

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 637**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014 PCT/US2014/066054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15077199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014 E 14812052 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3027016**

54 Título: **Soluciones para aumentar la estabilidad y la vida útil de una solución de conservación de órganos y tejidos**

30 Prioridad:
22.11.2013 US 201361963093 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2020

73 Titular/es:
**SOMAH LUTION, LLC (100.0%)
225 Chimney Corner Lane
Jupiter, FL 33458, US**

72 Inventor/es:
SURYAN, MAHENDRA

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 744 637 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

Soluciones para aumentar la estabilidad y la vida útil de una solución de conservación de órganos y tejidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención está dirigida a formulaciones para conservar la función de tejidos y órganos y más particularmente a formulaciones estables en almacenamiento para conservar la función de tejidos y órganos, en particular la función de los conductos vasculares, antes de la implantación.

10

Antecedentes de la invención

La Patente de Estados Unidos N° 7.981.596 divulga soluciones de conservación de tejidos y órganos, generalmente denominadas GALA. Esto lleva el nombre de tres componentes: glutatión, ácido ascórbico y L-Arginina. Las soluciones GALA también incluyen una solución salina equilibrada. Estas soluciones son especialmente útiles para conservar conductos vasculares como arterias y venas. Los conductos vasculares se usan como injertos para una variedad de procedimientos quirúrgicos de bypass, incluyendo, pero no limitados a, cirugía de bypass vascular periférica y la cirugía de injerto de bypass de la arteria coronaria (CABG). El injerto de bypass es un método en el que se injerta un conducto vascular de tal manera que se deriva una arteria obstruida para recoger el flujo sanguíneo a un tejido objetivo. Durante las cirugías vasculares, los conductos vasculares se cosechan, se enjuagan y se almacenan temporalmente en una solución de conservación antes de su injerto.

15

20

25

30

35

40

45

La disfunción endotelial es el determinante principal en la patogénesis interrelacionada que lleva a fallos del conducto vascular. El fallo del injerto está precedido por la trombosis del injerto, la hiperplasia de la íntima y la aterosclerosis acelerada del injerto, todo lo cual parte de un deterioro funcional y/o estructural previo del endotelio del conducto vascular. Se ha reconocido que la elección de la solución de almacenamiento para los segmentos de la vena safena recogidos intraoperatoriamente tiene un impacto significativo en la estructura y función endoteliales y, por lo tanto, en la permeabilidad del injerto. Varios investigadores han demostrado la incapacidad de estas soluciones para conservar adecuadamente el conducto vascular (Thatte HS, Biswas KS, Najjar SF, et al. Evaluación microscópica de fotones múltiples del endotelio de la vena safena y su conservación con una nueva solución, GALA. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 1145-52 y Hussaini 2011). En un estudio *ex vivo* de 2011 por Wilbring *et al* se demostró que la función vascular se eliminó por completo después de que los conductos recogidos de los pacientes se almacenaron en una solución salina tamponada, comúnmente usada para el almacenamiento de conductos vasculares. Los datos revelaron que la función de las células endoteliales también se redujo significativamente, sin embargo, estos conductos disfuncionales se usaron con éxito como injertos para cirugía de bypass en este estudio. El efecto de la solución de conservación GALA™ en los segmentos de la vena safena humana se evaluó en estudios *ex vivo*. Aunque las soluciones en uso clínico hoy llevan a una profunda disminución en la viabilidad de las células endoteliales de los conductos vasculares (vena safena), la GALA™ mantuvo la función endotelial y la viabilidad estructural durante por lo menos hasta 24 horas (Thatte 2003, *Circulation* 2013:127 e6-e245 Hussaini BE, Lu XG, Wolfe JA y Thatte S. Evaluación de la extracción de la vena endoscópica sobre la viabilidad estructural y funcional del endotelio de la vena safena. *J Cardiothorac Surg* 2011; 6:82-90). Los datos *ex vivo* demostraron por tanto que se podía lograr una mejor conservación de los conductos vasculares mediante el uso de GALA™ como una solución de conservación de conductos vasculares. Sin embargo, la solución divulgada tiene una vida útil limitada debido a la inestabilidad de la solución.

50

55

60

65

La WO 2014/106083 divulga formulaciones de conservación de órganos y tejidos con estabilidad y vida útil mejoradas. La formulación se separa en una primera solución que tiene un pH de por lo menos 7 y una segunda solución que tiene un pH de menos de 7. La primera solución incluye componentes con estabilidad mejorada cuando se almacena a un pH de 7 o más, y la segunda solución incluye componentes con estabilidad mejorada cuando se almacenan a un pH menor de 7. La primera solución incluye agua, una solución salina equilibrada, un azúcar, adenosina, ácido orótico, ácido málico y L-carnitina. La segunda solución incluye agua, un antioxidante como el ácido ascórbico, un agente reductor celular como glutatión reducido, L-citrulina, monohidrato de creatina, L-carnosina y L-arginina. Durante el uso, la primera y la segunda soluciones se mezclan para formar una formulación final que puede usarse a un pH fisiológico para conservar la función del órgano o tejido. La WO 2014/106091 divulga formulaciones de conservación de órganos y tejidos con estabilidad y vida útil mejoradas que se proporcionan separando la formulación en una primera solución que tiene un pH de por lo menos 7 y una segunda solución que tiene un pH de menos de 7. La primera solución incluye agua, una solución salina equilibrada, un azúcar y L-arginina. La segunda solución incluye agua, ácido ascórbico y glutatión reducido. Durante el uso, la primera y la segunda soluciones se mezclan para formar una formulación final que puede usarse a un pH fisiológico para conservar la función del tejido u órgano. La WO2014/176224 divulga soluciones de conservación de órganos y tejidos que tienen formulaciones mejoradas compuestas de dos soluciones separadas. La primera solución incluye una o más sales, agua, oxígeno disuelto, ácido lactobiónico, manitol, ácido glutámico e histidina a un pH de por lo menos 7. La segunda solución incluye agua y glutatión reducido a un pH menor de 7 en donde se elimina el oxígeno presente en la solución. Las dos formulaciones se mezclan juntas en el punto de uso dando como resultado una solución de conservación de órganos y tejidos que tiene una estabilidad mejorada y que contiene oxígeno para

prevenir la isquemia en los órganos conservados.

Por tanto, hay una necesidad de producir soluciones mejoradas de las soluciones de conservación de órganos y tejidos GALA para mejorar la estabilidad y la vida útil de la solución.

5

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la comprensión de que la estabilidad de la formulación GALA puede mejorarse separando la formulación en una primera Solución A que tiene un pH de por lo menos 7, generalmente 7,4-8 y una Solución B que tiene un pH de menos de 7, generalmente más bajo. La solución A incluye una solución salina equilibrada. La solución B incluye agua, un antioxidante como ácido ascórbico, un agente reductor como L-glutación, un sustrato de óxido nítrico como L-Arginina y un azúcar, como D-glucosa. Esta solución se mantiene a un pH inferior a 7, preferiblemente 5, 4 o 3, y preferiblemente con un contenido de oxígeno a cero partes por millón.

10

15 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva de una bolsa de múltiples cámaras para su uso en la presente invención;
 La FIG. 2 es una vista en perspectiva de un kit que tiene un primer y un segundo recipiente para su uso con la presente invención;
 Las FIGS. 3A y 3B son gráficos que representan la concentración a lo largo del tiempo en condiciones de almacenamiento aceleradas de glutación, ácido ascórbico y arginina;
 La FIG. 4 son dos gráficos que representan la tasa de degradación de L-glutación en la Solución B; y
 Las FIGS. 5A-5D son representaciones esquemáticas del método para poner en práctica la presente invención.

20

25

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la puesta en práctica o prueba de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

30

Como se usa en la presente, el término "paciente" incluye miembros del reino animal, incluyendo pero no limitado a, humanos.

35

Como se emplea en la presente, "órgano" incluye, pero no está limitado a, el corazón, venas, arterias, pulmones, hígado, páncreas y los riñones. También se contemplan porciones de órganos.

40

Como se usa en la presente, "agua estéril" incluye, pero no está limitado a, (a) agua estéril para inyección, USP, (b) agua desionizada destilada estéril y (c) agua estéril para irrigación.

45

Como se usa en la presente, "cardioplejia" incluye, pero no está limitado a, parálisis del corazón.

Como se usa en la presente, "hipotermia moderada" es de aproximadamente 10 grados a 21 grados C.

50

Como se usa en la presente, un "antioxidante" es una sustancia que, cuando está presente en una mezcla o estructura que contiene una molécula biológica de sustrato oxidable, retrasa o impide la oxidación de la molécula biológica del sustrato. Por ejemplo, el ácido ascórbico es un antioxidante.

"Solución salina equilibrada" se define como una solución acuosa que está equilibrada osmóticamente para prevenir el daño celular o tisular agudo.

55

"Solución salina tamponada" se define como una solución salina equilibrada a la que se han añadido productos químicos para mantener un intervalo de pH fisiológico predeterminado.

"GALA" se refiere a un tipo de solución de conservación de tejidos que incluye glutación, ácido ascórbico, L-Arginina y una solución salina equilibrada.

60

"Injerto" se define como tejido que se trasplanta o implanta en una parte del cuerpo para reparar un defecto.

"Conducto de bypass recogido" se define como una vía alternativa instalada quirúrgicamente para que la sangre evite una obstrucción.

65

"Solución de cardioplejia" se define como una solución que ayuda a conservar el corazón durante el transporte o la cirugía.

5 "Agente reductor celular" se define como una sustancia que pierde electrones fácilmente provocando de este modo que otras sustancias se reduzcan químicamente.

10 Un "agente de tamponamiento" es un ácido o base usado para mantener la acidez (pH) de una solución cerca de un valor elegido. Los agentes de tamponamiento preferidos usados para producir las soluciones de la presente invención son HCl 4N y NaHCO₃ al 84%.

15 Una solución isotónica se refiere a dos soluciones que tienen la misma presión osmótica a través de una membrana semipermeable. Una solución isotónica es una solución que tiene la misma concentración de sal que las células.

20 La solución fisiológica se define como una solución salina acuosa que es compatible con el tejido normal, en virtud de ser isotónica con el líquido intersticial normal.

25 La presente invención proporciona una formulación de conservación de tejidos de tipo GALA compuesta por dos soluciones, la Solución A y la Solución B que tienen una estabilidad inesperadamente más alta que las soluciones de conservación de tejidos de solución única anteriores del tipo GALA.

30 De acuerdo con la presente invención, la primera solución, o Solución A, está compuesta por una solución salina equilibrada. La solución salina equilibrada está compuesta de agua y sales fisiológicamente aceptables. Una solución salina equilibrada típica estará compuesta de agua, iones de calcio, iones de cloruro, iones de potasio, iones de fosfato, iones de magnesio e iones de sodio.

35 La solución salina equilibrada incluye sales seleccionadas entre las siguientes: dihidrato de cloruro de calcio, cloruro de potasio, fosfato de potasio monobásico, hexahidrato de cloruro de magnesio, heptahidrato de sulfato de magnesio, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, heptahidrato dibásico de fosfato de sodio y combinaciones de los mismos. La solución salina equilibrada se proporciona a una concentración que dará como resultado una solución isotónica cuando se mezclan la primera y la segunda soluciones. En una realización ejemplar, la solución salina equilibrada incluye 0,14 gramos/litro de dihidrato de cloruro de calcio, 0,4 gramos/litro de cloruro de potasio, 0,06 gramos/litro de fosfato de potasio monobásico, 0,1 gramos/litro de hexahidrato de cloruro de magnesio, 0,1 gramos/litro de heptahidrato de sulfato de magnesio, 8 gramos/litro de cloruro de sodio, 0,36 gramos/litro de bicarbonato de sodio y gramos/litro de cloruro de sodio, 0,36 gramos/litro de bicarbonato de sodio y 0,03 gramos/litro de heptahidrato dibásico de fosfato de sodio.

40 Los componentes de la Solución A se disuelven juntos en agua y el pH de la solución resultante puede ajustarse a 7,4-8,0 mediante la adición de una base, como el bicarbonato de sodio.

45 Opcionalmente, la Solución A puede contener agentes antiinflamatorios no esteroideos como aspirina, naproxeno e ibuprofeno. Opcionalmente, pueden añadirse medicamentos para anestesia local, preferiblemente en la Solución A o, como alternativa, el medicamento para anestesia puede añadirse en el punto de uso. Los ejemplos de tales medicamentos para anestesia local incluyen, pero no están limitados a, lidocaína, articaína/epinefrina, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína y cloroprocaína.

50 De acuerdo con la presente invención, los siguientes componentes de GALA estarán en una segunda solución, o Solución B: Glutatión reducido, un agente reductor como ácido ascórbico; un azúcar como D-Glucosa, L-Arginina y agua que opcionalmente se ha purgado con un gas inerte, como el argón, para eliminar sustancialmente todo el oxígeno disuelto (preferiblemente a menos de 0,1 ppm). El pH de la Solución B resultante es 5,0 o menos y generalmente de 3 a 5. Como alternativa, puede estar presente una mezcla de cisteinilglicina y Glutatión reducido en la Solución B. En la formulación más preferida, el pH de la Solución A es 8,0 y el pH de la Solución B es 3,0.

55 Más específicamente, la solución B es una solución de los componentes orgánicos en un recipiente separado de la solución A y compuesto de L-glutatión, L-arginina, ácido L-ascórbico, D-glucosa y H₂O para inyección a un pH de 3,0-5,0. Otros azúcares que pueden usarse en lugar de glucosa son cualquier azúcar, pero preferiblemente cualquier monosacárido, incluyendo pero no limitado a fructosa, manosa y ribosa. Cuando las soluciones A y B se mezclan en el punto de uso, el pH de la solución mezclada es de 7,3 ± 0,4. El pH de las soluciones A y B puede ajustarse usando muchos agentes de tamponamiento conocidos. Los agentes de tamponamiento preferidos son HCl 4N y NaHCO₃ al 84%. En una formulación preferida, el pH de la solución A es de 7,8 y la solución A es 8,0 y el pH de la solución B es 3,0.

65 Las sales en la solución están destinadas a tamponar (mantener el pH) y mantener la isotonicidad con respecto a los conductos vasculares. Los componentes orgánicos están destinados a mantener la capacidad de tamponamiento adicional, la osmolalidad y proporcionar un entorno no oxidante a los conductos vasculares. Los

cuatro componentes orgánicos; L-glutati3n, 3cido L-asc3rbico, L-Arginina y D-glucosa, son constituyentes normales de la sangre y se incluyen por su papel en la conservaci3n y el mantenimiento del entorno extracelular de los conductos vasculares.

5 El L-Glutati3n y el 3cido L-asc3rbico son antioxidantes que evitan el da3o oxidativo a las c3lulas absorbiendo radicales libres. La funci3n de estos antioxidantes en la soluci3n de conservaci3n de tejidos es 1) estabilizar otros componentes de la soluci3n evitando la oxidaci3n, mejorando de este modo la estabilidad y la vida 10 3til del producto y 2) evitar el da3o oxidativo a las membranas celulares y las estructuras de la matriz extracelular. Se ha demostrado que el da3o oxidativo rompe la integridad estructural de la arquitectura extracelular, provocando por tanto la interrupci3n del revestimiento celular endotelial. El revestimiento endotelial interrumpido es un indicador de injerto vascular da3ado. El az3car est3 destinado a proporcionar una fuente de energ3a para el tejido u3rgano.

15 Cuando la Soluci3n A se combina con la Soluci3n B, la concentraci3n de L-arginina deber3a ser de 250 μM a 2000 μM . La concentraci3n de glucosa deber3a ser de 50 mM a 120 mM, L-glutati3n de 50 μM a 2000 μM y 3cido L-asc3rbico de 25 μM a 1000 μM ,

20 La primera o la segunda formulaciones pueden incluir opcionalmente un anticoagulante en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulaci3n de la sangre dentro de la vasculatura de un tejido u3rgano. Los anticoagulantes ejemplares incluyen heparina e hirudina, pero pueden usarse otros anticoagulantes como la aspirina. Una realizaci3n ejemplar incluye heparina en intervalos de concentraci3n de 50 unidades/ml a 250 unidades/ml. La heparina tambi3n puede a3adirse por separado despu3s de que se hayan combinado las soluciones A y B y antes del uso.

25 En una realizaci3n ejemplar, la proporci3n volum3trica entre la Soluci3n A y la Soluci3n B es 19:1. Por ejemplo, en una realizaci3n, se mezclan 950 ml de Soluci3n A con 50 ml de Soluci3n B para dar como resultado la formulaci3n final para conservar la mezcla con 50 ml de Soluci3n B para dar como resultado la formulaci3n final para conservar la funci3n de un tejido u3rgano.

30 Si se a3ade EPO a la Soluci3n A o B, la concentraci3n de EPO debe ser de 5 unidades/ml cuando se combinan la Soluci3n A y la Soluci3n B.

35 Tambi3n se divulga en la presente una segunda soluci3n de conservaci3n de tejidos alternativa que incluye una soluci3n A, que incluye un az3car como glucosa, manosa, fructosa o similares, en combinaci3n con una soluci3n salina equilibrada a un pH de 7,4 a 8 y una segunda soluci3n, Soluci3n B, que comprende glutati3n reducido, 3cido asc3rbico, L-Arginina, en agua a un pH de 5 o menos, que puede almacenarse en un ambiente libre de ox3geno.

40 En general, ni la Soluci3n A ni la B incluir3n otros componentes org3nicos distintos de los enumerados espec3ficamente, ya que ser3an innecesarios y aumentar3an los costes de producci3n. En particular, los compuestos org3nicos distintos de los enumerados anteriormente que se encuentran en otros tipos de soluciones de conservaci3n de tejidos, no se incluir3an en las Soluciones A o B, para minimizar el costo y reducir las posibles reacciones secundarias, que podr3an ser perjudiciales para el producto final.

45 El proceso de fabricaci3n es robusto y se lleva a cabo bajo condiciones cGMP. El producto se esteriliza mediante procedimientos de llenado as3pticos y las pruebas de estabilidad proporcionan una vida 3til propuesta de por lo menos 2 a3os.

50 La FIG. 1 y la FIG. 2 muestran realizaciones ejemplares de kits o recipientes usados para enviar, almacenar y finalmente usar las soluciones de conservaci3n de tejidos de la presente invenci3n. Estos son ejemplos y pueden usarse otros recipientes para proporcionar soluciones separadas A y B que se combinan en el punto de uso para la conservaci3n del tejido.

55 La Figura 1 muestra una bolsa 10 que tiene dos c3maras 12 y 14 que se dividen o se separan entre s3 mediante la abrazadera 16. La c3mara 12 contiene la Soluci3n A y la c3mara 14 contiene la Soluci3n B. Cuando se retira la abrazadera 16, las c3maras 12 y 14 se convierten en una c3mara de la bolsa 10 y la Soluci3n A se mezcla con la Soluci3n B dando como resultado la soluci3n de conservaci3n de 3rganos y tejidos completa en la bolsa 10. Ver Patente de Estados Unidos N3 5.257.985.

60 La Figura 2 muestra un kit de conservaci3n de 3rganos y tejidos 20 que tiene dos recipientes 22 y 24. La soluci3n A est3 contenida en el recipiente 22 y la soluci3n B est3 contenida en el recipiente 24. En el punto de uso, el contenido del recipiente 24 puede vaciarse en el recipiente 22 o los contenido de tanto el recipiente 22 como del recipiente 24 pueden vaciarse ambos en una palangana o un cuenco en el que se puede colocar una arteria o vena para producir la soluci3n completa de conservaci3n de 3rganos y tejidos.

65 En una realizaci3n preferida como se muestra en la Figura 2, la Soluci3n A se llena as3pticamente en una botella de Nalgene preesterilizada, que luego se asegura con un tap3n de rosca de HDPE preesterilizado.

5 La solución B se llena asépticamente en un vial de vidrio, tipo I, de borosilicato preesterilizado que se asegura con un tabique Stelmi preesterilizado, que se mantiene en su sitio con un sello desprendible. El sello desprendible se embute en la botella usando un proceso de embutido validado en la configuración de embutido recomendada por el fabricante. La botella B puede desgasificarse con gas argón durante el proceso de mezcla y llenado para reducir la presencia de oxígeno, pero esto puede no ser necesario.

10 La botella que contiene la solución A y la botella que contiene la solución B se colocan luego en una caja preimpresa de cartulina. El folleto del envase también se coloca en la caja en este momento. La caja se sella y se etiqueta para su distribución.

15 En el punto de uso, las Soluciones A y B se mezclan para completar la Solución C final de GALA y el pH se ajustará a $7,3 \pm 0,4$. Si el pH de la solución A es 8,0, el pH de la solución B será 3,0. Si el pH de la solución A es 7,8, el pH de la solución B será 4,0. Y, si el pH de la solución A es 7,6, el pH de la solución B será 5,0.

El siguiente es un procedimiento recomendado para poner en práctica la presente invención.

20 Permitir que las soluciones 22 y 24 se calienten a temperatura ambiente. Antes del uso, comprobar que no haya fugas en cada recipiente 22 y 24 inspeccionando los cierres. Si se encuentra una fuga, desechar el recipiente de la solución. Realizar una inspección visual de la solución para material particulado. No usar la solución si son evidentes en la solución material particulado obvio, precipitados o contaminación. Inmediatamente antes de su uso, realizar los pasos siguientes:

25 1. Verter todo el contenido de la Solución A del vial 22 en un recipiente estéril 26 (por ejemplo, bandeja, copa o palangana pequeña) donde se almacenará el conducto vascular 32 antes del injerto, como se muestra en la FIG. 5A.

2. Con una jeringuilla estéril 28, extraer asépticamente 12,5 ml de solución B del vial 24 y añadirlos al recipiente 26 con solución A (FIG. 5B) para formar la solución GALA 34.

30 3. Añadir 12.500 unidades de heparina al recipiente 26 que contiene las Soluciones A y B como se muestra en la FIG. 5C.

4. Mezclar revolviendo suavemente en el recipiente 26.

35 La solución se usa para enjuagar el conducto vascular aislado 32 inmediatamente después de retirarlo del paciente. Las soluciones combinadas A y B también pueden usarse en combinación con una jeringuilla para aplicar una presión hidrostática al conducto para evaluar fugas en el conducto antes del almacenamiento en la solución. El conducto vascular 32 se almacena luego en la solución combinada 34 en el recipiente 26 hasta que el conducto vascular pueda injertarse en el paciente.

40 Las soluciones, dispositivos y métodos de perfusión de la presente invención no están limitados al uso con un tipo particular de tejido, órgano o célula. Por ejemplo, la invención puede usarse con venas safenas recogidas, arterias epigástricas, arterias gastroepiploicas y arterias radiales usadas en injerto de bypass coronario (CABG). La presente invención también puede usarse para mantener órganos y tejidos durante operaciones de trasplante. La presente invención no está limitada a ningún tejido u órgano particular. Por ejemplo, se contempla que tales órganos o tejidos puedan ser corazón, pulmones, riñón, cerebro, sangre, plaquetas, injertos musculares, piel, intestino, hueso, apéndices, ojos, etc. o partes de los mismos. Adicionalmente, la presente invención puede usarse como un conservante de tejidos u órganos in situ. Se contempla que la solución de la presente invención se use para enjuagar y bañar tejidos y órganos que no se hayan extraído del paciente. Por ejemplo, se contempla que la presente invención se use durante la cardioplejia. También se contempla que la presente invención se use, por ejemplo, en procedimientos de emergencia donde un tejido u órgano puede necesitar ser bañado para conservarlo hasta que se pueda obtener cirugía u otra atención médica. A este respecto, la solución puede ponerse a disposición del personal médico de emergencias tanto en entornos hospitalarios como "en el campo" (es decir, en ambulancias o en instalaciones médicas de emergencia temporales).

55 La solución GALA (Soluciones A y B combinadas) también puede usarse como solución de lavado en cirugías, en particular en cirugía plástica o reconstructiva. Esto incluye, pero no está limitado a, liposucción, reconstrucción mamaria, mastectomía u otras operaciones en las que sería deseable una solución de pH equilibrado isotónica como GALA. La solución GALA también puede usarse para enjuagar o cebar una máquina de diálisis usando el procedimiento del fabricante para cebar o enjuagar. La solución GALA también puede usarse junto con un soporte venoso externo. Un ejemplo de tal soporte es el soporte externo vascular Vest™ que está siendo desarrollado por Vascular Graft Solutions de Tel-Aviv, Israel.

Los componentes de las soluciones de conservación de órganos y tejidos también pueden incorporarse en geles, cremas o hidrogeles. Los ejemplos de hidrogeles se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 6.339.074.

65 La Tabla 1 siguiente muestra una realización de la presente invención en la que el pH de la Solución A es

8,0 y el pH de la Solución B es 3,0.

TABLA 1

| Composición cualitativa y cuantitativa de Soluciones A y B de una realización | | | |
|--|-------------------------------|-------------------|-----------|
| Componentes | * Concentración (± 5%) | | |
| SOLUCIÓN A | g/l | g/237.5ml | mM |
| Dihidrato de cloruro de calcio | 0.147 | 0.035 | 1.326 |
| Cloruro de potasio | 0.421 | 0.100 | 5.653 |
| Fosfato de potasio monobásico | 0.063 | 0.015 | 0.463 |
| Heptahidrato de sulfato de magnesio | 0.105 | 0.025 | 0.432 |
| Hexahidrato de cloruro de magnesio | 0.105 | 0.025 | 0.516 |
| Cloruro de sodio | 8.421 | 2.000 | 144.100 |
| Bicarbonato de sodio | 0.379 | 0.090 | 4.390 |
| Fosfato de sodio dibásico anhidro | 0.028 | 0.007 | 0.200 |
| Agua para inyección | c.s. para 1l | c.s. para 237.5ml | - |
| Bicarbonato de sodio 1.0M/HCl 1.0M | Ajuste el pH a 8.0 | | |
| Componentes | * Concentración (± 5%) | | |
| SOLUCIÓN B | g/l | g/12,5 ml | mM |
| L-Glutatión | 6.200 | 0.078 | 20.200 |
| D-glucosa | 20.000 | 0.25 | 111.000 |
| L-arginina | 3.000 | 0.038 | 17.200 |
| Ácido L-ascórbico | 1.800 | 0.023 | 10.200 |
| Agua para inyección | c.s. para 1l | c.s. para 12.5ml | - |
| Bicarbonato de sodio 1.0M/HCl 1.0M | Ajuste el pH a 3.0 | | |

Los componentes de la Solución A y la Solución B combinadas se muestran en la Tabla 2:

TABLA 2

| Composición cualitativa y cuantitativa de las soluciones A y B combinadas | | | |
|--|-------------------------------|----------------|-----------|
| Componentes | * Concentración (± 5%) | | |
| SOLUCIONES A + B | g/l | g/250ml | mM |
| Dihidrato de cloruro de calcio | 0.14 | 0.0348 | 1.26 |
| Cloruro de potasio | 0.40 | 0.0998 | 5.37 |
| Fosfato de potasio monobásico | 0.06 | 0.0148 | 0.44 |
| Heptahidrato de sulfato de magnesio | 0.10 | 0.0248 | 0.41 |
| Hexahidrato de cloruro de magnesio | 0.10 | 0.0248 | 0.49 |
| Cloruro de sodio | 8.00 | 1.9998 | 136.89 |
| Bicarbonato de sodio | 0.36 | 0.0900 | 4.17 |
| Fosfato de sodio dibásico anhidro | 0.026 | 0.0065 | 0.187 |
| 50-Glutatión | 0.31 | 0.0775 | 1.01 |
| D-glucosa | 1.00 | 0.2500 | 5.55 |
| L-arginina | 0.15 | 0.0375 | 0.86 |
| Ácido L-ascórbico | 0.09 | 0.0225 | 0.51 |
| Intervalo de pH después de mezclar A y B | 7.3 ± 0.4 | | |

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención.

Ejemplo 1

5 Se produjeron múltiples lotes de Solución A y Solución B de la Tabla 1. Se colocaron veintiún conjuntos de recipientes de Solución A y B de tres lotes separados en una cámara de estabilidad calificada mantenida a 40° C con 75% de humedad relativa. Los recipientes de solución de cada uno de los lotes se tomaron y probaron periódicamente bajo estas condiciones aceleradas. Se extrapolaron los resultados de estos datos para determinar la vida útil del producto, como si se hubiera almacenado a 2-8° C. La determinación de la vida útil se basó en la evaluación de la duración mínima de tiempo que las soluciones del producto permanecieron dentro de las especificaciones establecidas. Se estudió el pH, la osmolalidad y la conductividad de las soluciones A y B. Las ocho sales inorgánicas que constituyen la Solución A son inertes y permanecen estables en medios acuosos durante largos períodos de tiempo.

15 También se descubrió que dos de los componentes de la solución B, L-Arginina y D-glucosa, eran estables durante períodos prolongados de tiempo a un pH de 3. Por lo tanto, con todas las especificaciones restantes cumpliendo los criterios de aceptación, los dos componentes que influyeron en el resultado final de la vida útil del producto fueron el ácido L-ascórbico y el L-glutati6n debido a sus propiedades antioxidantes.

20 La razón de la propiedad de limitación de la estabilidad general era que la solución mantuviera las condiciones necesarias para un entorno reductor general. Cuando las soluciones dejaron de ofrecer este beneficio, quedaron fuera de especificación. Se logró un ambiente reductor siempre que permaneciese algo de L-glutati6n y ácido L-ascórbico reducido, por pequeño que fuese, en sus estados reducidos en redox, equilibrio y solución. En otras palabras, siempre que cada uno del L-glutati6n y del ácido L-ascórbico permanecieran por encima de los límites detectables del método analítico.

25 Los datos obtenidos mientras se almacenaba la solución a 40° C se extrapolaron a la temperatura de almacenamiento media de 5° de tales soluciones usando un factor Q10 de 2. En base a esta extrapolación, se predice que la estabilidad de almacenamiento de la Solución B es de aproximadamente 900 días, proporcionando una vida útil de por lo menos dos años, superando con creces los requisitos de la industria y superando con creces la estabilidad de las formulaciones actuales. Los datos brutos obtenidos que muestran la concentración de glutati6n se muestran en la FIG. 3A y la concentración a lo largo del tiempo para el ácido ascórbico y la arginina se muestran en la FIG. 3B.

35 EJEMPLO 2:

De acuerdo con la regla Q10, las relaciones entre la constante de velocidad, la temperatura y la vida útil pueden expresarse como:

$$40 \quad Q10 = \left(\frac{k2}{k1}\right)^{\frac{10}{T2-T1}} \quad o \quad \frac{k2}{k1} = Q10^{\frac{T2-T1}{10}} \quad o \quad \frac{SL1}{SL2} = Q10^{\frac{T2-T1}{10}}$$

45 Donde k1 y k2 son las constantes de velocidad a temperaturas T1 y T2 con vidas útiles SL1 y SL2. El valor del coeficiente de temperatura Q10 depende de la energía de activación Ea para la reacción. Por lo tanto, Q10 puede calcularse usando la ecuación anterior si las constantes de velocidad se conocen para por lo menos dos temperaturas diferentes. Los valores de Q10 son típicamente 2, 3 o 4, dependiendo de si las estimaciones deseadas de vida útil son a) conservadoras, b) probables y razonables, o c) menos conservadoras pero posibles, respectivamente. Como regla general, un Q10 de 2 corresponde a Ea de 12,2 kcal/mol, 3 para 19,4 kcal/mol y 4 para 24,5 kcal/mol.

50 Durante las etapas tempranas de la presentación reglamentaria del producto, cuando aún no se dispone de datos cinéticos dependientes de la temperatura detallados, debe realizarse una estimación conservadora de la vida útil. Por lo tanto, se supone una baja energía de activación para la reacción de degradación con un valor Q10 de 2 para determinar una estimación conservadora de la vida útil del producto. De acuerdo con esta regla, la velocidad de reacción se duplicaría aproximadamente por cada aumento de 10 grados en las temperaturas de almacenamiento suponiendo una "energía de activación más probable" para la reacción.

55 Se determinó que la constante de velocidad de primer orden para la descomposición de L-glutati6n en la Solución B a 40° C era de 0,0643 días⁻¹ a partir de estudios acelerados de dos Lotes de Solución B, uno con Argón en el espacio libre y el otro sin él. Estos perfiles se muestran juntos en la Figura 4. El decaimiento exponencial de primer orden se muestra en el gráfico inferior, y el gráfico logarítmico lineal correspondiente se muestra en el gráfico superior. Además, a esta temperatura (40° C), la especificación del producto para L-glutati6n se acercó a su límite de caducidad en aproximadamente 73 días. Usando los argumentos de la ecuación anterior, puede estimarse una estimación conservadora de la vida útil en almacenamiento a 5° C mediante extrapolación usando un valor Q10 de 2

de la siguiente manera:

$$\text{Vida útil @5}^\circ\text{C} = 73 * 2^{\frac{(40-5)}{10}} = 73 * 2^{3.5} \approx 800 \text{ días} \approx 27 \text{ meses}$$

Por lo tanto, a partir de este cálculo, puede inferirse que, como mínimo, la vida útil de la Solución B se pronosticará en 27 meses cuando el producto se almacena a 5° C.

Sin embargo, estudios en tiempo real detallados sobre la estabilidad de tres lotes GMP de solución B a 2-8° C después de quince meses de datos recopilados, sugieren que la estimación de vida útil de 27 meses de los estudios acelerados podría ser extremadamente conservadora y el factor Q10 real es 2,94.

Los estudios de estabilidad en tiempo real a 5° C han progresado durante aproximadamente un año hasta ahora. Los datos cinéticos disponibles de 12-15 meses de degradación de L-glutátion de estos Lotes pueden ajustarse a una cinética de reacción de primer orden con una constante de velocidad de aproximadamente 1,40x10⁻³ días⁻¹. A estas velocidades, la especificación del producto para L-glutátion se acercó a su límite de caducidad en aproximadamente 100 meses. Sorprendentemente, la vida útil determinada en base a los estudios acelerados a 40° C usando la técnica de extrapolación Q10 fue significativamente más corta (27 meses) de lo que sugieren los datos en tiempo real reales. Esta discrepancia puede racionalizarse sobre la base de los supuestos realizados durante la extrapolación Q10 como se describe a continuación.

En la Figura 4 se muestran las velocidades observadas para la degradación de L-glutátion en la Solución B de la Solución B bajo condiciones aceleradas de 40° C/75% HR durante un período de 65 días. Se han observado tendencias similares para varios otros Lotes de solución B. En todos los casos, la velocidad de esta reacción es de carácter puramente exponencial (primer orden), lo que implica que un tiempo transcurrido igual da una disminución fraccional igual en la concentración de analito, en este caso la concentración de L -glutátion, durante el intervalo de tiempo estudiado. Las constantes de velocidad a 40° C y 5° C de los once lotes estudiados se resumen en la Tabla 3. Los valores de los exponentes en la ecuación derivados del ajuste exponencial son la constante de velocidad de primer orden kl (en unidades de días⁻¹). Estos valores también se presentan en la Tabla 3 a cada una de las temperaturas estudiadas.

Este valor derivado empíricamente de 2,94 para el coeficiente de temperatura Q10 es más alto que el valor de 2 usado en cálculos previos de la vida útil. Un valor de Q10 = 2 representa una estimación muy conservadora de la vida útil resultante de una energía de activación relativamente baja de 12 kcal/mmol. Por otro lado, una energía de activación más alta de 19 kcal/mmol con un valor de Q10 = 2,94 significa que la velocidad de reacción se triplicaría aproximadamente por cada aumento de 10 grados en la temperatura de almacenamiento con una proporción inversa correspondiente a la vida útil.

Con el valor Q10 revisado de 2,94, que es más representativo de la verdadera energía de activación de 19,0 kcal/mol para la descomposición de L-glutátion, la vida útil de la Solución B puede recalcularse extrapolando los datos de vida útil de 40° C y/o directamente a partir del ajuste exponencial de los datos en tiempo real de un año a 5° C. Los valores revisados se tabulan en la Tabla 3.

La disparidad en los resultados derivados de los dos enfoques se ilustra en la comparación de la vida útil a varias temperaturas entre 5° C y 60° C por extrapolación de los datos empíricos a 40° C usando los valores Q10 de 2 (conservador) y 2,94 (empírico). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

| N° | Tabla 3. Constantes de velocidad y vida útil de los estudios de estabilidad | | | | | | |
|----|---|-----------|------------------------|-------------------|-----------------|---------|--------|
| | Espacio libre de Solución B | [GSH] g/l | kl, días ⁻¹ | °C Temperatura °C | Vida útil, días | | |
| | | | | | a 5° C * | a 20C * | Real** |
| 1 | con argón | 6.2 | 0.00143 | 5 | 3220 | 639 | 3220 |
| 2 | con argón | 6.4 | 0.00143 | 5 | 3220 | 639 | 3220 |
| 3 | con argón | 6.4 | 0.00140 | 5 | 3290 | 653 | 3290 |
| 4 | sin argón | 6.2 | 0.05937 | 40 | 3390 | 631 | 73 |
| 5 | sin argón | 6.2 | 0.06465 | 40 | 3100 | 622 | 72 |
| 6 | sin argón | 6.2 | 0.06465 | 40 | 3100 | 622 | 72 |
| 7 | con argón | 6.2 | 0.06378 | 40 | 3130 | 622 | 72 |
| 8 | con argón | 6.2 | 0.06465 | 40 | 3100 | 622 | 72 |

(continuación)

| N° | Tabla 3. Constantes de velocidad y vida útil de los estudios de estabilidad | | | | | | |
|--|---|-----------|------------------------|-------------------|-----------------|---------|--------|
| | Espacio libre de Solución B | [GSH] g/l | k1, días ⁻¹ | °C Temperatura °C | Vida útil, días | | |
| | | | | | a 5° C * | a 20C * | Real** |
| 9 | con argón | 6.2 | 0.06465 | 40 | 3100 | 631 | 73 |
| 10 | con argón | 6.2 | 0.05780 | 40 | 3400 | 691 | 80 |
| 11 | con argón | 6.2 | 0.05608 | 40 | 3400 | 709 | 82 |
| * extrapolado de 40° C a 5° C y 20C usando la regla Q10 con un valor Q10 de 2.94 | | | | | | | |
| ** Curva de datos real acelerada y en tiempo real que se acerca al 1% [GSH] | | | | | | | |

| Tabla 4. Vidas útiles extrapoladas de la Solución B en base a los valores Q10 antiguos (conservadores) y nuevos (empíricos) | | |
|---|-----------------------------|------------|
| Temperatura de almacenamiento, °C | Vida útil extrapolada, días | |
| | Q10 = 2 | Q10 = 2.94 |
| 5 | 830 | 3300 |
| 20 | 290 | 640 |
| 25 | 200 | 367 |
| 40 | 73 | 73 |
| 50 | 35 | 23 |
| 60 | 18 | 7 |

Por tanto, la vida útil se mejora significativamente separando los componentes de la solución GALA en una solución salina equilibrada de pH más alto, que puede incluir opcionalmente glucosa, y almacenando los componentes orgánicos, particularmente la L-arginina, el ácido ascórbico y el glutatión, más opcionalmente un azúcar a pH mucho más bajo. Se ha descubierto inesperadamente que aumentar la estabilidad del glutatión reducido también aumenta la estabilidad del ácido ascórbico y la L-arginina. La estabilidad de almacenamiento de las dos soluciones supera con creces las expectativas o necesidades comerciales, haciendo que esta formulación sea mucho más práctica y adecuada para una amplia variedad de entornos diferentes. Esto proporciona un resultado final del rendimiento del injerto mejorado, mejorando la viabilidad celular del material del injerto.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un kit de conservación de órganos y tejidos compuesto por una primera solución acuosa contenida en un primer recipiente y una segunda solución contenida en un segundo recipiente en donde la primera solución acuosa está compuesta por una solución salina equilibrada, y dicha primera solución tiene un pH de por lo menos 7,0; y en donde la segunda solución está compuesta de agua, glutatión reducido, ácido ascórbico, un azúcar, L-Arginina y dicha segunda solución tiene un pH de 5,0 o menos.
- 10 **2.** El kit de la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo recipientes son la primera y la segunda cámaras dentro de un recipiente individual y la primera y la segunda cámaras están separadas entre sí por una partición, en donde, tras la retirada de la partición, la primera solución se mezcla con la segunda solución para formar la solución de conservación de órganos y tejidos completa.
- 15 **3.** El kit de la reivindicación 1 en el que el pH de la primera solución es de 7,8 y el pH de la segunda solución es de 4,0.
- 4.** El kit de la reivindicación 1, en el que el pH de la primera solución es de 7,6 y el pH de la segunda solución es de 5,0.
- 20 **5.** El kit de la reivindicación 1, en el que la primera y la segunda solución se formulan en un gel, pomada, loción o hidrogel.
- 6.** Un método para preparar una solución de conservación de órganos o tejidos que comprende;
 - 25 preparar dichas primera y segunda soluciones de la reivindicación 1; y
 - en el punto de uso, mezclar la primera solución junto con la segunda solución para formar una solución combinada que tenga un pH de $7,3 \pm 0,4$.
- 30 **7.** Un método *ex vivo* para conservar un tejido u órgano que comprende formar una solución de acuerdo con el método de la reivindicación 6 y poner el tejido u órgano en contacto con dicha solución.
- 8.** El método de la reivindicación 7, en el que el tejido u órgano se selecciona del grupo que consiste de venas safenas, arterias epigástricas, arterias gastroepiploicas, arterias radiales, corazón, pulmones, riñones, cerebro, injertos musculares, piel, intestino, hueso, apéndices, ojos, y porciones de dicho tejido u órganos.
- 35 **9.** El kit de la reivindicación 1 en el que el pH de la primera solución es de 8,0 y el pH de la segunda solución es de 3,0.
- 40 **10.** El kit de la reivindicación 1 en el que la segunda solución comprende opcionalmente cisteinilglicina y en el que dicha agua en la segunda solución es una que se ha purgado con un gas inerte para eliminar sustancialmente todo el oxígeno disuelto.
- 11.** El kit de la reivindicación 10 en el que dicha segunda solución tiene un pH de 3,0-5,0.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

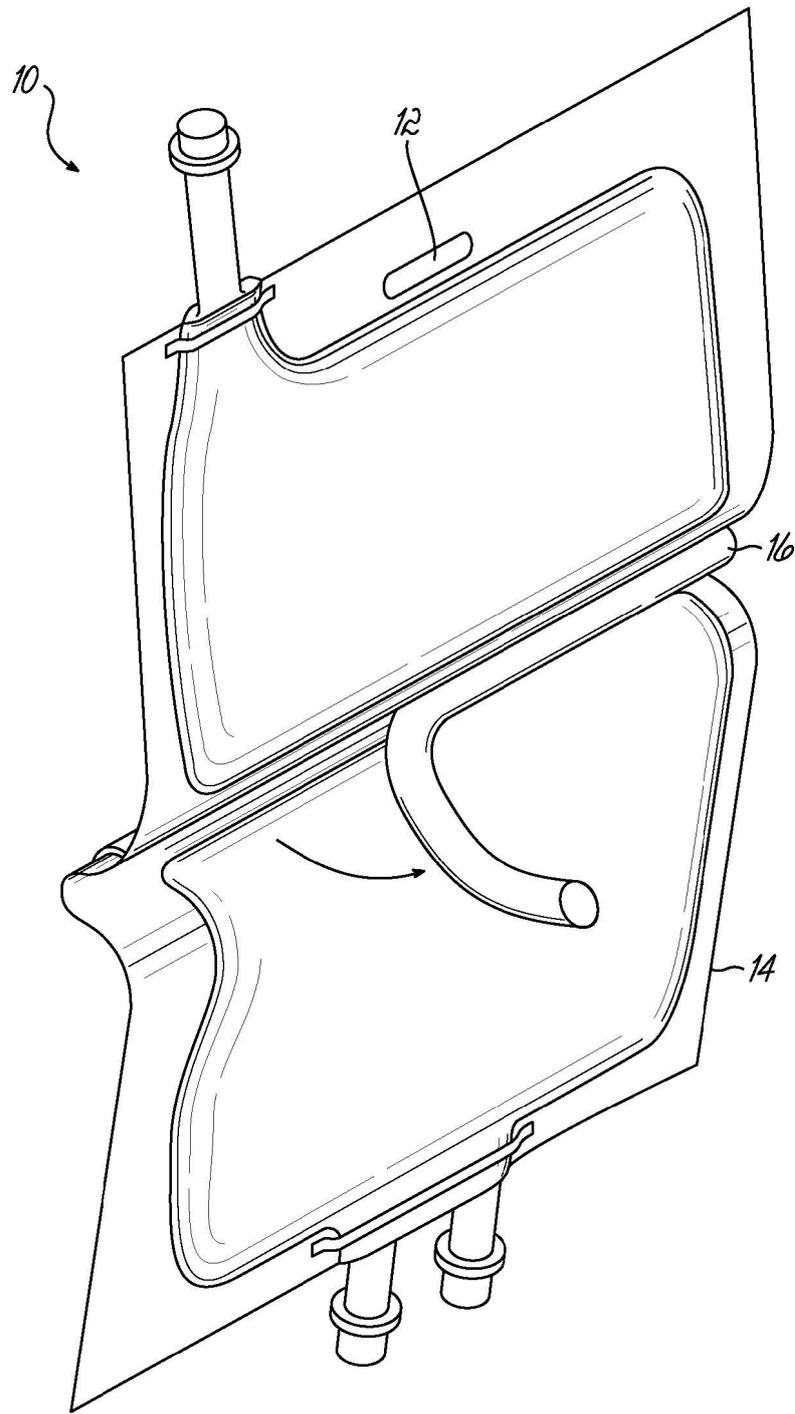


FIG. 1

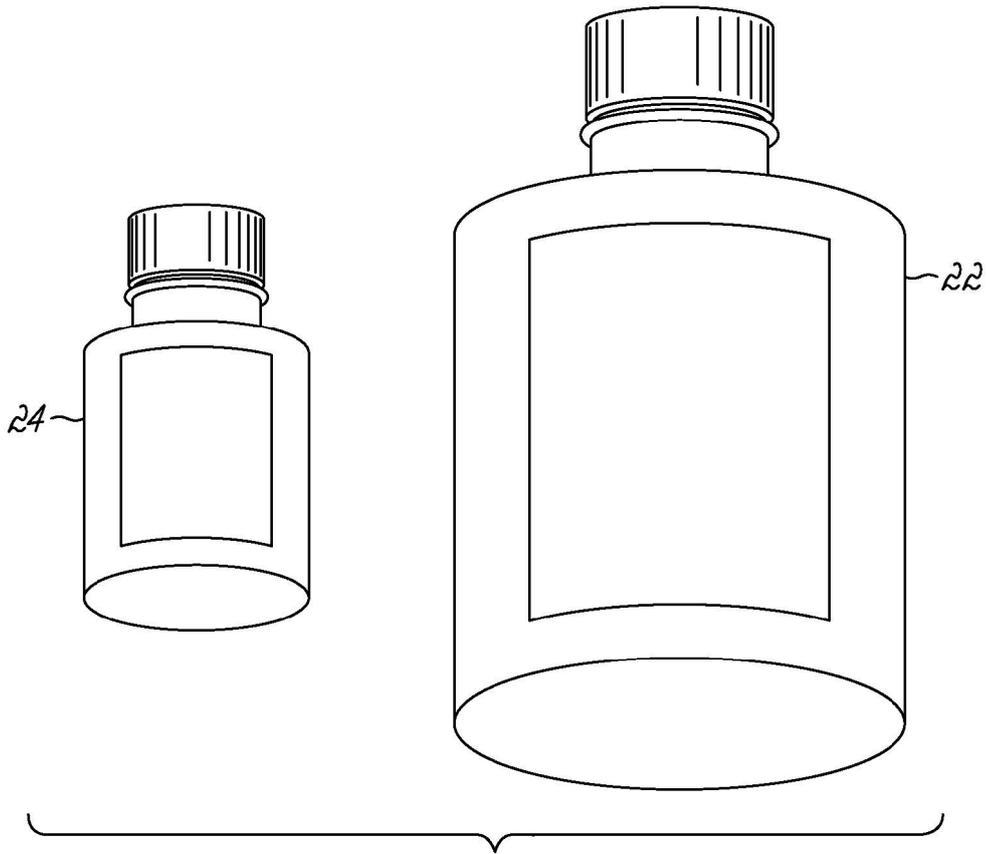


FIG. 2

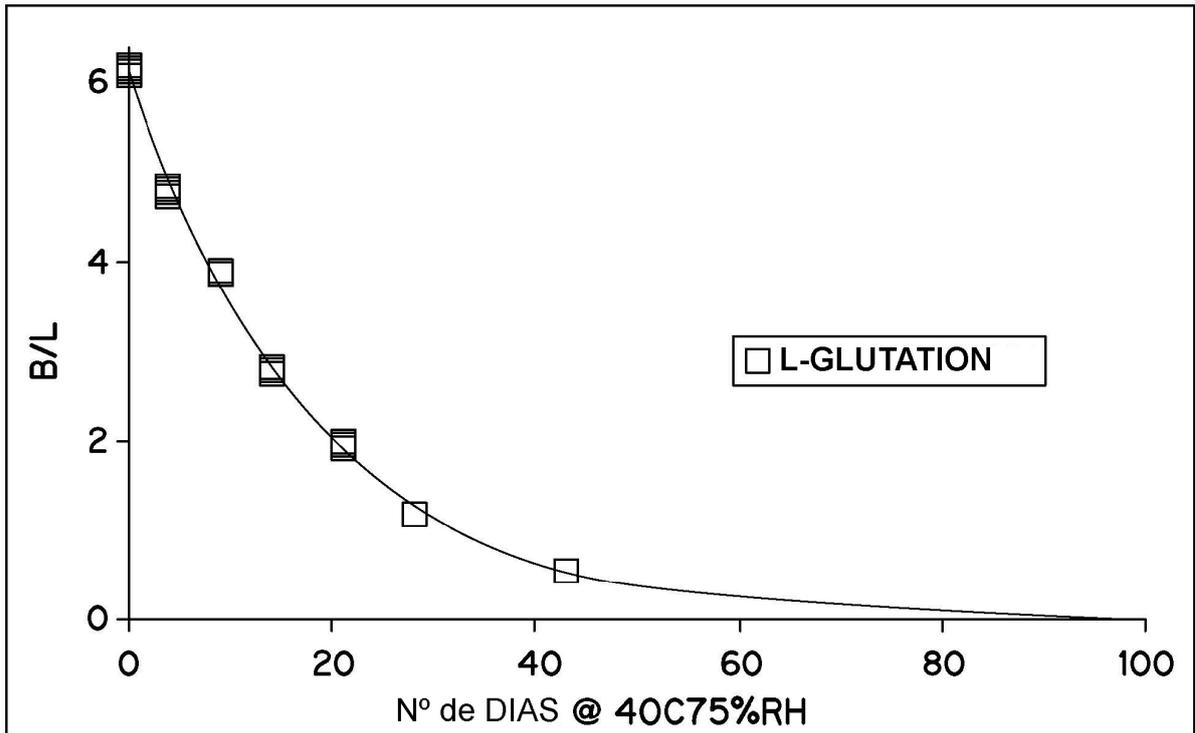


FIG. 3A

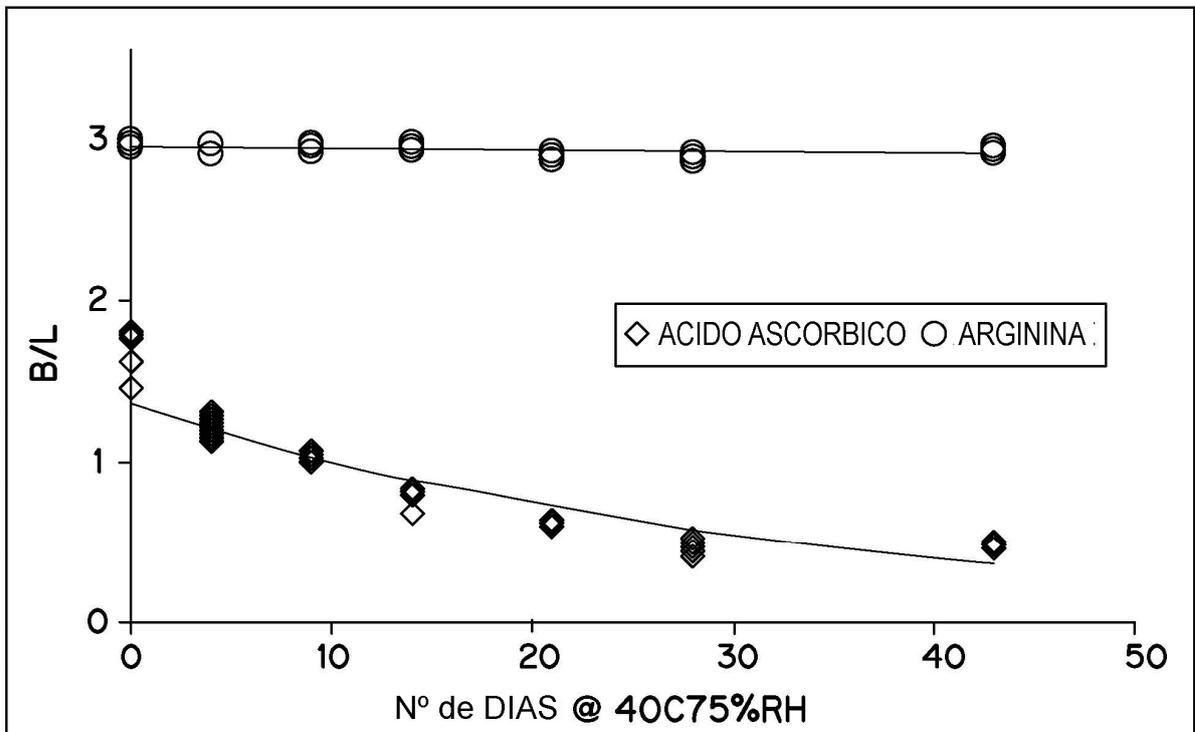


FIG. 3B

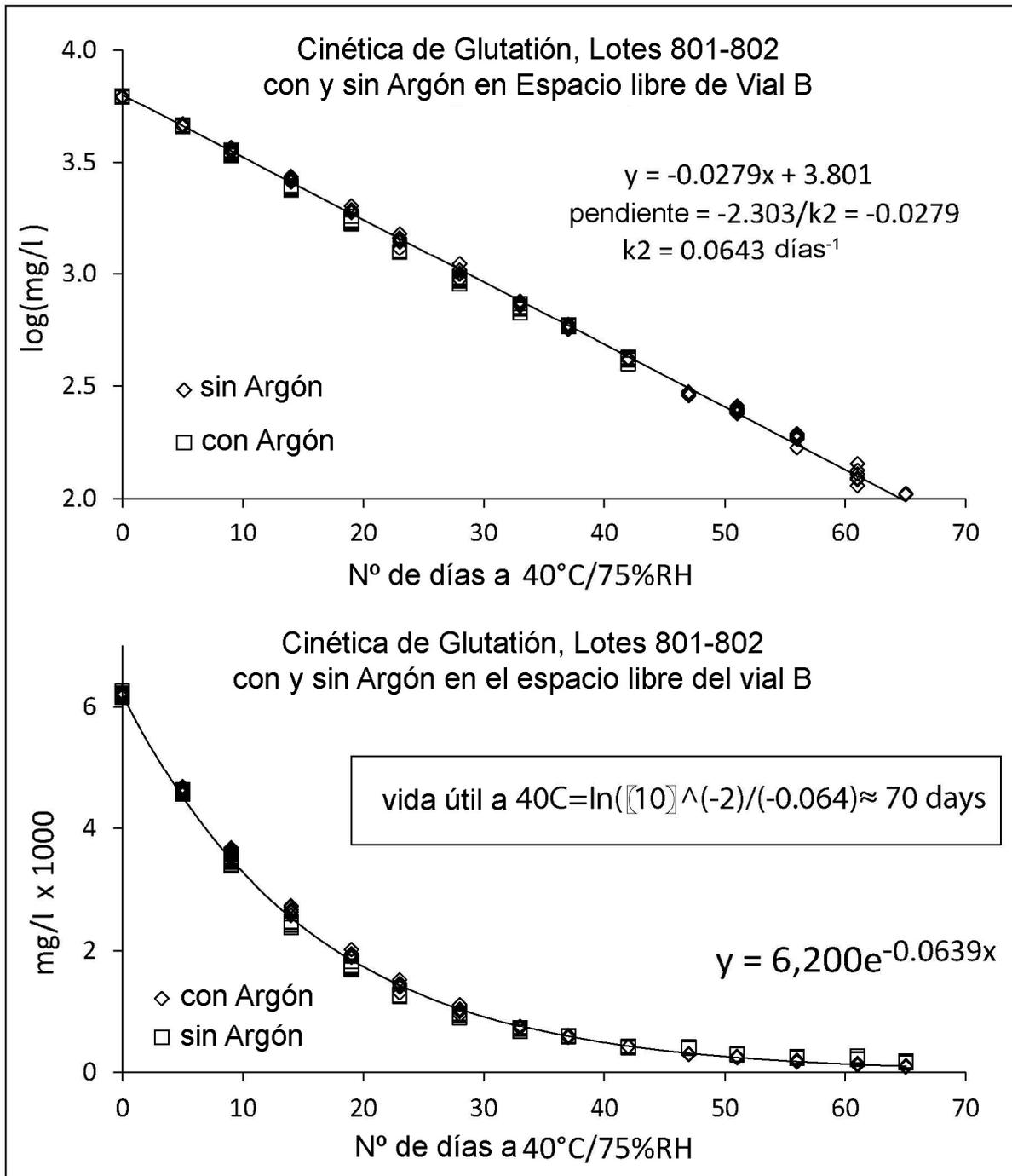


FIG. 4

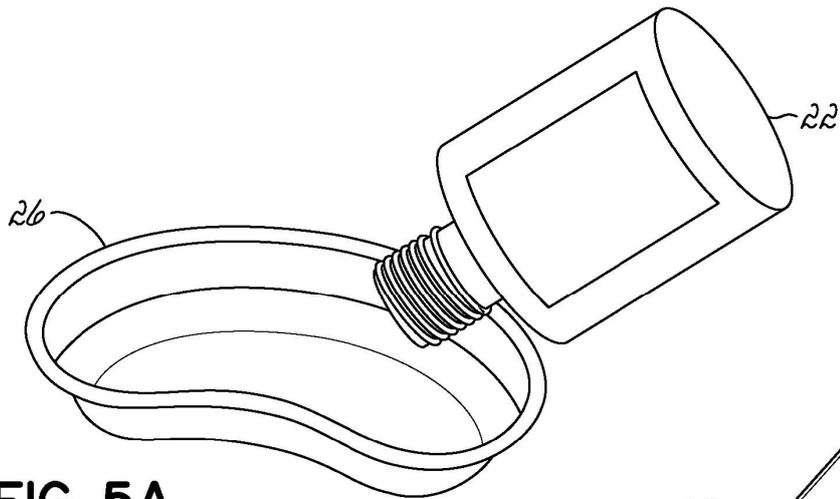


FIG. 5A

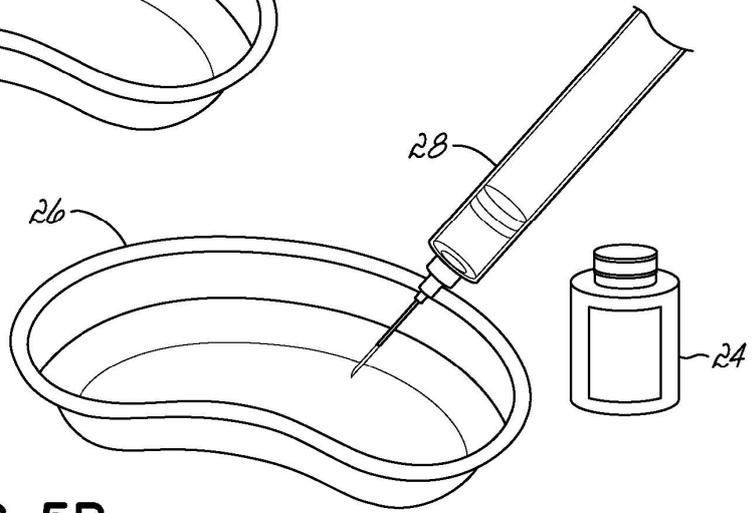


FIG. 5B

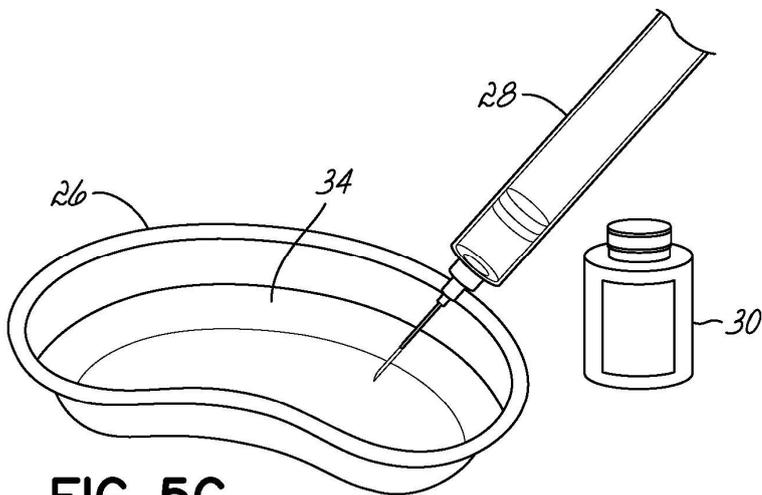


FIG. 5C

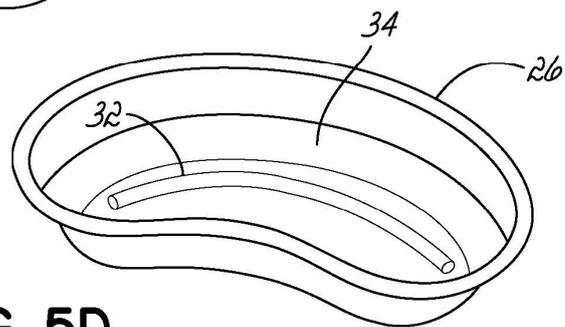


FIG. 5D