

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 575**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2014 PCT/FR2014/052897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2014 E 14821702 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 3068219**

54 Título: **Solución acuosa de conservación de un órgano y usos durante la isquemia hipotérmica**

30 Prioridad:

15.11.2013 FR 1361227

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

07.06.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (50.0%)
43 Boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex, FR y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

FERRERA, RENÉ

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 671 575 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 acuosa de conservación de un órgano y usos durante la isquemia hipotérmica

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere al campo técnico de las soluciones de conservación de órganos. Más específicamente, la invención se refiere a soluciones acuosas de conservación de un órgano, y preferentemente del miocardio, que comprenden ciclosporina A y taxol y sus usos durante la isquemia hipotérmica.
- 10 **[0002]** Sin embargo, hay una serie de solutos (menos de diez) que se utilizan en la práctica clínica para la conservación de un injerto cardíaco. Sin embargo, la vida útil del injerto cardíaco antes del trasplante está limitado actualmente a 4-6 horas, lo cual es bastante corta.
- [0003]** Es, por lo tanto, deseable proponer soluciones que permitan mejorar la vida útil al tiempo que garantiza la viabilidad del órgano.
- 15 **[0004]** Cientos de moléculas son potencialmente cardioprotectoras durante un infarto (situación de isquemia caliente del corazón). Algunas de estas moléculas como la ciclosporina A (J. Heart Lung Transplant. 2000, 19(1), 41; documento WO 01/20982; J. Card. Sur. 2000, Nov-Dec, 15(6), 392-402; Transplantation 2003, 15, 76(9), 1314-20 y J. Thorac Cardiovasc. Surg. 2008 Mar, 135(3), 585-93) o el taxol (documento EP 0 806 140; documento WO 20 02/41696) han demostrado su eficacia incluso durante la fase de parada hipotérmica (situación de isquemia fría del injerto cardíaco). La acción del taxol en el poro de transición mitocondrial es, a su vez, controvertida (Clinical Cardiology, vol. 32, Resultado 6, páginas E94-E96; Ann. Pharmacother. 1996 Oct, 30(10), 1110-2; J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown), 2009 Apr, 10(4), 336-9; Eur. J. Med. Res. 2005, Nov 16, 10(11), 498-501; FEBS Lett. 1996 Sep 9, 393(1), 86-8; J. Biol. Chem. 2002, Feb. 22, 227(8), 6504-10 y J. Biol. Chem. 2005, Jan 7, 280(1), 715-21).
- 25 **[0005]** Otras moléculas también han sido objeto de evaluación en la protección del injerto durante la isquemia fría, como los perfluorocarbonos (Transplantation, 2010 May 27;89(10):1169-75), los agentes antirradicales (J Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 2012 Mar;17(1):93-101), la eritropoyetina, EPO (J Heart Lung Transplant. 2013 Jun;32(6):633-40), la taurina (Heart Vessels. 2005 Nov;20(6):278-85), o la inhibición de ciertos factores como las metaloproteinasas MMP2 (Cardiovasc Toxicol. Cardiovasc. Toxicol. 2013 Oct 9., Epub ahead of print) o TNFa por ARNips (Circulation, 2009 Sep 22;120(12):1099-107).
- 30 **[0006]** A modo de ejemplos de soluciones propuestas, se puede citar los trabajos de uno de los inventores de la presente solicitud de patente, y en particular los descritos en J. Heart Lung Transplant, 2002, 21: 1030-1039, que describe una primera generación de solución denominada LYPS. En el artículo publicado en Bull. Acad. Natle Méd., 2011, 195 n.º 4 y 5, sesión del 31 de mayo de 2011, páginas 861-881, se hace hincapié en que es muy difícil establecer estudios comparativos de los medios de conservación. Una solución LYPS es citada junto con otras once soluciones utilizadas, algunas en clínica.
- 35 **[0007]** Uno de los objetivos de la invención es proporcionar una nueva solución de conservación de órganos cardíacos, particularmente adecuada para una conservación en hipotermia. Esta solución debe extender la vida útil de los órganos cardíacos garantizando al mismo tiempo la viabilidad y las posibilidades de trasplantes posteriores.
- [0008]** En este contexto, la invención se refiere a una solución acuosa de conservación del miocardio que
45 comprende:
- de 100 a 130 mM de Na⁺,
 - de 12 a 15 mM de K⁺,
 - de 0,25 a 1,3 mM de Ca⁺⁺,
 - 50 - de 0,25 a 1,5 µM de ciclosporina A, y
 - de 0,25 a 1,5 µM de taxol.
- [0009]** Las composiciones según la invención, comprenden preferentemente 1 ± 0,3 µM de taxol y 1 ± 0,3 µM de ciclosporina A y preferentemente 1 µM de taxol y 1 µM de ciclosporina A.
- 55 **[0010]** La invención también tiene por objeto el uso conjunto de ciclosporina A y taxol en una solución utilizada para la conservación *in vitro* del miocardio, el uso conjunto de ciclosporina A y taxol en una solución utilizada para la perfusión o la inmersión hipotérmica del miocardio *in vitro*, así como el uso conjunto de ciclosporina A y taxol en una solución utilizada para la conservación del miocardio, y en particular de un injerto cardíaco, en

hipotermia, en particular durante una isquemia fría, por ejemplo a una temperatura de 4 °C a 15 °C. La invención también tiene por objeto los procedimientos de conservación y perfusión asociados.

[0011] En tales usos y procedimientos, el miocardio o injerto cardíaco se puede sumergir en la solución de conservación que contiene la combinación de ciclosporina A/taxol. Es posible utilizar la solución de conservación a modo de soluciones cardioplégicas, en particular para realizar una perfusión hipotérmica de un órgano cardíaco, en particular a modo de una solución fisiológica en un dispositivo tal como el que se describe en la solicitud WO2011/077024.

10 **[0012]** En tales usos y procedimientos, la ciclosporina A y el taxol se utilizan en conjunto, en particular para asegurar la viabilidad del miocardio, y en particular de un injerto cardíaco, antes del trasplante. Su uso conjunto permite mejorar el efecto obtenido respecto a la viabilidad de las células del miocardio, especialmente cuando estas últimas se colocan en hipotermia y luego se someten a una reperfusión. Los procedimientos y usos descritos para el miocardio pueden extenderse a cualquier tipo de órgano tal como el riñón o el hígado. Tales órganos, cuando se
15 utilizan como injertos se colocan durante largas horas en una situación de conservación estática hipotérmica a 4 °C (isquemia fría), durante la cual es necesario evitar que los tejidos del injerto se alteren progresivamente. La asociación de ciclosporina A/taxol según la invención, y en particular las soluciones de conservación que se describen en el contexto de la invención, permitirán proteger las células de estos injertos diferentes de dolores relacionados con esta isquemia fría. Ventajosamente, en tales usos y procedimientos, la ciclosporina y el taxol están
20 presentes cada uno en la solución a una concentración de $1 \pm 0,5 \mu\text{M}$, preferentemente a una concentración de $1 \pm 0,3 \mu\text{M}$, y preferentemente a una concentración de $1 \mu\text{M}$. Preferentemente, la ciclosporina y el taxol se utilizan en una solución tal como se define en el contexto de la invención.

[0013] La invención se describirá ahora en detalle.

25 **[0014]** En la presente descripción, las concentraciones se dan con respecto a la solución total. mM corresponde a mmol/l. En el caso de la insulina, UI corresponde a Unidad Internacional de actividad.

[0015] En las soluciones de conservación según la invención, se utilizan dos agentes, por primera vez, en
30 combinación en el contexto de la cardioprotección del injerto cardíaco: se trata de la ciclosporina A (número de registro CAS: 59865-13-3) y taxol (también conocido con el nombre de paclitaxel - número de registro CAS 33069-62-4. Estos dos compuestos actúan sinérgicamente y aseguran una acción anti-isquémica. Por lo tanto, la ciclosporina A (CsA) está destinada a inhibir el MFTP (poro de transición de permeabilidad mitocondrial), mientras que el taxol presenta una acción de estabilización de microtúbulos celulares. Sin embargo, el taxol también posee
35 una acción no deseada inversa de la ciclosporina A (apertura del MPTP). La combinación CsA-taxol contemplada, en el contexto de la invención, permite conservar los efectos beneficiosos del taxol limitando al mismo tiempo los efectos cardiovasculares perjudiciales.

[0016] Las soluciones según la invención tienen por objeto alargar el tiempo de conservación de un órgano, preferentemente del miocardio y en particular de los injertos cardíacos, mientras que se mantiene la viabilidad del órgano de manera óptima.

[0017] Además, una solución de conservación según la invención presenta las siguientes características:

45 - Se trata de una solución de tipo extracelular. Contiene de 100 a 130 mM de Na^+ , y preferentemente de 120 ± 10 mM de Na^+ . Esta concentración sub-fisiológica está destinada a prevenir la sobrecarga sódica intracelular (resultado de la apertura de los canales sódicos dependientes del potencial) y, en consecuencia, la sobrecarga cálcica resultante.

- Aunque de tipo extracelular, la composición, sin embargo, comprende un nivel de potasio moderadamente elevado.
50 Contiene de 12 al 15 mM de K^+ , y preferentemente de 13 ± 1 mM de K^+ . Esta concentración no fisiológica de K^+ es, a la vez, lo suficientemente elevada para inducir una cardioplejia (parada del corazón) por despolarización de los cardiomiocitos; y lo suficientemente baja para cuidar el endotelio vascular, muy sensible a los valores elevados de K^+ .

- Se trata de una solución con un bajo contenido de calcio. Contiene de 0,25 a 1,3 mM de Ca^{++} , y preferentemente
55 de $1 \pm 0,3$ mM de Ca^{++} . Esta concentración de calcio está destinada a evitar la sobrecarga cálcica extremadamente perjudicial para el corazón.

[0018] La presencia de estos iones diferentes, a concentraciones preconizadas anteriormente, permite simultáneamente la parada del corazón (cardioplejia) y la protección contra la invasión cálcica.

[0019] Ventajosamente, en las soluciones según la invención, el bajo contenido de calcio está asociado con uno o incluso con dos compuestos que regulan sus intercambios, a fin de mejorar aún más la protección contra la invasión cálcica:

- 5 - el magnesio Mg^{++} , competidor de Ca^{++} , presente preferentemente en la composición a razón de 3,5 a 13 mM, y preferentemente a razón de $4 \pm 0,5$ mM, y/o
- la procaína inhibidor de los canales sódicos y, en consecuencia, inhibidor de la entrada de calcio en la célula por el intercambiador Na/Ca, presente preferentemente en la composición a razón de $1 \pm 0,5$ mM. Además, la entrada de Na^+ puede ser perjudicial para la célula en hipotermia debido al inductor del edema. La procaína que inhibe esta
- 10 entrada celular de Na^+ tiene un papel de protección contra los edemas.

[0020] Ventajosamente, las soluciones de conservación según la invención contienen polietilenglicol (PEG), y en particular dos tipos diferentes de PEG: PEG con un peso molecular promedio de 8.000 Da ± 10 % se utiliza para su actividad osmótica vascular y PEG con un peso molecular promedio de 20.000 Da ± 10 % utilizado para su

15 función antiinflamatoria y de inmunoenmascaramiento de los sitios antigénicos. El uso de estos dos PEG permite combatir más eficazmente contra el edema. Convencionalmente, el peso molecular de los PEG se puede determinar utilizando el procedimiento de permeación cromatográfica en gel.

[0021] En particular, la solución según la invención comprenderá:

- 20 - un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 8.000 daltons ± 10 % a razón de $2 \pm 0,5$ g/l, y
- un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 20.000 daltons ± 10 %, a razón de $3 \pm 0,5$ g/l.

[0022] También es deseable que las soluciones de conservación según la invención contengan sustratos y/o

25 activadores metabólicos:

- la glucosa asociada con la insulina para estimular la glicólisis anaerobia: la insulina estimula la entrada y el uso de glucosa en la célula; y/o
- el piruvato asociado a la insulina destinado a activar la glicólisis aerobia: la insulina estimula el uso de piruvato en
- 30 la mitocondria para producir energía. El piruvato tiene una función antiradical; y/o
- el glutamato asociado con el aspartato para estimular el ciclo de krebs: el aspartato y el glutamato, son 2 aminoácidos capaces, en combinación y en presencia de piruvato, de ser utilizados por la mitocondria en ausencia de oxígeno, para producir energía.

35 **[0023]** Estos compuestos diferentes actúan sinérgicamente y permiten una activación del metabolismo de las células cardíacas a pesar de una hipotermia profunda, por ejemplo, a $4^\circ C$, en particular la activación del ciclo de krebs y en consecuencia la fosforilación oxidativa mitocondrial.

[0024] Además, ventajosamente, las soluciones de conservación según la invención, comprenden:

- 40 - de 250 ± 10 UI/l de insulina y de 20 ± 1 mM de glucosa,
- de 250 ± 10 UI/l de insulina y de $2,5 \pm 0,1$ mM de piruvato,
- de 250 ± 10 UI/l de insulina, de 20 ± 1 mM de glucosa, y de $2,5 \pm 0,1$ mM de piruvato,
- de $2,5 \pm 0,1$ mM de piruvato, de 2 ± 1 mM de aspartato y de $1,4 \pm 1$ mM de glutamato,
- 45 - de 250 ± 10 UI/l de insulina, de $2,5 \pm 0,1$ mM de piruvato, de 2 mM ± 1 de aspartato y de $1,4 \pm 1$ mM de glutamato,
- de 250 ± 10 UI/l de insulina, de 20 ± 1 mM de glucosa, de $2,5 \pm 0,1$ mM de piruvato, de 2 ± 1 mM de aspartato y $1,4 \pm 1$ mM de glutamato,
- de 250 ± 10 UI/l de insulina, de 20 ± 1 mM de glucosa, de $2,5 \pm 0,1$ mM de piruvato, de 2 ± 1 mM de aspartato y de
- 50 $1,4 \pm 1$ mM de glutamato.

[0025] En las soluciones según la invención, los iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} cuando estos últimos están presentes, son, en general, introducidos en forma de sales, en particular en forma NaCl, KCl, $CaCl_2$ y $MgCl_2$, respectivamente, o en forma de contraiones de otros compuestos introducidos, del tipo aspartato, piruvato y glutamato. Las soluciones según la invención constarán, por lo tanto, de iones Cl^- , en relación con las cantidades de

55 iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} presentes.

[0026] Las soluciones de conservación según la invención pueden contener opcionalmente adenosina, preferentemente a razón de 5 ± 1 mM. La adenosina es un vasodilatador y también un activador de la vía de señalización PKC, conocido por sus efectos cardioprotectores.

[0027] Las soluciones de conservación según la invención pueden contener opcionalmente, además, un agente antiradical, tal como el glutatión reducido (número de registro CAS 70-18-8), preferentemente a razón de 5 ± 1 mM.

5 **[0028]** Ventajosamente, las soluciones según la invención tienen una osmolaridad y/o un pH cercano(s) a los valores fisiológicos. Preferentemente, las soluciones de conservación según la invención presentan una osmolaridad en el intervalo que oscila de 280 y 320 mOsm/l, y preferentemente de aproximadamente 290 mOsm/l. Las soluciones de conservación según la invención están preferentemente tamponadas a un pH de $7,35 \pm 0,05$. Cualquier tipo de tampón adecuado, tal como una solución de HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina etano sulfónico), de
10 histidina o una solución fosfato, podrá utilizarse.

[0029] A modo de ejemplo particular de composiciones de una solución según la invención, se puede citar las composiciones que comprenden:

- 15 - 120 ± 10 mM de Na^+ ,
- 13 ± 1 mM de K^+ ,
- $1 \pm 0,3$ mM de Ca^{++} ,
- $1 \pm 0,5$ μM de ciclosporina A,
- $1 \pm 0,5$ μM de taxol,
- 20 - $4 \pm 0,5$ mM de Mg^{++} ,
- 130 ± 12 mM de Cl^- ,
- $2 \pm 0,5$ g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 8.000 daltons ± 10 %,
- 3 ± 1 g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 20.000 daltons ± 10 %,
- 250 ± 10 UI/l de insulina,
- 25 - 20 ± 1 mM de glucosa,
- $2,5 \pm 0,1$ mM de piruvato,
- 2 ± 1 mM de aspartato,
- $1,4 \pm 1$ mM de glutamato,
- $1 \pm 0,5$ mM de procaína,
- 30 - y agua.

[0030] También es posible añadir a esta composición 5 ± 1 mM de adenosina, y/o 5 ± 1 mM de glutatión reducido.

35 **[0031]** Esta solución puede estar tamponada a un pH de $7,35 \pm 0,1$ con un tampón HEPES.

[0032] A modo de ejemplo más específico de dicha composición, se puede citar una composición que comprende:

- 40 - 120 mM de Na^+ ,
- 13 mM de K^+ ,
- 1 mM de Ca^{++} ,
- 1 μM de ciclosporina A,
- 1 μM de taxol,
- 45 - 4 mM de Mg^{++} ,
- 130 mM de Cl^- ,
- 2 g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 8.000 daltons,
- 3 g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 20.000 daltons,
- 250 UI/l de insulina,
- 50 - 20 mM de glucosa,
- 2,5 mM de piruvato,
- 2 mM de aspartato,
- 1,4 mM de glutamato,
- 1 mM de procaína,
- 55 - y agua.

[0033] La composición de tales soluciones da como resultado una selección de cientos de posibles compuestos, a una concentración cuasi-óptima, combinados con otros compuestos con los que interactúan, lo que permite actuar con diferentes niveles de protección del corazón en hipotermia, y otorga eficacia particularmente

satisfactoria a dichas soluciones.

5 **[0034]** También es posible que las soluciones de conservación según la invención contengan un fluidificante de membrana, tal como etanol, preferentemente, a razón de 10 ± 5 mM. Tal compuesto sería destinado a fluidificar las membranas celulares que tienden a endurecerse durante la hipotermia, bloqueando las bombas iónicas.

10 **[0035]** Los siguientes ejemplos, en referencia a las Figuras anexas, permiten ilustrar la invención pero no tienen ningún carácter limitativo.

La **Figura 1** pone de manifiesto el efecto de la ciclosporina y el taxol respecto a la viabilidad de los cardiomiocitos primarios de rata.

15 La **Figura 2** pone de manifiesto el efecto de la ciclosporina y el taxol respecto a la viabilidad de los cardiomiocitos H9c2.

La **Figura 3** pone de manifiesto el efecto sinérgico de la ciclosporina y el taxol respecto a la viabilidad de los cardiomiocitos primarios de rata.

20 La **Figura 4** pone de manifiesto el efecto sinérgico de la ciclosporina y el taxol respecto a la viabilidad de los cardiomiocitos H9c2.

25 La **Figura 5** pone de manifiesto el efecto sinérgico de la ciclosporina y el taxol respecto a corazones enteros de rata después de una isquemia fría - reperfusión.

La **Figura 6** pone de manifiesto el efecto sinérgico de la ciclosporina y el taxol respecto a la necrosis de corazones enteros de rata en reperfusión.

EJEMPLOS

30 **[0036]** El objetivo general de los siguientes estudios es mejorar la supervivencia de las células cardiacas sometidas a una isquemia fría (4 °C), seguido de una reperfusión normotérmica, situación encontrada por el injerto cardíaco antes del trasplante.

35 **[0037]** El uso combinado de ciclosporina A y taxol se evaluó con el fin de poner de manifiesto su acción sinérgica.

[0038] En este estudio, los modelos utilizados son:

- 40 - cultivo celular de cardiomiocitos de rata (en cultivo primario y en línea).
- corazón aislado perfundido de rata en modo Langendorff.

1 Determinación de las concentraciones óptimas

45 1-1 Material y procedimientos

1-1-1 Preparación de cardiomiocitos primarios

50 **[0039]** Se trata de un modelo clásico de cultivo primario de cardiomiocitos. Aproximadamente 40 ratas recién nacidas se utilizan para cada experimento. Las ratas pequeñas fueron decapitadas y colocadas durante 5 segundos en un vaso de precipitados que contiene alcohol a 70 °C. El ventrículo izquierdo de cada corazón se extrae cuidadosamente, a continuación, se deposita en un Erlenmeyer que contiene TFS frío (GIBCO, pH 7,4) conservado en hielo. Una vez que se han extraído todos los corazones, estos se lavaron 3 veces con TFS, después se transfirieron a una placa de Petri d35. Se reducen a continuación en fragmentos muy finos. Los fragmentos
55 obtenidos se lavan de nuevo 3 veces. Estos fragmentos se colocan en el tripsinador y se realizan 9 tripsinaciones (TFS con 0,3 % de tripsina) durante 10 min a 37 °C. Después de la centrifugación (10 min a 1.500 g), se eliminan los sobrenadantes y los sedimentos se suspenden en medio de crecimiento a 37 °C. Con el fin de separar los cardiomiocitos (CM) y los cardiofibroblastos (CF), se realizan 2 vínculos diferenciales (30 min y 120 min). Los diferentes tipos celulares se muestran en el medio de crecimiento suplementado con 15 % de SFB (PAA®), y se

contaron en la célula de Mallassez. Las células se sembraron a razón de $2,5 \cdot 10^5$ células/cm².

1-1-2 Preparación de cardiomiocitos en línea

5 **[0040]** Se trata de un modelo clásico de cultivo de cardiomiocitos de rata. Las células cardíacas H9c2 (ATTC®) proceden de ventrículos cardíacos de ratas transfectadas con un plásmido pSV3 que contiene el gen SV40. Estas células se cultivan en medio DMEM con un alto contenido de glucosa (PAA®) suplementado con 10 % de SFB Mycoplex (PAA®) y 1 % de penicilina-estreptomina. El medio se cambió cada 2 días y sus subcultivos se realizan a 70-80 % de confluencia.

10

1-1-3 Prueba de viabilidad con MTT

[0041] El MTT o trimetiltetrazolio (Sigma), es una molécula que se une a DH (deshidrogenasas) mitochondriales para formar, en presencia de coenzimas NAD⁺ y NADP⁺, cristales de formazán insolubles de color violeta. La coloración violeta formada indica la funcionalidad mitocondrial y por lo tanto la viabilidad celular. Estos cristales se solubilizan en una solución de permeabilización (dimetilsulfóxido, o DMSO, Sigma). Esta solubilización de formazán provoca además la lisis de las células. Una lectura de las placas se lleva a cabo por espectrofotometría (Multiskan Ex, Thermo, Electron Corporation ®) a 550 nm.

20 1-1-4 Procedimiento de isquemia fría-reperfusión

[0042] El objetivo de este protocolo es determinar el potencial efecto protector de su ciclosporina y/o taxol en cardiomiocitos colocados en situación de isquemia fría a 4 °C durante 24 horas, seguido de una perfusión durante 24 horas, con el fin de que se implemente un ensayo de viabilidad (ensayo de MTT). Un grupo llamado "simulado" no se somete a la secuencia de isquemia-reperfusión. Para cada una de las dosis ensayadas, 4 experimentos diferentes se llevan a cabo y en cada experimento, se ensayan simultáneamente 8 pocillos celulares diferentes.

25

[0043] El análisis estadístico consiste en una comparación de medias (prueba de Student entre el grupo estudiado y el grupo control).

30

1-2. Resultado. Modelo celular de células cardíacas de rata en cultivo primario.

[0044] La viabilidad de cardiomiocitos primarios se evalúa después de 24 horas de isquemia fría y 24 horas de perfusión. Durante la isquemia fría, las células se mantienen en diferentes medios y los resultados correspondientes se presentan en la Figura 1:

35

- En una solución basal de Saint Thomas (solución cardiopléjica) = grupo "control". La línea negra horizontal corresponde a la viabilidad básica de los cardiomiocitos en esta condición estándar de isquemia fría - perfusión.
- En la misma solución basal se añadió ciclosporina A (CsA) con el fin de obtener una concentración final en el medio de 0,25 µM (grupo CsA 0,25), o 0,5 µM (grupo CsA 0,5) o 1 µM (grupo CsA 1) o 5 µM (grupo CsA 5) o 10 µM (grupo CsA 10).
- En la misma solución basal se añadió taxol (Tx), con el fin de obtener una concentración final en el medio de 0,25 µM (grupo Tx 0,25), o 0,5 µM (grupo Tx 0,5) o 1 µM (grupo Tx 1) o 5 µM (grupo Tx 5) o 10 µM (grupo Tx 10).

40

45 **[0045]** El grupo simulado no se somete a la secuencia de isquemia fría - perfusión.

[0046] Los valores corresponden a la media ± EEM (n = 32, realizados en 4 series diferentes de experimentos durante 4 semanas). **: p < 0,01.

50 **[0047]** Los datos de la **Figura 1** indican que:

- La ciclosporina A, al igual que el taxol, es capaz, en determinadas concentraciones, de aumentar la viabilidad de las células cardíacas durante una secuencia de isquemia fría - perfusión.
- Existe un óptimo de concentración para cada uno de estos 2 agentes, alrededor de 1 µM (resultados enmarcados en la **Figura 1**), que permite aumentar la viabilidad de los cardiomiocitos en aproximadamente un 25 % (p < 0,01).

55

1-3 Resultado. Modelo celular de células cardíacas de la línea H9c2.

[0048] La viabilidad de los cardiomiocitos se evalúa después de 24 horas de isquemia fría y 24 horas de

reperusión. Durante la isquemia fría, las células se mantienen en diferentes medios y los resultados correspondientes se presentan en la **Figura 2**:

- En una solución basal de Saint Thomas (solución cardiopléjica) = grupo "control". La línea negra horizontal 5 corresponde a la viabilidad básica de los cardiomiocitos en esta condición estándar de isquemia fría - reperusión.
- En la misma solución basal se añadió ciclosporina A (CsA) con el fin de obtener una concentración final en el medio de 0,25 μM (grupo CsA 0,25), o 0,5 μM (grupo CsA 0,5) o 1 μM (grupo CsA 1) o 5 μM (grupo CsA 5) o 10 μM (grupo CsA 10).
- En la misma solución basal se añadió taxol (Tx), con el fin de obtener una concentración final en el medio de 0,25 10 μM (grupo Tx 0,25), o 0,5 μM (grupo Tx 0,5) o 1 μM (grupo Tx 1) o 5 μM (grupo Tx 5) o 10 μM (grupo Tx 10).

[0049] El grupo "simulado" no se somete a la secuencia de isquemia fría - reperusión.

[0050] Los valores corresponden a las medias \pm EEM ($n = 32$, realizados en 4 series diferentes de 15 experimentos durante 4 semanas). ***: $p < 0,001$.

[0051] Al igual que en el modelo anterior, los datos de la **Figura 2** confirman que:

- La ciclosporina A, al igual que el taxol, es capaz, en determinadas concentraciones, de aumentar la viabilidad de 20 las células cardíacas durante una secuencia de isquemia fría - reperusión.
- Existe un óptimo de concentración para cada uno de estos 2 agentes, alrededor de 1 μM (resultados enmarcados en la **Figura 2**), que permite aumentar la viabilidad de los cardiomiocitos en aproximadamente un 75 % para la ciclosporina A y un 90 % para el taxol ($p < 0,001$).

25 2. Búsqueda de un efecto sinérgico CsA-Tx

2-1 Material y procedimientos

[0052] Las células y los procedimientos utilizados son los mismos que en la parte 1.

30

[0053] La solución de St. Thomas utilizada en este trabajo tiene la siguiente composición (en mM): Na^+ : 147; K^+ : 20; Ca^{++} : 2; Mg^{++} : 16; Cl^- : 203; H_2O : csp. 1.000 ml. Osmolaridad: 388 mOsm/l.

[0054] La composición de la solución LYPS se proporciona en la **TABLA 1** a continuación.

35

TABLA 1: Composición de la solución LYPS

Componentes		LYPS
Iones		
Na^+		120 mM
K^+		13 mM
Ca^{2+}		1 mM
Mg^{2+}		4 mM
Cl^-		130 mM
Tampón		HEPES
Macromoléculas		
PEG (PM 8.000)		2 g/l
PEG (PM 20.000)		3 g/l
Sustratos metabólicos		
Glucosa		20 mM
Insulina		250 UI/l
Glutamato		1,4 mM
Aspartato		2 mM
Piruvato		2,5 mM
Agentes cardioprotectores		
Ciclosporina		1 μM

Taxol (paclitaxel) Procaína	1 μ M 1 mM
pH Osmolaridad (mOsm/l)	7,35 290-310

[0055] Para su preparación, esta solución se prepara de la siguiente manera:

- Pesar las sales (NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄), y disolverlas por agitación a temperatura ambiente en un volumen de agua conocido (aproximadamente 700 ml para una preparación de 1 litro de solución final).
- 5 - Añadir bajo agitación de Hepes, el clorhidrato de procaína, glucosa y piruvato de sodio.
- Pesar independientemente y disolver con agitación a una temperatura de 40 °C, en pequeños volúmenes de agua (alrededor de 25 ml para la preparación de 1 litro de solución final). Los siguientes compuestos: ácido glutámico, ácido aspártico, PEG 8.000 y PEG 20.000.
- Esperar a la disolución de los compuestos anteriores y añadirlos a la mezcla inicial, siempre en agitación.
- 10 - Añadir sucesivamente bajo agitación a temperatura ambiente los últimos 3 compuestos, previamente disueltos en su vehículo: insulina, ciclosporina A y paclitaxel.
- Ajustar el volumen a casi 1 l (950 ml para la preparación de 1 litro de solución final).
- Medir el pH a 25 °C: debe situarse a 4,80.
- Ajustar el pH a 7,15 con NaOH 10 N a 25 °C.
- 15 - Filtrar la solución a 0,22 μ m.
- Colocar la solución a 4 °C.
- Una vez que la temperatura se reduce, comprobar el pH a 4 °C: debe situarse alrededor de 7,40.

[0056] El piruvato, el glutamato y el aspartato se introducen respectivamente en forma de piruvato de sodio (C₃H₃NaO₃), ácido glutámico (C₅H₉NO₄) y ácido aspártico de potasio (C₄H₆KNO₄). Los iones Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ se introducen en forma NaCl, KCl, CaCl₂ y MgSO₄ para obtener las concentraciones totales deseadas al final.

2-2 Resultado. Modelo celular de células cardíacas de rata en cultivo.

25 **[0057]** Como anteriormente, (la viabilidad de los cardiomiocitos primarios se evalúa después de 24 horas de isquemia fría y 24 horas de reperfusión. Durante la isquemia fría, las células se mantienen en diferentes medios y los resultados correspondientes se presentan en la Figura 3:

- En una solución basal de Saint Thomas (solución cardiopléjica) = grupo "control".
- 30 - En la solución LYPS (sin ciclosporina A y sin taxol) = grupo "mixto metabólico" o "MM".
- En la misma solución "MM" al que se ha añadido solo ciclosporina A (CsA), solo taxol (Tx) o una combinación de CsA + Tx, con una concentración final en el medio de 1 μ M para cada uno de los 2 compuestos.
- Las mismas combinaciones que anteriormente se llevan a cabo con concentraciones de CsA y Tx 5 μ M y 10 μ M.

35 **[0058]** El grupo simulado no se somete a la secuencia de isquemia fría - reperfusión.

[0059] Los valores corresponden a las medias \pm EEM (n = 32, realizados en 4 series diferentes de experimentos durante 4 semanas). **: p <0,01.

40 **[0060]** Los datos de la **Figura 3** indican que:

- El mixto metabólico (MM = solución LYPS sin CsA ni Tx) protege mejor los cardiomiocitos que la situación control (= solución St. Thomas).
- La ciclosporina A y el taxol, añadidos solo a LYPS no aportan nada, en términos de efecto cardioprotector. De hecho, los grupos "MM + CSA 1 μ M", "MM + Tx 1 μ M", "MM + CsA 5 μ M", "MM + Tx 5 μ M", "MM + CsA 10 μ M", y "MM + Tx 10 μ M" son idénticos o incluso inferiores al grupo de referencia "MM".
- 45 - Solo la combinación CsA+Tx, añadida a LYPS a la concentración de 1 μ M, muestran un efecto cardioprotector marcado, con una viabilidad de las células aumentada en un 23 % con relación al único grupo LYPS "MM". Las otras combinaciones a 5 y 10 μ M no aportan nada y parecen aún más perjudiciales.

50

2-3 Modelo celular de células cardíacas de la línea H9c2.

Como anteriormente, la viabilidad de los cardiomiocitos H9c2 se evalúa después de 24 horas de isquemia fría y 24

horas de reperfusión. Durante la isquemia fría, las células se mantienen en diferentes medios y los resultados correspondientes se presentan en la **Figura 4**:

- En una solución basal de Saint Thomas (solución cardiopléjica) = grupo "control".
 - 5 - En la solución LYPS (sin ciclosporina A y sin taxol) = grupo "mixto metabólico" o "MM".
 - En la misma solución "MM" al que se añadió solo ciclosporina A (CsA), solo taxol (Tx) o una combinación de CsA + Tx, con una concentración final en el medio de 1 μ M para cada uno de los 2 compuestos.
 - Las mismas combinaciones que anteriormente se llevan a cabo con concentraciones de CsA y Tx 5 μ M y 10 μ M.
- 10 **[0062]** El grupo "simulado" no se somete a la secuencia de isquemia fría - reperfusión.
- [0063]** Los valores corresponden a la media \pm EEM (n = 32, realizados en 4 series diferentes de experimentos durante 4 semanas). **: p <0,001.

- 15 **[0064]** Los datos de la **Figura 4** confirman que:
- El mixto metabólico (MM = solución LYPS sin CsA ni Tx) protege mejor los cardiomiocitos que la situación control (= solución St. Thomas, barra negra).
 - La ciclosporina A y el taxol, añadidos solos a LYPS no aportan nada, en términos de efecto cardioprotector. De hecho, los grupos "MM + CSA 1 μ M", "MM + Tx 1 μ M", "MM + CsA 5 μ M", "MM + Tx 5 μ M", "MM + CsA 10 μ M", y "MM + Tx 10 μ M" son idénticos o incluso inferiores al grupo de referencia "MM".
 - Solo la combinación CsA+Tx, añadida a LYPS a la concentración de 1 μ M, muestra un efecto cardioprotector marcado, con una viabilidad de las células aumentada en un 34 % con relación al único grupo LYPS "MM". Las otras combinaciones a 5 y 10 μ M no aportan nada y parecen aún más perjudiciales.

25

3 Confirmación de un efecto sinérgico CsA-Tx respecto a un corazón entero

- [0065]** Con el fin de confirmar el efecto cardioprotector sinérgico de la asociación "ciclosporina A - taxol", se realizaron estudios sobre un modelo de corazón entero aislado de rata, sometido a una secuencia de isquemia fría - reperfusión. Para acercarse aún más a las condiciones encontradas en la clínica, se utilizó la solución Celsior, conocida por cirujanos y capaz de proporcionar una buena protección inicial contra las lesiones de isquemia - reperfusión. El taxol o la ciclosporina o la combinación de 2 agentes, se ensayaron a la concentración de 1 μ M, así como los trabajos anteriores lo recomendaban.
- 30
- 35 **[0066]** La solución Celsior es una solución acuosa que contiene 100 mM de Na⁺, 15 mM de K⁺, 0,25 mM de Ca²⁺, 41,5 mM de Cl⁻, 13 mM de Mg²⁺, 80 mM de lactobionato, 60 mM de manitol, 20 mM de glutamato, 30 mM de histidina, y 3 mM de glutatión reducido.

3-1 Material y procedimientos

40

3-1-1 Extracción de corazones e isquemia fría

- [0067]** Las ratas son anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). A continuación, se colocan en decúbito supino. Después del aislamiento de la vena femoral, la heparina se administra por vía intravenosa (200 UI/g). Se lleva a cabo una incisión abdominal y acto seguido torácica. El esternón se tira hacia la cabeza de la rata, utilizando una pinza, y el diafragma se disecciona. El corazón aislado de su pericardio se escinde y detiene en la solución hipotérmica de Celsior. A continuación, el corazón se perfundió durante 3 minutos con la misma solución añadida o no de ciclosporina A, taxol o la combinación de estos 2 agentes, para la concentración de 1 μ M en la solución final. Los corazones se colocan entonces a 4 °C en la misma solución durante 50 8 horas (es la fase de isquemia fría) antes de la reperfusión (es la fase de reanimación).

3-1-2 Reperfusión de los corazones y evaluación funcional

- [0068]** Tras las 8 horas de isquemia fría, el corazón está fijado por su aorta a una cánula, para una perfusión retrógrada continua con Krebs Henseleit (KH, cuya composición es la siguiente, en mM: Glucosa 11,0; NaCl 118,5; KCl 4,75; MgSO₄ 1,19; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 24,0; CaCl₂ 1,4). La presión impuesta, constante, es de 100 cm H₂O (correspondiente a 73 mm de Hg). La solución KH está en burbujeo continuo con 95 % de O₂ + 5 % de CO₂ (a fin de mantener el pH a 7,4. Esta técnica de perfusión es conocida por el experto en la materia y se denomina sistema de perfusión en modo Langendorff, o corazón palpitante que no trabaja.

[0069] Un balón de látex se instala en el ventrículo izquierdo y se conecta a un transductor de presión previamente calibrado por una calibración interna (0-200 mm de Hg). Al comienzo de la reperfusión, el balón se infla para obtener una presión telediastólica de 5 mm de Hg aproximadamente. Los electrodos de estimulación se instalan acto seguido en las aurículas. Los corazones se estimularon a una frecuencia de 300 latidos/min.

[0070] Un sistema de registro, compuesto de un sensor de presión, un monitor (HP 785 334 A) y un programa de adquisición de datos (Chart), permite medir los parámetros funcionales en diferentes momentos, incluyendo la presión ventricular izquierda desarrollada (PVID) y la frecuencia cardíaca (FC).

10

3-1-3 Evaluación de la necrosis miocárdica

[0071] Al final de la reperfusión, el corazón se corta en paralelo a la base en 5 cortes de 2 mm de espesor. Los cortes se incubaron a continuación durante 20 min a 37 °C en una solución de cloruro de trifeníltetrazolio (TTC) al 1 % a pH 7,4. El miocardio "viable" aparece en color rojo vivo, mientras que el área necrosada (AN) y zona infartada aparece como pálida sin marcar. Toda la superficie miocárdica se considera área de riesgo (AR). Para cada corte, la relación AN/AR se expresa en % y representa el tamaño del infarto. La suma de infartos de todos los cortes que pertenecen al mismo ventrículo izquierdo permite obtener la cantidad de necrosis del corazón en cuestión.

20

[0072] Las lactatos deshidrogenasas (LDH) y las creatinas fosfo-quinasas (CPK) se recogen en los efluentes coronarios de los corazones de rata perfundidos *in vitro*. Estas enzimas muestran la necrosis miocárdica. Su presencia en el efluente es proporcional al nivel de la necrosis miocárdica.

[0073] En la práctica, la velocidad de consumo de NADH se determina por fotometría (340 nm), es proporcional a la actividad de las enzimas en la muestra. Los resultados se expresan en UI/g en peso seco de corazón.

[0074] El análisis estadístico es una comparación de las medias (ANOVA), seguido del ensayo post-hoc de Bonferroni.

30

3-2 Protocolo sobre el modelo de corazón aislado perfundido

[0075] Este protocolo tiene como objetivo acercarse a las condiciones encontradas por el injerto cardíaco en situación clínica. Por tanto, se ha elegido trabajar en un modelo de corazón aislado colocado en isquemia fría-reperfusión. El objetivo de este estudio es así pues confirmar el potencial efecto cardioprotector y sinérgico de la ciclosporina asociada a taxol.

[0076] El protocolo implementado estudia el efecto de estos 2 agentes en la reactivación funcional y la necrosis de los corazones sometidos a una isquemia fría durante 8 horas a 4 °C, seguido de una reperfusión durante 1 hora a 37 °C, en modo Langendorff. Cuatro grupos de 6 corazones fueron asignados al azar según se indica:

- Un grupo "control", en el que los corazones se conservan 8 horas bajo isquemia fría en la solución Celsior,
- Un grupo "Tx", en el que los corazones se conservan 8 horas bajo isquemia fría en la solución Celsior suplementada con taxol a 1 µM,
- Un grupo "CsA", en el que los corazones se conservan 8 horas bajo isquemia fría en la solución Celsior suplementada con ciclosporina a 1 µM,
- Un grupo "Tx + CsA", en el que los corazones se conservan 8 horas bajo isquemia fría en la solución Celsior suplementada con taxol y ciclosporina, ambos a 1 µM.

50

3-3 Resultados funcionales

[0077] La **Figura 5** presenta los resultados obtenidos en los corazones mantenidos durante 8 horas a 4 °C en la solución Celsior (grupo "control"), suplementada con 1 µM de taxol (grupo "taxol") o 1 µM de ciclosporina A (grupo "ciclo-A"), o 1 µM de ciclosporina A y taxol (grupo "taxol + ciclo"). El grupo "simulado" es un control no isquémico. Al final de la isquemia fría, los corazones se reperfundieron durante una hora y se realizaron evaluaciones funcionales: el índice PVIDxFC corresponde a la presión ventricular izquierda desarrollada (PVID) multiplicado por la frecuencia cardíaca (FC). Los datos son las medias de 6 corazones ± EEM ** p <0,01; *** p <0,001.

55

[0078] Los datos de la **Figura 5** confirman que:

- El taxol solo, al igual que la ciclosporina A, solo a 1 μM mejora la recuperación de los corazones en la reperfusión. De hecho, se observa una ganancia de 25 % de PVIDxFC en comparación con el grupo control ($p < 0,01$).
- 5 - El taxol asociado con la ciclosporina A induce una mayor protección de los corazones en la reperfusión. Así, la función se mejora de un 50 a 80 % en comparación con otros grupos conservados ($p < 0,001$).
- Al igual que la ciclosporina y el taxol se utilizan en este caso con su concentración máxima de eficacia (1 μM), solo una acción sinérgica de los 2 agentes también puede explicar la mejora significativa observada.

10 **3-4. Resultados con respecto a la necrosis**

[0079] Los corazones se conservan durante 8 horas a 4 °C en la solución Celsior (grupo "control"), suplementada con 1 μM de taxol (grupo "taxol"), o 1 μM de ciclosporina A (grupo "ciclo"), o 1 μM de ciclosporina A y taxol (grupo "Tx+ciclo"). Al final de la isquemia fría, los corazones se reperfundieron y el tamaño del infarto se
 15 analiza histológicamente tras la tinción TTC. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 6** en la que los datos son las medias de 6 corazones \pm EEM ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (en comparación con el grupo control).

[0080] Los datos de la **Figura 6**, por la medición del tamaño del infarto, también confirman que el taxol asociado con la ciclosporina induce una protección máxima en la que el infarte cae a 6,9 % de la zona de riesgo
 20 (contra 8,7 % y 9,7 % respectivamente para Tx y CsA solo), lo que corresponde a una reducción del 47 % en comparación con el grupo control ($p < 0,001$).

4 Conclusiones

25 **[0081]** Los estudios llevados a cabo pusieron de manifiesto el impacto del uso combinado de ciclosporina A y taxol respecto a la viabilidad del corazón, sometido a una secuencia de isquemia fría - reperfusión, situación encontrada en clínica humana durante la conservación de injertos cardíacos.

[0082] Las conclusiones son las siguientes.

30

En los modelos celulares:

[0083]

- 35 - La ciclosporina A, al igual que el taxol, aumenta, a ciertas concentraciones, la viabilidad de las células cardíacas durante una secuencia de isquemia fría - reperfusión.
- Existe un óptimo de concentración para cada uno de estos 2 agentes, alrededor de 1 μM que permite aumentar la viabilidad de los cardiomiocitos entre un 25 y 75 % para la ciclosporina A y entre un 25 y 90 % para el taxol, según el modelo celular utilizado.
- 40 - La ciclosporina A y el taxol, solo añadidos a la solución LYPS no aportan nada en términos de efecto cardioprotector. En cambio, la combinación CsA+Tx, añadida a la solución LYPS a una concentración de 1 μM , muestra un efecto cardioprotector marcado, con un aumento de la viabilidad de las células que oscila entre un 23 y 34 %, según el modelo celular utilizado. Tenga en cuenta que otras combinaciones a 5 y 10 μM no aportan nada y parecen aún más perjudiciales, lo que confirma una vez más la idea de una concentración óptima. Estos resultados,
 45 obtenidos en 2 modelos celulares diferentes de cardiomiocitos en cultivo, apoyan la idea de una acción sinérgica de los 2 compuestos puesto que la eficacia anti-isquémica observada solo resulta de una sola condición: la presencia de los 2 compuestos en su concentración óptima.

En el modelo de corazón aislado:

50

[0084]

- El taxol asociado con la ciclosporina A en la solución Celsior también induce una mayor protección de los corazones en la reperfusión (función mejorada en un 80 %, necrosis disminuida en un 47 %).
- 55 - Al igual que la ciclosporina y el taxol se utilizan para su concentración máxima de eficacia (1 μM), solo una acción sinérgica de los 2 agentes también puede explicar la mejora significativa observada.

REIVINDICACIONES

1. Solución acuosa de conservación de un órgano, y en particular del miocardio, que comprende:
 - 5 - de 100 a 130 mM de Na⁺,
 - de 12 a 15 mM de K⁺,
 - de 0,25 a 1,3 mM de Ca⁺⁺,
 - de 0,5 a 1,5 µM de ciclosporina A, y
 - de 0,5 a 1,5 µM de taxol.
- 10 2. Solución según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende:
 - 120 ± 10 mM de Na⁺,
 - 13 ± 1 mM de K⁺, y
 - 15 - 1 ± 0,3 mM de Ca⁺⁺.
3. Solución según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** comprende, además, magnesio Mg^{**}, presente preferentemente a razón de 3,5 a 13 mM, y preferentemente a razón de 4 ± 0,5 mM.
- 20 4. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** comprende, además:
 - un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 8.000 daltons ± 10 %, preferentemente a razón de 2 ± 0,5 g/l,
 - y
 - 25 - un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 20.000 daltons ± 10 %, preferentemente a razón de 3 ± 0,5 g/l.
5. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** comprende insulina y glucosa, preferentemente a razón respectivamente de 250 ± 10 UI/l y de 20 ± 1 mM.
- 30 6. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** comprende insulina y piruvato, preferentemente a razón respectivamente de 250 ± 10 UI/l y de 2,5 ± 0,1 mM.
7. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** comprende
- 35 piruvato, aspartato y glutamato, preferentemente a razón respectivamente de 2,5 ± 0,1 mM, de 2 ± 1 mM y de 1,4 ± 1 mM.
8. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** comprende, además, procaína presente, preferentemente, a razón de 1 ± 0,5 mM.
- 40 9. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** comprende, además, adenosina, preferentemente a razón de 5 ± 1 mM.
10. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** comprende,
- 45 además, glutatión reducido, preferentemente a razón de 5 ± 1 mM.
11. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada porque** comprende, incluso está constituida exclusivamente de:
 - 50 - 120 ± 10 mM de Na⁺,
 - 13 ± 1 mM de K⁺,
 - 1 ± 0,3 mM de Ca⁺⁺,
 - 1 ± 0,5 µM de ciclosporina A,
 - 1 ± 0,5 µM de taxol,
 - 55 - 4 ± 0,5mM de Mg⁺⁺,
 - 130 ± 12 mM de Cl⁻,
 - 2 ± 0,5 g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 8.000 daltons ± 10 %,
 - 3 ± 1 g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 20.000 daltons ± 10 %,
 - 250 ± 10 UI/l de insulina,

- 20 ± 1 mM de glucosa,
 - 2,5 ± 0,1 mM de piruvato,
 - 2 ± 1 mM de aspartato,
 - 1,4 ± 1 mM de glutamato,
 - 5 - 1 ± 0,5 mM de procaína,
 - y agua.
12. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada porque** comprende 1 ± 0,3 µM de taxol y 1 ± 0,3 µM de ciclosporina A.
- 10 13. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizada porque** comprende, incluso está constituida exclusivamente de:
- 120 mM de Na⁺,
 - 15 - 13 mM de K⁺,
 - 1 mM de Ca⁺⁺,
 - 1 µM de ciclosporina A,
 - 1 µM de taxol,
 - 4 mM de Mg⁺⁺,
 - 20 - 130 mM de Cl⁻,
 - 2 g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 8.000 daltons,
 - 3 g/l de polietilenglicol con un peso molecular promedio de 20.000 daltons,
 - 250 UI/l de insulina,
 - 20 mM de glucosa,
 - 25 - 2,5 mM de piruvato,
 - 2 mM de aspartato,
 - 1,4 mM de glutamato,
 - 1 mM de procaína,
 - y agua.
- 30 14. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizada porque** presenta una osmolaridad en el intervalo que va de 280 a 320 mOsm/l, preferentemente del orden de 290 mOsm/l.
15. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizada porque** está tamponada
- 35 a un pH de 7,35 ± 0,05.
16. Solución según la reivindicación 15, **caracterizada porque** está tamponada con la solución de HEPES.
- 40 17. Solución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizada porque** comprende, además, un fluidificante de membranas, tal como etanol, preferentemente a razón de 10 ± 5 mM.
18. Uso conjunto de ciclosporina A y taxol en una solución para la conservación *in vitro* de un órgano, y preferentemente del miocardio.
- 45 19. Uso conjunto *in vitro* de ciclosporina A y taxol en una solución para la perfusión hipotérmica o la inmersión hipotérmica de un órgano, y preferentemente del miocardio.
20. Uso conjunto de ciclosporina A y taxol en una solución para la conservación de un órgano en
- 50 hipotermia, y preferentemente del miocardio, y en particular de un injerto cardíaco.
21. Uso según la reivindicación 20, **caracterizado porque** la solución se utiliza durante una isquemia fría, en particular a una temperatura de 4 °C a 15 °C.
- 55 22. Uso según una de las reivindicaciones 18 a 21 para asegurar la viabilidad de un órgano, y preferentemente del miocardio, y en particular de injerto cardíaco, antes del trasplante.
23. Uso según una de las reivindicaciones 18 a 22, **caracterizado porque** la ciclosporina y el taxol están cada uno presentes en la solución a una concentración de 1 ± 0,5 µM, preferentemente a una concentración de 1 ±

0,3 μM y preferentemente a una concentración de 1 μM .

24. Uso según una de las reivindicaciones 18 a 23, **caracterizado porque** la ciclosporina y el taxol están en una solución tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

5

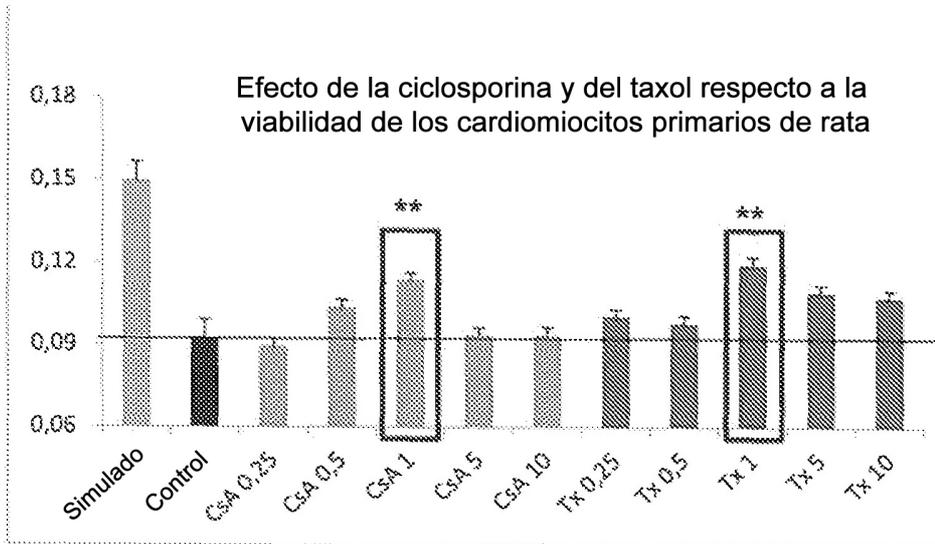


Figura 1

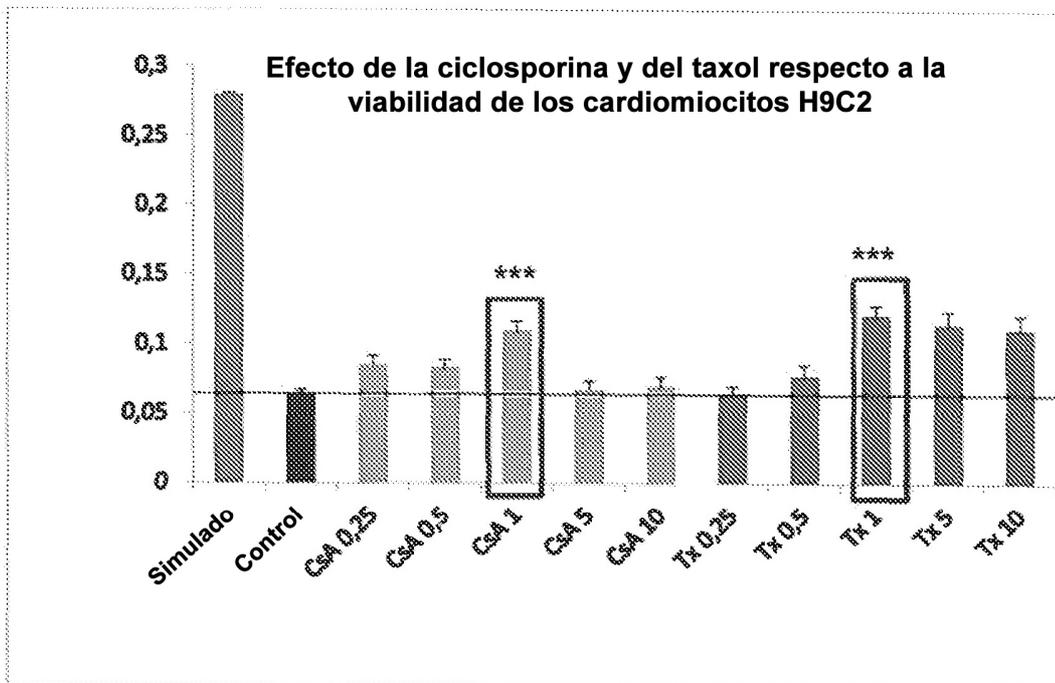


Figura 2

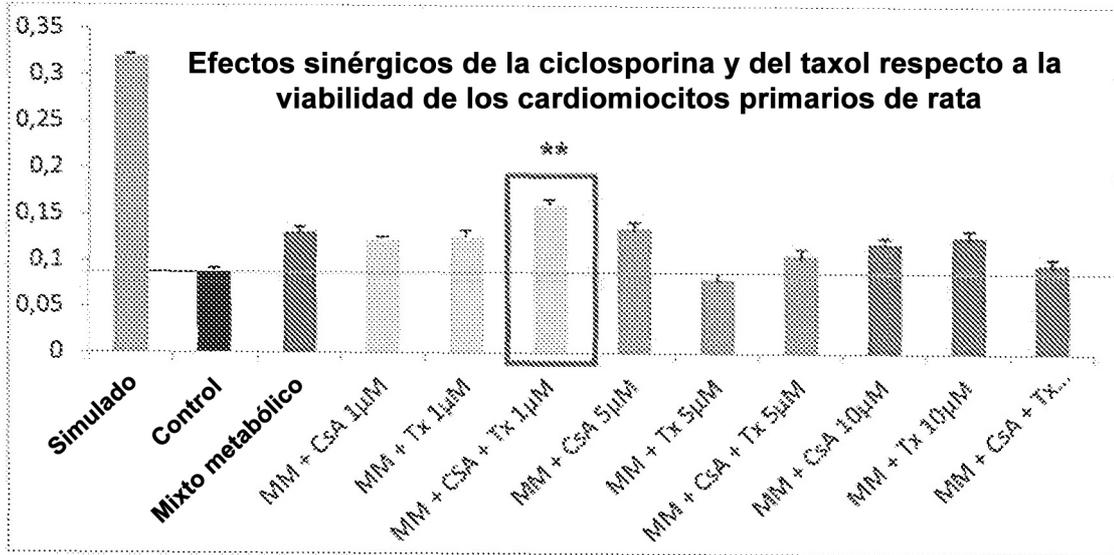


Figura 3

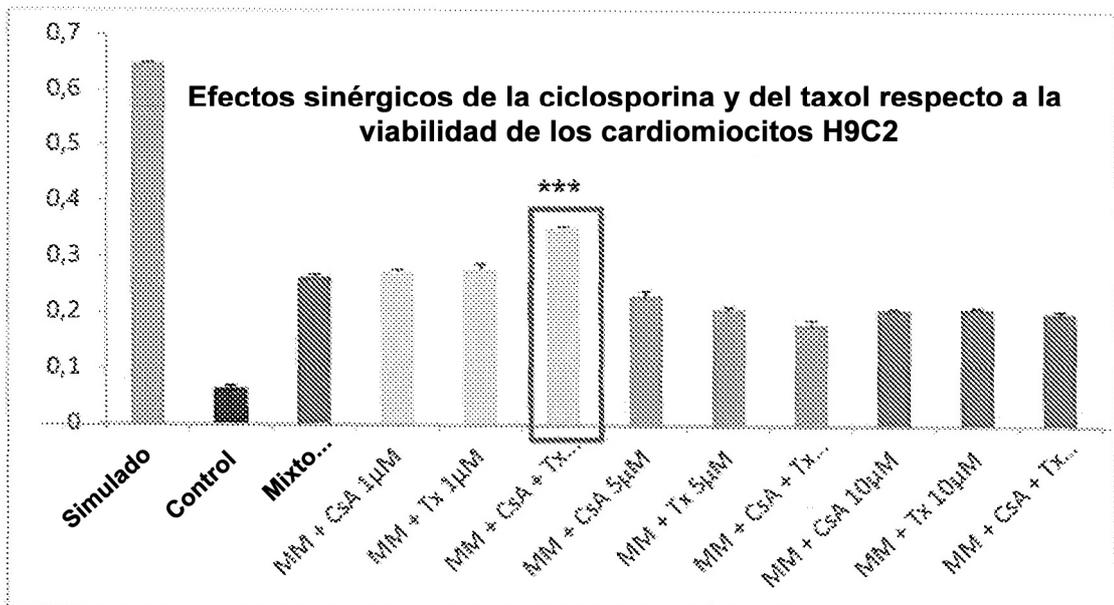


Figura 4

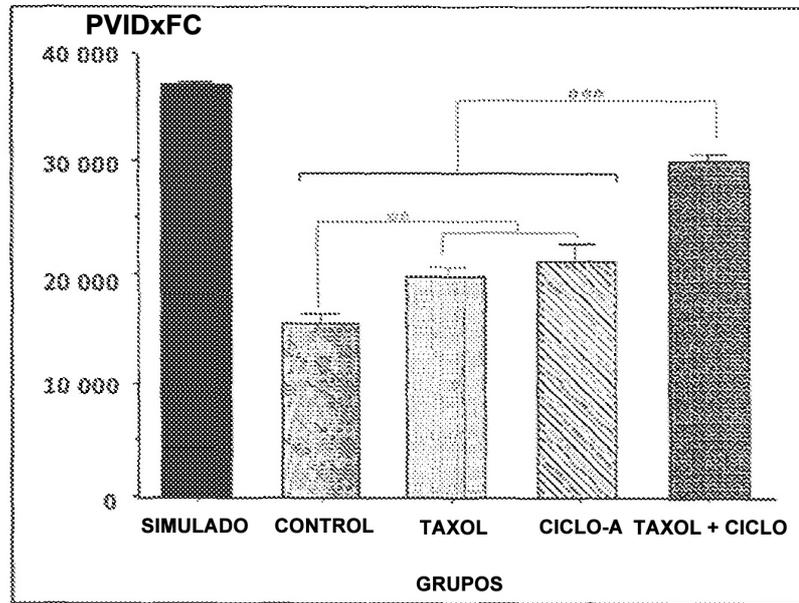


Figura 5

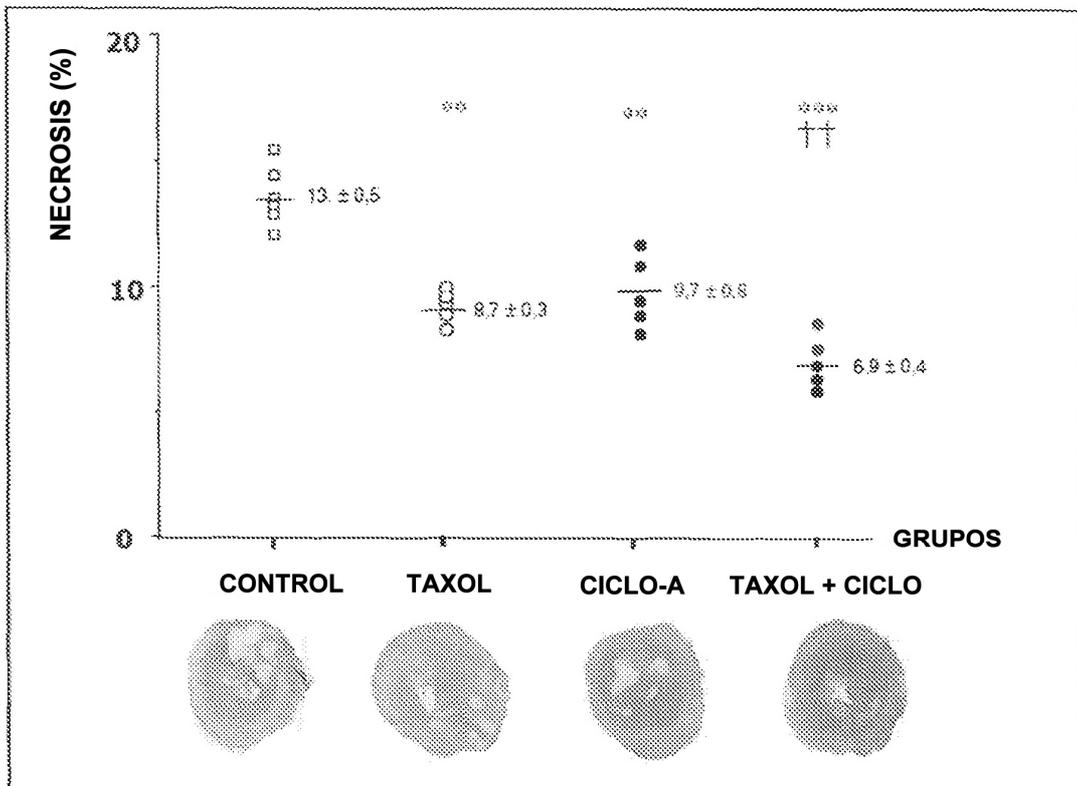


Figura 6