

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 782**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 08290484 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 1997374**

54 Título: **Procedimiento de lavado y de conservación de un órgano con vistas a su trasplante y solución utilizada en este procedimiento**

30 Prioridad:

**31.05.2007 FR 0703883**

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

**18.05.2017**

73 Titular/es:

**MACO PHARMA (20.0%)  
RUE LORTHIOIS  
59420 MOUVAUX, FR;  
CHU DE POITIERS (20.0%);  
UNIVERSITÉ DE POITIERS (20.0%);  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS  
(APHP) (20.0%) y  
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)  
(20.0%)**

72 Inventor/es:

**HERON, ANTOINE;  
EUGENE, MICHEL;  
HAUET, THIERRY;  
BARROU, FRANÇOIS y  
CINQUALBRE, JACQUES**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 612 782 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

Procedimiento de lavado y de conservación de un órgano con vistas a su trasplante y solución utilizada en este procedimiento

5 La invención se refiere a un procedimiento para el acondicionamiento de un órgano con vistas a su trasplante así como a una solución utilizada en este procedimiento y a un contenedor estéril que comprende tal solución.

Se aplica en el caso de que un órgano, tal como hígado, riñón, corazón y/o pulmón sea extraído de un donante. En el curso de la extracción, los órganos son lavados habitualmente por perfusión *in situ* y *ex situ* con una solución de perfusión, cultivados *in vitro* y conservados en una solución de conservación. Antes del trasplante al receptor, el órgano es lavado eventualmente de nuevo.

10 Existe un cierto número de soluciones utilizadas en el marco del trasplante. Por ejemplo, la solución UW (comercializada bajo el nombre Viaspan® por Fresenius), cuya especificidad es la presencia del coloide HES, es la referencia para la conservación de los órganos, tales como hígado, riñón, páncreas e intestino.

15 Esta solución tiene una concentración elevada en potasio, que compensa la pérdida en potasio del órgano conservado a baja temperatura en el estado de hipotermia. No obstante, el exceso de potasio debe ser eliminado del órgano antes del trasplante con el fin de evitar una parada cardíaca.

La solución de conservación de los órganos y tejidos, comercializada por Maco Pharma es una solución normopotásica que contiene polietileno glicol (PEG). Esta solución ha sido desarrollada para permitir la conservación de los órganos. Debido a su bajo contenido en potasio, no es necesario efectuar un nuevo lavado antes del implante.

20 No obstante, esta solución no está adaptada para el lavado del órgano en el curso de la extracción. En efecto, se crean zonas hipoperfusionadas, nefastas para la recuperación del injerto en el receptor.

El procedimiento según la invención propone, por lo tanto, mejorar esta solución de conservación de órganos, adaptándola al lavado del órgano. La solución conserva sus propiedades de conservación, principalmente limitando las lesiones de isquemia reperfusion.

25 La invención propone igualmente un procedimiento de acondicionamiento de un órgano que optimiza las condiciones de lavado del órgano, manteniendo buenas condiciones de conservación.

A este efecto, la invención propone un procedimiento para el acondicionamiento de un órgano con vistas a un trasplante que comprende las etapas sucesivas de:

- lavado del órgano, y

30 - conservación del órgano en una solución normopotásica, cuya concentración en potasio es inferior a 10 mM y que comprende una cantidad comprendida entre 15 y 20 g/L de polietileno glicol de un peso molecular de 20.000 Da, caracterizado por que el lavado se realiza con una solución de composición idéntica a la utilizada en la etapa de conservación, teniendo dicha solución una viscosidad comprendida entre 0,8 y 1,4 mm<sup>2</sup>/s a 20°C.

35 El documento WO02/41 696 describe un procedimiento de conservación, en el que el órgano es lavado con la misma solución, en la que es conservada. La solución normopotásica propuesta contiene PEG (20.000 Da) en una cantidad equivalente a 26 g/L.

El trasplante es la transferencia de un órgano de un individuo donante a un individuo receptor. El individuo donante es un animal humano o no. Los órganos que pueden ser trasplantados son los órganos abdominales tales como el hígado, riñón, páncreas y colon, pero también los otros órganos tales como el corazón y el pulmón. Los órganos son extraídos principalmente de un cadáver o de un voluntario sano.

40 El procedimiento de la invención es un procedimiento *in vitro*, es decir, que se refiere al órgano, una vez que éste ha sido extraído del donante.

El éxito de trasplante depende, entre otras cosas, de la calidad del órgano a trasplantar, de su lavado y de su conservación, con el fin de limitar las lesiones formadas durante las fases de isquemia y perfusión.

45 Para preparar un órgano con vistas a un trasplante, el órgano es lavado en primer lugar con una solución de lavado con el fin de eliminar la sangre residual del injerto.

El lavado se realiza por perfusión del órgano por la solución, según las condiciones de temperatura que van desde la hipotermia hasta la normotermia. Ventajosamente, el lavado se realiza con una solución refrigerada a 4°C para refrigerar el órgano.

50 A continuación el órgano es sumergido en una solución de conservación apta para prevenir las lesiones provocadas por la isquemia.

Ventajosamente, el órgano es conservado a baja temperatura, principalmente a 4°C, para mantenerlo en hipotermia.

Según la invención, las soluciones de lavado y la solución de conservación tienen una composición idéntica.

La solución es normopotásica, es decir, que comprende una concentración baja de iones de potasio, principalmente próxima a la existente en el plasma.

- 5 La solución utilizada en la invención comprende polietileno glicol (PEG) de alto peso molecular, es decir, de 20.000 Da. Esta molécula coloidal, ejerciendo una presión oncótica en el interior de los vasos, es particularmente eficaz para luchar contra el edema celular e intersticial. De esta manera, no se forman necrosis localizadas.

Además, el PEG disminuye la inmunogenicidad del injerto, ligada a las lesiones de la isquemia - reperfusión.

- 10 No obstante, el PEG es un compuesto viscoso que aumenta la viscosidad de la solución. Incluso aunque soluciones de viscosidad elevada, tal como la solución UW, están adaptadas para el lavado de los órganos, la presencia de una cantidad demasiado grande de PEG en una solución de conservación la vuelve inadaptada para esta utilización.

Según la invención, la solución de lavado y conservación posee una viscosidad comprendida entre 0,8 y 1,4 mm<sup>2</sup>/s a 20°C, principalmente entre 1 y 1,3 mm<sup>2</sup>/s a 20°C.

- 15 Esta viscosidad particular es suficientemente débil para que el órgano lavado no contenga ninguna zona hipoperfusionada, es decir, que la descoloración del órgano debida a la perfusión de la solución es homogénea. Estas zonas hipoperfusionadas dan lugar a una necrosis de conservación focalizada, con liberación citolítica.

Una solución utilizada en la invención comprende entre 0,8 y 1,4 mm<sup>2</sup>/s a 20°C, principalmente entre 1 y 1,3 mm<sup>2</sup>/s, inducida por la presencia y las propiedades del polietileno glicol en concentraciones dadas.

- 20 Estas características confieren a la solución propiedades reológicas adaptadas a una perfusión óptima de los órganos y principalmente del hígado. La viscosidad permanece inferior a la de la sangre y, por lo tanto, puede circular en todo el sistema vascular del órgano a trasplantar. La solución mantiene, sin embargo, las buenas propiedades de conservación.

Para el PEG 20.000 Da, una cantidad de 15 g/L permite obtener una viscosidad de aproximadamente 1,05 mm<sup>2</sup>/s a 20°C.

- 25 Esta viscosidad particular se obtiene utilizando una concentración definida de PEG, suficiente para garantizar sus propiedades anti-edema y de inmunocamuflaje.

Principalmente, la solución se utiliza para el lavado y la conservación del corazón.

En este caso, la solución utilizada en la invención puede comprender, además, un agente cardioprotector, tal como la 2,3-butanodiona monoxima.

- 30 La solución utilizada en la invención, comprende, además:

un agente impermeante,

un tampón,

una solución de electrolitos,

agua para fines de inyección.

- 35 El agente impermeante puede ser el ácido lactobiónico, el ácido glucónico o una de sus sales o un sacárido, tal como la rafinosa, la sucrosa o la glucosa. Impide el paso del agua a través de las membranas celulares y evita así el edema celular.

- 40 El tampón se selecciona, por ejemplo, entre los tampones fisiológicos (sulfato o carbonato) o sintético (HEPES), con el fin de mantener la solución de perfusión y de conservación a un pH fisiológico, comprendido entre 7 y 8, principalmente aproximadamente 7,5.

La solución de electrolitos contiene iones de sodio, potasio, calcio y/o magnesio y/u otros iones.

Ventajosamente, la solución utilizada en la invención es del tipo extracelular, su concentración de iones de sodio es elevada, principalmente superior a 40 mM, principalmente superior a 115 mM.

- 45 La solución es normopotásica, es decir, que su concentración en potasio es inferior a 10 mM. Así, no es necesario lavar el órgano antes del implante en el receptor.

La solución utilizada en la invención posee una osmolaridad fisiológica próxima a la del plasma comprendida entre 300 y 380 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, principalmente 320 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.

En un ejemplo particular, la solución de lavado y conservación comprende PEG 20.000 Da en una solución de Krebs, cuya composición para 1 L de solución es la siguiente:

- 5 0,45 g de cloruro de potasio
- 0,24 g de cloruro de magnesio hexahidrato
- 6,94 g de cloruro de sodio
- 0,17 g de cloruro de calcio dihidrato
- 2,2 g de D-glucosa monohidrato

- 10 2,1 g de carbonato de sodio
- agua para fines de inyección.

Cuando la solución comprende 20 g/L de PEG 20.000, posee una viscosidad de 1,19 mm<sup>2</sup>/s a 20°C. Con 15 g/L de PEG 20.000, la solución posee una viscosidad de 1,05 mm<sup>2</sup>/s a 20°C.

- 15 La solución de lavado y de conservación se vuelve estéril por filtración en un contenedor tal como un frasco o una bolsa flexible, ventajosamente impermeable al oxígeno.

El contenedor comprende una boca provista de un tapón amovible. Una vez retirado el tapón de la boca, la solución utilizada en la invención es vertida fácil y rápidamente en un recipiente que contiene el órgano a conservar.

- 20 Según una variante, el contenedor comprende un conector para línea de perfusión. Después de la conexión de una línea de perfusión sobre el conector del contenedor, la solución contenida en el contenedor es perfusionada fácilmente en el órgano a lavar.

Según otra variante, el contenedor comprende una boca provista de un tapón amovible y un conector para línea de perfusión para realizar sucesivamente las operaciones de lavado y conservación con la misma solución.

La solución utilizada en la invención se utiliza para el lavado y la conservación de los órganos según el procedimiento de la invención.

- 25 Esta solución está adaptada a todos los órganos abdominales. Para el corazón, la solución comprende, además, 3,03 g de 2,3-butanodiona como agente cardioprotector.

Se puede utilizar igualmente para la conservación de los tejidos o injertos vasculares, tales como las venas, arterias, válvulas, vasos. En combinación con dimetil sulfóxido, glicerol o cualquier otra molécula protectora, la solución se puede utilizar también para la crioconservación de los tejidos.

- 30 Ejemplo 1: Composición y viscosidad de diferentes soluciones de conservación.

Las viscosidades de las diferentes soluciones utilizadas en la invención (Tabla 1) así como soluciones comerciales de Maco Pharma (S7) y UW han sido determinadas a 20°C con la ayuda de un viscosímetro Cannon-Fenske (Schott tipo 511-01) y están registradas en la Tabla 2.

Tabla 1

S5-S7	Cantidad
Cloruro de potasio	0,45 g
Cloruro de magnesio hexahidrato	0,24 g
Cloruro de sodio	6,94 g
Cloruro de calcio dihidrato	0,17 g
D-glucosa, H <sub>2</sub> O	2,2 g
Carbonato de sodio	2,1 g
Polietileno glicol	Variable
Agua para fines de inyección	11

Tabla 2

Soluciones	Viscosidad (mm <sup>2</sup> /s)
SS- PEG 20 kDa - 1Sg/L	1,0S
S6- PEG 20 kDa - 20 g/L	1,19
S7- PEG 20 kDa - 20g/L	1,SS
UW (Viaspan®)	2,38

La solución S7 no es representativa de la invención.

Ejemplo 2: Estudio del efecto protector de una solución de conservación utilizada en la invención sobre el injerto hepático.

- 5 En el estudio siguiente, el hígado, debido a su sensibilidad a la isquemia y a la geografía de su red vascular, ha sido tomado como norma para ensayar la eficacia del lavado de una solución utilizada en la invención.

El modelo porcino ha sido elegido para realiza la experimentación antes de contemplar cualquier aplicación clínica en el hombre.

- 10 Los animales utilizados para el alotrasplante son cochinitos (Large White = cerdo blanco grande inglés) de aproximadamente 30 kg.

El injerto hepático es extraído de un donante según un protocolo quirúrgico adaptado y colocado en un contenedor lleno de solución S5, S6 o S7 a 4°C.

Una perfusión *ex-vivo* del injerto por las vías intra-portal e intra-arterial se realiza entonces con 500 ml de la solución SS, S6 u S7.

- 15 El injerto es implantado entonces en el animal receptor, se observa la recoloración homogénea del injerto hepático, sin ninguna correlación errónea de la anastomosis.

#### Resultados

Los criterios para evaluar la eficacia de la solución en un modelo de trasplante hepático en el cerdo son la función del injerto y la supervivencia de los animales el 7º día después del trasplante.

- 20 Los estudios histológicos se realizan por la observación microscópica de los cortes como sigue:

- hígado 1: hígado después de 8 h de conservación y antes del trasplante
- hígado 2: hígado trasplantado extraído después de 1 h de revascularización
- hígado 3: hígado a la muerte del animal

Los resultados se resumen a continuación:

- 25 - Solución S7 (9 animales alo trasplantados) : muy malas tasas de supervivencia de los animales - muerte de los animales algunas horas después del trasplante, un solo animal superviviente el D7.

- Solución S6 (7 animales alo trasplantados): masa media de supervivencia de los animales: muerte algunas horas o días después del trasplante, 3 animales supervivientes el D7, o sea, el 43 % de supervivencia con una buena función del injerto.

- 30 - Solución S5 (7 animales alo trasplantados): muy buena tasa de supervivencia de los animales el D7 (86%), una sola muerte por causa quirúrgica con una buena función del injerto.

En conclusión, el estudio preclínico no muestra diferencias significativas entre el grupo de animales, cuyo hígado ha sido lavado con la solución S5 frente a la solución UW (8 animales alo trasplantados según el grupo histórico) en términos de función del injerto y de supervivencia de los animales.

- 35 Las observaciones macroscópicas de los animales han revelado un lavado eficaz con la solución S5 y una recoloración homogénea en el curso de la revascularización.

Los exámenes anatomo-patológicos

- después de 8 h de conservación hipotérmica muestran un tejido hepático normal

- después de 1 h de revascularización después del trasplante no muestran congestión, ni infiltración, ni lesiones del endotelio, ni necrosis hepatocitaria,

- el D7 después de eutanasia del animal, no muestran infiltración de la estructura portal, ni necrosis, ni congestión. En dos casos, se ha observado un rechazo celular moderado.

- 5 Este estudio muestra la posibilidad de efectuar un lavado rápido con ausencia de hematíes evacuados durante una conservación de 24 h en la solución S5. La reperusión es rápida y homogénea.

Ejemplo 3: Conservación del riñón

El animal elegido fue el cerdo Large White. Por razones prácticas, se utilizaron machos, cuyo peso variaba entre 35 y 50 kilogramos (INRA, Domaine du Magneraud, Surgères, Francia).

- 10 El riñón extraído fue sumergido en suero fisiológico a 4°C. Un catéter (galga 14) se introdujo en la arteria renal, permitiendo el lavado por 300 a 500 ml de solución S5 o S6. Después de pesarlo, se colocó el riñón en un recipiente estéril que contenía la solución de conservación S5 o S6, y se conservó a 4°C.

Los animales donadores o bien fueron trasplantados al cabo de 30 minutos de isquemia fría o bien aislados en jaulas y trasplantados al cabo de 24 h de isquemia fría con su propio riñón.

- 15 Resultados de los estudios histomorfológicos durante la conservación

Las extracciones se realizaron a partir de riñones conservados, después del lavado con las soluciones estudiadas.

La evolución de las lesiones se determinó según una clasificación relacionada esencialmente con el Desprendimiento de las células Endoteliales en la Luz tubular (DEL) y la Pérdida de Borde en Cepillo (PBB).

Esta clasificación ha sido establecida según 5 clases de 1 a 5.

- 20 1: ninguna lesión

2: < 10 %

3: entre 11 y 25 %

4: entre 26 y 50 %

5: > 50 %

- 25 Las extracciones se realizaron en 6 animales (3 para cada grupo tratado con S5 y 3 para el grupo tratado con S6 en el tiempo 0, después de 1 h, 6h, 20h, 24h y 48h de conservación.

Los resultados de la graduación de las lesiones se resumen en la tabla 3

	PEG 15 g/L (S5)						PEG 20 g/L (S6)					
	DEL			PBB			DEL			PBB		
Animal	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 1	Nº 2	Nº3
0h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1h	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6h	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1
20h	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
24	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2
48h	3	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4

Resultados de los estudios funcionales durante la primera semana después del auto trasplante

- 30 Dos grupos de 4 animales fueron trasplantados con su propio riñón perfusionado y conservado en las soluciones S5 y S6, respectivamente.

Los resultados muestran que las soluciones S5 y S6 no fueron rechazadas por el órgano y que la disminución de concentración de PEG 20000 a 15 g/L tiene una influencia favorable con una producción de orina más precoz y una disminución de la creatininemia más rápida.

De esta manera se demuestran las cualidades de lavado y de conservación de una solución utilizada en la invención.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para el acondicionamiento de un órgano con vistas a un trasplante que comprende las etapas sucesivas de:
- lavado del órgano, y
- 5 conservación del órgano en una solución normopotásica, cuya concentración en potasio es inferior a 10 mM y que comprende una cantidad comprendida entre 15 y 20 g/L de polietileno glicol de un peso molecular de 20.000 Da, caracterizado por que el lavado se realiza con una solución de composición idéntica a la utilizada en la etapa de conservación, teniendo dicha solución una viscosidad comprendida entre 0,8 y 1,4 mm<sup>2</sup>/s a 20°C.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el lavado del órgano se realiza por perfusión de la solución.
- 3.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que el órgano se elige entre los órganos abdominales.
- 4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que el órgano es el corazón y la solución comprende, además, un cardioprotector.
- 15 5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la solución posee una viscosidad comprendida entre 1 y 1,3 mm<sup>2</sup>/s.
- 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la solución comprende, además:
- un agente impermeante,
- 20 un tampón,
- una solución de electrolitos,
- agua para fines de inyección.
- 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la solución posee una osmolaridad comprendida entre 300 y 380 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.
- 25 8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la solución comprende en un 1 L de agua para fines de inyección:
- 0,45 g de cloruro de potasio
- 0,24 g de cloruro de magnesio hexahidrato
- 6,94 g de cloruro de sodio
- 30 0,17 g de cloruro de calcio dihidrato
- 2,2 g de D-glucosa monohidrato
- 2,1 g de carbonato de sodio
- 15 g de PEG