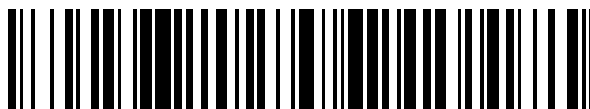


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 883**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2008 PCT/FR2008/001116**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO09050343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008 E 08840369 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2184977**

54 Título: **Utilización de una globina, de un protómero de globina o de una hemoglobina extracelular para la preservación de órganos, tejidos, o de células de órganos o tejidos**

30 Prioridad:

09.08.2007 FR 0705804

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

14.11.2017

73 Titular/es:

**HEMARINA SA (33.3%)
CCI MORLAIX-AEROPORT-CS 27934
29679 Morlaix Cedex, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS 6
(33.3%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones:

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

ES 2 641 883 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

Utilización de una globina, de un protómero de globina o de una hemoglobina extracelular para la preservación de órganos, tejidos, o de células de órganos o tejidos

5

[0001] La presente invención describe la utilización de al menos una globina, y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina nativa, naturalmente extracelular, para la preservación de órganos, de tejidos, o de células de órganos o tejidos, o de cultivo de células.

- 10 **[0002]** Se ha estudiado mucho a los anélidos por su hemoglobina extracelular (N.B. Terwilliger, Molecular Structure of the extracellular heme proteins., Vol. 13, C.P. Mangum (Ed), 193-229, Springer-Verlag, Berlin (1992); J.N. Lamy, B.N. Green, A. Toulmond, J.S. Wall, R.E. Weber and S.N. Vinogradov, Chem. Rev. 96 3113-3124 (1996)). Estas moléculas de hemoglobina extracelular están presentes en las tres clases de anélidos: Poliquetos, oligoquetos y aquetos y también es el caso de los vestimentíferos, han formado recientemente la familia de los
- 15 siboglínidos incluidos en la clase de poliquetos. Estos son biopolímeros enormes, constituidos por cerca de 200 cadenas polipeptídicas que pertenecen a 6 u 8 tipos distintos que se agrupan generalmente en dos categorías. La primera categoría, que cuenta con 144 a 192 elementos, agrupa las cadenas polipeptídicas llamadas "funcionales" que tienen un sitio activo y son capaces de enlazar el oxígeno de manera reversible; son cadenas del tipo globina en el que las masas están comprendidas entre 15 y 18 kDa y que son muy similares a las cadenas del tipo α y β de los
- 20 vertebrados. La segunda categoría, que cuenta 36 a 42 elementos, agrupa las cadenas polipeptídicas llamadas de "estructura" que tienen pocos o ningún sitio activo pero permiten la unión de duodécimas.

- [0003]** Las primeras imágenes obtenidas de las hemoglobinas extracelulares de arenícola (J. Roche, M. Bessis and J.P. Thiery, Biochim. Biophys. Acta 41 182-184 (1960); J. Roche, M.T. Bessis and J.P. Thiery, C. R. Soc. Biol. 154 73-80 (1960)) han revelado elementos hexagonales. Cada molécula de hemoglobina está formada por dos hexágonos superpuestos (O. Levin, J. Mol. Biol. 2. 95-101 (1963); J. Roche, Electron microscope studies on high molecular weight erythrocrurins (invertebrate hemoglobins) and chlorocruorins of annelids., D.A. Munday (Ed), 62-80, Pergamon Press, Oxford (1965)) que se han nombrado bicapa hexagonal (hexagonal bilayer) y cada hexágono en sí está formado por la unión de seis elementos con forma de gota de agua (E.F.J. Van Bruggen and R.E. Weber, Biochim. Biophys. Acta 359 210-212 (1974); O.H. Kapp and A.V. Crewe, Biochim. Biophys. Acta 789 294-301 (1984)), llamadas estructura globular hueca (hollow globular structure) (F. De Haas, F. Zal, V. You, F.H. Lallier, A. Toulmond and J.N. Lamy, J. Mol. Biol. 264 111-120 (1996); F. De Haas, F. Zal, F.H. Lallier, A. Toulmond and J.N. Lamy, Proteins-structure fonction and genetics, 3 241-256 (1996); F. De Haas, N. Boisset, J.C. Taveau, O. Lambert, S.N. Vinogradov and J.N. Lamy, Biophys. J. 70 1973-1984 (1996)) o "duodécima". La molécula nativa está formada
- 35 por doce de estas subunidades (dodecámero), con una masa molecular comprendida entre 200 y 250 kDa que constituye la unidad funcional de la molécula nativa. Se está particularmente interesado en la *Arenicola marina*, un anélido poliqueto del ecosistema intermareal. La estructura de su hemoglobina extracelular es también conocida (F. Zal, B. N. Green, F.H. Lallier, S.N. Vinogradov and A. Toulmond, Eur. J. Biochem. 243 85-92 (1997)). El documento WO01/92320 y Rousselot y otros (Biotechnology Journal, vol.1, no.3, 2006, pages 333-345) describen la utilización
- 40 de hemoglobina de *Arenicola marina* como sustituto sanguíneo. El documento DE10220990 describe la utilización de mioglobinas y hemoglobinas en el cultivo de células. El documento WO2007/085596 describe la utilización de hemoglobina de *Arenicola marina* para tratar los desórdenes ligados al calcio. Badet y otros. (L'utilisation des liquides de conservation en transplantation rénale, Prog Urol, 2006, 16, 25-31) describe las recomendaciones de utilización de líquidos de conservación de órganos. El trasplante de órganos consiste en reemplazar un órgano
- 45 enfermo de un paciente por un órgano sano, llamado injerto y que proviene de un donante. La distribución del oxígeno a todos los órganos y tejidos en el cuerpo humano está asegurado por la hemoglobina presente en el flujo sanguíneo humano o animal. Tras la extracción en el donante, el órgano no recibe más oxígeno y por tanto, durante un proceso de trasplante de órganos, mantener con vida, el mayor tiempo posible, el órgano fuera del cuerpo durante el tiempo que separa la extracción en el paciente del implante en el paciente, es indispensable para el éxito
- 50 del injerto e implica la puesta a punto de procedimientos de conservación. En la explicación, el injerto está privado de su entorno fisiológico y se vuelve muy sensible. En normotermia (37°C), la interrupción de la vascularización de un órgano conlleva la necrosis rápida de las células que lo constituyen. La solución de preservación de un órgano interviene con el fin de protegerlo. Uno de los grandes principios de la preservación de un órgano consiste en hacer descender rápidamente su temperatura de 37°C a 4°C. En efecto, la disminución de la temperatura de los tejidos
- 55 conlleva una disminución del metabolismo celular, sin poderse detener a pesar de ello (Belzer F.O., Southard J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation 1988; 45(4): 673-676.). La hipotermia y la composición de la solución de conservación permiten luchar contra los efectos perjudiciales de la privación de oxígeno y nutrientes inducidos por la parada de la circulación sanguínea y aplazan la muerte de las células, responsable de la necrosis de los tejidos. La solución contribuye así, gracias a sus propiedades osmóticas y/o

antioxidantes, al mantenimiento de la cualidad e integridad del injerto (morfología y bioquímica). Sobre todo mantiene su viabilidad *ex vivo*:

• Tras una fase de extracción, el injerto va a absorber la solución de preservación por perfusión con el fin de enjuagarlo y librarlo de la sangre del donante ("solución de enjuague"). El órgano es refrigerado tras la perfusión hipotérmica realizada *ex vivo* o *in situ* según se trate de una extracción en un donante vivo o fallecido. El lavado sirve igualmente para equilibrar el órgano con los componentes de la solución.

• El periodo, desde el comienzo de la extracción del donante hasta el fin de implante en el receptor, es crítico: es la duración de la isquemia total. Esta etapa es el origen de numerosos efectos perjudiciales observados. La isquemia se puede definir como una insuficiencia de riego sanguíneo tisular, con la pérdida de tres funciones importantes del flujo sanguíneo: aporte de nutrientes, oxigenación y eliminación de desechos.

[0004] Se distingue el tiempo de isquemia caliente: periodo en el que el órgano no tiene ya perfusión de la sangre del donante pero está todavía refrigerado, y el tiempo de isquemia fría: período tras el lavado y la refrigeración del órgano hasta su revascularización en el receptor. Tras el recalentamiento del órgano antes de su perfusión por la sangre del receptor, se puede observar un periodo de isquemia fría secundario. La solución de preservación tiene un papel real de protección del injerto durante el transporte ("solución de almacenamiento").

[0005] La hipotermia es el elemento esencial de la conservación. Reduce el metabolismo tisular, es decir, ralentiza la actividad enzimática catalítica necesaria para la viabilidad celular. El metabolismo se disminuirá de 12 a 13 veces mientras que la temperatura pasa de 37°C a 0°C (Belzer et Southard, Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation 1988; 45(4): 673-676. 1988)).

[0006] Es en efecto necesario reducir la demanda y el consumo del injerto de oxígeno y energía, pues estos se encuentra en estado de isquemia. Esto significa que el tejido está privado de oxígeno. Por tanto, la síntesis de energía en la forma de ATP no está asegurada ya por la fosforilación oxidativa sino por la glicólisis anaeróbica en donde el rendimiento es muy inferior. El tejido isquémico no tiene casi reserva energética y se deteriora rápidamente.

[0007] Es por tanto importante reducir sus necesidades gracias a la hipotermia. La calidad de la conservación en frío (~4°C) condicionará el éxito de la reperfusión tras el implante. El órgano es sumergido simplemente en la solución mantenida a baja temperatura mediante hielo apilado de acuerdo con las condiciones que garantizan la asepsia: la conservación estática en frío.

[0008] El tiempo aceptable para asegurar la recuperación de funciones ulterior del injerto varía de un órgano a otro. Por ejemplo, es de aproximadamente 4-5 horas para el corazón, 4-6 horas para el pulmón, 6 horas para el intestino, 10-16 horas para el hígado, 24-35 horas para el riñón y 12-18 horas para el páncreas (Thèse de Melle Delphine FORNAS soutenue le 15 juin 2001: Solution de préservation d'organe : descriptif, statut réglementaire et enregistrement en Europe ; Université Claude Bernard - Lyon I ; Faculté de Pharmacie ; Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques).

[0009] En consecuencia, la puesta a punto de procedimientos de conservación ha sido estudiada especialmente.

[0010] Por tanto, la patente US 7,220,538 se refiere a una composición de preservación de órganos o de células, en dos etapas, y que comprende una primera etapa que comprende un medio de base nutritiva y una segunda etapa que comprende nanopartículas que contienen una solución o suspensión con un compuesto capaz de unir o suministrar el oxígeno que puede ser de la hemoglobina intracelular hemolizada y modificada químicamente. Esta solución es mantenida a una temperatura no hipotérmica de entre 20 a 37°C.

[0011] La patente US 6,994,654 se refiere a una solución de preservación de un órgano y tejidos que contiene una solución a base de electrolitos con alta concentración de potasio y un aditivo que puede ser hemoglobina PEG para un proceso de suministro, preservación, trasplante y/o de cirugía no hemorrágica que implique un órgano o un tejido. Es preciso que las moléculas que transportan oxígeno, utilizadas como aditivo, lo sean para una perfusión "normotérmica". Cuando la perfusión es hipotérmica, no hay presencia del transportador de oxígeno porque a temperaturas hipotérmicas, la hemoglobina de los vertebrados de donde procede la molécula descrita en esta patente no tiene las mismas propiedades funcionales que a 37°C, principalmente su afinidad frente al oxígeno porque la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno depende de la temperatura.

[0012] La solicitud de patente US 2006/0063142 se refiere a un equipo y un procedimiento de perfusión de órganos para la supervisión, mantenimiento y/o restauración de órganos, así como la preservación de órganos durante el almacenamiento y/o el transporte.

5 **[0013]** El procedimiento comprende la perfusión de un órgano con un primer fluido médico a una primera temperatura (preferiblemente superior a 25°C) que puede contener un transportador de oxígeno como los glóbulos rojos o la hemoglobina reticular, tras el enjuague con una solución que puede ser de VIASPAN™ o de otras soluciones coloidales que contengan dextrano o HES (hidroxietilalmidón) u otros compuestos equivalentes, y después se realiza la perfusión del órgano con un segundo fluido médico que no contiene oxígeno a una segunda
10 temperatura (preferiblemente comprendida entre 4 y 10°C) inferior a la primera.

[0014] La patente US 6,642,045 se refiere a un sistema de asistencia metabólica que comprende un órgano o un tejido que emplea una solución de perfusión que puede comprender un transportador de oxígeno como una hemoglobina, una hemoglobina estabilizada, combinaciones de polioxietilenado de hemoglobina o una hemoglobina
15 recombinante. La temperatura de utilización del sistema está comprendida entre 25 y 37°C.

[0015] La solicitud WO 01/01774 se refiere a una composición para la preservación de órganos para el trasplante que contiene hemoglobina PEG de origen bovino, uno o varios electrolitos esenciales, al menos una proteína soluble, al menos una fórmula nutritiva y al menos un agente reactivo en el sistema cardiovascular.

20 **[0016]** En estos documentos diferentes, la hemoglobina utilizada es de origen humano o de mamífero, procedente de los glóbulos rojos o los liposomas, además puede ser reticular, o estar cubierta por polietileno glicol (hemoglobina PEG), para evitar la oxidación porque es bien sabido que cuando se aísla una hemoglobina de un glóbulo rojo, esta se oxida por el hecho de la ausencia de actividad antioxidante de las enzimas presentes en el
25 glóbulo rojo. (Savitsky JP, Doczi J, Black J & Arnold JD (1978) A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. Clin Pharmacol Ther 23, 73-80), (Chan WL, Tang NL, Yim CC, Lai FM & Tam MS (2000); New features of renal lesion induced by stroma free haemoglobin, Toxicol Pathol 28, 635-642). La utilización de glóbulos rojos necesita igualmente el control de la presión osmótica. Por encima de los 289 mOsmoles (presión osmótica normal del glóbulo rojo), el glóbulo rojo se encontrará en un medio hiperosmótico y tendrá tendencia a perder el agua que contiene.
30 Este proceso físico perturba los intercambios en las membranas principalmente los intercambios de sodio/cloro (Hendry EB (1961) Osmolarity of human serum and chemical solution of biological importance. Clin. Chem., 2, 156-164).

[0017] Igualmente, la utilización de una hemoglobina humana o de un mamífero únicamente permite
35 temperaturas normotérmicas para la preservación del órgano porque si están por debajo, el funcionamiento del glóbulo rojo se ve fuertemente perturbado (Jensen, FB, Wang T., Brahm, J., 2001, Acute and chronic influence of temperature on red blood cell anion exchange, 204, 39-45). Por lo tanto, la utilización de una hemoglobina de invertebrados necesita conocer el tipo sanguíneo del donante y del receptor con el fin de evitar una reacción inmunológica (Goodnough, Clin Orthop RelatRes.1998Dec;(357):89-100).

40 **[0018]** Sin embargo, la mejora de la supervivencia del implante durante la isquemia durante un periodo más largo permitirá un mejor estudio de la inmunología y las condiciones operatorias, favoreciendo así el éxito del injerto.

[0019] Igualmente, la mejora de la oxigenación del injerto y por tanto de su calidad permitirá una recuperación
45 de funciones más rápida.

[0020] En consecuencia, uno de los objetivos de la invención es suministrar a las globinas, y/o a los protómeros de globina y/o a las hemoglobinas extracelulares junto con un medio de conservación del órgano que
50 permitirá la creación de una composición de preservación de órganos, tejidos, o células de órganos o tejidos, o cultivo de células, como la que se define en la reivindicación 1.

[0021] Otro objetivo de la invención es suministrar una composición para la preservación de órganos, tejidos, o células de órganos o tejidos, o cultivo de células, como la que se define en la reivindicación 1, sin que necesite tipo
55 sanguíneo.

[0022] Otro objetivo de la invención es suministrar una composición para la preservación de órganos, tejidos, o células de órganos o tejidos, o cultivo de células, como la que se define en la reivindicación 1, que permita una
utilización prolongada en el tiempo y que pueda funcionar a una temperatura hipotérmica.

[0023] Se describe igualmente una composición de cultivo de células que pueda funcionar a una temperatura hipotérmica.

[0024] Otro objetivo de la invención es suministrar una composición que comprende al menos una globina, y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina extracelular en un medio de conservación de órganos, como el definido en la reivindicación 1, que permita la preservación de órganos, tejidos o de células de órganos o tejidos, o de cultivo de células.

[0025] Otro objetivo de la invención es suministrar un procedimiento de conservación de órganos, tejidos, o células de órganos o tejidos, como el que se ha definido en la reivindicación 8.

[0026] Se describe igualmente un procedimiento de perfusión de órganos.

[0027] Se describe igualmente un procedimiento de cultivo de células.

[0028] Por lo tanto, la invención describe la utilización de al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina nativa, naturalmente extracelular de un animal invertebrado escogido del filo de los anélidos y principalmente al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina extracelular que pertenece a gusanos marinos como la *Arenicola marina*, en una concentración, en relación al volumen final, comprendida entre 0,625 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 0,625 mg/ml a 20 mg/ml, preferiblemente de 0,625 mg/ml a 5 mg/ml, en concreto 1,25 mg/ml, junto con un medio de conservación de órganos, o un medio de cultivo de células, para constituir una composición de preservación de órganos, de tejidos o de células de órganos o de tejidos, o de perfusión de un órgano o de tejidos, o de cultivo de células.

[0029] Por "protómero de globina", se entiende la duodécima o el dodecámero de la globina.

[0030] Por "protómero de globina", se entiende una globina, o un protómero de globina o una hemoglobina originaria del mencionado animal invertebrado.

[0031] Por "naturalmente extracelular", se entiende una globina o un protómero de globina o una hemoglobina que naturalmente no está contenida en una célula y puede por tanto circular libremente en el sistema circulatorio sin modificación química para estabilizarla y hacerla funcional.

[0032] La hemoglobina extracelular de *Arenicola marina* es un biopolímero enorme de una masa de entre 4 a 4 millones de Daltons y compuesto de aproximadamente 200 cadenas polipeptídicas de dos tipos. Tres cuartos son cadenas del tipo globina capaces de fijar el oxígeno (O₂) de manera reversible y el cuarto restante son cadenas de estructuras ("linkers"), que aseguran el mantenimiento de la estructura cuaternaria y serán responsables de la actividad antioxidante de esta molécula. La unidad funcional de esta molécula es el dodecámero que tiene una masa comprendida entre 200 y 250 kDa.

[0033] En consecuencia, la hemoglobina extracelular, donde el protómero de globina o la globina de un animal invertebrado puede estar constituida por una sola cadena polipeptídica hasta aproximadamente varias centenas de cadenas polipeptídicas, con un peso molecular comprendido entre aproximadamente 15.000 Daltons a aproximadamente 8 millones de Daltons.

[0034] La utilización de al menos una globina y/o de al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina nativa extracelular permite aprovechar la actividad del superóxido dismutasa (SOD) intrínseca (determinada por método de Flohé & Ötting ; Flohé L, Ötting F. Methods Enzymol (1984), 105, 93-104) de la mencionada hemoglobina o globina de protómero de globina, procurando de esta manera una actividad antioxidante intrínseca, y sin necesitar, en consecuencia, ningún antioxidante para funcionar, al contrario que con la utilización de una hemoglobina de mamíferos por la cual las molécula antioxidantes son contenidas en el interior del glóbulo rojo y no están enlazadas a la hemoglobina. Por otra parte, la globina donde el protómero de globina o hemoglobina extracelular no necesita cofactor para funcionar al contrario que la hemoglobina de mamífero, especialmente la humana.

[0035] Por animal invertebrado, se entiende un animal que no tiene columna vertebral como las medusas, las esponjas, los insectos, los crustáceos, los moluscos, etc. o un animal que pertenezca a la rama de los anélidos.

[0036] La concentración de hemoglobina en el gusano marino *Arenicola marina* está comprendida entre 100 y

170 g/L de sangre (Toulmond, A. (1975). Recherches sur la physiologie respiratoire de l'Annélide Polychète Arenicola marina (L.). Thèse de Doctorat d'Etat, Pierre-et-Marie-Curie (Paris VI), Paris) y en el caso del hombre, es de aproximadamente 140 g/L de sangre (Données OMS WHO/LEISH/96.40 Appendice5 Page 57). En consecuencia, las concentraciones utilizadas en la invención son preferiblemente de aproximadamente 100 veces inferior a las concentraciones fisiológicas de los invertebrados o vertebrados.

[0037] La utilización de al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o de al menos una hemoglobina nativa extracelular evita el control de la presión osmótica necesario con la utilización de glóbulos rojos. La globina, el protómero de globina y la hemoglobina extracelular no poseen tipo sanguíneo lo que permite igualmente evitar todo problema de reacción inmunológica que se encuentra con la utilización de glóbulos rojos de mamífero como la hemoglobina humana o de bovino contenida en los hematíes. La hemoglobina extracelular de *A. marina* al ser extracelular y no glicosilada, *A. marina* puede considerarse como un donante universal.

[0038] Los órganos y tejidos son de origen animal, especialmente humano, de mamíferos, de aves, de reptiles, de peces o de insectos.

[0039] Un tejido es un conjunto de células idénticas o al menos del mismo origen, que participan en una función común. Los tejidos se agrupan en órganos.

[0040] La expresión "medio de conservación" designa todo medio capaz de proteger los órganos y/o las células de los efectos perjudiciales de la isquemia durante la reperfusión, satisfaciendo las necesidades metabólicas mínimas de los órganos y/o las células.

[0041] Los medios de conservación son soluciones acuosas que contienen electrolitos como el potasio, el sodio, el magnesio, el calcio, el cloruro, el sulfato, que contienen en su caso impermeabilizantes como el manitol, la rafinosa, la sacarosa, la glucosa, la fructosa, el lactobionato, o el gluconato, y puede contener igualmente coloides como la albúmina, el hidroxietil almidón, el polietileno glicol o el dextrano 40.

[0042] Los medios de cultivo de células están disponibles comercialmente y son muy variados. Por ejemplo, los medios disponibles de Invitrogen, sin estar limitados a estos son los medios siguientes: D-MEM, D-MEMIF-12, MEM, RPMI 1640, o medio 199, etc. O cualquier otro medio análogo.

[0043] Se dan ejemplos de soluciones, sin limitar la invención a estas, en la tabla 1 de la tesis de Melle Delphine Fornas (Thèse de Melle Delphine FORNAS soutenue le 15 juin 2001 Solution de préservation d'organe descriptif, statut réglementaire et enregistrement en Europe ; Université Claude Bernard - Lyon I ; Faculté de Pharmacie; Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques). Por cultivo de células, se entiende cualquier tipo de células, principalmente las células procariotas y eucariotas, como las de los microorganismos libres (bacterias o levaduras), de las células "sanas" extraídas frescas de un organismo (biopsia, etc.), que constituyen así "cultivos primarios".

[0044] Se entiende igualmente que las células tengan una capacidad de división ilimitada (se conoce como "inmortalidad en cultivo"), por ejemplo, linajes de células cancerosas, células en vías de cancerización, o incluso células sanas que se han vuelto "inmortales" artificialmente.

[0045] De acuerdo con un modo de realización preferida de la invención, la globina, y/o el protómero de globina, y/o la hemoglobina definida anteriormente se utiliza con un medio de conservación de órganos escogido preferiblemente de entre la solución de la Universidad de Winsconsin (UW, Viaspan), IGL1®, Celsior®, SCOT Maco®, BMPS Belzer®, Custodiol® (HTK), Euro-Collins®, Soltran®, Perfadex®, Ringer lactate®, o Plegisol®, o cualquier otra solución análoga.

[0046] Todos estos medios de conservación de órganos son productos comerciales.

[0047] El cultivo de células definido anteriormente puede corresponder a células de vertebrados.

[0048] Por vertebrado, se designa a un mamífero, un reptil, un anfibio, un ave o un pez.

[0049] Las células de vertebrados corresponden a todo tipo de células pertenecientes a un animal vertebrado y pueden ser, por ejemplo, sin estar limitadas a estas, células renales, hepáticas, pancreáticas, cardíacas, pulmonares, intestinales, estomacales, del colon, etc.

[0050] El cultivo de células definido anteriormente puede corresponder a células de invertebrados.

[0051] Por invertebrado se designa a un animal desprovisto de columna vertebral, por ejemplo, los insectos, los moluscos, los anélidos, los cnidarios, los espongiarios, etc.

[0052] Las células de invertebrados corresponden a todo tipo de células pertenecientes a un animal invertebrado y pueden ser, por ejemplo, sin estar limitadas a estas, células del tejido perivascular/hematopoyético u otros.

10

[0053] De acuerdo con un modo de realización preferido, la temperatura de las composiciones de preservación de órganos o de células de órganos, o de cultivo de células definidas anteriormente, está comprendida entre 4°C y 37°C, preferiblemente de 4°C a 25°C, y más preferiblemente de 4°C a 15°C, en concreto a 4°C.

15 **[0054]** De esta manera la utilización de al menos una globina o de al menos un protómero de globina y/o de al menos una hemoglobina nativa extracelular permite crear una composición capaz de trabajar en condiciones de hipotermia, elemento esencial de la conservación, porque la hipotermia reduce el metabolismo tisular, es decir que ralentiza la actividad enzimática catalítica necesaria para la viabilidad celular.

20 **[0055]** La utilización de al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o de al menos una hemoglobina, nativa extracelular, permite igualmente cultivar células de invertebrados marinos, lo que actualmente no es posible. En efecto, los cultivos primarios de invertebrados marinos son realizados en algunos tipos de invertebrados (algunos son mantenidos varios meses) pero no se ha establecido ningún linaje de células. (Rinkevich B, Mar Biotechnol (NY). 2005 Sep-Oct;7(5):429-39).

25

[0056] De acuerdo con otro modo de realización, la temperatura de la composición de perfusión de órganos o de cultivo de células está comprendida entre 4°C y 37°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a 37°C, y más preferiblemente de 25°C a 37°C, en concreto a 37°C.

30 **[0057]** Durante la perfusión de un órgano, la temperatura de perfusión debe ser generalmente normotérmica, es decir próxima a la temperatura fisiológica. En consecuencia, la utilización de una hemoglobina extracelular permite crear una composición capaz de trabajar en condición normotérmica.

[0058] De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a una composición como la que se ha definido en la reivindicación 1 que comprende al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina, nativa extracelular de un animal invertebrado elegido del filo de los anélidos y principalmente al menos una globina y/o al menos un protómero y/o al menos una hemoglobina extracelular que pertenece a gusanos marinos como la *Arenicola marina*, en una concentración, en relación al volumen final, comprendida entre 0,625 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 0,625 mg/ml a 20 mg/ml, preferiblemente de 0,625 mg/ml a 5 mg/ml, en concreto 1,25 mg/ml; y un medio de conservación de órganos.

40

[0059] La composición mencionada permite preservar órganos o tejidos, o células de órganos o de tejidos, o la perfusión de órganos o de tejidos.

45 **[0060]** De acuerdo con un modo de realización preferido, el mencionado medio de conservación de órganos es escogido preferiblemente de entre la solución de la Universidad de Wisconsin (UW, Viaspan®), IGL1®, Celsior®, SCOT Maco®, BMPS Belzer®, Custodiol® (HTK), Euro-Collins®, Soltran®, Perfadex®, Ringer lactate®, o Plegisol®, o cualquier otra solución análoga, pero no está limitada solamente a estas soluciones coloidales.

50 **[0061]** De acuerdo con otro aspecto, se describe una composición como la que se ha definido en la reivindicación 1 que comprende al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina, nativa extracelular de un animal invertebrado escogido del filo de los anélidos y principalmente al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina extracelular que pertenece a gusanos marinos como la *Arenicola marina*, en una concentración, en relación al volumen final, comprendida entre 0,625 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 0,625 mg/ml a 20 mg/ml, preferiblemente de 0,625 mg/ml a 5 mg/ml, en concreto 1,25 mg/ml; y un medio de cultivo de células.

55

[0062] La composición mencionada permite el cultivo de células de vertebrados o de invertebrados. De acuerdo con otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento de conservación de órganos o tejido, o de

células de órganos o de tejidos que comprende una etapa de conservación en estasis o en perfusión dinámica del mencionado órgano en una composición como la que se describe en la reivindicación 1.

[0063] En un modo de realización preferido, el procedimiento de conservación de un órgano o de tejidos, o de células de órganos o de tejidos, definido anteriormente, comprende las siguientes etapas:

- extracción del órgano mencionado, o de las mencionadas células de órganos o de tejidos;

- enjuague del mencionado órgano o del mencionado tejido, o de las mencionadas células de órganos o tejidos, a una temperatura comprendida entre 4°C y 37°C, preferiblemente de 4°C à 25°C, y más preferiblemente de 4°C à 15°C, en concreto a 4°C, con una composición definida anteriormente.

- conservación en estasis o en perfusión dinámica del mencionado órgano o del mencionado tejido, o de las mencionadas células de órganos o tejidos, a una temperatura comprendida entre 4°C y 37°C, preferiblemente de 4°C à 25°C, y más preferiblemente de 4°C à 15°C, en concreto a 4°C, durante un tiempo determinado, en función del mencionado órgano o del mencionado tejido, o de las mencionadas células de órganos o tejidos, en una composición definida anteriormente.

[0064] La expresión "tiempo determinado, en función del mencionado órgano o del mencionado tejido, o de las mencionadas células de órganos o tejidos," designa un tiempo de conservación que es específico y depende del órgano utilizado.

[0065] El tiempo aceptable para asegurar la recuperación de funciones ulterior del injerto varía de un órgano a otro. Por ejemplo, es de aproximadamente 4-5 horas para el corazón, 4-6 horas para el pulmón, 6 horas para el intestino, 10-16 horas para el hígado, 24-35 horas para el riñón y 12-18 horas para el páncreas. Todos estos valores son bien conocidos por el experto en la materia y pueden encontrarse por ejemplo en la tesis de Melle Delphine Fornas (Thèse de Melle Delphine Fornas soutenue le 15 juin 2001: Solution de préservation d'organe: descriptif, statut réglementaire et enregistrement en Europe; Université Claude Bernard - Lyon I; Faculté de Pharmacie; Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques).

[0066] Se describe igualmente un procedimiento de cultivo de células o de tejidos de órganos de vertebrados, o de invertebrados que comprendan una etapa de puesta en cultivo de células en una composición como la que se ha definido anteriormente.

[0067] De acuerdo con un modo de realización preferido, el procedimiento de conservación de un órgano, definido anteriormente, comprende las siguientes etapas:

- extracción del órgano mencionado;

- enjuague del mencionado órgano o del mencionado tejido, o de las mencionadas células de órganos o tejidos, a una temperatura comprendida entre 4°C y 37°C, preferiblemente de 15°C à 37°C, y más preferiblemente de 25°C a 37°C, con una composición definida anteriormente;

- conservación en estasis o en perfusión dinámica del mencionado órgano a una temperatura comprendida entre 4°C y 37°C, preferiblemente de 15°C à 37°C, y más preferiblemente de 25°C à 37°C, en concreto a 37°C, durante un tiempo determinado, en función del mencionado órgano, en una composición definida anteriormente.

[0068] La expresión "tiempo determinado, en función del mencionado órgano" designa un tiempo de conservación que es específico y depende del órgano utilizado, como se ha indicado anteriormente.

[0069] Se describe igualmente un procedimiento de cultivo de células de vertebrados, que comprende las siguientes etapas:

- extracción de las mencionadas células de un vertebrado;

- cultivo en una temperatura comprendida entre aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 37°C, más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, en concreto aproximadamente 37°C durante un tiempo determinado o no, en función de las células, en una composición definida anteriormente;

- recuento de las células mediante enjuague y lisis del tapiz celular.

[0070] La expresión "tiempo determinado, en función de las células" designa un tiempo de cultivo que es específico y depende del tipo de células utilizadas, del linaje de las células utilizadas.

[0071] Por ejemplo, está comprendido generalmente de entre algunas horas a aproximadamente una semana para los cultivos de células como las células sanguíneas como los polimorfonucleares neutrófilos.

10 [0072] Estas células no pueden mantenerse habitualmente en cultivo de manera indefinida, principalmente a causa de su número limitado de divisiones (límite de Hayflick).

[0073] Para cultivos primarios, cultivo de células que provienen directamente de un tejido, está comprendido en general de entre algunos días a varias semanas.

15 [0074] Este primer cultivo podrá, después, dar lugar a cultivos llamados "secundarios", durante la consecución de la confluencia del cultivo primario.

[0075] Por último, en el caso de las células inmortales, este tiempo no está determinado y puede ser teóricamente infinito.

[0076] Se describe igualmente un procedimiento de cultivo de células de invertebrados, que comprende las siguientes etapas:

- 25 • extracción de las mencionadas células de un invertebrado;
- cultivo en una temperatura comprendida entre aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente de aproximadamente 4°C a 25°C, más preferiblemente de aproximadamente 4°C a aproximadamente 15°C, en concreto aproximadamente 4°C, durante un tiempo determinado, en función de las células, en una composición definida anteriormente;
- 30 • recuento de las células mediante enjuague y lisis del tapiz celular.

[0077] La expresión "tiempo determinado, en función de las células" designa un tiempo de conservación que es específico y depende del tipo de células utilizadas, del linaje de las células utilizadas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0078]

40 La Figura 1 representa la cinética de disociación de la hemoglobina de *Arenicola marina* (HbAm) en cuatro medios de conservación de órganos (cuadro blanco: UW, círculo negro: IGL1, cruz: Celsior, triángulo blanco BMPS Belzer). El cuadrado gris corresponde a la estabilidad de la hemoglobina de *Arenicola marina* en un tampón que sirve para purificar la molécula.

La Figura 2 representa las propiedades funcionales de la hemoglobina de *Arenicola marina* (HbAm) en distintos medios de conservación de órganos.

45 Para cada medio, la medida de la P₅₀ (líneas continuas), que representa la afinidad de la hemoglobina de *Arenicola marina* por el oxígeno por lo que la medida de la n₅₀ (líneas de puntos) que representa la cooperatividad, son representadas. La Figura 3 representa el porcentaje de lactato deshidrogenasa (LDH) liberado en el sobrenadante de conservación para las células de vasos renales de cerdo LC PK1 (eje de ordenadas) tras 2h a 4°C en función de la concentración de hemoglobina de la *Arenicola marina* (1,25 mg/ml a 20 mg/ml) en un medio de conservación de órganos (ViaSpan®, Bristol-Myers-Squibb).

50 Las columnas negras representan los resultados obtenidos por las distintas concentraciones de la HbAm, las columnas grises representan los resultados obtenidos con el tampón únicamente en el ViaSpan®, en ausencia de la HbAm.

55 La Figura 4 representa el porcentaje de lactato deshidrogenasa detectado (LDH) liberado en el sobrenadante de conservación para las células de vasos renales de cerdo LC PK1 (eje de ordenadas) tras 24h a 4°C en función de la concentración de hemoglobina de la *Arenicola marina* (0,039 mg/ml a 1,25 mg/ml; eje de abscisas) en un medio de conservación de órganos (ViaSpan®, Bristol-Myers-Squibb). Las columnas negras representan los resultados obtenidos por las distintas concentraciones de la HbAm.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Estabilidad de la hemoglobina de *Arenicola marina* en distintos medios de conservación de órganos.

[0079] Estos estudios han sido realizados en el laboratorio con el fin de evaluar la estabilidad de la HbAm en diferentes medios de conservación de órganos (soluciones coloidales usadas comúnmente durante el trasplante de órganos y suministradas por el laboratorio del Prof. T. Hauet). Estas soluciones son UW®, IGL1®, Celsior®, y BMPS Belzer®.

[0080] Los análisis cinéticos han sido realizados 48 horas a partir del área sobre la curva del cromatógrafo y del porcentaje 414 nm de diferentes subunidades (correspondientes a la absorción del hemo). El porcentaje de la

HbAm a lo largo del tiempo sigue una ley monoexponencial:
$$\frac{[HbAm]_t}{[HbAm]_{t_0}} = \exp(-k_d t)$$
 donde k_d es la constante de disociación del HbAm.

[0081] Estos estudios han revelado que en diferentes medios de conservación de órganos la HbAm es estable, no oxidada y funcional durante un periodo de al menos 48 horas, lo que es totalmente compatible con la duración de la vida de los órganos en espera de trasplante (Figura 1).

[0082] Las constantes de disociación y el tiempo de semivida obtenidos por las diferentes soluciones indican que la HbAm es estable en estos diferentes medios de conservación de órganos puestos a prueba durante 48 horas (disociación <3%, Tabla I).

Tabla I: Constantes de disociación y tiempo de semivida de la HbAm en los distintos medios puestos a prueba.

	HbAm	UW®	IGL1®	Celsior®	BMPS Belzer®
k_d (h ⁻¹)	0.0001	0.0002	0.0011	0.0004	0.0006
$T_{1/2}$ (h)	∞	∞	625	1154	1705

Ejemplo 2: Funcionalidad de la hemoglobina de *Arenicola marina* en distintos medios de conservación de órganos.

[0083] La medida de la P_{50} se ha efectuado de acuerdo con la técnica del hemox (A. Toulmond et al., Biol. Bull. 179 366-373 (1990)) a 4° y durante 48h.

La medida de la n_{50} se ha efectuado sobre las curvas de saturación por el oxígeno de un pigmento respiratorio, obtenidas a partir de la técnica del hemox.

[0084] Los resultados obtenidos presentes en la figura 2 muestran que la HbAm es funcional en los diferentes medios de conservación de órganos puestos a prueba como indican los valores de P_{50} y n_{50} observados (UW, IGL1, Celsior, Scot Maco, BPMS).

[0085] La afinidad de la HbAm por el O₂ es fuerte, comprendida entre 1 y 3 y ~0,2 en SCOT Maco. La afinidad es ligeramente más importante en los diferentes medios de conservación de órganos y particularmente en SCOT Maco y aumenta ligeramente durante 48 horas.

[0086] La cooperatividad es por su parte constante ~1,5 entre los diferentes medios de conservación, así como en el tiempo.

Ejemplo 3: Test de eficacia de la hemoglobina de *Arenicola marina* en una concentración comprendida entre 1,25 mg/ml y 20 mg/ml, en un modelo *in vitro* de conservación en frío de células renales

1) Conservación en frío del linaje celular renal

- Material biológico

[0087] Los experimentos se han realizado en el linaje celular de vasos renales de cerdos LLC-PK1 (CL-101,

Lot 1928865) (ATCC, LGC-Promochem, Molsheim, France) suministrado gratuitamente por el Laboratoire Inserm E0324 'Ischémie-reperfusion en transplantation rénale' de Poitiers dirigido por el Prof. G. Mauco.

[0088] El linaje LLC-PK1 es un linaje de células no transformadas, establecidas a partir de células epiteliales de vasos que rodean en proximidad el riñón del cerdo.

- Cultivo de células **LLC-PK1**

[0089] Las células LLC-PK1 son cultivadas en el medio M199 (Ref 31150, Gibco-BRL, Invitrogen Life Technologie) con un suplemento del 3% de suero fetal de ternera (F7524, Lot 085K3397, Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin (P4333, Sigma-Aldrich) y 2 mM L-Glutamina (25030, Gibco-BRL). Las células son cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene un 95% de aire y un 5% de CO₂.

Conservación en frío de las células LLC-PK1

[0090] Para los experimentos de conservación en frío, las células son sembradas en placas de cultivo de 6 pozos (140675, Nunc) con una concentración de 2×10^5 células/mL en 2 mL de medio de cultivo para cada pozo. Tras 48 horas de cultivo, el sobrenadante es eliminado y se realizan dos lavados del tapiz celular con tampón de fosfato salino (PBS, 70011, GIBCO-BRL). Las células son conservadas entonces durante 24 horas a 4°C en presencia de 1,2 mL de una solución de conservación comercial, la solución UW (ViaSpan®, Bristol-Myers-Squibb), a la que previamente se le ha añadido la HbAm a concentraciones de 0, 1.25, 2.5, 5, 10 o 20 mg/ml.

2) Detección de la liberación del lactato deshidrogenasa (LDH)

[0091] El impacto de la adición de la HbAm conservada en tampón de almacenamiento Hemorgan sobre la viabilidad de las células LLC-PK1 conservadas durante 24 horas a 4°C en la solución UW se ha estudiado. La viabilidad celular se estudia por detección de la cantidad de LDH presente en el tapiz celular tras la conservación en frío en comparación con la cantidad de LDG presente inicialmente en el tapiz antes de la etapa de conservación.

[0092] En efecto, la liberalización de esta enzima en el medio extracelular es el reflejo de la permeabilización de la membrana plasmática de las células y por consecuencia de la muerte celular.

- Modo operatorio

[0093] Tras 24 horas de conservación, el sobrenadante es eliminado, y el tapiz celular es enjuagado entonces 3 veces con 2 mL de PBs y después las células adherentes son lisadas en 1,2 mL de PBS que contiene un 0,1% de Triton®X-100 (X100, Sigma- Aldrich). La suspensión obtenida tras el raspado del tapiz celular es sonicada durante 10 segundos con un equipo de ultrasonidos y después es centrifugada a 1.000 g durante 7 minutos.

[0094] La cantidad de LDH presente en el tapiz celular es determinada por una dosificación colorimétrica de acuerdo con las instrucciones del proveedor (TOX7, Sigma-Aldrich). Esta dosificación está basada en la reducción del NAD por el LDH durante la transformación del piruvato en lactato. Brevemente, se depositan 25 mL de la muestra a dosificar en una placa 96 tras la adición de 25 µL de una mezcla de reacción que contiene 1 volumen de sustrato (L2402), 1 volumen de cofactor (L2527) y 1 volumen de colorante (L2277). La mezcla es entonces homogeneizada delicadamente e incubada 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se para al añadir 5 mL de HCl 1N. La absorción medida por fotometría a 490 nm y 630 nm (referencia plástica) (ELx800™, Biotek couplé au logiciel Gen5®) es directamente proporcional a la cantidad de enzimas presentes en la muestra. Se dosifica cada muestra dos veces y se efectúa una media de la diferencia de absorción (DO490-DO630).

50 - Resultados

[0095] Los resultados son expresados en porcentaje de la cantidad de LDH detectadas en el tapiz de células conservadas a 4°C en relación a la cantidad de LDH detectada en el tapiz antes del periodo de conservación en frío (células en T0). El porcentaje de liberación de LDH se calcula entonces de acuerdo con la relación:

$$100 - (\text{LDH tapiz celular}) \times 100 / (\text{LDH células en T0}) \text{ (Figura 3 y Tabla II)}$$

HbAm	UW	1,25g/L	2,5g/L	5g/L	10g/L	20g/L
MEDIA	14	-6	-3	-3	2	-5

DESVIACIÓN TÍPICA	9	6	4	8	4	2
Tp Am	UW	25µL	50µL	100µL	200µL	300µL
MEDIA	74	72	69	72	70	62
DESVIACIÓN TÍPICA	9	5	6	3	5	4

Tabla II: Porcentaje de liberación de LDH obtenido por las distintas concentraciones de la HbAm o en tampón (los resultados corresponden a la media de tres ensayos).

10 - Conclusión

[0096] La conservación de las células LLC-PK1 durante 24 h a 4°C en la solución UW (Viaspan) induce una muerte celular importante (74%±69).

15 **[0097]** Además, la presencia del tampón de almacenamiento Hemogan en la solución de conservación UW no modifica o lo hace poco la viabilidad de las células renales.

[0098] Por el contrario, la presencia de la HbAm durante la conservación, en una concentración de 1,25 g/L de la molécula, protege totalmente la viabilidad del tapiz celular.

20

Ejemplo 4: Test de eficacia de la hemoglobina de *Arenicola marina* en una concentración comprendida entre 0,039 mg/ml y 1,25 mg/ml, en un modelo *in vitro* de conservación en frío de células renales

[0099] El material biológico, el cultivo de células y la conservación en frío se preparan y efectúan de la misma manera que en el ejemplo 3.

25

- Concentración de la HbAm :

[0100] Las células son conservadas durante 24 horas a 4°C en presencia de 1,2 mL de una solución de conservación comercial, la solución UW (ViaSpan®, Bristol-Myers-Squibb), a la que previamente se le ha añadido la HbAm a concentraciones de 0, 0,039, 0,078, 0,156, 0,312, 0,625 o 1,25 mg/mL.

30

- Resultados

35 **[0101]** Los resultados son expresados en porcentaje de la cantidad de LDH detectadas en el tapiz de células conservadas a 4°C en relación a la cantidad de LDH detectada en el tapiz antes del periodo de conservación en frío (células en T0). El porcentaje de liberación de LDH se calcula entonces de acuerdo con la relación:

$$100 - [(LDH \text{ tapiz celular}) \times 100 / (LDH \text{ células en T0})] \text{ (Figura 4 y Tabla III)}$$

40

Tabla III: Porcentaje de liberación de LDH obtenido por las distintas concentraciones de la HbAm (los resultados corresponden a la media de tres ensayos).

HbAm	Uw cel	0,039g/LC	0,078g/L	0,156g/L	0,312g/L	0,625g/L	1,25g/L
MEDIA	76	69	71	62	47	25	7
DESVIACIÓN TÍPICA	7	14	6	7	7	12	5

45 - Conclusión

[0102] La conservación de las células LLC-PK1 durante 24h a 4°C en la solución UW (ViaSpan®, Bristol-Myers-Squibb) induce una muerte celular importante (76%±7). La liberación de LDH de las células tubulares renales es disminuida considerablemente en presencia la HbAm y esto de manera dependiente de la dosificación. De esta manera, desde 0,625 mg/ml, la HbAm protege las células renales (25%±12 *versus* 76%±7) y a una concentración de 1,25 g/L, la HbAm protege totalmente las células renales de la muerte celular inducida por 24 horas de conservación en frío (7%±5 *versus* 76%±7).

50

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:
 - 5 - al menos una globina y/o al menos un protómero de globina y/o al menos una hemoglobina extracelular de un animal invertebrado escogido del filo de los anélidos, en una concentración, en relación al volumen final, comprendida entre 0,625 mg/ml y 100 mg/ml, y
 - un medio de conservación de órganos, siendo dicho medio capaz de proteger los órganos de los efectos deletéreos de la isquemia satisfaciendo las necesidades metabólicas mínimas de los órganos y siendo dicho medio una solución acuosa que contiene electrolitos e impermeabilizantes.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la globina y/o al menos el protómero de globina y/o al menos la hemoglobina extracelular es de *Arenicola marina*.
- 15 3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** el mencionado medio de conservación de órganos contiene además coloides.
4. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** la mencionada concentración en relación al volumen final es de 0,625 mg/ml a 20 mg/ml, concretamente de 20 0,625 mg/ml a 5 mg/ml, y más concretamente de 1,25 mg/ml.
5. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** los mencionados electrolitos son escogidos de entre el potasio, el sodio, el magnesio, el calcio, el cloruro o el sulfato.
- 25 6. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** los mencionados impermeabilizantes son escogidos de entre el manitol, la rafinosa, la sacarosa, la glucosa, la fructosa, el lactobionato, o el gluconato.
7. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizada porque** los 30 mencionados coloides son escogidos de entre la albúmina, el hidroxietil almidón, el polietileno glicol o el dextrano 40.
8. Procedimiento de conservación de órganos o tejido, o de células de órganos o de tejidos que comprende una etapa de conservación en estasis o en perfusión dinámica del mencionado órgano en una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9. Procedimiento de conservación de un órgano o tejido, o de células de órganos o de tejidos de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende las siguientes etapas:
 - enjuague del mencionado órgano o del mencionado tejido previamente extraídos, o de las mencionadas células de 40 órganos o de tejidos previamente extraídos, a una temperatura comprendida entre 4°C y 15°C, con una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7,
 - conservación en estasis o en perfusión dinámica del mencionado órgano o del mencionado tejido, o de las mencionadas células de órganos o tejidos, a una temperatura comprendida entre 4°C y 15°C, durante un tiempo determinado, en función del mencionado órgano o del mencionado tejido, o de las mencionadas células de órganos 45 o tejidos, en una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Procedimiento de conservación de un órgano de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende las siguientes etapas:
 - 50 • enjuague del mencionado órgano previamente extraído, a una temperatura comprendida entre 25°C y 37°C, con una composición definida entre una de las reivindicaciones 1 a 7;
 - conservación en estasis o en perfusión dinámica del mencionado órgano a una temperatura comprendida entre 25°C y 37°C, durante un tiempo determinado, en función del mencionado órgano, en una composición definida en una de las reivindicaciones 1 a 7.
- 55

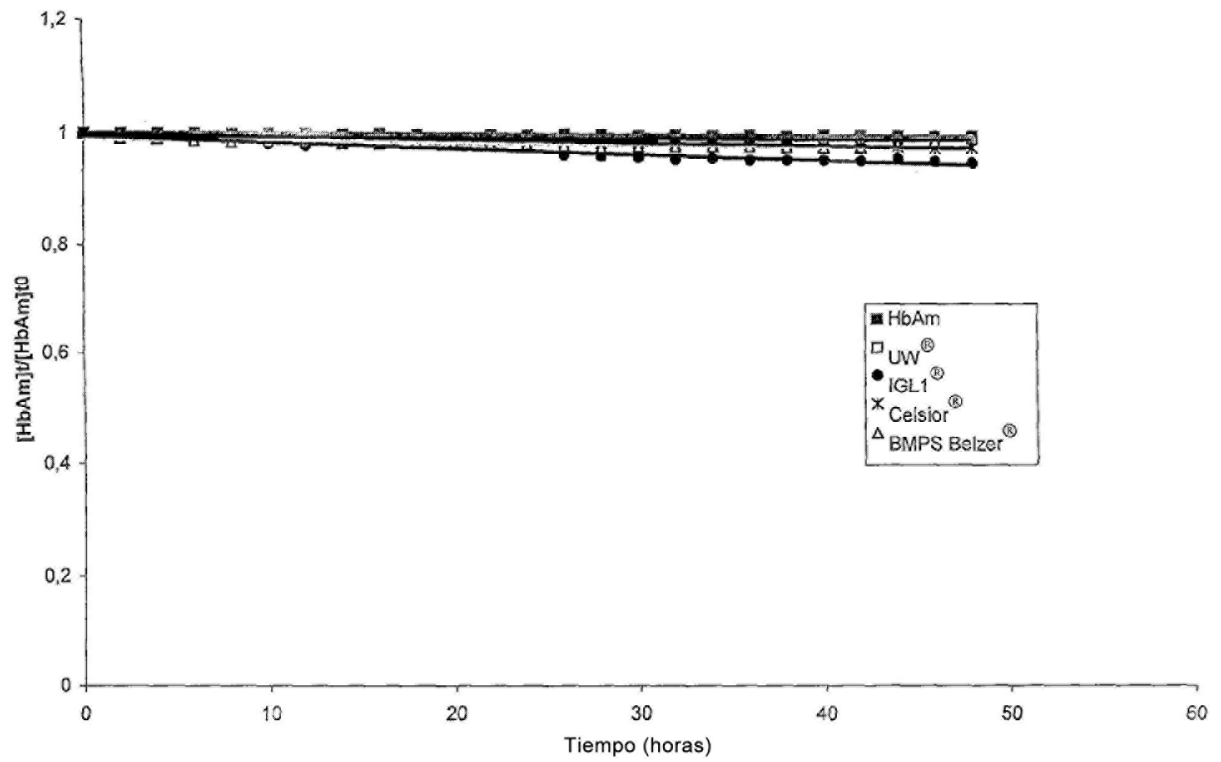


FIGURA 1

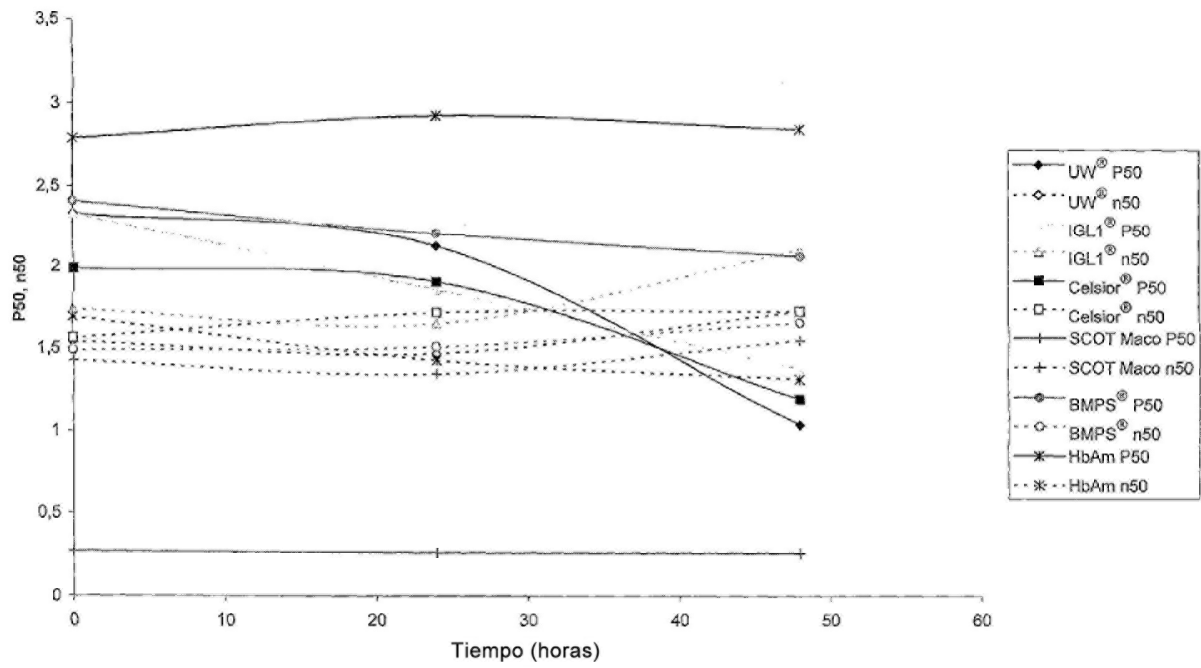


FIGURA 2

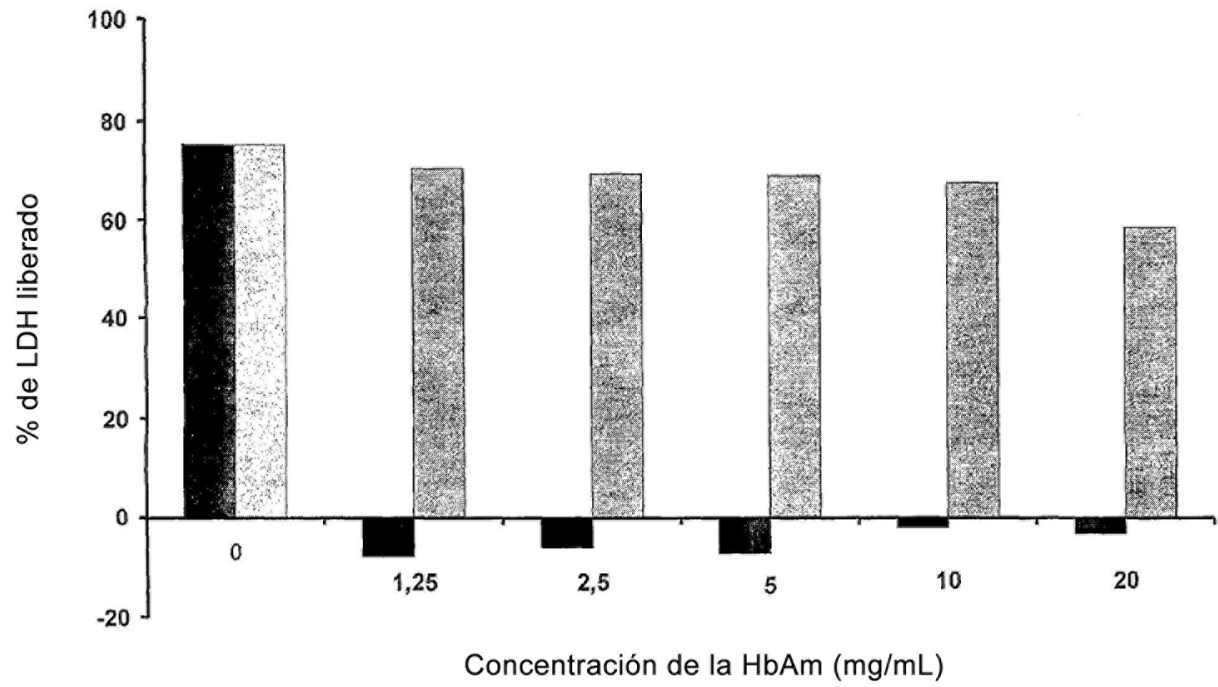


FIGURA 3

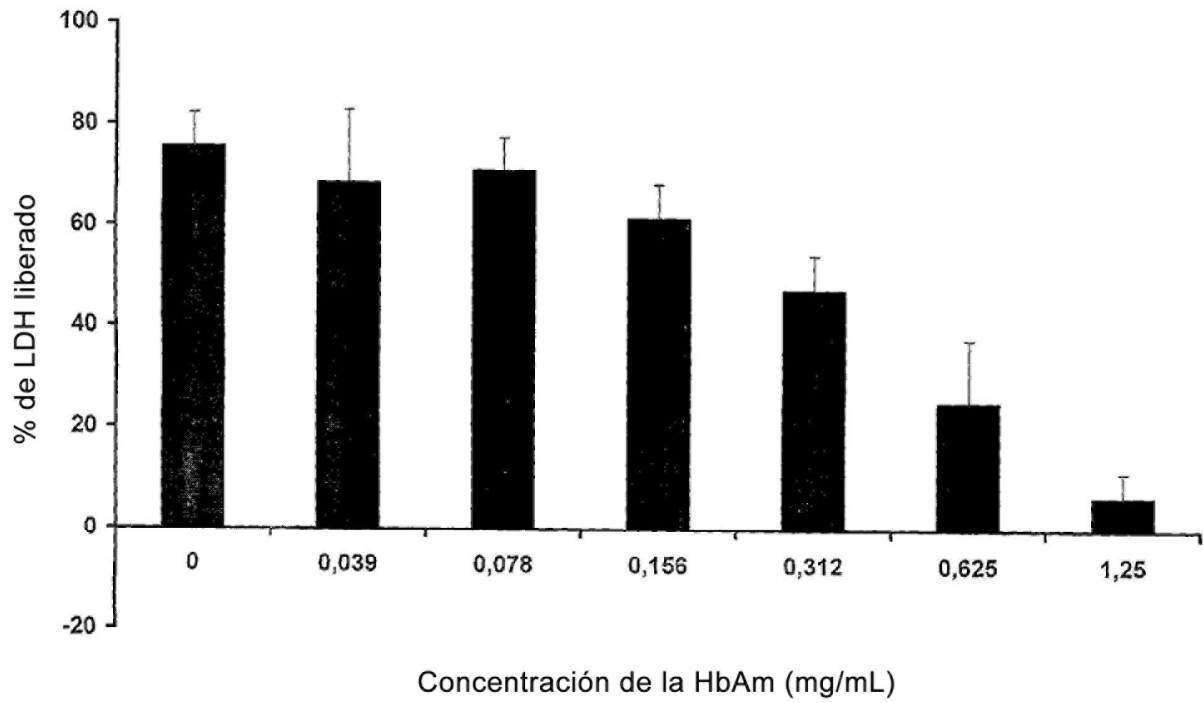


FIGURA 4