurinol: 1 mM
Almidón de hidroxietilo: 50 g/l,

- IGL-1®, que tiene una osmolaridad de 320 mOsm/kg y un pH de 7,4, que tiene la siguiente formulación para un litro en agua:

NaCl: 125 mM
KH₂PO₄: 25 mM
MgSO₄: 5 mM
Rafinosa: 30 mM
Lactobionato de potasio: 100 mM
Glutatión: 3 mM
Alopurinol: 1 mM
Adenosina: 5 mM
Polietilenglicol (peso molecular: 35 kDa): 1 g/l,

- Celsior®, que tiene una osmolaridad de 320 mOsm/kg y un pH de 7,3, que tiene la siguiente formulación para un litro en agua:

Glutatión: 3 mM
Manitol: 60 mM
Ácido lactobiónico: 80 mM
Ácido glutámico: 20 mM
NaOH: 100 mM
Dihidrato de cloruro de calcio: 0,25 mM
MgSO₄: 1,2 mM
KCl: 15 mM
Hexahidrato de cloruro de magnesio: 13 mM
Histidina: 30 mM,

- SCOT 15 Multi Organes Abdominaux® y SCOT 30 Greffons Vasculaires® de Macopharma, ambos comprendiendo en particular polietilenglicol de peso molecular alto (20 kDa),
- BMPS Belzer®, o solución de perfusión por máquina Belzer o KPS1, que comprende en particular 100 mEq/l de sodio, 25 mEq/l de potasio, un pH de 7,4 a temperatura ambiente, y que tiene una osmolaridad de 300 mOsm/l,
- Solución Custodiol® HTK Solution, que tiene la siguiente formulación para un litro en agua, el pH siendo 7,20 a temperatura ambiente y la osmolaridad siendo de 310 mOsm/kg:

5	NaCl: 18,0 mM KCl: 15,0 mM KH ₂ PO ₄ : 9 mM 2-cetoglutarato de potasio hidrogenado: 1,0 mM Hexahidrato de cloruro de magnesio: 4,0 mM Histidina, HCl, H ₂ O: 18,0 mM Histidina: 198,0 mM Tryptófano: 2,0 mM
10	Manitol: 30,0 mM Dihidrato de cloruro de calcio: 0,015 mM,
15	- Euro-Collins®, que tiene una osmolaridad de 355 mOsm/kg y un pH de 7,0, y que tiene la siguiente formulación para un litro en agua:
20	Sodio: 10 mM Potasio: 115 mM Cloruro: 15 mM H ₂ PO ₄ ⁻ : 15 mM HPO ₄ ²⁻ : 42,5 mM HCO ₃ ⁻ : 10 mM Glucosa: 194 mM,
25	- Soltran®, que tiene una osmolaridad de 486 mOsm/kg y un pH de 7,1, y que tiene la siguiente formulación para un litro en agua:
30	Sodio: 84 mM Potasio: 80 mM Magnesio: 41 mM Sulfato: 41 mM Manitol: 33,8 g/l Citrato: 54 mM Glucosa: 194 mM,
35	- Perfadex®, que tiene una osmolaridad de 295 mOsm/l y que tiene la siguiente formulación en agua:
40	50 g/l de dextrano 40 (peso molecular: 40.000), Na ⁺ : 138 mM, K ⁺ : 6 mM, Mg ²⁺ : 0,8 mM, Cl ⁻ : 142 mM, SO ₄ ²⁻ : 0,8 mM, (H ₂ PO ₄ ⁻ + HPO ₄ ²⁻): 0,8 mM y Glucosa: 5 mM,
45	- Ringer lactate®, que tiene la siguiente formulación, en agua, el pH siendo entre 6,0 y 7,5 a temperatura ambiente y que tiene una osmolaridad de 276,8 mOsm/l:
50	Na ⁺ : 130 mM, K ⁺ : 5,4 mM, Ca ²⁺ : 1,8 mM, Cl ⁻ : 111 mM, Lactatos: 27,7 mM,
55	- Plegisol®, que tiene la siguiente formulación, en agua:
60	KCl: 1,193 g/l, MgCl ₂ , 6 H ₂ O: 3,253 g/l, NaCl: 6,43 g/l, CaCl ₂ : 0,176 g/l,
65	- Solución del Hospital Edouard Henriot, que tiene la siguiente formulación en agua, el pH siendo igual a 7,4 a temperatura ambiente, y que tiene una osmolaridad de 320 mOsm/l:
	KOH: 25 mM, NaOH: 125 mM,

KH₂PO₄: 25 mM,
MgCl₂: 5 mM,
MgSO₄: 5 mM,
Rafinosa: 30 mM,
Lactobionato: 100 mM,
Glutación: 3 mM,
Alopurinol: 1 mM,
Adenosina: 5 mM,
Almidón de hidroxietilo 50 g/l,

- y la solución Steen®, que comprende albúmina de suero humano, dextrano y electrolitos extracelulares con una concentración baja de potasio.

Todas estas soluciones de conservación de órganos son productos comerciales.

Preferiblemente, la composición según la invención comprende (i) la solución estabilizante y (ii) la solución de conservación de órganos, preferiblemente una de las soluciones comerciales descritas anteriormente, en una relación de peso (i):(ii) de entre 0:100 y 100:0.

Preferiblemente, la composición de acuerdo con la invención tiene un pH de entre 6,5 y 7,6, y comprende:

- al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*,
- iones de calcio, preferentemente en una cantidad de entre 0 y 0,5 mM;
- KOH, preferentemente en una cantidad de entre 20 y 100 mM;
- NaOH, preferentemente en una cantidad de entre 20 y 125 mM;
- KH₂PO₄, preferiblemente en una cantidad de entre 20 y 25 mM;
- MgCl₂, preferiblemente en una cantidad de entre 3 y 5 mM;
- al menos un azúcar elegido entre rafinosa y glucosa, preferentemente en una cantidad de entre 5 y 200 mM;
- adenosina, preferiblemente en una cantidad de entre 3 y 5 mM;
- glutación, preferiblemente en una cantidad de entre 2 y 4 mM;
- alopurinol, preferiblemente en una cantidad de entre 0 y 1 mM; y
- al menos un compuesto elegido entre almidón de hidroxietilo, polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y albúmina de suero humano, preferentemente en una cantidad de entre 1 y 50 g/l.

Típicamente, la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, sus protómeros de globina y/o sus globinas está presente a una concentración, en relación con el volumen final de composición, de entre 0,001 mg/ml y 100 mg/ml, preferentemente entre 0,005 mg/ml y 20 mg/ml, más preferentemente entre 1 mg/ml y 5 mg/ml, en particular, 1 mg/ml.

Típicamente, la composición de acuerdo con la invención tiene una osmolaridad de entre 250 y 350 mOsm/l, preferiblemente entre 275 y 310 mOsm/l, preferiblemente de aproximadamente 302 mOsm/l.

Preferiblemente, la composición según la invención comprende (i) la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, sus protómeros de globina y sus globinas, (ii) la solución de conservación de órganos y (iii) la solución estabilizante, para una dosis de hemoglobina de entre 0 g/l y 150 g/l, para una dilución de la solución de conservación de órganos en una relación volumétrica de 8×10^{-3} a 100 por ciento.

De acuerdo con una modalidad de realización preferida, la temperatura de las composiciones de acuerdo con la invención es de entre 0°C y 37°C, preferentemente entre 2°C y 32°C, preferentemente entre 4°C y 25°C y más preferentemente de aproximadamente 4°C.

Las composiciones de acuerdo con la invención hacen que sea posible trabajar tanto bajo condiciones de hipotermia como en condiciones normotérmicas (cercana a la temperatura fisiológica).

Un objeto de la invención es también un método para conservar un órgano *ex situ* en una donación de donantes después de muerte cerebral o después de parada cardíaca del donante, que comprende las siguientes etapas:

- a) perfusión de dicho donante fallecido con una composición que comprende al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos, teniendo dicha composición una temperatura de entre 0°C y 37°C, preferentemente entre 2°C y 5°C, más preferentemente de aproximadamente 4°C, o con una solución acuosa que comprende cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, gluconato de sodio y acetato de sodio, y opcionalmente uno o más antioxidantes, dicha solución acuosa que tiene un pH de entre 6,5 y 7,6, preferiblemente igual a $7,1 \pm 0,5$, preferiblemente de aproximadamente 7,35; luego
- b) recolección del órgano a ser trasplantado; luego

c) conservación por perfusión estática o dinámica de dicho órgano obtenido en b), a una temperatura de entre 0°C y 37°C, preferentemente entre 2°C y 25°C, más preferentemente de aproximadamente 4°C, durante un tiempo determinado dependiendo de dicho órgano, en la composición o la solución acuosa definida en la etapa a).

La expresión "tiempo determinado dependiendo de dicho órgano" se entiende que significa un tiempo de conservación que es específico y depende del órgano a ser trasplantado, como se indicó anteriormente.

La composición de acuerdo con la invención se administra preferiblemente por inyección, en particular por inyección intravascular. También puede ser administrada por circulación regional normotérmica (CRN), es decir, con un catéter arterial, un catéter venoso y un catéter de Fogarty, o por circulación regional hipotérmica (CRH) para un enfriamiento generalizado del donante. También se puede administrar usando una sonda de Gillot o cualquier otra técnica similar.

El sistema de CRN o CRH es una técnica para la circulación extracorpórea del fluido sanguíneo.

La sonda de Gillot permite, por su parte, un enfriamiento *in situ* de los órganos abdominales. En particular, cuando se implanta en el circuito de la arteria femoral, hace que sea posible aislar la circulación renal. Una rápida perfusión de la composición según la invención puede llevarse a cabo a través de la sonda de Gillot. Una vía de descarga se implanta a la altura de la vena femoral, lo que permite la evacuación de la composición de líquido perfundido.

Descripción detalla de la invención

La invención se ilustra ahora por medio de los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1:

Material y Métodos

Producción y uso de M101 en soluciones de conservación

M101 (HEMO2life®, Hemarina SA, Francia) es una solución amortiguadora de hemoglobina de *Arenicola marina*, y fue fabricada usando procedimientos estándar para la extracción de los productos biológicos, de conformidad con las especificaciones de la autoridad sanitaria. La proteína purificada se congela a -80°C y después se descongeló a 4°C antes del experimento y se diluyó en una solución de conservación: UW (ViaSpan®, Bristol Myers Squibb, Bélgica), HTK (Custodiol®, Alemania), IGL (IGL-1®, Institut Georges Lopez, Francia), Celsior (Celsior®, Genzyme, Francia), Ringer Lactate (RL, Aguetant, Francia) o Perfadex (Perfadex®, Vitrolife, Suecia).

Análisis funcionales de M101

Fijación del oxígeno

Se añadió M101 (1 g/l) a la solución de UW. El gas N₂ se utilizó para desoxigenar la solución, o bien células LLC-PK1 se incorporaron en la preparación, y luego las dos preparaciones se sellaron herméticamente. La funcionalidad de M101 se controló por espectrofotometría, [35], siendo posible caracterizar oxihemoglobina y desoxihemoglobina. Los espectros de absorción se registraron en el rango 390-650 nm (UVmc2, SAFAS, Mónaco). El O₂ disuelto (dO₂) se comprobó mediante un sensor de O₂ (Metler Toledo, Francia).

Actividad de SOD

La actividad SOD de M101 se evaluó por medio de una dosificación de tetrazolio de nitro azul (NBT) modificado por Oberley y Spitz [36]. Brevemente, fue generado superóxido por la xantina y la xantina oxidasa en presencia de catalasa y DETAPAC. La reducción del NBT se detectó por espectrofotometría a 560 nm. KCN se añadió durante 1 h a 4°C antes de comenzar el experimento con el fin de desactivar el complejo Cu/Zn-SOD. Un complejo Cu/Zn-SOD derivado de eritrocitos bovinos se utilizó como control (Calbiochem). Una disminución en la absorbancia indica un aumento en la actividad de atrapamiento. El porcentaje de inhibición de la producción de anión superóxido se calculó usando la fórmula: $[(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$, donde A₀ es la absorbancia del control y A₁ es la absorbancia de las muestras.

Análisis estructurales de M101

Se añadió M101 (1 g/l) a unas soluciones, su estructura se controló en el tiempo mediante filtración en gel isocrático a temperatura ambiente con un muestreador automático fijo a 4°C usando un sistema de HPLC (Dionex, Francia) y una columna Superose 6C de 1 cm x 30 cm (rango de fracciones 5-5.000 kDa, GE Healthcare, Francia). El caudal fue de 0,5 ml/min y el eluato se controló con un detector de fotodiodos en el rango de 250-700 nm. Las curvas de elución se adquirieron y se procesaron usando el software Chromeleon® (Dionex).

La curva de disociación se obtuvo por normalización del área del pico M101 en el tiempo t (A_t) con el área del pico de M101 en el momento 0 (A_{t0}), y se representó gráficamente como una función del tiempo. El software Prism GraphPad (softwares GraphPad, EE.UU.) se utilizó para ajustar la curva en un perfil lineal ($f(A_t/A_{t0}) = -kd \cdot t$, $T_{1/2} = 1 / (2 \cdot kd)$) o monoexponencial ($f(A_t/A_{t0}) = a \cdot \exp [-kd \cdot t]$). La aceptabilidad se calculó con el mejor coeficiente de correlación. La constante de disociación (kd) y la vida media ($T_{1/2}$) se dedujeron a partir de la mejor curva ajustada: lineal o monoexponencial.

Experimentos en células a 4°C

Unas células del túbulo proximal porcino LLC-PK1 (CL-101, ATCC, LGC Standards, Francia) se cultivaron como se ha descrito anteriormente [37]. Las lesiones de isquemia fría se simulaban mediante el almacenamiento de una monocapa de células a 4°C bajo atmósfera ambiente en una solución de preservación (UW, HTK, IGL, Celsior, RL o Perfadex) complementada o no con M101.

Las dosificaciones fueron:

- para la necrosis: la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se ensayó utilizando un Kit de Dosificación In Vitro de Toxicología;
- para la apoptosis: la actividad caspasa-3 se determinó usando el estuche de dosificación fluorimétrico Caspasa-3 (R & D Systems, Francia);
- para la viabilidad: la actividad metabólica se determinó utilizando la prueba MTT;
- para el contenido de energía: la ATP intracelular se determinó utilizando el kit de prueba bioluminiscente de adenosina 5'-trifosfato (ATP). Los kits se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones se cuantificaron con un lector de múltiples etiquetas (Victor 3, Perkin-Elmer, Francia).

Para cada parámetro, los resultados se expresan como porcentaje de los valores medidos en las células conservadas en frío en relación con el valor medido en las células antes de la lesión (control).

Intervenciones quirúrgicas *in vivo* y grupos experimentales

Cerdos machos de tipo Large White (INRA/GEPA, Surgères, Francia) se prepararon como se ha descrito anteriormente [4], de conformidad con las recomendaciones francesas de la Commission d'Ethique pour l'Homme et des Etudes chez l'Animal [Comité de Ética para Estudios en humanos y animales]. El riñón derecho fue recolectado, el frío se inyectó y se mantuvo durante 24 horas antes del trasplante; este tiempo fue elegido porque es un poco más largo que el tiempo de duración de isquemia fría recogida por la Red Unida para Compartir Órganos para los aloinjertos renales ($19,6 \pm 8,4$ h en 2000 [43]). El riñón izquierdo se nefrectomizó con el fin de imitar la masa renal en situación trasplantada. Los equipos quirúrgicos no tenían conocimiento de qué protocolo se estaba utilizando. El tiempo para la anastomosis vascular fue de 30 ± 5 minutos, la pérdida de sangre fue mínima y no se observó ninguna complicación postoperatoria. Se estudiaron cuatro grupos:

- 1-UW: conservación de los órganos con UW;
- 2-UW + M101: UW complementado con 5 g/l de M101;
- 3-HTK: HTK;
- 4-HTK + M101: HTK complementado con 5g/l de M101.

Los controles fueron los animales en los que se efectuaron las operaciones simuladas.

Parámetros funcionales

Los cerdos se colocaron en una jaula metabólica para las mediciones de diuresis (ml/24 h), de niveles de creatina en sangre (mol/l), de fracción excretada de sodio (%) y de proteinuria (g/24 h), como se ha descrito anteriormente [3-5].

Estudios morfológicos

Se tomaron biopsias 7 días, 14 días y 1 mes después de la reperusión. La pérdida de bordes y el desprendimiento endoluminal se evaluaron mediante una escala semicuantitativa de 6 puntos: 0 - ninguna anomalía; 1 - lesiones leves que afectan a menos de 25% de las muestras de riñones; 2 - lesiones que afectan del 25-50% de las muestras de riñones; 3 - lesiones que afectan del 51-75% de las muestras de riñones; 4 - lesiones que afectan a más del 75% de las muestras de riñón y 5 - una necrosis generalizada y lesiones renales [38].

La determinación cuantitativa de la invasión intersticial se adaptó a partir de la clasificación Banff [39]: 0 - No hay células mononucleares inflamatorias en los túbulos; 1 - Focos con 1 a 4 células mononucleadas por sección transversal de túbulo o diez células de los túbulos; 2 - Focos con 5 a 10 células mononucleadas por sección transversal de túbulo y 3 - Focos de más de 10 células mononucleadas por sección de túbulo. La fibrosis túbulointersticial se determinó mediante la tinción Picrosirius [40]. La inmunohistoquímica se usó para medir la invasión de células ED1+ y CD3+ (SouthernBiotech, EE.UU). La evaluación cuantitativa se llevó a cabo en los

campos de alta tensión 5-10 (200X).

Métodos estadísticos

La media $\pm$ SEM o SD se indica. Los datos *in vitro* se compararon mediante la prueba de Dunnett. Para datos *in vivo* se utilizó la prueba de Mann-Whitney U para las comparaciones entre los 2 grupos (solo las comparaciones UW comparada con UW + M101, y HTK frente a HTK + M101, se llevaron a cabo). Unas correlaciones se midieron con la prueba de Spearman y la dependencia del efecto de M101 en la solución utilizada fue probada usando una prueba de ANOVA. Los softwares SPSS (IBM, EE.UU.) y Graphpad (Graphpad, EE.UU.) se utilizaron para los análisis estadísticos. La significatividad fue aceptada para $p < 0,050$.

Resultados

Funcionalidades de M101

Unión a O₂:

La molécula M101 en solución con UW se desoxigenó burbujeando con N₂ o mediante adición de células LLC-PK1. Los datos obtenidos con las células dan los mismos resultados que con N₂. En condiciones atmosféricas ambientales, M101 disuelto en UW está bajo conformación de HbO₂ (normoxia). La preparación fue luego herméticamente sellada y el O₂ se consumió por las células (hipoxia). Después de 75 min de hipoxia, el espectro de M101 cambia gradualmente a la conformación desoxi-Hb con un cambio de la banda de Soret, una disminución de las bandas Beta y Alfa, y un aumento de la absorbancia alrededor de 555 nm (datos no mostrados). La desoxigenación completa ocurrió después de 90 min de hipoxia: el espectro muestra un Soret con un máximo a 428 nm y una meseta, con un máximo a 555 nm, es decir un espectro característico de un derivado de desoxi-Hb. Este estado es reversible, ya que la oxigenación de la preparación provoca un retorno al espectro inicial de M101. La medición del dO₂ se correlaciona con los espectros de absorción de la luz (datos no presentados).

Actividad de SOD (datos no mostrados):

M101 es un antioxidante eficaz, con la inhibición total de la formación de NBT ($93,5 \pm 1,1\%$). Esta actividad se refiere a Cu/Zn-SOD ya que KCN, un inhibidor específico de la actividad enzimática de Cu/Zn-SOD, inhibe totalmente la capacidad de atrapamiento de M101.

M101 es estable en las soluciones de preservación comerciales (datos no mostrados)

Se analizó la estabilidad de M101 en UW, HTK, IGL, Celsior, RL y Perfadex. Las constantes de disociación y la vida media de M101 muestran que es estable durante largos periodos de tiempo.

M101 protege a las células *in vitro* contra las lesiones causadas por la conservación por frío (datos no mostrados)

La conservación de las células epiteliales de riñón en la solución estándar, UW, fue muy perjudicial. La evaluación de la viabilidad celular por liberación de LDH demostró una pérdida de viabilidad de las células después de 12 h de CS. No se detectó ninguna activación significativa de la caspasa-3. La actividad metabólica y el contenido de ATP se redujeron de forma concomitante a la liberación de LDH.

M101 protege contra estos eventos: solo 0,312 g/l fueron suficientes para mejorar de manera significativa la integridad estructural y metabólica y el contenido de energía después de 24 horas. Protección total se alcanzó a 1,25 g/l de M101 (liberación de LDH: $6 \pm 8\%$, prueba de MTT: $71 \pm 13\%$ y contenido de ATP: $78 \pm 23\%$). El contenido de energía de la célula se aumenta con concentraciones por encima de 2,5 g/l (contenido de ATP $> 120\%$ con respecto al control). M101 también protegió las células renales de una manera dependiente del tiempo: la integridad celular se preserva por completo (liberación de LDH $< 20\%$) durante 24 horas a 1,25 g/l, durante 36 h a 2,5 g/l, durante 48 h a 5 g/l y durante 72 horas a 10 g/l.

Unos experimentos se reprodujeron con otras soluciones: RL, Perfadex, HTK, IGL y Celsior. Como para UW, mantener las células en estas soluciones causa daño celular estructural y/o funcional. Se obtuvieron dos tipos de resultados: 1) de la misma manera como para UW, las células almacenadas en frío en RL y, en menor medida, en Perfadex, exhiben tanto daño estructural como funcional; 2) células almacenadas en frío en HTK, IGL o Celsior únicamente muestran lesiones funcionales. En cada solución, la complementación con M101 protege tanto la integridad de las células como la funcionalidad de las células (liberación de LDH $< 20\%$ en todas las condiciones y prueba MTT: 50-100%).

Recuperación de la función renal del órgano de trasplante *in vivo* más rápida con M101

Los cerdos trasplantados con un riñón preservado con la mezcla UW + M101 comienzan nuevamente una

producción de orina en el día 1 (en comparación con el día 2 para UW), y tuvieron una recuperación más rápida hasta niveles de producción de orina estables en el día 4 (datos no mostrados, $p = 0,016$). Los grupos HTK tuvieron una recuperación equivalente de la diuresis. Los niveles de creatinina sérica en el grupo UW mostraron niveles altos alcanzando un punto máximo en el día 3, y, posteriormente, una disminución lenta. Los animales UW + M101 mostraron niveles significativamente más bajos, alcanzando su punto máximo en el día 1, y recuperaron los niveles pretrasplante en el día 7 ($p = 0,009$, en todo momento, datos no mostrados). Los animales HTK mostraron un pico de creatinina sérica alto en el día 1, seguido de una lenta recuperación por encima de los niveles I pretrasplante, mientras que los animales HTK + M101 tienen un pico mucho menor en el día 1 ($p = 0,009$), y una recuperación más rápida hasta el nivel de pretrasplante en el día 11. Las mediciones de la reabsorción de sodio mostraron un rendimiento mucho más alto en los riñones conservados con M101 en comparación con la solución sola.

La integridad de los tejidos se preserva mejor en los órganos trasplantados con M101

La evaluación de la pérdida de bordes en cepillo y de la separación de células, es decir, típicas lesiones de túbulo IRI, reveló daños considerables en los trasplantes UW en los días 7 y 14, estabilizándose en el mes 1. Los riñones conservados en UW + M101 exhibían lesiones menos extendidas. Los grupos HTK mostraron una tendencia similar hacia la mejoría de las lesiones histológicas utilizando M101.

La inflamación es menos severa en los riñones con M101

Hubo un considerable desarrollo de la respuesta inmune en los trasplantes UW durante todo el seguimiento. Los riñones conservados en UW + M101 mostraron poca infiltración inmune desde el principio, y la reducción de los signos de inflamación posteriormente. Los dos grupos HTK mostraron un bajo nivel de infiltración. A los 3 meses, la invasión de las células inmunes innatas (ED1+) y adaptativas (CD3+) muestra una disminución de los niveles de invasión en los riñones conservados con M101 en comparación con la solución sola.

Resultado mejorado por la suplementación con M101

Los cerdos fueron sacrificados a los 3 meses, es decir, en el momento en que los inventores han demostrado el desarrollo de la fibrosis crónica en este modelo [41, 42]. El desarrollo de la fibrosis intersticial y de la atrofia tubular (IFTA) en los órganos de trasplante UW se propagó (23%), mientras que la complementación con M101 lo redujo significativamente (11%, $p = 0,049$). Los riñones HTK también mostraron un desarrollo de IFTA considerable (25%). Aquí también, la adición de M101 redujo significativamente el desarrollo del daño (10%, $p = 0,038$).

El daño histológico se asoció con una pérdida crónica de la función, ya que los dos grupos HTK y UW mostraron altos niveles de creatinina sérica y de proteinuria. Para las dos soluciones, la complementación con M101 redujo significativamente estos niveles.

La complementación con M101 se correlaciona con mejores resultados al principio y después de 3 meses

Otros análisis estadísticos mostraron que la complementación con M101 estaba negativamente correlacionada con los niveles de creatinina en el día 3 ($R^2 = 0,75$, $p = 0,0001$) y con los niveles de la excreción de sodio en el día 3 ($R^2 = 0,74$, $p = 0,0001$). Además, los inventores determinaron que la complementación con M101 también tiene una correlación negativa con un resultado crónico (3 meses): con la creatinina ($R^2 = 0,75$, $p = 0,0001$), la proteinuria ($R^2 = 0,55$, $p = 0,013$) y la fibrosis ($R^2 = 0,78$, $p = 0,0001$).

El ANOVA reveló que había una interacción entre M101 y la solución utilizada para un resultado agudo: con los niveles en sangre de creatinina ($p = 0,001$) y la reabsorción de sodio ($p = 0,04$) en el día 3; mientras que los efectos crónicos de M101 después de 3 meses son independiente de la solución utilizada (datos no presentados).

REFERENCIAS

- [1] Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. American journal of physiology. 2004 Aug; 287(2):F181-7.
- [2] Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplant organs: some new strategies against an old problem. Am J Transplant. 2004 Jan; 4(1):1.
- [3] Faure JP, Baumert H, Han Z, Goujon JM, Favreau F, Dutheil D, et al. Evidence for a protective role of trimetazidine during cold ischemia: targeting inflammation and nephron mass. Biochemical pharmacology. 2003 Dec 1; 66(11):2241-50.
- [4] Hauet T, Goujon JM, Vandewalle A, Baumert H, Lacoste L, Tillement JP, et al. Trimetazidine reduces renal dysfunction by limiting the cold ischemia/reperfusion injury in autotransplanted pig kidneys. J Am Soc Nephrol. 2000 Jan; 11(1):138-48.
- [5] Jayle C, Favreau F, Zhang K, Doucet C, Goujon JM, Hebrard W, et al. Comparison of protective effects of trimetazidine against experimental warm ischemia of different durations: early and long-term effects in a pig kidney model. American journal of physiology. 2007 Mar; 292(3):F1082-93.
- [6] Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. The Journal of

urology. 2008 Jul; 180(1):19-30.

[7] Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. Transplantation proceedings. 2008 Dec; 40(10):3279-88.

[8] Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Mauco G, et al. Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. Am J Transplant. Jan; 10(1):30-9.

[9] Giraud S, Thuillier R, Belliard A, Hebrard W, Nadeau C, Milin S, et al. Direct thrombin inhibitor prevents delayed graft function in a porcine model of renal transplantation. Transplantation. 2009 Jun 15; 87(11):1636-44.

[10] Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. Kidney Int. 2000 Nov; 58(5):2166-77.

[11] Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. The American journal of pathology. 1998 Aug; 153(2):557-66.

[12] Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A, Viskovic MM, Tibbles LA. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. Free Radic Biol Med. 2004 May 1; 36(9):1102-11.

[13] Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation. 1988 Apr; 45(4):673-6.

[14] Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. Transplantation. 2007 May 27; 83(10):1289-98.

[15] Minor T, Sitzia M, Dombrowski F. Kidney transplantation from non-heart-beating donors after oxygenated low-flow machine perfusion preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. Transpl Int. 2005 Jan; 17(11):707-12.

[16] Matsumoto S, Kuroda Y. Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. Transplantation. 2002 Dec 27; 74(12):1804-9.

[17] Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees JF, et al. Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. Biotechnology journal. 2006 Mar; 1(3):333-45.

[18] Rousselot M, Le Guen D, Zal F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. FEBS J. 2006 Apr; 273(7):1582-96.

[19] Zal F, Green BN, Lallier FH, Vinogradov SN, Toulmond A. Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*: a multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. European journal of biochemistry / FEBS. 1997 Jan 15; 243(1-2):85-92.

[20] Toulmond A. Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina* (L.). The Journal of experimental biology. 1975 Dec; 63(3):647-60.

[21] Toulmond A, Tchernigovtzeff C. Ventilation and respiratory gas exchanges of the lugworm *Arenicola marina* (L.) as functions of ambient PO₂ (20-700 torr). Respiration physiology. 1984 Sep; 57(3):349-63.

[22] Ahlenstiel T, Burkhardt G, Kohler H, Kuhlmann MK. Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. Transplantation. 2006 Jan 27; 81(2):231-9.

[23] McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. The New England journal of medicine. 1985 Jan 17; 312(3):159-63.

[24] Chabasse C, Bailly X, Rousselot M, Zal F. The multigenic family of the extracellular hemoglobin from the annelid polychaete *Arenicola marina*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2006 Jul; 144(3):319-25.

[25] Royer WE, Jr., Omartian MN, Knapp JE. Low resolution crystal structure of *Arenicola erythrocrurin*: influence of coiled coils on the architecture of a megadalton respiratory protein. J Mol Biol. 2007 Jan 5; 365(1):226-36.

[26] Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Mauco G, et al. Anti-thrombin Therapy During Warm Ischemia and Cold Preservation Prevents Chronic Kidney Graft Fibrosis in a DCD Model. Am J Transplant. 2009 Dec 2.

[27] Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, Buchholz B, Campean V, Schodel J, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogeneic kidney transplant model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009 Nov 23.

[28] Bos EM, Leuvenink HG, Snijder PM, Kloosterhuis NJ, Hillebrands JL, Leemans JC, et al. Hydrogen Sulfide-Induced Hypometabolism Prevents Renal Ischemia/Reperfusion Injury. J Am Soc Nephrol. 2009 Jul 23.

[29] Hosgood SA, Nicholson ML. Hydrogen sulphide ameliorates ischaemia-reperfusion injury in an experimental model of non-heart-beating donor kidney transplantation. The British journal of surgery. 2009 Dec 23.

[30] Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, Patel NS, Harwood S, Mazzon E, et al. Dexamethasone Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Soc Nephrol. 2009 Sep 24.

[31] Yoshida J, Ozaki KS, Nalesnik MA, Ueki S, Castillo-Rama M, Faleo G, et al. Ex vivo Application of Carbon Monoxide in UW Solution Prevents Transplant-Induced Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Pigs. Am J Transplant. Feb 25.

[32] Companiesandmarkets.com. Organ Preservation Solutions - A Global Strategic Business Report. 2010 [cited; Available from: <http://www.companiesandmarkets.com/Summary-Market-Report/organ-preservation-solutions-a-global-strategic-business-report-317184.asp>

[33] Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJ. Pig kidney: anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. The Journal of urology. 2004 Nov; 172(5 Pt 1):2077-81.

[34] Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of Large Pig for Renal

Ischemia-Reperfusion and Transplantation Studies: The Preclinical Model. Journal of Biomedicine and Biotechnology. in press.

[35] Assendelft, ed. Spectrophotometry of haemoglobin derivatives. Assen, The Netherlands: Charles C Thomas Publisher, Royal Vangorcum LTD 1970.

[36] Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. Methods Enzymol. 1984; 105:457-64.

[37] Dutheil D, Rioja-Pastor I, Tallineau C, Goujon JM, Hauet T, Mauco G, et al. Protective effect of PEG 35,000 Da on renal cells: paradoxical activation of JNK signaling pathway during cold storage. Am J Transplant. 2006 Jul; 6(7):1529-40.

[38] Hauet T, Goujon JM, Baumert H, Petit I, Carretier M, Eugene M, et al. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. Kidney international. 2002 Aug; 62(2):654-67.

[39] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am J Transplant. 2008 Apr; 8(4):753-60.

[40] Grimm PC, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Stern E, Jeffery J, et al. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. J Am Soc Nephrol. 2003 Jun; 14(6):1662-8.

[41] Favreau F, Rossard L, Zhang K, Desurmont T, Manguy E, Belliard A, et al. Expression and modulation of translocator protein and its partners by hypoxia reoxygenation or ischemia and reperfusion in porcine renal models. American journal of physiology. 2009 Jul; 297(1):F177-90.

[42] Thuillier R, Favreau F, Celhay O, Macchi L, Milin S, Hauet T. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. Transplantation. 2010 Sep 27; 90(6):612-21.

[43] Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett. 2006 Jan 5; 160(2):171-7.

[44] Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. Current opinion in immunology. 2001 Feb; 13(1):114-9.

[45] El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. Am J Transplant. 2009 Mar; 9(3):527-35.

[46] Copeland JW, Beaumont BW, Merrilees MJ, Pilmore HL. Epithelial-to-mesenchymal transition of human proximal tubular epithelial cells: effects of rapamycin, mycophenolate, cyclosporin, azathioprine, and methylprednisolone. Transplantation. 2007 Mar 27; 83(6):809-14.

[47] Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. Transplantation. 2006 Mar 15; 81(5):643-54.

[48] t Hart NA, van der Plaats A, Faber A, Leuvenink HG, Olinga P, Wiersema-Buist J, et al. Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: an in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. Liver Transpl. 2005 Nov; 11(11):1403-11.

[49] Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, Fujiwara H, Yamamoto K, Saitoh Y. A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. Transplantation. 1988 Sep; 46(3):457-60.

[50] Fujino Y, Kuroda Y, Suzuki Y, Fujiwara H, Kawamura T, Morita A, et al. Preservation of canine pancreas for 96 hours by a modified two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. Transplantation. 1991 May; 51(5):1133-5.

[51] Yoshikawa T, Suzuki Y, Fujino Y, Kakinoki K, Li S, Goto T, et al. Detailed analysis of mucosal restoration of the small intestine after the cavity two-layer cold storage method. Am J Transplant. 2005 Sep; 5(9):2135-42.

[52] Farrar D, Grocott M. Intravenous artificial oxygen carriers. Hosp Med. 2003 Jun; 64(6):352-6.

[53] Cataldi A. Cell responses to oxidative stressors. Current pharmaceutical design. 16(12):1387-95.

[54] Hosgood SA, Mohamed IH, Nicholson ML. The two layer method does not improve the preservation of porcine kidneys. Med Sci Monit. 17(1):BR27-33.

[55] Rolles K, Foreman J, Pegg DE. A pilot clinical study of retrograde oxygen persufflation in renal preservation. Transplantation. 1989 Aug; 48(2):339-42.

[56] Kakehata J, Yamaguchi T, Togashi H, Sakuma I, Otani H, Morimoto Y, et al. Therapeutic Potentials of an Artificial Oxygen-Carrier, Liposome-Encapsulated Hemoglobin, for Ischemia/Reperfusion-Induced Cerebral Dysfunction in Rats. Journal of pharmacological sciences. Sep 11.

[57] Spahn DR, Kocian R. Artificial O₂ carriers: status in 2005. Current pharmaceutical design. 2005; 11(31):4099-114.

[58] Regner KR, Nilakantan V, Ryan RP, Mortensen J, White SM, Shames BD, et al. Protective effect of Lifer solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury. The Journal of surgical research. 2010 Dec; 164(2):e291-7.

[59] Jouan L, Taveau JC, Marco S, Lallier FH, Lamy JN. Occurrence of two architectural types of hexagonal bilayer hemoglobin in annelids: comparison of 3D reconstruction volumes of Arenicola marina and Lumbricus terrestris hemoglobins. J Mol Biol. 2001 Jan 26; 305(4):757-71.

[60] Weber RE, Vinogradov SN. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. Physiol Rev. 2001 Apr; 81(2):569-628.

[61] Patel S, Spencer CP. Studies on the Haemoglobin of Arenicola Marina. Comp Biochem Physiol. 1963 Feb; 16:65-82.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende al menos una globina de hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, un protómero de globina de hemoglobina extracelular de *Arenicolidae* o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, una solución estabilizante y/o una solución de conservación de órganos, teniendo dicha composición una temperatura de entre 0°C y 37°C, para la preservación de un órgano en una donación de donante después de muerte cerebral o una donación de donante después de parada cardíaca.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae* es la hemoglobina extracelular de *Arenicola marina*.
3. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado por que** la solución estabilizante es una solución acuosa que comprende sales, y confiere a la composición de acuerdo con la invención un pH de entre 6,5 y 7,6.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la solución estabilizante es una solución acuosa que comprende iones de cloruro, sodio, calcio, magnesio y potasio.
5. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la solución estabilizante es una solución acuosa que comprende 90 mM de NaCl, 23 mM de gluconato de Na, 2,5 mM de CaCl₂, 27 mM de acetato de Na, 1,5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, y un pH de 7,1 ± 0,5.
6. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la solución de conservación de órgano es una solución acuosa que tiene un pH de entre 6,5 y 7,5, y que comprende sales; azúcares; antioxidantes; agentes activos; y opcionalmente coloides.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** la solución de conservación de órgano es una solución acuosa que tiene un pH de entre 6,5 y 7,5 y que comprende:
 - sales elegidas entre iones de cloruro, sulfato, sodio, calcio, magnesio y potasio;
 - azúcares elegidos entre manitol, rafinosa, sacarosa, glucosa, fructosa, lactobionato y gluconato;
 - glutatión;
 - agentes activos elegidos entre inhibidores de xantina oxidasa tal como alopurinol, lactatos y aminoácidos, tal como histidina, ácido glutámico, triptófano;
 - y opcionalmente coloides elegidos entre almidón de hidroxietilo, polietilenglicol y dextrano.
8. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, sus protómeros de globina y/o sus globinas, está presente a una concentración, en relación con el volumen final de composición, de entre 0,001 mg/ml y 100 mg/ml, y **por que** la composición tiene una osmolaridad de entre 250 y 350 mOsm/l.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** la hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*, sus protómeros de globina y/o sus globinas, está presente a una concentración, en relación con el volumen final de composición, de entre 1 mg/ml y 5 mg/ml, y **por que** la composición tiene una osmolaridad de entre 275 y 310 mOsm/l, preferiblemente de aproximadamente 302 mOsm/l.
10. Método para conservar un órgano ex situ en una donación después de muerte cerebral o una donación después de parada cardíaca, que comprende las siguientes etapas:
 - a) perfusión de dicho donante fallecido con una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9; luego
 - b) recolección del órgano a ser trasplantado; luego
 - c) conservación por perfusión estática o dinámica de dicho órgano obtenido en b), a una temperatura de entre 0°C y 37°C, preferentemente entre 2°C y 25°C, más preferentemente de aproximadamente 4°C, durante un tiempo determinado dependiendo de dicho órgano, en la composición o la solución acuosa definida en la etapa a).
11. Método para conservar un órgano ex situ de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** la etapa c) de conservación por perfusión estática o dinámica de dicho órgano obtenido en b) se hace a una temperatura de entre 2°C y 25°C.
12. Composición que tiene un pH de entre 6,5 y 7,6, que comprende:
 - al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*,
 - iones de calcio;
 - KOH;

- NaOH;
- KH_2PO_4 ;
- MgCl_2 ;
- al menos un azúcar elegido entre rafinosa y glucosa;
- adenosina;
- glutatión;
- alopurinol; y
- al menos un compuesto elegido entre almidón de hidroxietilo, polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y albúmina de suero humano.

13. Composición de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende:

- al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de *Arenicolidae*,
- iones de calcio en una cantidad de entre 0 y 0,5 mM;
- KOH en una cantidad de entre 20 y 100 mM;
- NaOH en una cantidad de entre 20 y 125 mM;
- KH_2PO_4 en una cantidad de entre 20 y 25 mM;
- MgCl_2 en una cantidad de entre 3 y 5 mM;
- al menos un azúcar elegido entre rafinosa y glucosa en una cantidad de entre 5 y 200 mM;
- adenosina en una cantidad de entre 3 y 5 mM;
- glutatión en una cantidad de entre 2 y 4 mM;
- alopurinol en una cantidad de entre 0 y 1 mM; y
- al menos un compuesto elegido entre almidón de hidroxietilo, polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y albúmina de suero humano, en una cantidad de entre 1 y 50 g/l.