

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 673**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/EP2013/055378**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13135867**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13715620 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2825038**

54 Título: **Solución para el almacenamiento de órganos que contiene (hidroxi)ectoína**

30 Prioridad:

**16.03.2012 DE 102012005177**

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

**21.02.2018**

73 Titular/es:

**BITOP AG (100.0%)  
Stockumer Strasse 28  
58453 Witten, DE**

72 Inventor/es:

**BILSTEIN, ANDREAS;  
LENTZEN, GEORG;  
TOLBA, RENE y  
QUESNEL, FABIÁN, BERNAL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 655 673 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Solución para el almacenamiento de órganos que contiene (hidroxi)ectoína

La invención se refiere a una solución de almacenamiento para la conservación de órganos o tejidos para trasplantes.

5 El trasplante de órganos, en particular riñón, corazón, hígado, páncreas y pulmón, desempeña en la medicina moderna un papel importante. El trasplante de un órgano puede ser necesario por ejemplo en caso de insuficiencia renal crónica, determinadas cardiopatías coronarias o cirrosis hepática. La mayoría de trasplantes se realizan con órganos de donantes clínicamente muertos, por tanto desde el tiempo de la extracción hasta el hallazgo y preparación de un receptor adecuado transcurre un cierto tiempo, de modo que es necesaria una conservación del  
10 órgano. El órgano permanece por consiguiente durante un determinado tiempo sin alimentación de oxígeno, es decir atraviesa una fase isquémica con un correspondiente daño reversible. El órgano se conserva o se transporta normalmente a baja temperatura de aprox. 4 °C. Durante la isquemia se diferencia entre el denominado tiempo de isquemia caliente, es decir el espacio de tiempo entre la interrupción del riego sanguíneo en el organismo del donante y el inicio de la perfusión en frío, y el tiempo de isquemia fría, concretamente el inicio de la perfusión en frío  
15 y el implante en el organismo del receptor. En el caso de almacenamiento frío en correspondientes soluciones para el almacenamiento de órganos puede extenderse el tiempo de isquemia fría en el caso de un trasplante de riñón hasta 48 horas.

En la extracción de un órgano se lava éste normalmente con una solución de perfusión y se almacena en ésta. Una solución usada con frecuencia es la denominada solución UW (University of Wisconsin) en la que la concentración de iones corresponde a la concentración en las células. Otra solución para el almacenamiento de órganos usada con frecuencia es la solución HTK, que se comercializa entre otros mediante la Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Alemania con el nombre Custodiol. La abreviatura HTK representa las sustancias constitutivas histidina, triptófano y  $\alpha$ -cetoglutarato. Otra solución para el almacenamiento de órganos conocida se comercializa con el nombre Celsior por la empresa Genzyme, Cambridge, EE.UU. Las propiedades de distintas soluciones para el  
20 almacenamiento de órganos para el almacenamiento de trasplantes de hígado se comparan en la publicación H. Janßen *et al.*, Liver Transplantation, vol. 10, 2004, pág. 1514-1523.

En el transcurso del tiempo se ha intentado minimizar mediante otras mejoras daños del órgano que va a trasplantarse. Además del daño mediante la propia isquemia tiene prioridad a este respecto también la evitación de los denominados daños por reperfusión, que se producen cuando se calienta el órgano hipotérmico y se reperfunde con sangre. Por este motivo propone la patente europea EP 1 362 511 B1 añadir a la solución para el almacenamiento de órganos un derivado de ácido hidroxámico. La patente EP 1 859 679 B1 propone usar un  
30 tampón a base de n-acetilhistidina/base.

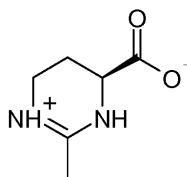
Partiendo de este estado de la técnica se hizo frente al objetivo de reducir adicionalmente los daños por isquemia y reperfusión durante el trasplante de órganos, tejidos y sistemas de órganos.

35 Este objetivo se soluciona de acuerdo con la invención mediante el uso de una solución de almacenamiento según la reivindicación 1.

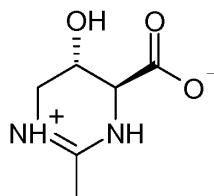
Ha resultado sorprendente que los daños en los órganos y tejidos, riñón, hígado, páncreas y córnea, conservados en una solución de almacenamiento y perfundidos con la solución de almacenamiento pueden reducirse cuando a la solución de almacenamiento se añade ectoína (ácido 2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) o hidroxiectoína (ácido 5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) o bien una sal de estos compuestos. La ectoína es un derivado de tetrahidropirimidina que se sintetiza en condiciones de estrés por microorganismos extremófilos, en particular halófilos. Para ectoína e hidroxiectoína se han descrito hasta ahora distintos usos, por ejemplo como agente hidratante, para el tratamiento del síndrome de fuga vascular, *vascular leak syndrom* (VLS) (documento DE 10 2006 056 766 A1) o para el tratamiento de neurodermitis (documento DE 103 30 243 A1).  
40 También el uso en la prevención o el tratamiento de estrés inflamatorio postoperatorio se divulgó en la solicitud de patente internacional WO 2009/095269 A1. A este respecto se menciona también que pueden reducirse las reacciones inflamatorias que aparecen en el trasplante de secciones de intestino mediante uso de ectoína, sin embargo no se describe la adición de ectoína o hidroxiectoína a una solución HTK en este documento. Por consiguiente, para el experto era sorprendente que pudieran mejorarse adicionalmente las propiedades de esta  
45 solución para el almacenamiento de órganos eficaz y que puede obtenerse comercialmente mediante adición de ectoína/hidroxiectoína. En el caso de las soluciones se trata por regla general de soluciones acuosas.

En relación con la conservación de trasplantes de intestino delgado se había descrito la utilidad de ectoína en solución de polisol ya por L. Wei *et al.*, Pathobiology, vol. 76, 2009, pág. 212-220, sin embargo la publicación no se manifiesta con respecto al uso de ectoína en combinación con una solución HTK o en relación con el trasplante de  
50 riñón, hígado, páncreas o córnea.

La estructura de la L-ectoína natural (ácido (S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) está representada a continuación:



La estructura de la hidroxiectoína natural (ácido (4S,5S)-5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) se reproduce a continuación:



- 5 El uso de los estereoisómeros indicados se prefiere, sin embargo no es obligatorio, es decir también es posible el uso de otros estereoisómeros o bien del racemato.

Se prefiere especialmente el uso de hidroxiectoína. Como base sirve una solución HTK, es decir una solución de almacenamiento que contiene histidina, triptófano y  $\alpha$ -cetoglutarato o sales correspondientes. Se prefiere muy especialmente el uso de hidroxiectoína o bien una sal de la hidroxiectoína en una solución de almacenamiento que contiene histidina, triptófano y  $\alpha$ -cetoglutarato o sales correspondientes.

10 La concentración de ectoína/hidroxiectoína debía ascender a entre 0,1 y 100 mM. Se prefieren concentraciones entre 1 y 10 mM, de manera especialmente preferente de 4 a 7 mM y de manera muy especialmente preferente de aprox. 5 mM. Con las correspondientes concentraciones pudo observarse una reducción significativa de los daños de órganos.

- 15 Una solución HTK acuosa, típica contiene:

cloruro de sodio	15,0 mM
cloruro de potasio	9,0 mM
cloruro de magnesio hexahidratado	4,0 mM
clorhidrato de histidina monohidratado	18,0 mM
histidina	180,0 mM
triptófano	2,0 mM
manitol	30,0 mM
cloruro de calcio dihidratado	0,015 mM
hidrogeno-2-cetoglutarato de potasio	1,0 mM

El principio de la solución HTK se basa en la inactivación de la función del órgano mediante retirada del sodio y calcio extracelular, unida con el tamponamiento del medio extracelular mediante histidina/clorhidrato de histidina. De esta manera se alarga el intervalo que los órganos toleran la interrupción del suministro con sangre que contiene oxígeno. La composición de electrolitos de la solución HTK impide el desencadenamiento de procesos de activación que consumen energía, de modo que se reduce la demanda de energía del órgano. El tampón histidina/clorhidrato de histidina ralentiza la caída de pH durante la isquemia, lo que eleva el grado de acción de la obtención de energía anaeróbica. El hidrogeno-2-cetoglutarato de potasio sirve como sustrato para la obtención de energía aeróbica, el triptófano actuará de manera protectora de membrana y el manitol impedirá la producción de un edema celular. Las propiedades de una solución de este tipo pueden optimizarse mediante adición de la cantidad indicada de ectoína/hidroxiectoína.

La invención se usa en el trasplante de riñón, hígado o páncreas. Sin embargo es posible también el almacenamiento de tejidos que van a trasplantarse, concretamente la córnea.

La solución de almacenamiento que se basa en una solución HTK puede contener otros componentes conocidos por el estado de la técnica. Con respecto a esto se remite en particular a la patente europea EP 1 362 511 B1 y 1 859 679 B1. Una solución de almacenamiento según la reivindicación 1, que contiene además componentes de soluciones para el almacenamiento de órganos, descritos en las patentes europeas mencionadas, es de manera explícita igualmente objeto de esta solicitud.

En particular puede contener la solución de almacenamiento ácido hidroxámico o un derivado de ácido hidroxámico, que está eventualmente sustituido con alquilo o arilo. En particular es adecuada deferoxamina, en caso de la cual se trata de un agente quelante de hierro fuerte y que presenta igualmente tres funciones de ácido hidroxámico. De esta manera se previene un daño por frío dependiente de hierro. Básicamente pueden usarse también otros agentes

quelantes de hierro. Un tampón puede usarse a base de n-acilhistidina, en particular N-acetilhistidina así como la correspondiente base.

5 Pueden estar contenidos lisina, arginina o glicina o correspondientes derivados, por ejemplo dipéptidos que contienen lisina, arginina o glicina. Lo mismo se aplica para los demás aminoácidos naturales alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, triptófano, serina, treonina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, tirosina, cisteína e histidina. Los aminoácidos básicos lisina y arginina o bien derivados pueden usarse como equivalentes de base.

10 También es ventajosa la adición de aspartato, que fomenta el intercambio de sustancias en membranas y acelera el restablecimiento de la homeostasis y favorece además en unión con  $\alpha$ -cetoglutarato el metabolismo energético aeróbico en la fase de reperfusión.

15 Para cubrir la demanda de energía del órgano durante la isquemia, puede añadirse glucosa a la solución de almacenamiento. A este respecto debe seleccionarse la concentración de glucosa de modo que se evite una absorción de glucosa excesiva mediante otras células. También pueden usarse otros azúcares, alcoholes de azúcar u otros polioles (por ejemplo manitol, rafinosa, sacarosa, xilitol, sorbitol) o sustancias de alto peso molecular, tales como HES o dextrano, para conseguir la presión osmótica fisiológica necesaria de aprox. 300 mosm/l.

Puede usarse dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector. Pueden usarse captadores de radicales tales como Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) para captar radicales intracelulares.

20 Lógicamente puede usarse la solución de almacenamiento de acuerdo con la invención no únicamente para la conservación de los órganos o tejidos, sino también para la perfusión durante la extracción del órgano del organismo del donante. Normalmente se perfunde el órgano con la solución de almacenamiento y a continuación se conserva y se transporta en la solución de almacenamiento hasta el implante en el receptor.

### Ejemplo

En los ensayos realizados se extrajo el hígado de ratas Wistar machos con anestesia con isoflurano. Se dividió en tres grupos:

25 Grupo control (grupo con NaCl): ningún tiempo de isquemia caliente o fría (n=5)

Grupo de ensayo 1 (grupo con HTK): los hígados se lavaron tras un tiempo de isquemia caliente de 30 min con 60 ml de solución HTK (n=5)

Grupo de ensayo 2 (grupos con HTK+hidroxiectoína): los hígados se lavaron tras un tiempo de isquemia caliente de 30 min con 60 ml de solución HTK, que presentaba una concentración de hidroxiectoína de 5,27 mM (n=5)

30 En los grupos de ensayo se colocó una cánula para la vena porta 30 min tras el paro cardíaco con un tubo flexible de polietileno de calibre 14. A continuación se lavaron los hígados a través de la vena porta con 20 ml de una solución salina enfriada con hielo (0,9 %, DeltaSelect GmbH, Dreieich, Alemania). Después se separaron los hígados y se lavaron a 4 °C inmediatamente con 60 ml de solución HTK (Dr. Franz Köhler Chemie, Alemania) o bien con 60 ml de solución HTK que contiene hidroxiectoína 5,27 mM.

35 Los hígados se conservaron en 60 ml adicionales de la respectiva solución para el almacenamiento de órganos a 4 °C durante 24 h. Durante el almacenamiento se introdujo y se aseguró un catéter de polietileno de calibre 14 en la vena cava suprahepática.

40 Para la simulación del calentamiento en el reimplante se llevaron los órganos a temperatura ambiente en el intervalo de 30 min. Antes de la unión con el circuito de perfusión se lavaron los hígados a través del catéter de la vena porta con 10 ml de solución salina a 22 °C durante como máximo 35 min. También se lavó el circuito de perfusión con 200 ml de solución salina estéril y a continuación con 100 ml de tampón de Krebs-Henseleit (KHB). La reperfusión se realizó *ex vivo* durante 45 min en un sistema de recirculación con velocidad de flujo constante de 3 ml por gramo de hígado y minuto con 220 ml de KHB oxigenado a 37 °C.

45 Para la oxigenación se usó carbógeno (95 % de O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub>) y se mantuvo la presión parcial de oxígeno-material perfundido continuamente en por encima de 500 mm de Hg.

El grupo control (grupo con NaCl) no se expuso ni a isquemia caliente ni fría. Los hígados se lavaron únicamente durante la extracción con solución de NaCl y HTK e inmediatamente se reperfundieron.

### Resultados

50 1) la enzima aspartatoaminotransferasa (AST) transforma aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato en oxalacetato y glutamato o bien a la inversa. Se diferencia entre dos isoformas enzimáticas, AST-1 y AST-2. Un nivel elevado en la sangre está unido normalmente con trastornos de la función hepática, por lo tanto se usan como marcadores bioquímicos para daños hepáticos. La medición se realizó con ayuda de procedimientos fotométricos habituales

en un analizador clínico (Vitros 250, Ortho-Clinical-Diagnostics, New Jersey, EE.UU.). El resultado está representado en la figura 1. Se distinguió que el nivel de AST tras reperfusión durante 15 y 45 min para el grupo con HTK era significativamente más alto que para el grupo con HTK+hidroxiectoína.

- 5 2) El líquido biliar es un líquido verde oscuro o marrón amarillento, que se produce por los hepatocitos. A falta de vesícula biliar en ratas fluye éste directamente a través del conducto biliar. Se introdujo un catéter en el conducto biliar para absorber el líquido durante la reperfusión. La cantidad de líquido biliar se encuentra en relación directa con la función hepática, estando correlacionadas cantidades más grandes con una mejor función del órgano. La producción de líquido biliar era significativamente más alta para el grupo con HTK+hidroxiectoína que para el grupo con HTK (véase la figura 2).
- 10 3) La presión venosa portal (*portal venous pressure*, PVP) es la presión que impera en la vena porta. Normalmente se encuentra ésta entre 5 y 12 mm de Hg. En este sentido, ésta es una medida de la resistencia que debe superarse para bombear la sangre en la circulación sanguínea. La presión venosa portal se midió durante la reperfusión de manera continua en el catéter de flujo de la vena porta. Tal como puede deducirse de la figura 3, la presión venosa portal en el grupo con HTK+hidroxiectoína es más baja que en el grupo con HTK.
- 15 4) Se determinó ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) para determinar la reacción de inflamación de células endoteliales sinusoidales dañadas. El grupo control mostró en comparación con el grupo con HTK nivel significativamente más bajo ( $242 \pm 46,22$  pg/ml en comparación con  $403,6 \pm 39,61$  pg/ml). También el grupo con HTK+hidroxiectoína mostró valores claramente más bajos ( $305,2 \pm 37,71$ ) pg/ml en comparación con el grupo con HTK. El resultado se reproduce en la figura 4 (\*:  $P < 0,05$  en comparación con el grupo con HTK).
- 20 5) La apoptosis se volvió visible con ayuda del procedimiento TUNEL (*terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*). A este respecto, los grupos 3'-OH, que se producen durante la apoptosis, de la cadena de ADN fragmentada se dotan de nucleótidos marcados mediante la transferasa. Se usaron un protocolo estándar y un kit que puede obtenerse comercialmente (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) con incubación mediante 3-aminoetilcarbazol y tinción mediante hematoxilina. El resultado puede
- 25 distinguirse en la figura 5. En el grupo control se observaron sólo pocas células positivamente apoptóticas ( $0,6 \pm 0,3$  de recuento de células promedio), mientras que en el grupo con HTK es significativamente elevado el número ( $2,12 \pm 0,13$ ). El grupo con HTK+hidroxiectoína muestra en comparación con esto una tasa de apoptosis significativamente más baja ( $0,76 \pm 0,17$ ).

30 Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las leyes de protección de animales de la República Federal de Alemania. Se aplicaron los principios del *Laboratory Animal Care* (NIH, 1985).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una solución de almacenamiento para la conservación de órganos, tejidos o sistemas de órganos para trasplante, en el que dicha solución de almacenamiento contiene histidina, triptófano y  $\alpha$ -cetoglutarato o sales correspondientes y en donde los órganos o los tejidos para trasplante se seleccionan del grupo que está constituido por riñón, hígado, páncreas y córnea, **caracterizado porque** la solución de almacenamiento contiene ectoína, hidroxietoína y/o una sal de la ectoína o de la hidroxietoína.
2. Uso de una solución de almacenamiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la solución de almacenamiento contiene hidroxietoína.
- 10 3. Uso de una solución de almacenamiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la concentración de ectoína y/o de hidroxietoína asciende a de 0,1 a 100 mM.
4. Uso de una solución de almacenamiento según la reivindicación 3, **caracterizado porque** la concentración de ectoína y/o de hidroxietoína asciende a de 1 a 10 mM.
5. Uso de una solución de almacenamiento según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la concentración de ectoína y/o de hidroxietoína asciende a de 4 a 7 mM.
- 15 6. Uso de una solución de almacenamiento según la reivindicación 5, **caracterizado porque** la concentración de ectoína y/o de hidroxietoína asciende a aprox. 5 mM.

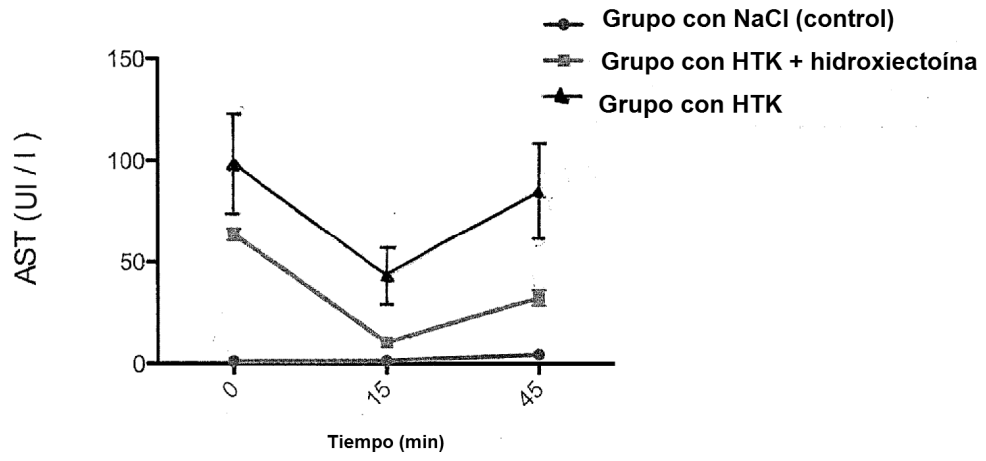


Fig. 1

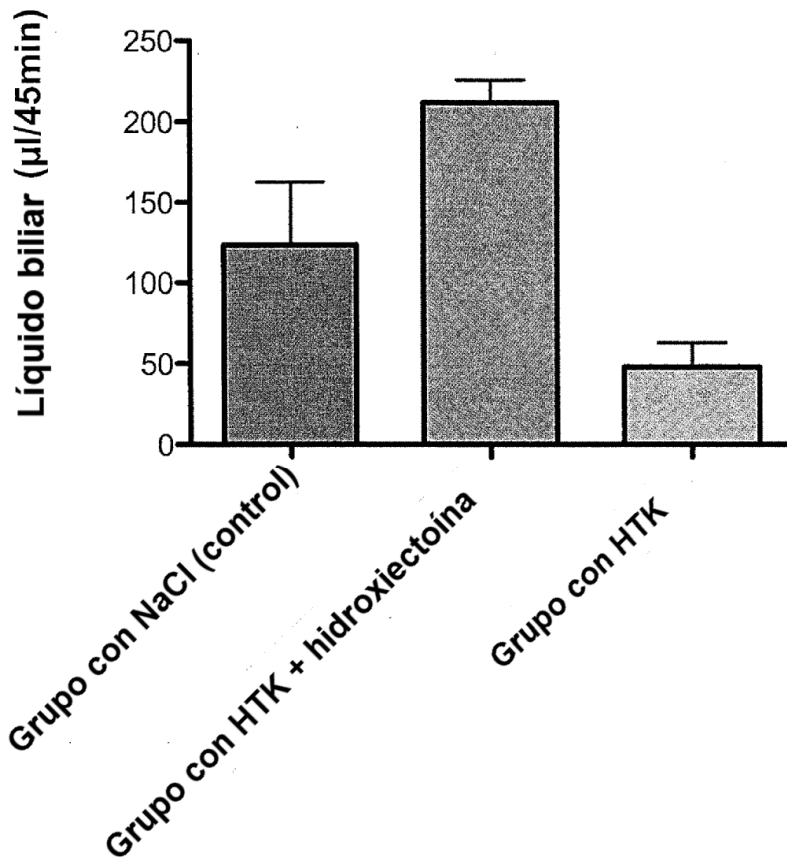


Fig. 2



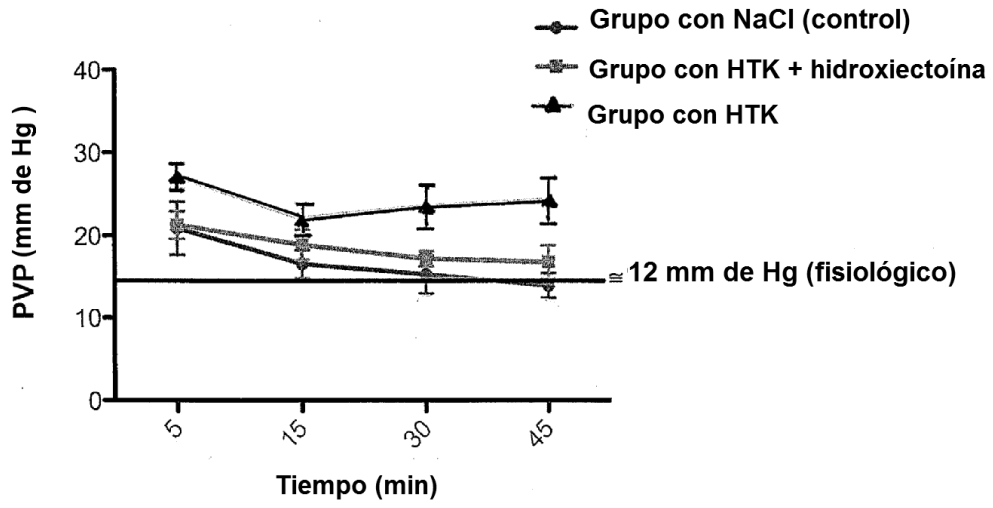


Fig. 3

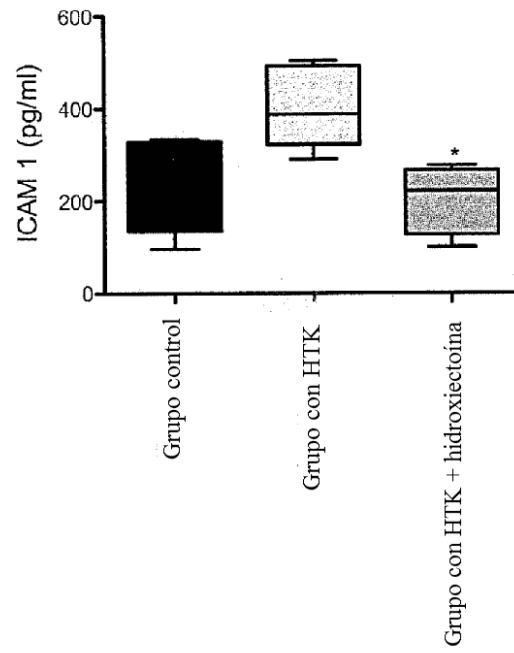


Fig. 4

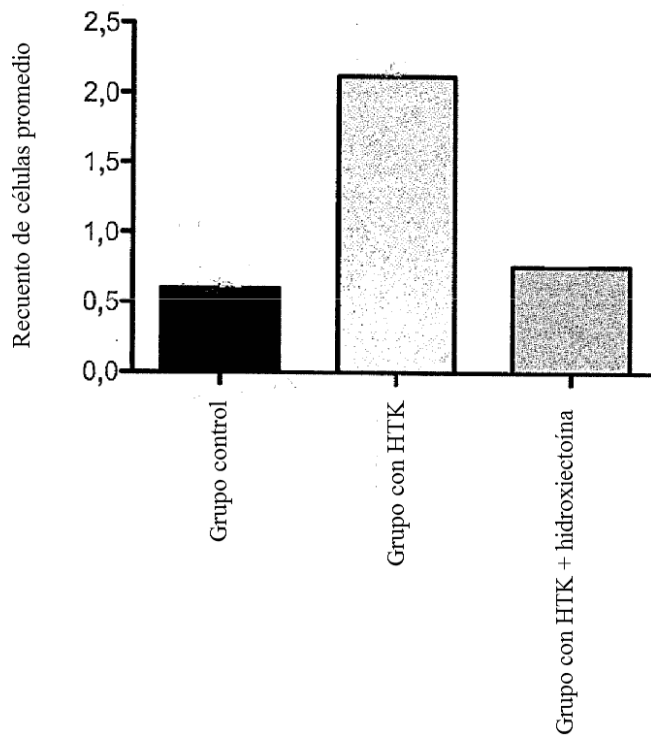


Fig. 5